Strategie molecolari nelle neoplasie della mammella

M.B. Di Sciascio[a], E. Ricevuto[b], S. Martinotti[a]

[a]*Laboratorio di Patologia Clinica 2, P.O. "S.S. Annunziata", Chieti*
[b]*Divisione di Oncologia Medica, Università degli Studi, Aquila*

Le scoperte degli ultimi 25 anni hanno aperto nuove frontiere nella ricerca sul cancro basate sull'identificazione e comprensione dei processi cellulari di base che vengono alterati durante lo sviluppo tumorale. Storicamente sono stati impiegati modelli empirici per spiegare le cause del cancro, tra questi le anormalità cromosomiche somatiche, i virus, gli agenti ambientali, i carcinogeni chimici e la predisposizione famigliare. Negli anni più recenti tutto ciò si è convertito in un paradigma genetico: "il cancro è il risultato di una selezione e di un accumulo di mutazioni nei geni che determinano il fenotipo tumorale". Queste mutazioni attivano o disregolano i geni che sono coinvolti nella regolazione della crescita, della senescenza e della morte cellulare, provocano una crescita selettiva e favoriscono la sopravvivenza delle cellule tumorali, le quali derivano tutte da un singolo progenitore cellulare. Tutti i tumori sono d'origine genetica, nel senso che la forza portante dello sviluppo tumorale è la mutazione genetica, ma soltanto alcuni sono ereditari.

Ogni individuo nasce con due copie di ciascun gene, una ereditata dal padre l'altra dalla madre. I soggetti con una mutazione costitutiva (per es. a livello dei geni BRCA1 o BRCA2) nascono con un gene mutato e, se durante la vita si ha un danno dell'altro gene, si può sviluppare il tumore. La maggior parte dei tumori si sviluppa attraverso l'accumulo di mutazioni random "tumore sporadico" che si sviluppano, durante la vita di un individuo, nelle cellule dei tessuti corporei (come polmone, mammella, prostata, etc.) che sono esclusivamente di origine somatica, queste mutazioni possono verificarsi come un errore durante la divisione cellulare o in risposta ad un insulto ambientale. Le mutazioni somatiche non vengono ereditate dalla progenie. La mutazione germinale è invece presente sin dal concepimento e si ritrova in tutte le cellule dell'organismo. Siccome le mutazioni germinali si trovano anche sulle cellule riproduttive, queste sono trasmissibili di generazione in generazione. Solo una piccola percentuale di tumori è ereditaria. I tumori ereditari si sviluppano in età molto più precoce dei tumori sporadici, perché gli individui geneticamente suscettibili sono nati con una mutazione germinale e necessitano di acquisire solo una mutazione sporadica per sviluppare il tumore. Quello che si eredita non è il tumore ma la predisposizione ad esso.

Il tumore della mammella è uno tra i più frequenti (negli USA una donna su otto è colpita entro gli 85 anni). Il 75-85% dei casi di tumore al seno sono sporadici, il 10-15% sono familiari (cioè associati ad una storia familiare positiva per cancro al seno), solo il 5-10% sono ereditari HBC (hereditary breast cancer), con una trasmissione autosomica dominante. La maggior parte degli HBC sono associati con una mutazione BRCA1 e BRCA2, a questi si aggiungono 4 altre rare sindromi (a cui afferiscono meno dell'1% degli HBC) come la Sdr Li-Fraumeni, legata alla mutazione germline del gene TP53, la Sdr Peutz-Jeghers, associata con il gene LKB1/STK11, la Sdr di Cowden associata al gene PTEN e la HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome) associata ai geni MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 e PMS1.

Il gene BRCA1 è composto da 22 esoni codificanti distribuiti su 100 Kb di DNA genomico sul cromosoma 17q21 ed appartiene alla famiglia dei tumor suppressor gene. Il gene BRCA2 è composto di 26 esoni codificanti distribuiti su 70 Kb di DNA genomico sul cromosoma 13q. Le proteine BRCA sembrano funzionare sia come *"gatekeepers"* controllando la trascrizione genica e la crescita/differenziazione cellulare che come *"care takers"* coinvolte nel processo di riparazione del DNA. Fino ad oggi sono state identificate più di 200 mutazioni in BRCA1 e BRCA2 e nuove mutazioni vengono riportate giornalmente. E' stato dimostrato che solo poche mutazioni ricorrono in più famiglie. Di grande importanza sono le tre mutazioni degli ebrei Ashkenazi, queste mutazioni sono: 185delAG e 5382insC a livello BRCA1, 6174delT al livello BRCA2. Circa una persona su 40 appartenente alla popolazione Ashkenazi è portatrice di una di queste mutazioni, circa il 90% degli ebrei americani sono Ashkenazi. L'HBC colpisce le donne giovani, con l'80% dei tumori che si manifestano prima dei 50 anni, con una distribuzione esattamente opposta a quella della popolazione generale. Le donne affette da HBC sviluppano cancro al seno controlaterale

(da 2.5% a 5% per anno per i tumori BRCA1-associati, e 1.8% per anno per i tumori BRCA2-associati) in percentuale di gran lunga maggiore che nella popolazione di donne con tumore al seno non ereditario (meno del 1% per anno). Il rischio cumulativo di cancro all'ovaio nelle donne con HBC va dal 40% dei tumori BRCA1-associati al 20% dei tumori BRCA2-associati. E' noto, inoltre, che il tumore al seno maschile (6% di rischio) è associato ad un mutazione BRCA2, la suscettibilità a sviluppare altri tumori (colon, prostata, pancreas) è maggiore nei soggetti con mutazione BRCA2 rispetto a quelli con mutazione BRCA1. Tutti i soggetti con la predisposizione ereditaria per il cancro al seno, colpiti o meno dalla malattia, richiedono una strettissima sorveglianza. Però il rischio cumulativo di sviluppare tumori della mammella sale dal 12% della popolazione generale al 85% dei sgg. portatori di mutazione BRCA1, mentre quello dell'ovaio sale dal 1-2% della popolazione generale al 40-60% nei portatori.

Per i sgg. portatori di mutazione BRCA2 invece il rischio cumulativo di sviluppare tumori della mammella sale nelle donne dal 12% della popolazione generale al 56-85% dei portatori mentre negli uomini dall'estrema rarità della popolazione al 5-10% nei sgg. portatori, quello dell'ovaio invece sale dal 1-2% della popolazione generale al 16-27% nei sgg. portatori(1-2).

E' evidente quindi come sia importante l'identificazione delle famiglie con predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio, che dipende principalmente dai seguenti fattori:

- selezione delle famiglie a rischio sulla base di criteri codificati (familiarità per neoplasie della mammella o neoplasie correlate, precoce età di insorgenza, diagnosi di molteplici neoplasie in uno stesso individuo) che si presentano variabilmente concomitanti in profili familiari variegati, a differente prevalenza e frequenza di inattivazioni genetiche predisponenti;
- identificazione dell'inattivazione genetica predisponente dei geni BRCA1 e BRCA2 mediante congrue strategie di diagnosi molecolare.

L'identificazione dell'alterazione genetica BRCA1 o BRCA2 predisponente rappresenta il primo obiettivo di un programma più ampio, articolato e complesso, che prevede successivamente: l'analisi della segregazione dell'alterazione genetica predisponente, ovvero l'accertamento diagnostico della presenza o dell'assenza della stessa alterazione predisponente nel maggior numero di soggetti sani appartenenti ad una stessa famiglia; la pianificazione di programmi di prevenzione da attuare nei soggetti affetti e non affetti portatori della predisposizione genetica.

Il panorama diagnostico-molecolare propone una prima generazione di metodiche comunemente basate su procedure operative esclusivamente manuali caratterizzate da due differenti modalità di effettuazione dell'analisi genetica su DNA o RNA (3): sequenziazione diretta; scansione molecolare (SSCP, DGGE, PTT). L'analisi di sequenza consiste in una reazione chimica alla quale è sottoposto il DNA (genomico o retro-trascritto da mRNA per effetto di reazione con trascriptasi inversa) che consente di leggere la sequenza nucleotidica del gene analizzato e riconoscere una mutazione per confronto della sequenza del DNA campione rispetto alla sequenza di controllo del gene normale. Le modalità diagnostiche di scansione molecolare si basano sul riconoscimento del campione mutato per effetto della modificazione di specifiche caratteristiche fisiche e/o chimiche dell'acido nucleico o della proteina: polimorfismo di conformazione del DNA a singolo filamento (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism); modificazioni conformazionali del DNA a doppio filamento, in particolare delle molecole di DNA-heteroduplex (catene complementari di DNA appartenenti ad alleli differenti, uno dei quali portatore della mutazione) (DGGE, Denaturant Gradient Gel Electrophoresis); modificazioni del peso molecolare della proteina tradotta in vitro (PTT, Protein Truncation Test); modificazioni di reattività chimica dei nucleotidi coinvolti nella mutazione per effetto della alterata ibridizzazione (misappaiamento o "mismatch") delle catene di DNA-heteroduplex che espone maggiormente tali nucleotidi all'azione del reagente chimico (CCM, Chemical Cleavage Mismatch). Nell'ambito delle differenti procedure di scansione molecolare, quelle basate sul CCM presentano il maggior livello di accuratezza diagnostica. L'evoluzione tecnologica degli ultimi anni ha consentito di sviluppare procedure operative semiautomatiche nelle quali le modalità di effettuazione dell'analisi genetica (per sequenziazione o per scansione) si sono potute avvalere di strumenti che hanno consentito l'automatizzazione delle fasi di risoluzione diagnostica ed analisi del risultato sperimentale: sequenziatori automatici di DNA per procedure basate sull'elettroforesi; cromatografi specializzati per separazioni di DNA-heteroduplex su colonna (DHPLC, Denaturant High Performance Liquid Cromatography); sistemi di sequenziazione genica automatizzata su micropiastre ("microchip"); spettrometri di massa (MALDI-TOF, SELDI-TOF).

L'identificazione dei geni BRCA1 e BRCA2 si è inserita in questo scenario di possibilità e di innovazioni tecnologiche della diagnosi molecolare. Il nostro gruppo di ricerca ha considerato il gene BRCA1 come un modello di gene di grandi dimensioni ed elevata complessità strutturale sul quale sviluppare una strategia diagnostico-molecolare semiautomatizzata con l'obiettivo prioritario della accuratezza diagnostica ottimale per l'applicazione clinica dell'analisi genetica e che, inoltre, potesse fornire garanzie di fattibilità su ampia scala, a costi limitati ed in tempi contenuti per completare l'analisi genetica. Il gene BRCA1, infatti, presenta le seguenti caratteri-

stiche strutturali (4): locus genomico, 81 kb; 23 esoni comprendenti l'esone 11 di grandi dimensioni (3426 nucletidi, 63% della regione codificante); regione di DNA codificante la proteina, 5592 nucleotidi; elevata densità di sequenze ripetitive nel suo contesto (41,5%). La FAMA (Fluorescence Assisted Mismatch Analysis) rappresenta una procedura di scansione molecolare semiautomatizzata del DNA (elettroforesi mediante sequenziatore automatico di DNA) che si basa sul clivaggio chimico del misappaiamento che si determina su molecole di DNA-heteroduplex per effetto della mutazione. Si distingue, rispetto al CCM, in quanto la differente marcatura fluorescente del singolo filamento di DNA consente non soltanto di riconoscere la presenza di una mutazione ma anche di localizzare la posizione lungo la sequenza del gene e distinguere la tipologia della mutazione stessa (5).

L'applicazione della FAMA al riconoscimento di mutazioni del gene BRCA1 (6) si caratterizza per due aspetti principali: 1) sviluppo di una strategia diagnostica che semplifica l'analisi mutazionale di un gene caratterizzato da numerosi esoni, di piccole e grandi dimensioni per l'applicazione di condizioni omogenee di amplificazione delle singole regioni mediante una singola procedura di scansione; 2) accuratezza diagnostica ottimale per l'applicazione routinaria in ambito clinico-preventivo dimostrata dal riconoscimento di mutazioni note dell'esone 11 di tipologie differenti (sostituzioni semplici, inserzioni, delezioni) e ricerca di mutazioni in famiglie ad alto rischio di predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio. La strategia diagnostica si caratterizza per: analisi diretta di DNA genomico, previa amplificazione doppia mediante PCR (Polymerase Chain Reaction); disegno di sonde oligonucleotidiche (primers) con code "universali" fluorescenti che consente l'utilizzazione di una sola coppia di primers per marcare in fluorescenza il campione; scansione dell'intera regione codificante del gene BRCA1 in 23 ampliconi (segmenti di DNA amplificati mediante PCR), comprendenti 7 ampliconi di dimensioni >1 kb; scansione dell'esone 11 mediante 4 ampliconi di dimensioni >1 kb. Peraltro, la FAMA è stata di recente applicata anche al riconoscimento delle mutazioni del gene BRCA2 (7).

L'accurato riconoscimento della mutazione avviene per: rilevazione visiva, diretta (immagine computerizzata del gel elettroforetico) di segnali a duplice fluorescenza, in relazione alla catena di DNA ed alla tipologia della mutazione, che coinvolgono i nucleotidi mutati e quelli destabilizzati adiacenti alla mutazione; rilevazione di picchi ad elevata intensità di fluorescenza lungo la linea di corsa elettroforetica, previa sovrapposizione delle linee di corsa di differenti campioni (elettroferogrammi). Elementi peculiari, pertanto, della FAMA da un punto di vista diagnostico sono:

1) la scansione analitica, puntuale, della sequenza genica che consente, rispetto alle altre modalità di scansione, di localizzare e prevedere la tipologia della mutazione, limitando la necessità della sequenza di conferma all'analisi di una limitata "finestra" di sequenza della regione della mutazione;

2) elevato potere di risoluzione diagnostica della mutazione, specie rispetto alla sequenza, di non poca rilevanza in un contesto clinico multidisciplinare per la migliore condivisione del dato clinico e lo sviluppo di una adeguata integrazione polispecialistica;

3) capacità di risoluzione differenziata di multiple mutazioni e polimorfismi lungo la scansione di una stessa regione di DNA;

4) discriminazione selettiva di mutazioni singolarmente caratterizzate da un insieme di specifici segnali fluorescenti che differiscono per numerosità e catena di DNA coinvolta in relazione alla posizione ed alla tipologia della mutazione ("FAMA signatures").

La capacità di discriminazione selettiva della FAMA e la particolare rilevanza di tale caratteristica riguardano in particolare l'esone 11, frequentemente mutato ed analizzato per scansione di 4 ampliconi di grandi dimensioni, e l'esone 16, il secondo in ordine di lunghezza (311 nucleotidi) nel gene BRCA1. Una recente analisi preliminare delle scansioni FAMA dell'esone 16 effettuate su probande a rischio di predisposizione genetica al carcinoma della mammella e dell'ovaio selezionate presso l'U.O. Oncologia Medica dell'Università dell'Aquila ha permesso di distinguere selettivamente le seguenti mutazioni: la variante allelica A4956G (Ser1613Gly) riscontrata con una frequenza del 23% (28/122 alleli); la rara variante missense G5075A (Met1652Ile) dal significato funzionale sconosciuto, riscontrata con una frequenza del 2,5% (3/122), osservata sempre in associazione con la variante allelica Ser1613Gly e specificamente riconoscibile; la mutazione predisponente 5083del19 (stop1670), caratterizzata da un pattern specifico di segnali fluorescenti osservato riproducibilmente in 5/7 probandi analizzati (1 affetta e 4 non affetti appartenenti alla stessa famiglia). Peraltro, la presenza di quest'ultima mutazione è prevedibile anche mediante semplice elettroforesi del campione di DNA mutato che utilizzando le altre procedure di scansione ma richiede una reazione di sequenza monoallelica di conferma proprio per l'assenza della capacità di discriminazione selettiva di tutte le suddette procedure diagnostiche; al contrario, la FAMA è in grado di escludere univocamente la presenza della mutazione o di verificarla e differenziarla rispetto ad altre mutazioni.

Tale considerazione assume particolare importanza per la recente dimostrazione, in collaborazione con i colleghi dell'Oncologia Medica dell'Università della Magna Grecia, dell'Istituto Tumori di Milano e del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, che le famiglie portatrici della mutazione 5083del19

condividono l'origine calabrese e la segregazione di uno stesso allele BRCA1 (8). Ciò rende altamente probabile che tale mutazione predisponente possa riscontrarsi in una buona parte delle pazienti affette da carcinoma della mammella e dell'ovaio ed in una piccola parte della popolazione calabrese (effetto "founder"); il riconoscimento rapido, specifico, di tale mutazione può essere effettuato su ampia scala e consentire lo sviluppo di adeguate strategie di prevenzione del carcinoma della mammella e dell'ovaio.

Valutato il coinvolgimento dei geni predisponenti al cancro della mammella e dell'ovaio, come il caso di BRCA1 e BRCA2, sono da prendere in considerazione altri markers fondamentali nella determinazione dei meccanismi patogenetici alla base dell'induzione neoplastica dei tumori sporadici. Uno dei principali è sicuramente il gene p53, trovato mutato in quasi la metà dei tumori umani analizzati.

In condizioni fisiologiche, la sintesi della proteina p53, che funge da "guardiano del genoma", è indotta da condizioni che determinano un danno del genoma (cancerogeni ambientali, stress, ed anche chemioterapia con farmaci genotossici e radioterapia); cellule così danneggiate non proliferano più ciclicamente (interruzione del ciclo cellulare al passaggio tra la fase G1 e la fase S, di sintesi del DNA) e, seguendo una logica fine ed intellegibile, la stessa proteina p53 le avvia ai percorsi geneticamente programmati della riparazione del danno, se questo è reversibile, o della morte cellulare programmata, se questo è considerato irreversibile (apoptosi p53-dipendente).

In una buona parte delle cellule neoplastiche, ad esempio di carcinoma della mammella, che non presentano una mutazione e la delezione allelica del gene p53, la proteina p53 continua ad esercitare bene il suo ruolo di "guardiano", così é ancora attivo un controllo della proliferazione delle cellule neoplastiche che limita l'aggressività biologica del tumore ed anche le terapie mediche (chemioterapia, radioterapia) possono essere consistentemente efficaci in quanto danneggiano selettivamente il DNA delle cellule neoplastiche rispetto a quello delle cellule normali al punto che il guardiano p53 le avvia a distruzione (apoptosi p53-dipendente).

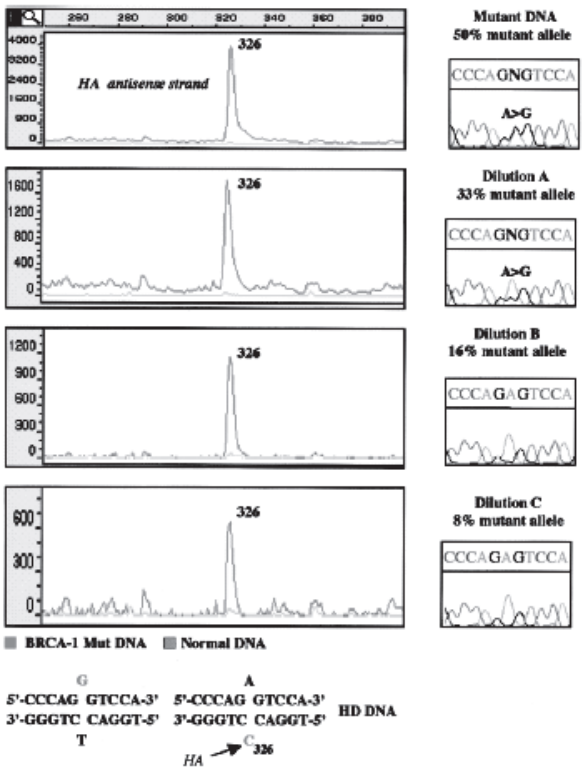
Le cellule neoplastiche con la mutazione del gene p53, associata eventualmente anche alla delezione dell'allele p53 omologo, perdono, tra gli altri, anche questo meccanismo di controllo: continuano a proliferare attivamente anche se danneggiate (mancanza del blocco al passaggio G1-S del ciclo cellulare) e tendono così ad accumulare danni a livello del genoma (instabilità cromosomica); in presenza del danno genotossico indotto, eventualmente, dalle terapie mediche (chemioterapia, radioterapia) la mancanza del controllo p53 non consente l'induzione dell'apoptosi p53-dipendente e ciò determina una condizione di resistenza a questo tipo di trattamenti.

Il 32% dei carcinomi della mammella presenta una mutazione del gene p53. Numerose evidenze hanno dimostrato una differenziazione prognostica e di predittività di risposta alle terapie mediche in relazione allo stato del gene p53 (normale o mutato) nel carcinoma della mammella, di recente confermata da una metanalisi di tali esperienze. La significatività statistica di tali differenze può perdersi quando la determinazione dello stato p53 è effettuata mediante immunoistochimica. Tale modalità di determinazione rivela la positività di espressione della proteina p53 sulla base dell'incremento della vita media che si osserva in presenza di una mutazione p53. L'accuratezza diagnostica dell'indagine p53 in immunoistochimica è limitata proprio da una tale valutazione indiretta della presenza della mutazione. Falsi negativi si ottengono, ad esempio, in presenza di mutazioni che determinano la sintesi di una proteina p53 più corta (mutazioni troncanti la sintesi della proteina); in questo caso la proteina p53 non è funzionante ma paradossalmente la determinazione immunoistochimica risulta negativa.

La determinazione dello stato molecolare del gene p53 nel carcinoma della mammella rappresenta un fattore prognostico e predittivo indipendente dallo stato linfonodale. Le osservazioni più recenti del nostro gruppo su una casistica di pazienti affette da carcinoma della mammella ad alto rischio di ripresa di malattia (linfonodi positivi >10), sottoposte ad un follow-up mediano di 5 anni, conferma tali osservazioni (9). Pertanto, in queste pazienti, è possibile distinguere: circa un 30% con mutazione del gene p53 nelle quali la malattia recidiva entro 18 mesi, con una sopravvivenza mediana di circa 3 anni; la maggior parte delle pazienti (circa il 70%) non presenta una mutazione del gene p53 e, nonostante l'alto rischio a priori di ripresa della malattia, sopravvive libera da malattia a 5 anni (intervallo libero da malattia 90%). E' evidente quindi come sia importante avere una metodica accurata per la determinazione della p53, le procedure diagnostiche sono diverse con differenti livelli di accuratezza, come la PCR-SSCP, la DGGE, o la sequenza. Queste metodiche un'accurata analisi di frammenti non più grandi di 500bp e, per raggiungere una sensitività ottimale, spesso richiedono un arricchimento della cellularità neoplastica. L'SSCP è uno dei mezzi di screening più rapido e semplice, e, come la DGGE, permette di identificare l'amplicone portatore l'alterazione genetica ma non da informazioni circa la posizione o la natura della mutazione. Sebbene sia costoso e richieda un notevole lavoro, la sequenza è universalmente accettata per essere la procedura diagnostica più accurata. La FAMA (Fluorescence Assisted Mismatch Analysis) metodica precedentemente utilizzata per evidenziare mutazioni germline in vari geni è stata utilizzata anche per la determinazione della p53. Il nostro gruppo ha dimostrato come la FAMA (10) abbia una sensibilità migliore della se-

quenza diretta, permettendo la detenzione di una sostituzione nucleotidica persino quando la frequenza dell'allele mutante sia molto bassa (8%) Figura 1. La FAMA è anche in grado di evidenziare pattern di mutazioni complesse e multiple nello stesso amplicone e può discriminare tra le differenti sostituzioni nucleotidiche nello stesso codone.

Figura 1. Un DNA portatore di una mutazione germline BRCA1 (A/G, Ser1613Gly, esone 16) è stato diluito serialmente in DNA normale. Le diluizioni sono state testate in parallelo con FAMA e con sequenziamento. Nella figura sono riportati, l'elettroferogramma sulla sinistra e la corrispondente sequenza sulla destra. È evidente come la sostituzione A/G non sia identificabile dalla sequenza nella diluizione B, al contrario il segnale mutazionale è chiaramente identificato con la FAMA persino nella diluizione C.



E' evidente quindi come la FAMA sia una procedura altamente sensibile e specifica da poter essere utilizzata per uno screening di routine e per un'analisi di un lungo amplicone di DNA di tumori della mammella, per l'identificazione delle mutazioni somatiche TP53.

In conclusione, l'esperienza sviluppata in questi anni ci porta a trarre la considerazione che il miglioramento dei risultati sul trattamento del carcinoma della mammella dipenderà anche da due aspetti fondamentali: la perseveranza nell'integrazione dialettica di differenti figure professionali; la disponibilità, la valutazione delle implicazioni cliniche e la routinaria utilizzazione di parametri molecolari, come l'analisi genetica p53, del BRCA1 e BRCA2, che potranno giustificare una ricollocazione delle strategie terapeutiche.

Bibliografia

1. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal P, Harshman K, Tavtigian S et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. Science, 1994; 266: 66-71.
2. Wooster R, Bignell G, Lancaster, Swift S, Seal S, Mangion J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. Nature, 1995; 378: 789-92.
3. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene *BRCA1*. Genome Res., 1996; 6: 1029-49.
4. Cotton, RGH. Slowly but surely towards better scanning for mutations. T.I.G., 1997; 13: 43-6.
5. Verpy E, Biasotto M, Meo T, Tosi M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1994; 91: 1873-7.
6. Ricevuto E, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Gulino A, Marchetti P, Ficorella C et al. Diagnostic strategy for analytical scanning of *BRCA1* gene by Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis using large bifluorescently labeled amplicons. Clin Canc Res, 2001; 7 : 1638-46.
7. Pages S, Caux V, Stoppa-Lyonnet D, Tosi M. Screening of male breast cancer and of breast-ovarian cancer families for BRCA2 mutations using large bifluorescent amplicons. Br J Cancer. 2001; 84: 482-8.
8. Baudi F, Quaresima B, Grandinetti C, Cuda G, Faniello C, Tassone P, et al. Evidence of a founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. Hum Mutat. 2001; 18: 163-4.
9. Marchetti P, Cannita K, Ricevuto E, De Galitiis F, Di Rocco ZC, Tessitore A et al. Pronostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. Annals of Oncology 2003;14: 704-8.
10. Tessitore A, Di Rocco ZC, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Tosi M et al. Sensitive analysis of TP53 somatic mutations. Genes, chromosomes & cancer, 2002; 35: 86-91.