

VARIANTY NEZNÁMÉHO VÝZNAMU A INTRAGENOVÁ PŘESKUPENÍ V GENECH BRCA1 A BRCA2

VARIANTS OF UNKNOWN CLINICAL SIGNIFICANCE AND INTRAGENIC REARRANGEMENTS IN BRCA1 AND BRCA2 GENES

VAŠIČKOVÁ P.¹, MACHÁČKOVÁ E.¹, LUKEŠOVÁ M.¹, HORKÝ O.², PAVLŮ H.¹, KUKLOVÁ J.¹, URBÁNKOVÁ V.¹, FOLTÁNKOVÁ V.¹, NAVRÁTILOVÁ M.¹, FORETOVÁ L.¹

¹ ODDĚLENÍ EPIDEMIOLOGIE A GENETIKY NÁDORŮ, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

² CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENOVÉ TERAPIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE, BRNO

Souhrn

V klinické praxi lze využít jako výstup molekulárně genetického testování pouze prokazatelně patogenní - onemocnění způsobující - mutace. Podhodnocení množství celkově zjištěných patogenních mutací nalezených v rámci mutačního screeningu genů BRCA1 a BRCA2 může být způsobeno existencí obtížně interpretovatelných sekvenčních variant. Ze skupiny 25 sledovaných variant neznámého významu nalezených v rámci screeningu u probandů z vysoce rizikových rodin s dědičným výskytem nádoru prsu a/nebo ovaria bylo po následných analýzách určeno šest patogenních splice site mutací a čtyři polymorfnní varianty bez vlivu na nádorovou predispozici. Odlišení patogenních mutací od neškodných polymorfnních variant má velký praktický význam pro genetické poradenství. Další příčinou podhodnocení záchytu mutace u vysoce rizikových rodin může být přítomnost velkých intragenových přeskupení nedetekovaných screeningovými testy vycházejícími z PCR reakce. Proto byla u 152 nepřibuzných pacientek diagnostikovaných s dědičnou formou nádoru prsu a/nebo ovaria, které byly negativní po kompletním screeningu kódujících sekvencí BRCA1 a BRCA2 genů, provedena MLPA analýza. Bylo identifikováno 6 různých typů rozsáhlých intragenových delecí v BRCA1 genu celkem u 9 vysoce rizikových rodin. Pomocí MLPA se celkové množství nalezených BRCA1 mutací zvýšilo o dalších téměř 8%.

Klíčová slova: BRCA1, BRCA2, varianty neznámého významu, sestřihové mutace, MLPA, intragenové přestavby

Abstract

In clinical practice only true pathogenic - disease causing - mutations can be used as an output of molecular genetic testing. Underestimating of total number of pathogenic mutations detected during BRCA1 and BRCA2 genes mutation screening might be due to existence of sequence variants of unknown significance. The group of 25 unknown variants found in probands from high-risk families with hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome was examined. After consequent analysis six pathogenic splice site mutations and four polymorphic variants without an effect on cancer predisposition were determined. Differentiating of pathogenic mutations from common benign polymorphisms is very important for genetic counseling. The presence of large intragenic rearrangements commonly overlooked by PCR-based screening techniques is supposed to be another reason for lower prevalence of pathogenic mutations in high-risk families. MLPA analysis was performed in 152 unrelated patients with hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome which were negative after complete screening of coding regions of BRCA1/2 genes. Six different large intragenic deletions in BRCA1 gene were identified in nine of high-risk families. Using MLPA the total number of detected BRCA1 mutations were increased about 8%.

Key words: BRCA1, BRCA2, variants of unknown significance, splice site mutations, MLPA, intragenic rearrangements

Úvod

V laboratoři epidemiologie a genetiky nádorů Masarykova onkologického ústavu v Brně je prováděna molekulárně genetická analýza kompletní kódující sekvence a míst sestřihu BRCA1 a BRCA2 genů u rizikových pacientek (viz. výběrová kritéria - 1). Přibližně u 35% vysoce rizikových rodin s dědičným výskytem nádoru prsu a/nebo ovaria bývá standardním screeninem zachycena patogenní mutace. U dalších zhruba 10% rodin jsou nalézány obtížně klasifikovatelné vzácné varianty neznámého významu (zkráceně označovány jako UV - „unknown“ variant), u kterých nelze jednoznačně prokázat nebo vyloučit přímou souvislost s výskytem nádorového onemocnění. Většinou se jedná o nukleotidové substituce v intronech nebo substituce v kódující sekvenci vedoucí

k záměně aminokyseliny v polypeptidovém řetězci. Jako „UV“ varianty jsou klasifikovány také drobné delece/inzerce, které buď nenarušují čtecí rámec nebo jsou lokalizovány na C-terminálním konci proteinu a není jasný jejich důsledek na funkci proteinu. Za varianty neznámého významu by měly být považovány také varianty v místech sestřihu, dokud nebyl aberrantní sestřih prokázán na mRNA úrovni.

Pro posuzování vlivu UV variant na vznik nádorového onemocnění lze použít různé metody. Ideální metodou by byl **funkční test**, který ovšem není v případě BRCA1 a BRCA2 genu dostupný. **Segregační analýza** sleduje kosegregaci onemocnění spolu se sekvenční variantou v dané rodině. K jejímu provedení je však potřeba větší počet spolupracujících příbuzných z alespoň 2 generací a ve věku s předpokládaným pro-

jevem onemocnění. V případě komplexního onemocnění s neúplnou penetrancí a navíc s projevem silně ovlivněným pohlavím jedince je interpretace segreganční analýzy často velmi problematická. K orientačnímu posouzení možné patogenity lze použít **srovnání četnosti výskytu** varianty v selektované a kontrolní skupině (2).

Dá se usuzovat, že pokud je četnost dané sekvenční varianty ve skupině pacientek s předpokládanou genetickou predispozicí podobná její četnosti v onemocněním nezatížené skupině, je velmi nepravděpodobné, že by varianta mohla mít výraznější vliv na vznik onemocnění.

Patogenní mutace v BRCA1 nebo BRCA2 genu je nejčastější monogenně podmíněnou příčinou u dědičné formy nádoru prsu a/nebo ovaria. Záchyt patogenních mutací v genech BRCA1 a BRCA2 u vysoce rizikových probandů závisí také na zvolených postupech molekulárně genetického vyšetření. Jednou z příčin podhodnocení záchytu u vysoce rizikových rodin může být přítomnost intragenového přeskupení, které nelze detekovat v rámci standardního screeningu založeného na PCR metodách. Zvýšená náchylnost k rozsáhlým intragenovým rekombinacím je v případě genu BRCA1 způsobena vysokou četností Alu-repeditivních sekvencí v jeho intronických oblastech (3) a také přítomností duplikace oblasti na 5' konci BRCA1 genu obsahující BRCA1 pseudogen (4).

Podle údajů z literatury se množství nalezených genových přestaveb v BRCA1 genu v různých populacích liší, pohybuje se nejčastěji v rozmezí 5-15% (5), v holandské populaci však tvoří až 36% z celkového počtu mutací v BRCA1 genu (6). O spektru a frekvenci intragenových přeskupení v BRCA1 genu u pacientů s dědičnou formou karcinomu prsu a/nebo ovaria v české populaci není doposud nic známo. Proto byla v laboratoři epidemiologie a genetiky nádorů MOU zavedena metoda MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), která umožňuje stanovení počtu kopií všech BRCA1 exonů současně v jedné reakci (7). Podstatou MLPA je hybridizace speciálně navržených sond specifických pro jednotlivé BRCA1 exony s genomovou DNA, jejich ligace a následná multiplex PCR reakce s využitím pouze jednoho páru primerů. Pouze sousední zligované sondy, které hybridizovaly s genomovou DNA, mohou být následně amplifikovány. Relativní plocha píků jednotlivých amplifikačních produktů je srovnána s relativní plochou píků kontrolních sond a odpovídá relativnímu počtu kopií cílové sekvence.

Metody

Vyšetřovaná skupina a standardní mutační screening

Molekulárně genetické testování bylo prováděno na základě genetické konzultace a podepsaného informovaného souhlasu u rodin, jejichž členové splňovali alespoň jedno z výběrových kritérií I. – V (1). Standardní mutační screening kódujících oblastí a míst sestřihu genů BRCA1 a BRCA2 byl prováděn pomocí „protein truncation testu“ (PTT) a heteroduplexní analýzy (HA), detekované fragmenty s aberantní mobilitou byly sekvenovány (1).

Kontrolní skupina

Kontrolní skupina byla vytvořena ze 73 nepříbuzných, zdravých žen starších 60-ti let, bez výskytu nádorového onemocnění v rodinné anamnéze. Výskyt sledovaných variant v kontrolní skupině byl detekován pomocí heteroduplexní analýzy a následného sekvenování fragmentů s aberantní mobilitou. **Segregační analýza**

V této studii je zahrnuto 11 rizikových rodin s přítomností sekvenční varianty, kde bylo k dispozici několik (2-6) spolupracujících příbuzných, případně kde byl k vyšetření dostupný dostupný archivní patologický materiál: tkáňové parafinové bloky.

cDNA analýza

cDNA analýza předpokládaných sestřihových variant byla provedena ve spolupráci s Centrem lékařské genetiky Univerzity nemocnice v Gentu v Belgii (metodika viz. 8).

MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

Pro detekci intragenových přestaveb BRCA1 genu byl použit SALSA P002 BRCA1 MLPA kit (MRC-Holland, www.mlpa.com). Fragmentační analýza byla prováděna souběžně na gelovém sekvenátoru ALF express II (Pharmacia) a na sekvenátoru ABI310 ve spolupráci s Centrem molekulární biologie a genové terapie v dětské nemocnici v Brně.

„Long-range“ PCR

Pozitivní výsledky MLPA byly potvrzovány pomocí kitu Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science).

Výsledky

Varianty neznámého významu

V této práci jsou prezentovány předběžné výsledky analýzy 25 různých variant neznámého významu: 10 variant v BRCA1 genu a 15 variant v BRCA2 genu.

Výsledky segreganční analýzy a detekované alelické frekvence 18 sledovaných variant nejasného významu ve skupině vysoce rizikových nepříbuzných pacientek s dědičným výskytem nádoru prsu a/nebo ovaria (kritérium I.+II.) bez záchytu patogenní mutace v BRCA1 nebo BRCA2 genu a v kontrolní skupině jsou uvedeny v Tab.1. U osmi ze kontrolní skupiny bylo detekováno pět různých sledovaných variant (BRCA1: c.4654G>T, c.5075G>A, c.5396+48_5396+59dup12, BRCA2: c.9485-16T>C, c.10323delCins11). BRCA1 varianta c.5075G>A se v kontrolní skupině vyskytovala s alelovou četností 2,74%, která je srovnatelná s alelovou četností zjištěnou ve skupině vysoce rizikových žen (viz. Tab. 1.), což naznačuje, že se jedná pravděpodobně o vzácnou polymorfni variantu bez vztahu k nádorové predispozici.

Segregační analýzu bylo možné provést u 11 vysoce rizikových rodin (viz. Tab.1). Vzhledem k tomu, že byl sledován projev nádorového onemocnění v dospělosti s předpokladem neúplné penetrance (cca 80% u žen a cca 10% u mužů), bylo možné využít segreganční analýzu spíše k vyloučení patogenity sledované varianty.

Na základě segreganční analýzy a zachycených alelických frekvencí byly **BRCA1 varianty: c.5075G>A; c.5396+48_5396+59dup12** a **BRCA2 varianty: c.10323delCins11** zařazeny mezi **vzácné polymorfni varianty bez výrazného vlivu na predispozici k nádorovému onemocnění**.

V případě lokalizace „UV“ variant v konzervovaných oblastech míst sestřihu, případně kde byl předpoklad ovlivnění správného sestřihu mRNA dle prediktivního softwarového programu pro vyhledávání pravděpodobného místa sestřihu (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), byla provedena cDNA analýza. Aberantní sestřih, jehož důsledkem bylo narušení čtecího rámce a předčasná terminace transkripcí proteinu, byl prokázán celkem u šesti variant (Tab.1.): **BRCA1: c.4304G>A; BRCA2: c.703G>A, c.704-2A>G, c.7235G>A, c.8983-1G>A a c.9346-2A>G**. Tyto sestřihové varianty jsou již nyní posuzovány jako **patogenní mutace, způsobující nádorovou predispozici**. Varianta **c.9485-16T>C v BRCA2** genu vykazovala pouze normální sestřih a byla zachycena také v kontrolní skupině (Tab.1.), což svědčí spíše o skutečnosti, že tato varianta **nemá vliv na predispozici k nádorovému onemocnění**.

Poněkud komplikovaný výsledek byl získán cDNA analýzou varianty **c.4794+1G>A v BRCA1** genu, kde byl kromě aberantního sestřihu zachován v malém množství také transkript normální.

Intragenová přeskupení BRCA1 genu

Pro MLPA testování byly vybrány pacientky/pacienti z vysoce rizikových rodin (kritérium I.), u kterých nebyla nalezena patogenní mutace v BRCA1 a BRCA2 genech v rámci standardního screeningu. Doposud bylo otestováno 152 nepříbuzných pacientů, z toho u 9 z nich byly zachyceny intragenové přestavby (Obr.1. - výsledky MLPA). Jednalo se o následující delece v BRCA1 genu:

- v jednom případě

delece exonů 1A+1B+2
delece části exonu 11+exonu 12
delece exonů 18+19
delece exonu 20
delece exonů 21+22
delece exonů 5-14

- ve dvou případech

- ve třech případech

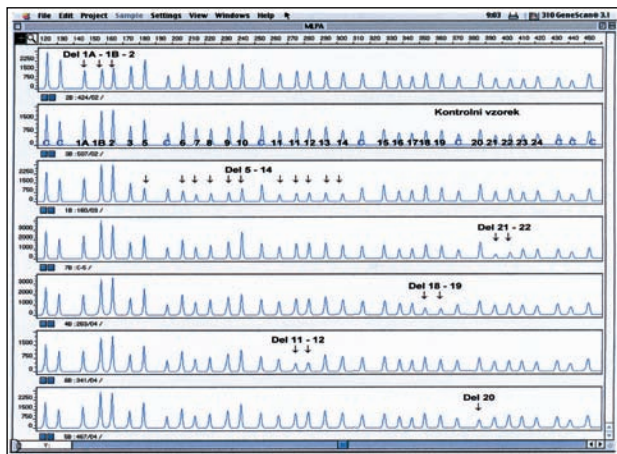
ných mutací v BRCA1 genu. Výsledky byly v současné době ověřeny metodou „Long-range“ PCR a jsou charakterizovány na úrovni genomové DNA. Teprve po charakterizaci delecí na úrovni DNA nebo případně mRNA a po posouzení jejich vlivu na funkci BRCA1 proteinu lze nabídnout testování příbuzným členům postižených rodin (Obr.2. - příklad rodiny s detekovanou delecí v BRCA1 genu) .

Tyto delece tvoří 5,8% původně BRCA1+2 negativních případů, což je v přepočtu téměř 8% ze všech nalezených

Tab.1. Varianty neznámého významu v genech BRCA1 a BRCA2 detekované u vysoce rizikových probandů s dědičným syndromem nádoru prsu a/nebo ovaria.

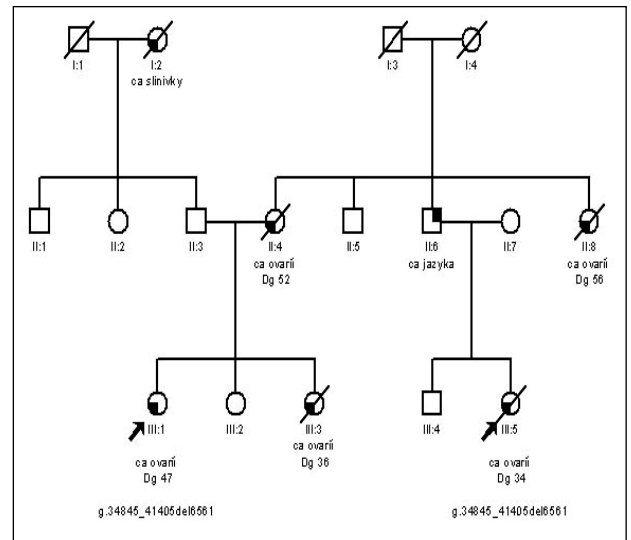
	Exon	BIC nomenklatura	Protein	Zařazovací kritéria	Alelická frekvence (množství alel)		Segregace s onemocněním: ano / ne (počet rodin)	Průkaz aberantního sestřihu mRNA (cDNA analýza)
					Pacienti (300)	Kontroly (73)		
BRCA1	2	c.172T>A	p.M18K	I, II	0,50 (3)	0	ano (2)	
	12	c.4304G>A, splice site	p.Q1395Q	I	0,17 (1)	0		Ano; předčasná terminace translace
	15	c.4654G>T	p.S1512I	II	0,50 (3)	0,69 (1)		
	15	c.4755G>A	p.D1546N	I	0,17 (1)	0		
	IVS15	c.4794+1G>A	intron	Dg.42	-	-		Ano + zachováno malé množství normálního sestřihu !!!
	16	c.4931A>G	p.Q1604Q	II	0,17 (1)	0		
	16	c.4991G>A	p.G1624G	I	0,17 (1)	0		
	16	c.5075G>A, polymorfismus	p.M1652I	I, II	2,50 (15)	2,74 (4)	ano (3), ne (1)	
	IVS20	c.5396+48_5396+59dup12, polymorfismus	intron	I, II	0,67 (4)	0,69 (1)	ne (2)	
IVS20	c.5396+78G>A	intron	I	0,33 (2)	0			
BRCA2	5	c.703G>A, splice site	p.V159M	I	0,17 (1)	0		Ano; předčasná terminace translace
	IVS5	704-2A>G, splice site	intron	II	0,17 (1)	-		Ano; předčasná terminace translace
	10	c.1206C>A	p.S326R	II	0,33 (2)	0		
	13	c.7235G>A, splice site	p.R2281H	I	0,17 (1)	-		Ano; předčasná terminace translace
	15	c.7772C>T	p.T2515I	I	0,17 (1)	0		
	18	c.8225G>C	p.R2666T	II	0,17 (1)	0		
	18	c.8377G>T	p.A2717S	I	0,17 (1)	0		
	21	c.8951T>G	p.V2908G	II	0,17 (1)	0		
	IVS21	c.8983-1G>A, splice site	intron	II	0,17 (1)	-		Ano; předčasná terminace translace
	IVS23	c.9346-2A>G, splice site	intron	I	0,17 (1)	-		Ano; předčasná terminace translace
	IVS24	c.9485-16T>C, polymorfismus	intron	I	0,33 (2)	0,69 (1)		Ne; pouze normální transkript
	IVS24	c.9485-75G>C	intron	I, II	0,50 (3)	0		
	25	c.9599A>T	p.N3124I	I	0,83 (5)	0	ne (1)	
	27	c.10323delCins11, polymorfismus	stop 3370	I, II	0,50 (3)	0,69 (1)	ano (1), ne (1)	
	27	c.10462A>G	p.L3412V	II	0,17 (1)	0		

Obr. 1. Detekce delecí exonů BRCA1 genu metodou MLPA - výsledky kapilární elektroforózy provedené na přístroji ABI310 (Applied Biosystems).



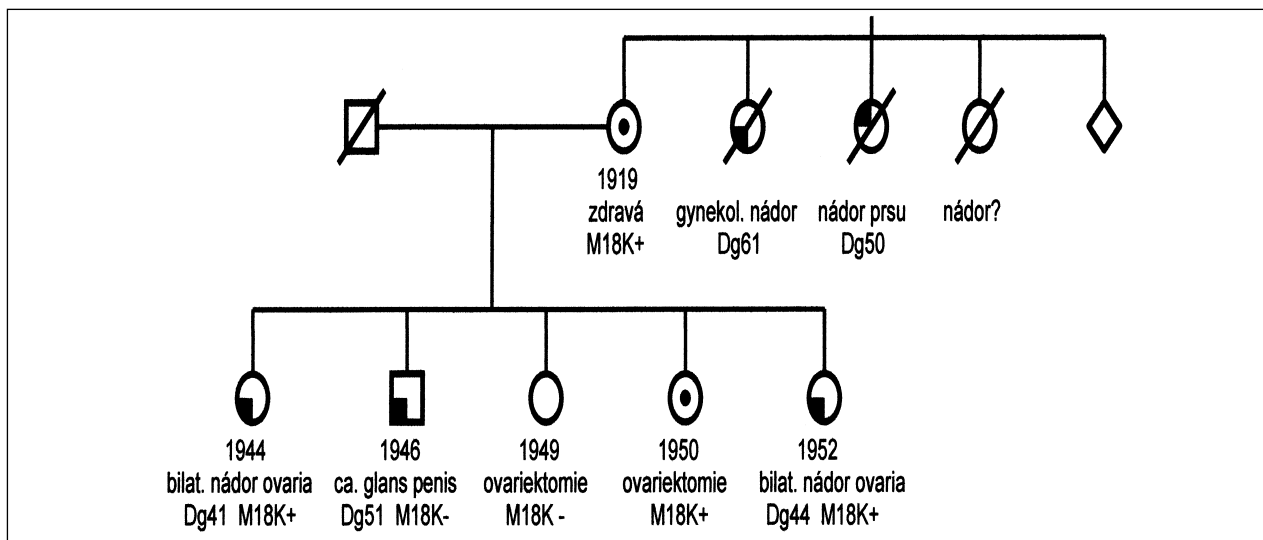
BRCA1 P002 MLPA kit obsahuje 34 sond: 9 kontrolních sond rozeznávajících sekvence různých chromozomů (označeny „C“) a BRCA1 specifické sondy (exony BRCA1 rozeznávané specifickými sondami jsou označeny čísly; dva alternativní exony 1... 1A, 1B; exon 4 není přítomen u normálního BRCA1 transkriptu; s ohledem na velikost exonu 11 zařazeny dvě sondy pro exon 11).

Obr. 2. Výsledky MLPA v rodině s častým výskytem karcinomu ovarii.



Metodou MLPA byla u dvou sestřenic s karcinomem ovarii nalezena delece části exonu 11 a exonu 12 v BRCA1 genu. „Long-range“ PCR a následné sekvenování potvrdilo delecí 6561 bází v pozici 34845 - 41405 genomové DNA (referenční sekvence L78833).

Obr. 3. Příklad segreganční analýzy u rodiny cz-026: sledovaná varianta c.172T>A / p.M18K.



Diskuse

Varianty neznámého významu

Varianta **c.172T>A** (p.M18K) v BRCA1 genu vykazuje pozitivní segregaci ve dvou rodinách (Obr.3. - příklad provedené segreganční analýzy) a nebyla nalezena v kontrolní populaci. Vede k záměně nepolárního metioninu za polární lysin ve vysoce konzervativní oblasti domény zinkového prstu BRCA1 proteinu. Důsledkem může být změna terciální struktury proteinu a možná porucha jeho funkce, mutace je tedy pravděpodobně patogenní (9). V klinické praxi je však použití výsledků strukturálního modelování jako důkazu poněkud sporné.

Varianta **c.5075G>A** (M1652I) v BRCA1 genu byla na základě alelových frekvencí a segreganční analýzy vyhodnocena jako polymorfismus, což je v souladu s výsledky jiných prací (10, 11). Také mezidruhové srovnání ukázalo, že varianta M1652I představuje wild-type variantu u jiných druhů a byla nalezena společně s patogenní mutací (12, 13).

Za polymorfismus lze nejspíš považovat také variantu **c.9485-16T>C** v BRCA2 genu. Při cDNA analýze nebyl prokázán žádný efekt této varianty na úrovni mRNA (8) a zároveň byla nalezena u sledované kontrolní skupiny. Také ve španělské populaci byla c.9485-16T>C varianta publikována jako s onemocněním nesegregující polymorfismus (11).

Varianty **c.5396+48_5396+59dup12** v BRCA1 genu, **c.10323delCins11** a **c.9599A>T** v BRCA2 genu se jeví na základě segreganční analýzy spíše jako polymorfismy. BRCA1 varianta **c.5396+48_5396+59dup12** byla také popisována v jiných populacích jako polymorfismus detekovaný u zdravých kontrol (11, 14). BRCA2 varianta **c.10323delCins11** vyvolá posun čtecího rámce a následný vznik stop kodonu v pozici 3370, což je až za jadernou lokalizační sekvencí BRCA2 proteinu. Lze tedy předpokládat, že vliv na funkci proteinu je minimální, protože způsobuje ztrátu kratší části proteinu než v literatuře popsána nepatogenní varianta K3326X (15). Varianta **c.10323delCins11** byla publikována také v souvislosti s jinými nádory a rovněž byla klasifikována jako polymorfismus bez vlivu na nádorovou predispozici (16, 17).

Varianty s prokázaným aberantním sestřím na mRNA úrovni: **BRCA1: c.4304G>A; BRCA2: c.703G>A, c.704-2A>G, c.7235G>A, c.8983-1G>A a c.9346-2A>G** lze označit za patogenní, onemocnění způsobující mutace, protože byl prokázán aberantní sestřih s důsledkem předčasné terminace translace a narušení funkce proteinu. Prediktivní testování přítomnosti těchto mutací již lze nabídnout příbuzným postižených pacientů.

Poněkud komplikovaný výsledek byl získán cDNA analýzou varianty **c.4794+1G>A** v BRCA1 genu, kde byl kromě abe-

rantního sestřihu zachován v malém množství také transkript normální. Patogenita c.4794+1G>A varianty tedy stále není zcela prokázána a bude potřeba provést následně pomocné analýzy jako u jiných neklasifikovaných variant.

Intragenová přeskupení BRCA1 genu

Delece či duplikace částí genu je častou příčinou mnoha onemocnění. Proto je metoda MLPA pro svou jednoduchost a rychlou dostupnost výsledků v současné době často používána ke stanovení relativního počtu kopií exonů v různých genech: BRCA1/2 (rakovina prsu a vaječníků), MLH1 a MSH2 (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom), DMD (Duchenneova muskulární dystrofie) a jiných. Zavedení metody na pracovišti MOU umožnilo detekci sekvenční alterace v BRCA1 genu u dalších téměř 6% rizikových případů.

Množství intragenových přeskupení v BRCA1 genu detekovaných v české populaci odpovídá výsledkům získaným v Německu (18), Francii (19) a Anglii (20). Podíl intragenových přeskupení v Holandsku a v Itálii je podle výsledků studií vyšší, intragenové delece a duplikace zde tvoří čtvrtinu až třetinu BRCA1 mutací (6, 21, 22). Je nepravděpodobné, že by rozdíly v množství detekovaných přestaveb byly způsobeny metodologickými odlišnostmi, protože uvedené studie využívaly stejného komerčního MLPA kitu. Příčinou bude pravděpodobně rozdílný genetický základ studovaných populací a přítomnost tzv. „founder“ mutací, které v určitých populacích tvoří většinu detekovaných přestaveb (6).

Některé typy delecí exonů BRCA1 genu zmiňovaných v této práci byly v literatuře popsány. Jedná se o delece exonů 1A-1B-2 (4, 22, 23, 24), delecí exonů 18-19 a delecí exonu 20 (22, 25). Po přesné charakterizaci detekovaných delecí a bodů zlomu bude možné říci, zda jsou delece nalezené v české populaci odlišné od delecí popsanych v jiných populacích.

Závěr

V rámci molekulárně genetického testování lze v klinické praxi využít pouze prokazatelně patogenní - onemocnění způsobující - mutace, odlišení patogenních mutací od neškodných polymorfních variant má tedy velký praktický význam pro genetické poradenství, stejně jako zavádění nových, přesnějších metod detekce sekvenčních variant a přeskupení.

Práce podpořena granty MZČR MZO 00209805 a IGA MZČR NR/8213-3.

Poděkování K. Claes z Centra pro lékařskou genetiku při Univerzitní nemocnici v Gentu za spolupráci při cDNA analýze.

Literatura

1. Lukešová M, Macháčková E, Vašíčková P, et al. Výsledky testování BRCA1 a BRCA2 genů u rizikových pacientek v molekulárně genetické laboratoři Masarykova onkologického ústavu. *Klinická onkologie, Supplement* 2006, str. 55.
2. Cotton RGH, Scriver CR. Proof of „disease causing“ mutation. *Hum. Mutat.* 1998, 12: 1 - 3.
3. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res.* 1996, 6: 1029 - 1049.
4. Puget N, Gad S, Perrin - Vidoz L, et al. Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 70: 858 - 865.
5. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, et al. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 67: 841 - 850.
6. Petrij Bosch A, Peelen T, van Vliet M, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat. Genet.* 1997, 17: 341 - 345.
7. Schouten JP, McElgunn CJ, Cathal J, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30: e57.
8. Claes K, Poppe B, Machackova E, et al. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Gen. Chromos. Cancer* 2003, 27: 314 - 320.
9. Machackova E, Damborsky J, Valik D, Foretova L. Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and breast/ovarian cancer families from the Czech Republic. *Hum. Mutat.* 2001, 18:545 - 549.
10. Deffenbaugh AM, Frank TS, Hoffman M, et al. Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet. Test.* 2002, 6 (2): 119 - 121.
11. Díez O, Osorio A, Duran M, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: A high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum. Mutat.* 2003, 22: 301 - 312.
12. Southey MC, Tesoriero AA, Anderesen CR, et al. BRCA1 mutations and other sequence variants in a population-based sample of Australian women with breast cancer. *Br. J. Cancer* 1999, 79: 34 - 39.
13. Arnold N, Peper H, Bandick K, et al. Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2002, 782: 99 - 104.
14. Kozłowski P, Sobczak K, Jasinska A, et al. Allelic imbalance of BRCA1 transcript in the IVS20 12-bp insertion carrier. *Hum. Mutat.* 2000, 16: 371.
15. Mazoyer S, Dubbing AM, Serova O, et al. A polymorphic stop kodon in BRCA2. *Nat. Genet.* 1996, 14:253 - 254.
16. Similnikova OM, Egan KM, Quinn JL, et al. Germline BRCA2 sequence variants in patients with ocular melanoma. *Int. J. Cancer* 1999, 82 (3): 325 - 328.
17. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95: 214 - 221.
18. Hartmann C, John AL, Klaes R, et al. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum. Mutat.* 2004, 24 (6): 534.
19. Gad S, Caus-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, et al. Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. *Oncogene* 2002, 21: 6841 - 6847.
20. Bunyan DJ, Eccless DM, Sillibourne J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br. J. Cancer* 2004, 91: 1155 - 1159.
21. Hogervorst FBL, Nederlof PM, Gille JJP, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative Method. *Cancer Res.* 2003, 63: 1449 - 1453.
22. Montagna M, Dalla Palma M, Menin C, et al. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum. Mol. Genet.* 2003, 12 (9): 1055 - 1061.
23. Swensen J, Hoffman M, Skolnick MH, Neuhausen SL. Identification of a 14kb deletion involving the promoter region of BRCA1 in a breast cancer family. *Hum. Mol. Genet.* 1997, 6 (9): 1513 - 1517.
24. Brown M, Lo L-J, Cateau A, et al. Germline BRCA1 promoter deletions in UK and Australian familial breast cancer patients: identification of a novel deletion consistent with BRCA1:BRCA1 recombination. *Hum. Mutat.* 2002, 19: 435 - 442.
25. Belogianni I, Apeessos A, Mihalatos M, et al. Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. *BMC Cancer* 2004, 4: 61.