

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE VARIANTES
DE PATOGENICIDADE INCERTA, MLH1 Leu676Pro
E MSH2 Met729Ile, ENCONTRADAS EM
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM SÍNDROME
DE LYNCH**

JOSÉ ROBERTO DE OLIVEIRA FERREIRA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ferreira, José Roberto de Oliveira

Caracterização funcional de variantes de patogenicidade incerta, MLH1 Leu676Pro e MSH2 Met729Ile, encontradas em pacientes diagnosticados com síndrome de Lynch / José Roberto de Oliveira
Ferreira – São Paulo 2014.

110p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. SÍNDROME DE LYNCH. 2. NEOPLASIAS
COLORRETAIS HEREDITÁRIAS SEM POLIPOSE. 3. REPARO DO DNA.
4. CLONAGEM MOLECULAR. 5. IMUNOFLUORESCÊNCIA.

“JOSÉ

E agora, José?
A festa acabou,
a luz apagou,
o povo sumiu,
a noite esfriou,
e agora, José?
e agora, Você?
Você que é sem nome,
que zomba dos outros,
Você que faz versos,
que ama, protesta?
e agora, José?

.....

Se você gritasse,
se você gemesse,
se você tocasse,
a valsa vienense,
se você dormisse,
se você cansasse,
se você morresse...
Mas você não morre,
você é duro, José!

Sozinho no escuro
qual bicho-do-mato,
sem teogonia,
sem parede nua
para se encostar,
sem cavalo preto
que fuja a galope,
você marcha, José!
José, para onde?”

Carlos Drummond de Andrade

DEDICATÓRIA

In memoriam de **Paulo Ferreira Santos**, meu pai, minha vida, minha força.

A meu segundo pai **Adelson dos Anjos**, pela força, carinho e ensinamentos.

Dedico esta tese a minha maravilhosa família, pelo apoio de sempre, pela paciência, tolerância e amor sempre constante. A minha mãe **Maria Cícera de Oliveira Ferreira** por mesmo sem entender o que é uma pós-graduação, sem sequer saber o que eu faço, foi capaz de abdicar de tudo e me deixar seguir em frente, apenas pela realização do meu sonho. A minha irmã **Maria Aline de Oliveira Ferreira**, meu exemplo, meu orgulho, minha segurança, minha amiga, aquela que sempre estará comigo. Agradeço a Deus pela família que possuo. E a Deus, agradeço tudo, aos momentos de paz, aos momentos difíceis, principalmente pela presença constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Dra Dirce Carraro** pela maravilhosa oportunidade de trabalhar em seu grupo e fazer parte do A.C. Camargo Cancer Center.

Ao **Dr Alex Fiorini de Carvalho** pela co-orientação e esforço conjunto para desenvolvimento desta tese.

Ao **Dr Felipe Cavalcanti Carneiro Silva** pela ajuda e amizade imprescindível neste período de doutorado, e pelas discussões científicas que certamente aprendi muito.

Ao **Programa de Pós-graduação em Oncologia** da fundação Antônio Prudente, pela qualidade no ensino e pesquisa, em especial ao **Dr Fernando Augusto Soares** e **Ana Kuninari**.

Ao **Dr Gustavo Campos Molina** pela amizade e confiança, e os ensinamentos passados.

As **Dras Elisa Ferreira** e **Adriana Miti** por zelarem pela organização e qualidade do grupo.

A **Dra Bruna Barros** pela amizade, risadas, respeito e a ajuda para a realização do sequenciamento de última geração.

A **Dra Vanina Elias** pela ajuda e ensinamentos na imunofluorescência

A **Rafael Garfield** pela ajuda na construção das bibliotecas de sequenciamento.

A todos do **Laboratório de Genômica e Biologia Molecular**, que ajudaram direta ou indiretamente para este trabalho (Danielle Braggio, Márcia Pena, Giovana Torrezan, Mabel, Dra Tatiana, Daiana, Lucimeire, Louise Motta, Eloisa, Ana Paula, Bianca Lisboa, Fernanda).

Aos **queridos amigos do CIPE** pelos momentos de café científico, com discussão de projetos, resultados, ensaios e sobre a vida. Momentos regados a risadas, desabafos, cansaço, esperança, família, obrigado a vocês por tudo!

A todos que compõe a **Biblioteca** do A.C. Camargo Cancer Center, em especial a **Suely**.

Sem dúvida alguma não posso deixar de agradecer aqueles que passaram e ficaram na minha vida, e muito ensinaram.

As minhas queridas ex-orientadoras que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal: **Dra Cláudia Pessoa** (UFC - Mestrado) e **Dra Ana Rosa de Almeida Alves** (UFAL -Iniciação Científica), obrigado pelo incentivo de sempre, e em cada momento desta caminhada percebi o quanto aprendi com vocês.

Ao **Dr Bruno Coêlho Cavalcanti**, amigo, irmão, e pesquisador formidável, por ter apresentado o mundo do Reparo de DNA.

Aos amigos sempre presentes, não importando a distância, pelas colaborações científicas e amizade, apoio e tudo (**Hemerson Iury, Paulo Michel, Cecília de Oliveira, Kristiana Mousinho**).

RESUMO

Ferreira JRO. **Caracterização funcional de variantes de patogenicidade incerta, MLH1 LEU676PRO E MSH2 MET729ILE, encontradas em pacientes diagnosticados com síndrome de Lynch.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Síndrome de Lynch é a forma mais comum de câncer colorretal hereditário e está associado com mutações germinativas em genes de reparo de erros de pareamento de bases (MMR - *mismatch repair*). Em estudo anterior, de nosso grupo, foram detectados 34 (28,5%) mutações deletérias e 3 (3%) variantes patogenicidade incerta, para as quais não há informações sobre o efeito na função da proteína. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o impacto na função da proteína de três novas variantes, uma em MLH1 (Leu676Pro) e duas em MSH2 (Thr8Met e Met729Ile). Inicialmente, a fim de prever a patogenicidade das variantes, usamos algoritmos computacionais (SIFT, POLYPHEN -2 e MAPP - MMR) e avaliamos a prevalência em 96 amostras de DNA provenientes de indivíduos saudáveis, sem histórico familiar de câncer. Para a análise funcional, o cDNA *full-length* foi clonado em plasmídeo pcDNA3.1 his e as variantes foram construídas por mutagênese sítio-dirigida. Realizamos uma transfecção transiente para expressar tanto o tipo selvagem e as variantes. A expressão das construções foi avaliada por *Western blot*. As linhagens celulares de câncer de cólon SW - 480, utilizada como controle positivo, e HCT - 116 e LoVo, foram utilizadas para a transfecção dos construtos de MLH1 e MSH2, respectivamente. A fim de avaliar a localização subcelular e interação proteína-proteína realizamos microscopia confocal e co-imunoprecipitação. As variantes MLH1 Leu676Pro e MSH2 Met729Ile foram classificados como patogênicas por algoritmos computacionais e não foram encontrados em nenhum dos controles saudáveis e a variante MSH2 Thr8Met foi encontrada em duas amostras controle de indivíduos saudáveis, dado sugestivo de que

não esteja relacionada com a doença, sendo retirada dos ensaios in vitro. Nossos resultados demonstraram que a isoforma proteica MLH1 Leu676Pro apresentou coloração nuclear por imunofluorescência semelhante ao MLH1 tipo selvagem. Enquanto, MSH2 Met729Ile mostrou marcação nuclear e citoplasmática também igualmente ao tipo selvagem da proteína. A combinação de imunoprecipitação seguido de *western blot* para detectar a interação entre MLH1 e seu parceiro funcional PMS2 revelou que PMS2 estava presente em quantidades iguais para isoforma e o tipo selvagem. Este resultado confirma que o complexo de proteína MLH1 - PMS2 estava presente em ambos os precipitados. Juntos estes dados indicam que estas variantes não têm impacto sobre a localização subcelular e interação (MLH1-PMS2). Adicionalmente, na tentativa de identificar a variante genética nos genes MLH1 e MSH2 foram conduzidos experimentos para avaliação no número de cópias no DNA de ambos genes. Os resultados demonstraram que o paciente portador da variante MSH2 Met729Ile, apresentou uma amplificação do éxon 5, pela primeira vez identificada e que é provavelmente a causa de SL, neste paciente. Assim, esse trabalho identificou a causa genética de um suspeito da síndrome de Lynch e revelou por ensaios funcionais a ausência de patogenicidade de duas variantes dos genes *MLH1* e *MSH2*.

SUMMARY

Ferreira JRO. **[Functional characterization of variants of uncertain pathogenicity, MLH1 Leu676Pro and MSH2 Met729Ile, found in patients diagnosed with Lynch syndrome]**. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Lynch syndrome is the most common form of hereditary colorectal cancer and is associated with germline mutations in one of the mismatch repair (MMR) genes. In a previous study we detected 34 (28.5%) deleterious mutations and 3 (3%) variants of unknown significance, for those no information in protein function is available. Therefore, the aim of this study is to evaluate the impact in protein function of three novel variants, one in *MLH1* and two in *MSH2* genes. Previously, in order to predict the variant pathogenicity, we used computational algorithms (SIFT, POLYPHEN-2 and MAPP-MMR) and assessed its prevalence in 96 DNA samples obtained from healthy subjects with no family history of cancer. For functional analysis, the full-length cDNA was cloned in pcDNA3.1 HisA plasmid and the variant was constructed by site-directed mutagenesis. We performed a transient transfection to express both the wild type and mutated *MLH1* gene. The protein expression of all constructions was assessed by *Western blot* analysis. The colon cancer cell lines SW-480 was used as positive control, and the HCT-116 and LoVo were used for transfection of *MLH1* and *MSH2* constructs, respectively. In order to assess the sub-cellular localization and protein-protein interaction we performed confocal microscopy and co-immunoprecipitation. The *MLH1* Leu676Pro and *MSH2* Met729Ile were classified as pathogenic by computational algorithms and were not found in any of the healthy controls. Our results demonstrated that the protein isoform *MLH1* Leu676Pro presented nuclear staining by immunofluorescence similar to *MLH1* wild type, showing no alteration in subcellular localization. Whereas *MSH2* Met729Ile showing nuclear and cytoplasmatic staining like wild-type.

Combined immunoprecipitation and western blot assays to detect the ability of the mutant protein to interact with its functional partner PMS2 revealed that PMS2 was present in equal amounts in the isoform and wild type. This result confirms that the protein complex MLH1-PMS2 was present in both precipitates. Taken together, these data suggest these pontual variants have no impact on either in subcellular localization and interaction (MLH1-PMS2). Additionally, in an attempt to identify the genetic variant in MLH1 and MSH2 experiments were conducted to evaluate the number of DNA copies of both genes. The results demonstrated that MSH2 patient variant Met729Ile presented amplification of exon 5, the first time identified and is probably the cause of SL in this patient. Thus, this study identified the genetic cause of a suspected of Lynch syndrome and functional assays revealed by the lack of pathogenicity of two variants of MLH1 and MSH2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo canônico de reparo de erros de pareamento de bases do DNA (<i>Mismatch Repair</i>).....	10
Figura 2	Modelo de três passos para avaliação de variantes de patogenicidade incerta nos genes de reparo <i>mismatch</i>	23
Figura 3	Sequenciamento de 96 amostras de DNA controle de voluntários sem histórico de câncer familiar, para rastreamento da presença das alterações de estudo em indivíduos saudáveis.....	49
Figura 4	Heredograma do paciente portador da alteração <i>MLH1</i> Leu676Pro, demonstrando sistema de órgãos acometido e idade de diagnóstico.....	51
Figura 5	Heredograma resumido do paciente portador da variante <i>MSH2</i> Met729Ile, demonstrando sistema de órgãos acometido e idade de diagnóstico.....	52
Figura 6	Esquematização dos domínios funcionais da proteína hMLH1.....	53
Figura 7	Esquematização dos domínios funcionais da proteína hMSH2.....	54
Figura 8	Iniciadores utilizados para a síntese dos fragmentos 1 e 2 de <i>MLH1</i>	56
Figura 9	Iniciadores utilizados para a síntese dos fragmentos 1 e 2 de <i>MSH2</i>	57

Figura 10	Construção vetor der expressão MLH1.....	59
Figura 11	Construção vetor der expressão MSH2.....	59
Figura 12	Caracterização das linhagens celulares.....	61
Figura 13	Expressão e imunoprecipitação das construções de MLH1.....	63
Figura 14	Expressão da variante hMSH2 Met729Ile.....	64
Figura 15	Localização subcelular da variante Leu676Pro hMLH1.....	66
Figura 16	Localização subcelular da variante Met729Ile.....	67
Figura 17	Representação gráfica dos picos relativos da dosagem gênica do paciente portador da alteração hMLH1 Leu676Pro das sondas para os genes EPCAM, MLH1 e MSH2.....	69
Figura 18	Representação gráfica dos picos relativos à dosagem gênica do paciente portador da alteração hMSH2 Met729Ile das sondas para os genes <i>EPCAM</i> , <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	70

LISTA DE TABELA E QUADROS

Tabela 1	Dados das alterações missenses encontradas em <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , com os dados das trocas de nucleotídeos e aminoácidos.....	48
Quadro 1	Desenho dos iniciadores utilizados para a mutagênese sítio-dirigida.....	36
Quadro 2	Linhagens de adenocarcinoma humanos utilizadas para os estudos funcionais.....	40

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer colorretal	1
1.2	Síndrome de Lynch	3
1.3	Sistema de Reparo de Erros de Pareamento do DNA (<i>Mismatch Repair - MMR</i>)	5
1.4	O mecanismo de MMR durante a replicação.....	8
1.5	Principais componentes do sistema MMR.....	11
1.6	Instabilidade de Microssatélites e Imunoistoquímica das Proteínas de Reparo.....	13
1.7	Linhagens celulares.....	15
1.8	O rastreamento de mutações	17
1.9	Variantes de Patogenicidade Incerta.....	19
1.10	Ensaio de caracterização funcional de UV's	21
1.11	Análise funcional de VUS	24
1.12	A problemática dos alelos raros	26
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.1	Caracterização das alterações	29
4.1.1	Análise <i>in silico</i>	30
4.1.2	Rastreamento das alterações em uma população controle.....	31
4.2	Clonagem e mutagênese sítio-dirigida	33
4.2.1	Obtenção de cDNA específico a partir de RNA total	33

4.2.2	Subclonagem dos fragmentos do cDNA full length	33
4.2.3	Clonagem do cDNA <i>full length</i>	35
4.2.4	Mutagênese Sítio-dirigida	35
4.2.5	Transformação bacteriana.....	37
4.2.6	Purificação dos plasmídeos.....	37
4.2.7	Sequenciamento dos plasmídeos.....	38
4.3	Ensaio Funcionais	39
4.3.1	Cultura de Células	39
4.3.2	Transfecção transitória	40
4.3.3	Expressão das proteínas recombinantes.....	41
4.3.4	Co-imunoprecipitação de hMLH1 e hPMS2.....	42
4.3.5	Localização sub-celular das variantes	43
4.4	Análise da Presença de Outras Alterações Genômica	44
4.4.1	Avaliação de rearranjos genômicos.....	44
4.4.2	Preparação das bibliotecas e Sequenciamento de regiões alvo	45
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Predição de Patogenicidade <i>In Silico</i>	47
5.2	Heredograma dos Pacientes Portadores das Alterações em HMLH1 Leu676Pro E <i>HMSH2</i> M729i e Localização no Domínio Funcional das Proteínas	49
5.3	Clonagem dos Genes Selvagens	55
5.4	Mutagênese Sítio-Dirigida: Construção dos Vetores de Expressão com as Variantes.....	58
5.5	Expressão dos Constructos de <i>HMLH1</i> e <i>HMSH2</i> e suas Variantes e em Modelo Celular	60
5.6	Expressão das Variantes De HMLH1 Leu676Pro e HMSH2 M729i	62
5.7	Localização Subcelular.....	65
5.8	Rastreamento de Rearranjos Genômicos nos Genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> e de Mutação Pontual em outros Genes de Susceptibilidade ao Câncer	68

6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação co Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer é a segunda causa de morte no Brasil, representando no ano de 2007 quase 17% dos óbitos de causa conhecida. As estimativas do Instituto Nacional de Câncer-INCA para o ano de 2014 são de aproximadamente 490 mil novos casos de câncer, dentre os quais o câncer colorretal corresponde a aproximadamente 32 mil casos (Ministério da Saúde 2014). É o terceiro câncer mais diagnosticado e a terceira causa de morte nos Estados Unidos (American Cancer Society-ACS 2008).

O câncer colorretal (CCR) representa um sério problema de saúde, com mais de um milhão de novos casos diagnosticados a cada ano em todo o mundo, como resultado de múltiplos processos que conduzem ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em células da mucosa do cólon, afetando principalmente oncogenes, genes supressores tumorais e de reparo de DNA, todos envolvidos em caminhos críticos da iniciação e progressão tumoral (COPPEDÊ 2014).

O risco de CCR é definido pela predisposição genética e fatores ambientais, com a idade sendo o fator de risco mais importante para o CCR esporádico. O risco de desenvolver CCR aumenta com a idade, e mais de 90% dos CCRs esporádicos ocorrem em indivíduos com idade superior a 50 anos. Outros fatores de risco incluem história familiar de CCR, uma dieta

pobre em fibras e folato, rica em gordura e carne vermelha, álcool, tabagismo, sedentarismo, obesidade e diabetes (AL-SOHAILY et al. 2012).

Aproximadamente 30% dos indivíduos com CCR possuem um histórico de um ou mais familiares também diagnosticados com a doença. O histórico de CCR em um parente de primeiro grau está associado com um aumento de 2 vezes no risco de desenvolver CCR e, no caso de inúmeros parentes ou afetados diagnosticados em idade jovem, o risco de CCR é ainda maior (BONADONA et al. 2011). No cenário de síndromes específicas de câncer hereditário, o risco de CCR pode se aproximar de 70% a 90% na ausência de qualquer intervenção médico ou cirúrgica. Dada a eficácia da colonoscopia com polipectomia e ressecção cirúrgica, a identificação de indivíduos com maior risco para CCR em fases pré-sintomáticas proporciona a oportunidade para a prevenção do desenvolvimento de tumores (STOFFEL e KASTRINOS 2013).

O termo câncer colorretal familiar (CCF) é usado para categorizar famílias com CCR que não cumprem os critérios clínicos para o diagnóstico de síndromes hereditárias conhecidas. Nessas famílias, genes menos penetrantes e interações gene-ambiente são provavelmente a base da agregação familiar. O CCF representa de 20 a 25% de todos os casos de CCR, os quais estão envolvidos com fatores ambientais, endógenos, assim como fatores genéticos múltiplos, incluindo polimorfismos nos genes do citocromo *P450*, que aumentam significativamente o risco de desenvolvimento de câncer colorretal. Acredita-se que grande parte dos componentes herdados nos restantes dos casos de CCR familiar seja

poligênico, e muitas das alterações genéticas envolvidas ainda não foram identificadas ou devidamente elucidadas (POWER et al. 2010; FERREIRA et al. 2004).

Ao longo dos últimos 10 a 15 anos, a genética molecular teve um impacto significativo na identificação de mutações germinativas e somáticas associadas com o desenvolvimento de CCR. Mutações germinativas que conferem susceptibilidade ao CCR hereditário representam cerca de 6% a 7% de todos CCRs. O CCR hereditário pode ser dividido em duas principais síndromes, a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), responsável por menos de 1% dos casos, e a Síndrome de LYNCH (SL), responsável por 5 a 7% dos casos (FERREIRA et al. 2004). Os genes envolvidos nessas síndromes são o APC e os de reparo de pareamento errôneo do DNA (MMR – mismatch repair), para FAP e SL, respectivamente (HEINEN 2010).

1.2 SÍNDROME DE LYNCH

A Síndrome de Lynch (SL) (MIM#s 120435, 609310) é a forma mais comum de CCR hereditário e é caracterizada por uma doença autossômica dominante, causada por mutações nos genes do sistema de reparo de erros de pareamento de bases (*Mismatch Repair – MMR*) (HEINEN 2010; SILVA et al. 2009; PINO et al. 2010). Anteriormente denominada como CCR hereditário sem polipose, HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal câncer), recentemente, foi proposto usar o termo SL para se referir especificamente aos pacientes com HNPCC que carregam uma mutação

patogênica nos genes MMR (GREEN et al. 2009), sendo que pacientes com critérios clínicos para Lynch e sem a confirmação da mutação patogênica, são denominados pacientes suspeitos de SL.

A SL é caracterizada por uma predisposição para desenvolver câncer colorretal, endometrial, e outros tipos, em idade jovem (abaixo dos 50 anos). Famílias afetadas frequentemente incluem vários parentes com cânceres e exibem um padrão autossômico dominante de herança, com todas as gerações afetadas. O espectro fenotípico de SL inclui o câncer colorretal, endométrio, estômago, trato urinário superior, intestino delgado, ovário, ductos biliares, cérebro e pele (VASEN et al. 2013). Os riscos estimados para o desenvolvimento de câncer, nos pacientes identificados com SL, estão na faixa de 22% a 75% para CCR e de 32% a 45% para endometrial, com aumento de risco para outros tipos de câncer (incluindo ovário, gástrico, intestino delgado, do trato urinário, cérebro, pâncreas e neoplasias sebáceas da pele) (STOFFEL e KASTRINOS 2014).

Recentemente, WIN et al. (2012), realizando o acompanhamento de indivíduos portadores de mutação nos genes MMR e seus familiares não portadores, demonstraram que portadores de mutação possuem um risco aumentado de desenvolvimento de câncer colorretal, endometrial, ovário, renal, pancreático, gástrico, de bexiga e mama em mulheres, enquanto que não foi encontrada nenhuma evidência de aumento no risco de qualquer tipo de câncer, incluindo o CCR, nos familiares não portadores.

Critérios clínicos com base no histórico familiar foram originalmente concebidos para identificar pacientes com uma forma hereditária de CCR,

particularmente SL (UMAR et al. 2004a e b). O Critério de Amsterdã, criado em 1991, estabelece uma lista com os critérios mínimos para identificar famílias suspeitas de SL, dentre os quais são a ocorrência de câncer de colorretal em três membros de uma família, sendo no mínimo dois deles parentes em primeiro grau, ao longo de duas ou mais gerações, e o desenvolvimento do CCR antes dos 50 anos em pelo menos um indivíduo (STIGLIANO et al. 2008). O Critério de Amsterdã foi revisado em 1999 e vários tumores extra-colônicos foram incluídos (endométrio, urotélio e intestino delgado). Em 1996, baseado no Critério de Amsterdã, outras características tais como instabilidade microssatélite nos tumores, localização dos tumores e idade de acometimento foram consideradas no Critério de Bethesda (GROVER et al. 2009; HEINEN 2010).

1.3 SISTEMA DE REPARO DE ERROS DE PAREAMENTO DO DNA (*MISMATCH REPAIR - MMR*)

O sistema MMR é uma via extremamente importante para a manutenção da estabilidade do genoma, onde defeitos nesta via de reparo estão envolvidos em diversos cânceres humanos (OU et al. 2008).

Experiências com camundongos *knockout* implicam o envolvimento das proteínas MMR em outras vias do metabolismo do DNA, como modulação de resposta a agentes alquilantes (LIN et al. 2004; O'BRIEN e BROWN 2006; TRAN et al. 2007; HASSEN et al. 2012), processamento de microRNAs (MAO et al. 2012; LIU et al. 2013; ZHONG et al. 2013),

hipermutação somática (SHM) e recombinação para troca de classe (CSR) de anticorpos, envolvendo este, bastante inesperado, visto que um sistema de alta fidelidade de reparo do DNA, também é capaz de participar de mutagênese específica de certas regiões (HSIEH 2012; PEÑA-DIAZ e JIR ICNY 2012).

A replicação do material genético ocorre de forma inalterada, e é a condição mais importante para a existência e manutenção da viabilidade dos organismos. Durante a replicação do genoma, a maquinaria do sistema MMR corrige os erros gerados pela atividade de polimerização que escaparam da atividade de revisão das DNA polimerases replicativas, contribuindo significativamente para a preservação correta do material genético (GAMMIE et al. 2007; TAKAHASHI et al. 2007; WANAT et al. 2007).

Um sistema de reparo de DNA defeituoso resulta em instabilidade genética e um fenótipo alterado, o que permite a acumulação de alterações que levam e/ou contribuem para a transformação neoplásica, inativando genes que são críticos para a manutenção da integridade celular (CASTELLS et al. 2009). Graças ao alto grau de conservação evolutiva da via de MMR entre genes humanos e genes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a constatação de que a deficiência funcional das proteínas codificadas pelos genes MMR nesta levedura dava origem à instabilidade de microssatélites (MSI) levou à hipótese de que os tumores com MSI também poderiam ter defeito no sistema MMR, e este, por sua vez, ter sido desencadeado por uma alteração germinativa nos genes do sistema

(BOLAND e 2010). Assim, ortólogos humanos de genes MMR de levedura foram rapidamente identificados e comprovados serem mutados na Síndrome de Lynch.

Um total de nove genes já foram identificados como membros do sistema MMR em humanos (*MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MLH3*) (HEINEN 2010). Os casos de SL são causados em sua maioria por alterações nos genes *MSH2* (MIM# 609309) e *MLH1* (MIM# 120436) e apenas 9% deles apresentam alterações no gene *MSH6* (MIM# 600678), *PMS1* (MIM# 600258) e *PMS2* (MIM# 600259) (FERREIRA et al. 2004; OU et al. 2008).

As proteínas-chave do sistema MMR são MutS e MutL. Os genes que codificam estas proteínas foram originalmente descobertos em *Streptococcus pneumoniae* (genes hexA e hexB). Um pouco mais tarde, os respectivos genes ortólogos foram descobertos em *Escherichia coli* (*E. coli*) (gene mutS, homólogos de hexA, e mutL, homólogos de hexB). As proteínas do sistema MMR foram nomeadas de Mut (abreviação de mutagênico), porque a sua disfunção conduz à hipermutabilidade em microrganismos.

Os nomes dos ortólogos *MutS* e *MutL* foram formadas a partir de abreviaturas *MSH* (MutS homólogo) e *MLH* (MutL homólogo), respectivamente. A proteína MutS interage com a proteína MutL, formando um complexo ternário, que atua como um coordenador de processos subsequentes do reparo de erros de pareamento de bases, incluindo a distinção entre a fita parental e nascente, enquanto que MutL induz um *nick*

na dupla fita de DNA, possibilitando a excisão e correção do erro de pareamento de bases (PEREVOZTCHIKOVA et al. 2013).

Erros de pareamento de bases são considerados quaisquer outros pares de nucleotídeos de G/C e A/T. Sua ocorrência é causada pela inserção errônea de nucleotídeos pelas DNA polimerases durante a replicação do DNA, bem como a influência de fatores mutagênicos (incluindo os radicais livres, agentes alquilantes e as radiações ionizantes).

1.4 O MECANISMO DE MMR DURANTE A REPLICAÇÃO

A via canônica de sinalização de MMR começa com o reconhecimento de erros de pareamento base-base ou loops de inserção/deleção, contendo um ou mais pares de base desalinhadas, por MutS α (MSH2-MSH6) e, menos frequentemente, pelo heterodímero MutS β (MSH2-MSH3) (HSIEH e YAMANE 2008). O recrutamento subsequente do heterodímero MutL α (MLH1-PMS2) em um processo modulado por ATP e o fator de processividade de replicação PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) (IYER et al. 2008; JAVAID et al. 2009), resulta na ativação da função endonuclease da subunidade PMS2, de MutL α . A EXO1, uma exonuclease 5'-3', realiza a excisão da fita (DROTSCHMANN et al. 2001; JIRICNY 2013). A Figura 1 fornece uma esquematização da via canônica de reparo de erros de incompatibilidades.

Importantemente, estas nucleases dirigem a excisão exclusivamente na fita recém-sintetizada contendo o erro. No passo final, a re-síntese no *gap*

de fita simples, criado pela EXO1, é revestida por RPA (*Replication protein A*), que previne que a formação de estruturas secundárias (KUNKEL e ERIE 2005; LARREA et al. 2010). A restauração da fita dupla é catalisada por polimerases replicativas de alta fidelidade, como Pol δ e Pol ϵ , e a ligação final das fitas ocorre pela DNA ligase (MCCULLOCH e KUNKEL 2008).

Embora o sistema de MMR humano tenha sido reconstituído *in vitro*, como o sistema MMR ocorre *in vivo* ainda não está completamente esclarecido. A ausência de metilação na fita recém-sintetizada desempenha um papel importante na distinção entre a fita parental e as fitas nascentes de DNA. A capacidade do sistema MMR para reparo direto à cadeia de DNA nascente é absolutamente essencial, pois garante que a informação genética codificada na fita molde (e, portanto, no genoma parental) seja passada para a próxima geração de células (JIRICNY 2013).

Foi demonstrado que a trimetilação da histona na lisina 36, H3K36me3, é requerida *in vivo* para o recrutamento do complexo de reconhecimento MutS α (hMSH2-hMSH6) na cromatina, através de interações diretas com o domínio PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) de hMSH6 (LI et al. 2013). Assim, a marca das histonas regula o sistema de MMR em células humanas e em parte explica o enigma de células cancerosas que são MSI-positivos, porém carecem de mutações, germinativas ou somáticas, detectáveis nos genes conhecidos e implicados com a doença. Essa descoberta ressalta a importância do código de histona na manutenção da estabilidade do genoma.

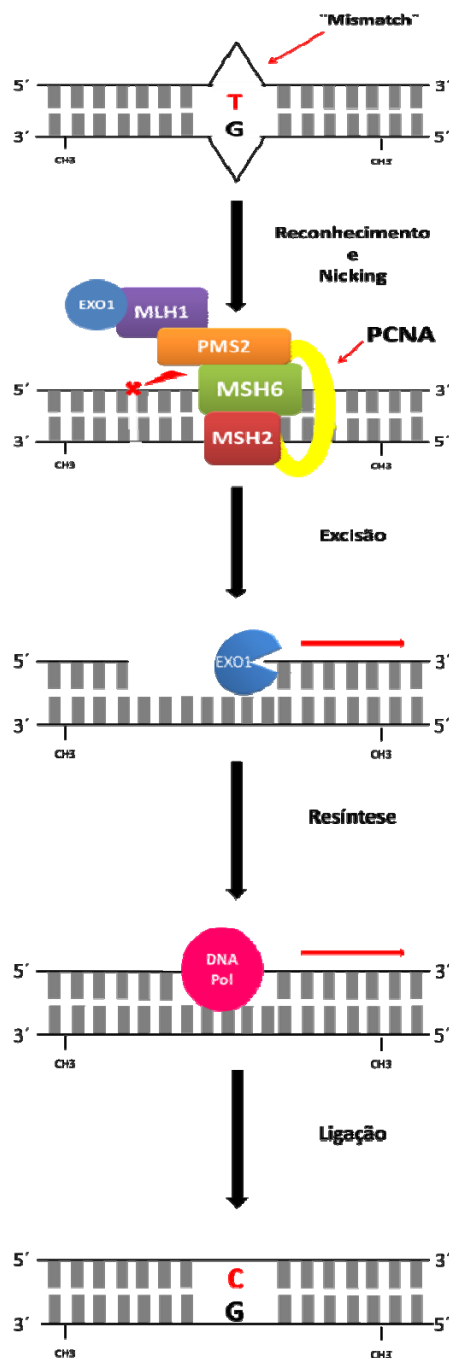


Figura 1 - Modelo canônico de reparo de erros de pareamento de bases do DNA (*Mismatch Repair*). A primeira fase do MMR tem início com o Reconhecimento do *Mismatch*, pelo complexo MutSα (MSH2-MSH6), que recruta MutLα (MLH1-PMS2). A subunidade com atividade endonucleásica de MutLα (PMS2), introduz um *nicking* na dupla fita do DNA. A segunda fase consiste na Excisão da fita com erro recém-sintetizada que contém o erro. Na terceira fase, é feita a Resíntese da fita excisada por DNA polimerases de alta fidelidade a partir da fita molde (DNA parental). Na última fase é feita a ligação das fitas por DNA ligases.

1.5 PRINCIPAIS COMPONENTES DO SISTEMA MMR

A proteína hMSH2 é membro de uma família de proteínas que são homólogas a proteína MutS de *Escherichia coli* (*E. coli*), que é responsável pelo reconhecimento inicial dos nucleotídeos emparelhados gerados durante a replicação do DNA (GRILLEY et al. 1989; GUPTA et al. 2011). Heterodímeros formados entre hMSH2 e outros dois MutS homólogos (hMSH3 e hMSH6) são requeridos para o reparo desses erros de replicação do DNA (HSIEH 2012). Embora hMSH2 pareça ser um componente essencial de forma uniforme de todos os heterodímeros, são hMSH3 e hMSH6 os modificadores de especificidade de substrato. O heterodímero hMSH2-hMSH6 reconhece incompatibilidades de pares de bases únicas e pequenos loops de inserções/deleções (INDELS), enquanto que o heterodímero hMSH2-hMSH3 reconhece um set de grandes inserções/deleções, assim como pequenas INDELS, demonstrando uma sobreposição de funções, o que talvez explique o fenótipo atenuado de pacientes portadores de alterações em hMSH6 ou hMSH3 (KARIOLA et al. 2004; BONADONA et al. 2011; JIRICNY 2013).

Os quatro MutL parálogos capazes de formar complexos heterodímeros protéicos são: MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-PMS1) e MutL γ (MLH1-MLH3). Interessantemente, PMS2 e MLH3 possuem um domínio conservado evolutivamente identificado com atividade de endonuclease capaz de fazer uma incisão na fita de DNA com erro. PMS2 em MutL α é geralmente aceito como o único executor da atividade

endonucleolítica, mas desde que foi demonstrado que MLH3 (MutLy) também é capaz de realizar o reparo do DNA em níveis baixos *in vitro*, foi sugerido que MLH3 possa servir como *backup* em uma situação de ausência de função de MutL α . Todavia, esta sugestão foi confrontada e descartada recentemente por ROESNER et al. (2013). Para avaliar se MutLy possui funções semelhantes à MutL α , foi realizado um tratamento com radiação ultravioleta (UV) em células MMR proficientes e deficientes, transfectadas com MutL α ou MutLy. Ambos os heterodímeros foram recrutados para os sítios de danos no DNA, surpreendentemente, a variante de *splicing* MLH3 sem o éxon 7, ou seja, sem o motivo endonucleolítico, foi capaz de formar focos de MutLy no DNA, indicando que o recrutamento não necessariamente representa que o reparo está ativo. Apenas MutL α foi capaz de uma completa recuperação da resposta a dano ao DNA e, em células deficientes em MMR, a expressão de MutLy ou MLH3 sozinho não o fez.

Diversos trabalhos demonstram a interação entre as proteínas do sistema MMR com o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) (CLARK et al. 2000; MASIH et al. 2008). É PCNA que recruta as proteínas MMR para a forquilha de replicação (NIELSEN et al. 2004; UMAR et al. 1996; LEE e ALANI 2006). Além disso, foi demonstrado que hMLH1 e hMSH2 interagem e co-localizam com PCNA e hEXO1. Alguns estudos indicam que MutSa (MSH2-MSH6) ao se ligar a PCNA, permite o complexo sensor de examinar o DNA, juntamente com PCNA (WANG e EDELMANN 2006; CHAHWAN et al. 2011). Entretanto, não está claro se o complexo MSH2/MSH6 está

constantemente à procura de erros do genoma ou se liga ao DNA *in situ* quando um erro de pareamento surge (IYER et al. 2010).

A Exonuclease 1 humana (hEXO1) interage com PCNA e as proteínas de MMR, também fazendo parte do sistema (TRAN et al. 2007; LIBERTI et al. 2011). Mutações em hEXO1 podem estar associadas com a SL, como demonstrado *in vitro*, onde células deficientes ou mutantes para hEXO1 apresentam fenótipo mutador (IZUMCHENKO et al. 2012).

1.6 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES E IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE REPARO

A descoberta da base genética da SL resultou na implementação do rastreio de base populacional para indivíduos com diagnóstico de CCR. Uma vez que o sistema MMR é responsável pela vigilância e correção de erros na replicação do DNA, descobriu-se que as sequências de DNA repetitivas, que consistem em mononucleotídeos, dinucleotídeos, ou repetições de nucleotídeos de ordem superior, estão propensas a *slippage* (deslize) das DNA polimerases replicativas, causando diminuição ou aumento dessas regiões. Este fenômeno é designado de instabilidade de microssatélites (O'BRIEN e BROWN 2006).

Esta instabilidade, remanescente do fenótipo do sistema MMR defectivo em bactérias e leveduras (STRAND et al. 1993), demonstrou uma função crucial na ligação desta síndrome a defeitos no sistema MMR em humanos (FISHEL et al. 1993; PARSONS et al. 1993), possibilitando a

identificação do defeito bioquímico envolvido no desenvolvimento da SL (TENNEN et al. 2013). Este fenótipo MSI (também conhecido como o fenótipo mutador), apesar de ser característico de SL, é também observado em 10% a 15% de CCRs esporádicos.

O pré-rastreamento molecular utilizando MSI ou a análise de IHC do tecido tumoral para a perda da proteína MMR foram propostos como ferramenta de rastreamento primário para todos os pacientes com CCR. O racional para o uso da IHC, que é um teste rápido, de baixo custo e altamente reprodutível, é que a perda de expressão identifica o gene MMR está deficiente no tumor (HAMPEL et al. 2008; MVUNDURA et al. 2010).

O exame de tecidos de tumor para a perda de expressão de uma proteína MMR por IHC é um método comprovado e eficaz para pré-rastreamento de tumores para um fenótipo de MMR defeituoso. Presume-se que os tecidos de tumor que demonstram a ausência de marcação nuclear, na presença de uma coloração positiva nas células normais circundantes possuem perda bialélica (mutação) do gene correspondente MMR (HAMPEL et al. 2008). Atualmente a análise de IHC é aplicada rotineiramente nos principais hospitais do mundo para a detecção de alterações nos genes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2*.

Como as proteínas MMR agem como heterodímeros funcionais: MutS α (MSH2 – MSH6) e MutL α (MLH1 – PMS2), a perda de expressão na IHC do componente principal (MSH2 ou MLH1) implica na ausência dos componentes secundários (MSH6 e PMS2). É amplamente aceito que esta perda concomitante de proteínas de MMR está relacionada com a

estabilidade das proteínas, uma estabilidade que depende da formação do heterodímero (PEREVOZTCHIKOVA et al. 2013). Todavia, a perda na IHC de marcação apenas para PMS2 ou MSH6, é uma indicação da presença de uma mutação da linhagem germinativa no respectivo gene (MVUNDURA et al. 2010).

A análise de IHC e testes de MSI têm limitações como ferramentas de triagem. Como discutido anteriormente, os tumores com MSI são vistos em 10 % a 15 % de CCRs esporádicos e, além disso, a perda de proteína MLH1 em análise de IHC pode ser causada pela hipermetilação do promotor ao invés da presença de uma mutação da linhagem germinativa (SHIA 2008; ZHANG 2008).

1.7 LINHAGENS CELULARES

O mesmo fenótipo para a expressão ou ausência de proteínas MMR é encontrado em linhagens de células humanas. A linhagem LoVo possui hMSH2 mutado, e não expressa níveis detectáveis de hMSH3 ou hMSH6. Similarmente, as células HCT-116 que possuem hMLH1 mutado, não expressão as proteínas hPMS2, enquanto que nas células HCT-116 +ch3, em que foi micro-injetado o cromossomo 3 onde está o gene MLH1, níveis detectáveis de hMLH1 e hPMS2 são encontrados. Assim, a estabilidade de hMSH3, hMSH6 e hPMS2 depende da presença de seus parceiros funcionais.

A linhagem embrionária de rim Hek-293T, não expressa MLH1, por hipermetilação do promotor, e conseqüentemente, também não expressa PMS2 (TROJAN et al. 2002).

Em HCT-15, uma linhagem de adenocarcinoma de colorretal humano, que possui hMSH6 mutado, há um aumento de hMSH3 no nível de mRNA e proteína (CHANG et al. 2000). A inativação de hMSH6 em combinação com hMSH2 intacto é associada com um aumento da expressão de hMSH3, que pode compensar, em certo grau, a função defectiva de hMutS α , haja vista que há alguma redundância entre hMutS α e hMutS β , como ambas podendo reparar pequenos loops de inserção/deleção. Além disto, a perda da proteína hMSH6 permitiria um aumento compensatório de hMutS β , pelo aumento da estabilidade de hMSH3, seguido de sua dimerização com hMSH2. Esta observação, ajuda a explicar, relativamente, o fraco efeito mutador de um gene hMSH6 mutado, e também o fenótipo atenuado dos pacientes portadores de mutação em hMSH6 encontrados com SL.

Células que perdem MLH1 são praticamente desprovidas da proteína PMS2, em um nível detectável, apesar de níveis normais de mRNA de PMS2 serem produzidos (CHANG et al. 2000). Portanto, a expressão de PMS2 é reduzida pela baixa estabilidade da proteína na ausência de dimerização com MLH1.

A transfecção dessas linhagens com *PMS2* ou *MSH6* sozinhos, demonstrou que estes são eficientemente expressos somente na presença de seu parceiro dimérico MLH1 ou MSH2 (CHANG et al. 2000; BRIEGER et al. 2005; MOHD et al. 2006). Esses achados e outros, demonstram que

hMSH2 e hMLH1 são necessários para estabilizar suas proteínas parceiras (KNUDSEN et al. 2007).

1.8 O RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES

A realização do diagnóstico de uma síndrome de câncer hereditário tem implicações significativas na conduta médica dos pacientes com CCR e suas famílias (MOREIRA et al. 2012). Os testes genéticos podem ser úteis para confirmar o diagnóstico e proporcionar aos familiares em situação de risco a oportunidade de estabelecer um programa de vigilância para prever o aparecimento de tumores (HAMPEL et al. 2008). Por outro lado, a identificação de indivíduos não portadores da mutação específica na família pode evitar procedimentos desnecessários.

A maior parte das mutações patogênicas relatadas nos genes MMR são mutações pontuais, compreendendo substituições de bases, pequenas inserções e deleções (PELTOMÄKI et al. 2004; PETERSEN et al. 2013). Além disso, rearranjos genômicos, como grandes deleções e duplicações não detectáveis por PCR convencional e sequenciamento capilar, foram identificados em uma proporção significativa de famílias SL, as quais não carregam mutação patogênica de ponto nos genes MMR (CHARBONNIER et al. 2002; TAYLOR et al. 2003; PISTORIUS et al. 2007; WERNSTEDT et al. 2012).

O banco de dados da Sociedade Internacional para Tumores Gastrointestinais Hereditários (International Society for Gastrointestinal

Hereditary Tumors-INSIGHT) lista um total de 8.688 diferentes alterações nas linhagens germinativas em genes do sistema MMR, destas 40% estão no gene MLH1 e 34,6% no MSH2. A maioria das mutações nos genes MMR em pacientes com SL são do tipo nonsense (origina um código de terminação) ou *frameshift* (alteração na matriz de leitura), que resultam em proteínas truncadas com funções deficientes, ou comumente, nenhum produto proteico é detectado. As proteínas truncadas são instáveis na célula, resultando em sua perda de expressão, como pode ser frequentemente observado na imunohistoquímica de tumores de portadores de SL (PELTOMÄKI et al. 2004). Por esta razão, a análise imunohistoquímica das quatro principais proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) é frequentemente utilizada para diagnóstico, sendo que patogenicidade destas mutações nonsense e *frameshift* são frequentemente assumidas (OU et al. 2007). Entretanto 26% das alterações listadas nos genes MMR são alterações *missense*, que acarretam a troca de um aminoácido por outro na sequência da proteína (HEINEN 2010). O significado dessas alterações na patogênese do SL ainda não está claro para muitas das variantes encontradas (WANAT et al. 2007; CASTELLS et al. 2009).

Mutações *missenses* podem causar uma perda da função da proteína e resultar em um fenótipo semelhante a mutações que causam um códon de parada prematuro, que levam ao truncamento da proteína; outras podem criar proteínas que mantêm a função parcial ou originam proteínas não funcionais que ainda são expressas e marcam como tipo selvagem na análise de IHC.

Há um consenso generalizado de que a interpretação correta do significado clínico das mutações *missense* específicas (mesmo com algoritmos de bioinformática) é extremamente desafiador e dificulta o aconselhamento genético e o tratamento médico das famílias envolvidas (PASTRELLO et al. 2011). Nesse ínterim, surgem os ensaios funcionais, que buscam caracterizar possíveis defeitos bioquímicos, envolvidos com o desenvolvimento tumoral.

1.9 VARIANTES DE PATOGENICIDADE INCERTA

Testes genéticos para a predisposição de câncer tornou-se generalizado e são especialmente procurados por indivíduos com história familiar de câncer, principalmente por possibilitar uma melhor avaliação de risco (COUCH et al. 2008; RASMUSSEN et al. 2012). Os testes genéticos podem estabelecer a presença de alterações em genes de predisposição ou a ausência de qualquer alteração específica (BONADONA et al. 2011).

No entanto, a descoberta de uma Variante de Patogenicidade Incerta (*VUS - Variant of uncertain significance*), é outro possível resultado, que pode complicar ao invés de melhorar o processo de avaliação de risco (OU et al. 2008). Neste caso, a alteração na sequência de nucleotídeos encontrada, para o qual não existe informação suficiente, impossibilita decidir se ela afeta a função da proteína e, conseqüentemente, influencia o risco de câncer (ARNOLD et al. 2009). Além disso, no caso de genes que fortemente afetam o risco, tais resultados não informativos podem ser uma

fonte de ansiedade para os indivíduos e seus descendentes, porque não serão capazes de utilizar a informação a partir de testes genéticos para modificar o comportamento ou estilo de vida, ou fazer decisões clínicas importantes, que podem, em muitos casos, envolver cirurgia profilática (RASMUSSEN et al. 2012).

Além disso, todos os familiares em primeiro grau, incluindo não portadores, são considerados de risco, desde que a contribuição da variante para a doença não tenha sido avaliada, resultando frequentemente em uma ansiedade ao longo da vida e exames preventivos desnecessários (HOFSTRA et al. 2008).

A predisposição herdada à uma doença é frequentemente ligada à atividade reduzida de um produto gênico associado à doença. Assim, a quantificação da influência das variantes herdadas sobre a função dos genes pode, potencialmente, ser utilizada para prever a relevância destas variantes para a doença (COUCH et al. 2008). O princípio por trás dos ensaios funcionais reside no fato de que uma alteração que predispõe ao câncer resulta em perda de função dos genes. Assim, os ensaios funcionais, podem estabelecer e, eventualmente, quantificar a atividade das proteínas alteradas, predizendo se a variante predispõe a doença ou, alternativamente, não tem influência no risco de câncer (OU et al. 2007).

A alteração de um único aminoácido não necessariamente resulta em uma proteína disfuncional, entretanto, mesmo a substituição de um único aminoácido pode dar origem a um sistema MMR defeituoso, onde se pode encontrar proteínas instáveis, inativação da atividade enzimática, falhas na

interação proteína-proteína, ou proteína-DNA e erros na localização sub-celular da proteína (LÜTZEN et al. 2008).

1.10 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UV'S

O profundo conhecimento mecanicista na genética e bioquímica do sistema MMR permitiu o desenvolvimento e o uso de ensaios orientados para avaliar a patogenicidade das variantes encontradas em pacientes com suspeita de SL (RASMUSSEN et al. 2012).

Uma infinidade de ensaios funcionais em diferentes sistemas experimentais foi desenvolvida para investigar se as variantes causam defeitos funcionais, resultando em uma predisposição ao câncer (OU et al. 2008; HOFSTRA et al. 2008).

De modo geral, os ensaios podem ser subdivididos em três categorias: Ensaios baseados na atividade MMR *in vivo*; ensaios que medem a atividade MMR *in vitro* e ensaios que medem propriedades biológicas e bioquímicas específicas das variantes MMR (TAVTIGIAN et al. 2008).

Os ensaios de reparo *in vivo*, exploram a conservação do sistema MMR através de diferentes espécies, como *S. cerevisiae* e *E. coli*. Neste caso, as VUS encontradas em genes humanos são reproduzidas artificialmente no gene MMR correspondente na levedura ou bactéria e, desta maneira, as variantes estudadas por estas metodologias ficam restritas a variantes localizadas em posições evolutivamente conservadas.

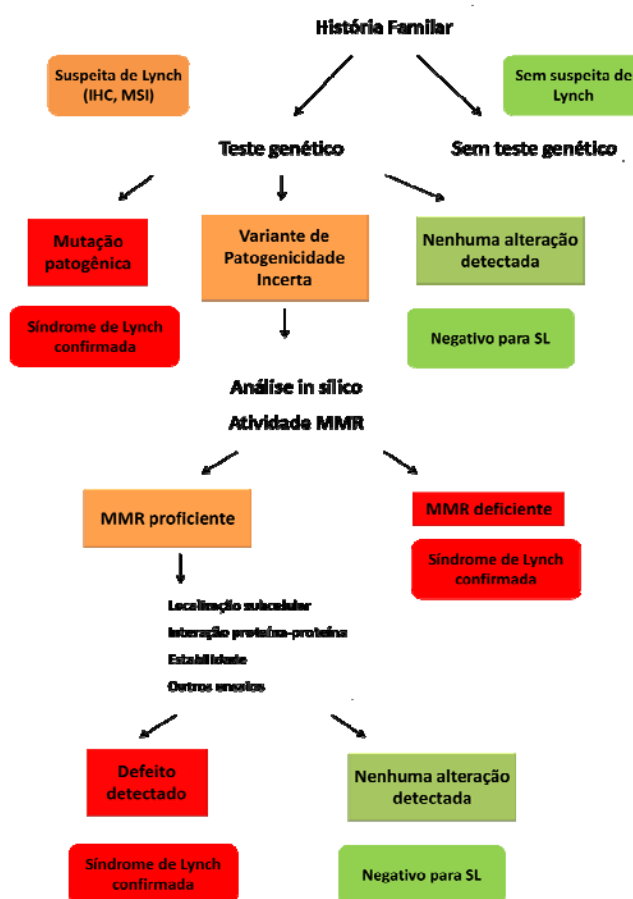
Além disto, a falta de modificações pós-traducionais pode interferir nos resultados (HOFSTRA et al. 2008; AGGARWAL et al. 2012).

Os ensaios que avaliam a atividade de reparo *in vitro*, fazem uso de extratos proteicos de células ou proteínas sintetizadas em sistemas *cell-free*, como reticulócitos de coelho. Os extratos proteicos ou as proteínas são adicionados a uma reação *in vitro*, tendo como substrato um plasmídeo contendo um erro de pareamento de bases. Este *mismatch* está localizado em um sítio de enzima de restrição inativado, que quando reparado eficientemente restaura o sítio da enzima e os fragmentos da digestão podem ser observados em um gel de agarose (OU et al. 2008; COUCH et al. 2008).

Os ensaios que verificam as propriedades bioquímicas específicas incluem a capacidade das proteínas MMR interagirem com outras proteínas, a estabilização de parceiros funcionais, a localização subcelular e outros (TAVTIGIAN et al. 2008).

COUCH et al. (2008), propuseram uma árvore de decisão para a análise de variantes nos genes MMR, o modelo encontra-se esquematizado na figura 2. Esta árvore de decisão consiste de três passos, onde o primeiro é baseado no histórico familiar e a identificação do possível gene MMR envolvido, consistindo de análise a IHC para a perda de proteínas MMR e a MSI no tumor; seguido por teste genético a procura de alterações nos genes MMR, onde a identificação de mutações patogênicas confirmaria o diagnóstico de SL e caso nenhuma alteração seja encontrada, é menos provável que seja SL. A identificação de variantes sem significado clínico

conhecido (VUS) levaria ao segundo passo, onde é feita a análise *in silico*, em programas de predição de patogenicidade e avaliado a atividade de reparo *in vitro*. A perda de atividade de reparo *in vitro*, confirma o diagnóstico de mutação patogênica, e assim de SL. Caso a alteração ainda resulte em uma proteína com atividade de reparo, o terceiro passo é realizado. Nesta etapa, são avaliadas propriedades bioquímicas específicas como localização subcelular, interação proteína-proteína, estabilidade e reconhecimento do *mismatch*.



Fonte: Adaptado de COUCH et al. (2008) e KANSIKAS et al. (2011)

Figura 2 - Modelo de três passos para avaliação de variantes de patogenicidade incerta nos genes de reparo *mismatch*. O primeiro passo é composto do teste genético a procura de alterações nos genes. O segundo passo consiste em análise *in silico* em programas de predição de patogenicidade e ensaios de atividade de reparo. O terceiro passo é baseado em ensaios que avaliam atividades bioquímicas específicas.

Este modelo de avaliação funcional para as proteínas MMR foi validado posteriormente, por um grupo independente, conforme trabalho de KANSIKAS et al. (2011). De acordo com este trabalho, apenas os passos 1 e 2 são necessários para a confirmação de patogenicidade, ficando o passo 3 para variantes com resultados discrepantes e inconclusivos.

É importante combinar resultados de diferentes ensaios funcionais (verificando diferentes aspectos funcionais ou a função como um todo), com as análises *in silico* e evidências indiretas como segregação da alteração com a doença na família e características patológicas (perda de expressão de proteína MMR, presença de MSI) (HOFSTRA et al. 2008; ARNOLD et al. 2009; BORRÀS et al. 2012). Um bom exemplo é o trabalho de FARRELL et al. (2013), onde a variante MLH1 p.Leu555Pro VUS segrega com três casos de síndrome de Lynch clássico na família, com consistente perda de expressão de MLH1 e PMS2 na análise IHC, alta MSI. E nos ensaios *in vitro* demonstraram baixa atividade de reparo.

1.11 ANÁLISE FUNCIONAL DE VUS

LÜTZEN et al. (2008) estudaram as consequências funcionais de sete alterações missenses em *MSH2* de famílias SL: D167H, A305T, P622L, H639R, G674R, C697F e A834T. As variantes P622L e C697F tiveram sua localização subcelular alterada, ficando no citoplasma, sendo incapazes de formar complexo com MSH6. As proteínas MMR necessitam serem transportadas para o núcleo onde encontrarão o seu alvo, o DNA alterado. A

regulação da localização subcelular das proteínas MMR ainda é pouco entendida, entretanto, sabe-se que esta regulação depende de: 1) sequências específicas nas proteínas que interagem com fatores envolvidos no transporte de proteínas para o núcleo, assim como 2) sequências envolvidas na translocação de proteínas para o núcleo; e 3) interações específicas proteína-proteína nos complexos MMRs (WU et al. 2003; OU et al. 2008).

Outro estudo, conduzido por GAMMIE et al. em 2007, analisaram 50 variantes missense de *MSH2* em *Saccharomyces cerevisiae* quanto suas capacidades de restaurar o reparo em cepas nocaute para o gene *MSH2*. Trinta e três variantes foram incapazes de restaurar o dano ao DNA, quando comparado ao controle, enquanto três apresentaram um fenótipo intermediário. Outro grupo (TAKAHASHI et al. 2007) examinou 100 variantes MLH1 expressas em células HCT-116 deficientes em hMLH1 e constatou que 50 variantes missense possuíam atividade de reparo inferior ao grupo controle.

A região N-terminal de hMLH1 (resíduos 1-505) é a responsável pela interação de MutL α /beta com MutS α (PLOTZ et al. 2003). PLOTZ et al. (2006). identificaram a alteração Ala128Pro localizada na interface responsável pela interação entre MutL α – MutS α que é capaz de abolir a interação e o reparo. Outras variantes podem ser instáveis, sendo rapidamente degradadas via ubiquitina-proteossoma. Inibidores do proteossoma são capazes de restaurar níveis normais de expressão e em nível normais estas variantes possuem pleno funcionamento, similar a *wild-type* (ARLOW et al. 2013; HINRICHSEN et al. 2013).

1.12 A PROBLEMÁTICA DOS ALELOS RAROS

A elucidação da base genética de doenças humanas e outras características relacionadas com a saúde tem comumente invocado uma dicotomia simplista, caracterizada por doenças comuns “monogênicas” e complexas “multigênicas” (BAMSHAD et al. 2011). Nesse contexto, a partir de 2010, surgiram as primeiras evidências experimentais de que alelos fracos e polimorfismos de genes MMR são capazes de interagir para produzir um forte defeito poligênico capaz de dirigir a tumorigênese (MARTINEZ et al. 2010).

Há pouquíssimos estudos na literatura relatando a presença de alelos raros segregando com a doença em famílias de SL. Até o presente, o trabalho inicial de MARTINEZ et al. (2010), realizado em leveduras, sugeriu a possibilidade de alelos fracos em genes de MMR interagirem e contribuírem para a formação do tumor. Três estudos identificaram VUS, em diferentes genes, segregando com a doença em famílias SL. O estudo de LIU et al. 2003, relata a presença de duas alterações missenses, uma em MSH2 (E198G) e MLH3 (W1276R), segregando na família com a presença de tumor. Posteriormente, DURATURO et al. (2011), identificou duas variantes de baixo risco, uma em hMSH3 e outra em hMSH2, segregando com a doença na família. O outro estudo de WANG et al. (2014), identificou duas alterações VUS, uma em hPMS2 e outra em TP53, segregando com a doença na família também.

2 JUSTIFICATIVA

A caracterização funcional das alterações encontradas em genes do sistema MMR é crítica para avaliação de sua patogenicidade em SL (TAKAHASHI et al. 2007). Se uma VUS contribui para o fenótipo da doença ou se representa apenas uma variante rara, é um dos principais problemas com consequências diretas para o paciente (OU et al. 2008). Portadores de mutações patogênicas têm um risco elevado de desenvolvimento de câncer e devem ser monitorados regularmente para a detecção precoce de neoplasias (BONADONA et al. 2011). Em trabalhos anteriores do grupo, cento e quatro pacientes que preencheram critério para SL (Critério de Amsterdã I, II ou Bethesda) tiveram suas amostras de DNA sequenciadas para os genes *MLH1* e *MSH2* (DOMINGUEZ et al. 2008; SILVA et al. 2009, SILVA et al. 2010; VALENTIN et al. 2011). Cento e sete alterações foram identificadas (73 missense 16 nonsense 10 frameshift, 7 em sítios de splicing e 1 indel), em 65 pacientes, das quais 63 foram classificadas como não patogênicas 29 como patogênicas (14 em *MLH1* 15 em *MSH2*) e três ainda não foram descritas, não existindo dados funcionais (DOMINGUEZ et al. 2008). Destas três VUS, uma foi encontrada em *MLH1* (c.2027 T>C) e duas em *MSH2* (c.2187 G>T, c.23 C>T). Estas três alterações foram selecionadas para análise funcional no presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente, através de ensaios *in vitro*, variantes de patogenicidade incerta (VUs), resultantes de alterações *missenses* não descritas em genes do sistema MMR (MLH1 e MSH2) e que foram encontradas em pacientes que preencheram critério clínico para SL.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de plasmídeo pcDNA 3.1/myc-His A contendo MLH1 ou MSH2 tipo selvagem;
- Mutagênese sítio-dirigida para construção das alterações de estudo;
- Identificar possíveis alterações prejudiciais quanto à localização sub-celular e interação com outras proteínas de reparo.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As alterações selecionadas foram construídas em plasmídeos de expressão em mamíferos por mutagênese sítio-dirigida. Para análise funcional foram utilizadas linhagens celulares que não expressam proteínas específicas do sistema MMR [HCT-116 (MLH1(-/-)) e LoVo (MSH2(-/-)]. Como controles positivos para os ensaios, a linhagem SW480 [MLH1(+/+) e MSH2 (+/+)], além das linhagens HCT-116 e LoVo, transfectadas com o plasmídeos selvagens para *MLH1* e *MSH2* foram utilizados.

As alterações foram inseridas nas linhagens por transfecção transitória, então para assim avaliar a função, expressão, interação proteína-proteína e a localização subcelular das isoformas. Para os experimentos funcionais foram utilizados como controles: *MLH1* ou *MSH2* selvagem.

Amostras de DNA dos pacientes portadores das alterações de estudo, provenientes do banco de macromoléculas do AC Camargo Câncer Center, foram utilizadas para análise de rearranjo genômico e sequenciamento de regiões alvo. Este projeto foi autorizado pelo comitê de ética desta instituição pelo número 1423/10.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES

As alterações previamente encontradas em pacientes do A.C. Camargo Câncer Center que preencheram os critérios para SL e que não

apresentam dados funcionais nos bancos de dados pesquisados, foram selecionadas para estudo funcional. Antes da realização dos ensaios funcionais em células, realizamos uma caracterização *in silico* das alterações e o rastreamento das mesmas em uma população controle. Foram selecionadas três alterações, uma alteração no éxon 18 de *MLH1*, responsável pela troca c.2027 T>C, codificando a variante p.Leu676Pro, e duas alterações em *MSH2*, c.23 C>T (éxon 1) e c.2187 G>T (éxon 13), codificando as variantes p.Thr8Met e p.Met729Ile.

4.1.1 Análise *in silico*

Para predizer possíveis defeitos funcionais nas variantes identificadas foram utilizados métodos *in silico*, que são ferramentas computacionais utilizados para identificar e predizer possíveis defeitos funcionais na isoforma protéica. Diversos algoritmos de predição estão disponíveis para a análise *in silico* (KANSIKAS et al. 2011). Para o presente trabalho foram escolhidos três programas de predição já bem estabelecidos na literatura. Os softwares *on line*, de predição de patogenicidade foram: Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), o SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) e o MAPP-MMR (<http://mappmmr.blueankh.com/>), todos gratuitos.

O *Polymorphism Phenotyping v2* (Polyphen-2), é uma versão diferente da versão anterior, PolyPhen1 no *pipeline* de alinhamento e o método de classificação. É um software de predição de patogenicidade baseado em uma árvore de decisão que irá combinar uma série de atributos estruturais com um alinhamento de sequências múltiplas pré-construído,

geralmente incluindo somente sequências de mamíferos. Além disso, utiliza dados de conservação das sequências, estrutura e anotações no SWISS-PROT.

O *Sorting Intolerant from Tolerant* (SIFT), calcula se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína com base na homologia de sequências e as propriedades físicas dos aminoácidos.

O *Multivariate Analysis of Protein Polymorphisms-Mismatch Repair* (MAPP-MMR), neste software cada aminoácido no alinhamento multisequencial de ortólogos de *MLH1* ou *MSH2* têm suas propriedades físico-químicas calculadas, com média e desvio padrão, conforme o aparecimento de cada aminoácido no alinhamento (CHAO et al. 2008). A substituição de um aminoácido por outro que leve a um grande escore indica que o novo aminoácido é muito diferente dos outros que aparecem na posição durante o alinhamento multisequencial, e que, portanto, possivelmente afeta a função da proteína.

4.1.2 Rastreamento das alterações em uma população controle

Amostras de DNA de voluntários saudáveis, sem histórico de câncer na família armazenadas no biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, foram solicitadas para averiguação das VUS para os genes *MLH1* e *MSH2*, com o objetivo de rastrear a presença destas em uma população controle. Neste ensaio a identificação das variantes na população controle é sugestiva de que a mesma não está relacionada com a doença.

Para realização da PCR os iniciadores foram desenhados com aproximadamente 70b do limite éxon-intron das mutações, possuindo um conteúdo CG em torno de 50%, com no mínimo de 15 bases e com no máximo 2^oC de diferença entre as temperaturas de alinhamento dos pares de iniciadores. Os iniciadores foram desenhados no programa *OLIGOTECH*, versão 1.00 (Oligos Etc. Inc. e Oligo Therapeutics Inc. 1995), no qual foi avaliada a formação de estruturas secundárias (loops) e homodímeros. Todos os iniciadores foram solubilizados a uma concentração estoque de 100 µM, e alíquotas de 10 µM foram utilizadas na PCR.

O sequenciamento direto dos produtos de PCR de todos os éxons de *MLH1* e *MSH2* foi realizado a partir de 2.5 µl da PCR tratada (± 50 ng) com Exonuclease I e Fosfatase Alcalina, a reação de *Exo-Sap IT* (USB Molecular Biology), onde restos de iniciadores e DNA fita simples são digeridos. O mesmo par de iniciadores utilizado para gerar o fragmento foi utilizado para o sequenciamento direto com 0,5 µl de *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado no Sequenciador Automático de DNA, *AbiPrism 3130* (Applied Biosystems). A análise das sequências obtidas foi realizada no programa *CLC Genomics Workbench* (CLC bio), utilizando as sequências de referência para *MLH1* (NM_00249) e *MSH2* (NM_000251).

4.2 CLONAGEM E MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

4.2.1 Obtenção de cDNA específico a partir de RNA total

Para a construção do cDNA dupla fita, o RNA total de um voluntário sadio, sem histórico de câncer familiar, previamente sequenciado para hMLH1 e hMSH2, foi tratado com *TURBO DNase* (Ambion), para degradar DNA contaminante. A verificação da presença de DNA contaminante, após o tratamento com DNase foi realizada com primers intrônicos para MLH1. O aparecimento de uma banda, nesta reação indica a necessidade de novo tratamento com DNase. A seguir 1 ug de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA com iniciadores específicos dos genes *MLH1* (MLH1-TR) e *MSH2* (MSH2-TR), conforme instruções do fabricante, *ImProm-II™ Reverse Transcriptase* (Promega). OS cDNAs obtidos de *MLH1* e *MSH2* foram utilizados como molde para a síntese dos fragmentos utilizada na clonagem.

4.2.2 Subclonagem dos fragmentos do cDNA full length

A estratégia de clonagem adotada envolveu, primeiramente, a geração de dois fragmentos para cada gene. Os fragmentos possuíam uma região de *overlapping* (região comum), com sítio de restrição único. Nesta primeira etapa, os fragmentos foram gerados por PCR, utilizado como template o cDNA sintetizado a partir do voluntário sadio, que teve seus genes *MLH1* e *MSH2* sequenciados completamente. Os iniciadores e condições utilizadas estão no Quadro 1. Conforme pode ser visto na tabela, os fragmentos para cada gene foram divididos em A e B e a síntese de cada

fragmento envolve a utilização de dois iniciadores, em que o iniciador *forward* A (Fa) possui um sítio de restrição para a enzima KpnI, e o reverso A não possui sítio de restrição. No fragmento B o iniciador *forward* B (Fb) não possui sítio de restrição, entretanto o reverso B (Rb) possui um sítio de restrição para a enzima XbaI. Esta abordagem de iniciadores Fa e Rb possuírem sítios de restrição foi utilizada para a ligação dos fragmentos ao vetor de expressão pcDNA3.1A, na segunda etapa.

Após a síntese dos fragmentos, estes foram clonados utilizando o *InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit* (Fermentas). Este kit de clonagem utiliza um vetor linearizado, o pTZ57R/T (2886 pb), que possui em ambas as extremidades 3' uma timina extra desfosforilada, prevenindo a recircularização do vetor durante a ligação, aumentando o rendimento da clonagem. A timina extra nas extremidades também facilita a clonagem direta de produtos de PCR, visto que DNA polimerases que perderam a atividade exonuclease 3'-5' (*proofreading*), possuem a atividade de desoxinucleotidil-transferase, adicionando adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado. Após a ligação, foi realizado a transformação em bactérias *E. coli*, eletrocompetentes *DH10β*. Os iniciadores do vetor M13Fw e M13Rv foram utilizados para a PCR de seleção dos clones, com análise inicial em gel de agarose. Os clones inicialmente selecionados foram confirmados por sequenciamento direto, utilizando os iniciadores do vetor (M13Fw e M13Rv) e iniciadores do inserto.

Os clones selecionados por sequenciamento foram digeridos com enzimas de restrição para os sítios únicos localizados na região de

sobreposição entre os fragmentos. Para os fragmentos *MLH1* foi usada a enzima *KpnI*, *XbaI* e *XmaI* e para *MSH2* *KpnI*, *HindIII* e *XbaI*. Os fragmentos digeridos foram purificados e ligados ao vetor de expressão pcDNA3.1A.

4.2.3 Clonagem do cDNA *full length*

Os clones sequenciados e confirmados na etapa 1, foram digeridos e ligados ao pcDNA 3.1/myc-His A para obtenção do cDNA *full length* dos genes. O pcDNA3.1/myc-His A INVITROGEN (5.5 kb) é um vetor de expressão derivado do pcDNA3.1(+) e desenhado para ter um alto nível de expressão, purificação e detecção de proteínas recombinantes em células de mamíferos. A clonagem do cDNA *full length* foi realizada sem o stop códon dos genes, assim as tags c-terminal codificando o epítipo myc (c-myc) e uma cauda de polihistidina (6 aminoácidos), foram incorporadas as proteínas recombinantes dos constructos de hMLH1 e hMSH2. Isto possibilita o uso de anticorpos dirigidos a estas tags. Após a ligação ao pcDNA3.1/myc-His A, o produto foi novamente transformado em *DH10 β* e os clones foram selecionados por PCR com os iniciadores do vetor (T7Fw e BGHRv). Após análise em gel de agarose, os clones de interesse foram sequenciados diretamente com iniciadores do vetor e do inserto.

4.2.4 Mutagênese Sítio-dirigida

As alterações selecionadas para estudo foram construídas por meio de mutagênese sítio-dirigida, com *QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit* (Cat #200555, Agilent Technologies). A presença das

alterações foi confirmada por sequenciamento direto, com iniciadores do inserto que flanqueiam a região, e outros internos, pertencentes ao inserto.

Resumidamente, os vetores construídos anteriormente contendo o cDNA dos genes *MLH1* e *MSH2* selvagem, foram utilizados como moldes para a reação de mutagênese. Os iniciadores *forward* e *reverse*, ambos desenhados com a mutação de interesse, anelaram-se a sequência alvo no vetor e com o aumento da temperatura ocorreu a extensão dos iniciadores pela polimerase *PfuUltra high fidelity* gerando um plasmídeo com a alteração de interesse. A reação de mutagênese foi então tratada com a endonuclease *DpnI* (sequência de reconhecimento: 5' Gm₆ATC-3'), uma enzima de restrição que é utilizada porque reconhece e digere DNA metilado ou hemimetilado, clivando desta forma apenas o vetor parental. O vetor mutado, recém sintetizado, contendo a mutação desejada não é metilado, a reação foi então purificada utilizando a resina Strataclean. O produto da reação purificado foi transformado por eletroporação em *E. coli*, cepa *XL10-blue* ou *DH10β*.

Quadro 1 - Desenho dos iniciadores utilizados para a mutagênese sítio-dirigida. Em negrito é mostrado a localização das alterações.

Gene	Alteração	Iniciador	Sequência
MLH1	c.2027	Senso	5'-gaaaaggaatgttttgaaagcc C cagtaaagaatgcgctatgttc-3'
	T>C	Antisenso	5'-gaacatagcgcattcttactg G ggcttcaaacattccttttc-3'
MSH2	c.2187	Senso	5'-agtctccacgttcatggctgaaatt T tgaaactgctt-3'
	G>T	Antisenso	5'-aagcagttccaa A atttcagccatgaacgtggagact-3'

4.2.5 Transformação bacteriana

Após a clonagem dos fragmentos ou do cDNA *full length* ao vetor de interesse, a ligação foi dialisada em membrana Millipore (Millipore, CAT. NO.:VSWP02500). Após a ligação 2 μ l desta foi utilizado para a transformação das cepas de bactéria *DH10 β* (Invitrogen) ou *XL10-blue* (*Stratagene*) por eletroporação (Electroporator 2510, Eppendorf).

A cepa *DH10 β* possui genótipo: $\Delta(\textit{araABC-leu})7697$ *araD139 deoR endA1 galK galU $\Delta(\textit{lac})X74 mcrA \Delta(\textit{mcrCB-hsdSMR-mrr}) nupG recA1 rpsL(\textit{Strr}) (\phi 80 lacZ\Delta M15)$* . Enquanto que a cepa *XL10-blue* possui genótipo *Tetr $\Delta(\textit{mcrA})183 \Delta(\textit{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacHte [F' proAB lacIqZ\Delta M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]$* O marcador genotípico *mcrAE* e *mcrBC*, *mrr* deleção fazem desta cepa adequada para a clonagem de DNA que contém metilcitosina e metiladenina.

4.2.6 Purificação dos plasmídeos

A purificação dos plasmídeos foi realizada conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Plasmídeos purificados em mini-preparação foram utilizados para sequenciamento direto ou mutagênese sítio-dirigida. Enquanto plasmídeos purificados em maxi-preparação [Maxiprep Endofree (cat#12362)] foram utilizados para transfecção transitória.

Resumidamente, a purificação dos plasmídeos foi realizada conforme protocolo do fabricante. A partir de uma única colônia selecionada, foi obtido um pré-inócuo que cresceu por volta de 8 horas em agitador por 250 rpm a

37⁰C. Este pré-inócuo foi diluído 1:1000 em meio de cultura LB com ampicilina e incubado overnight. A seguir, o inócuo foi precipitado e o pellet formado, sofreu lise alcalina, que foi neutralizada. Após, o lisado foi filtrado e extensivamente lavado, e incubado com tampão para remoção de endotoxinas, no caso de *Maxiprep Endofree*. O DNA plasmidial foi precipitado e eluído em água. A quantificação foi realizada pelo *Nanodrop* e alíquotas de uso único foram preparadas e armazenadas no -20⁰C.

4.2.7 Sequenciamento dos plasmídeos

Toda etapa de ligação e mutagênese sítio-dirigida foi seguida por sequenciamento direto do DNA plasmidial. Após a purificação dos plasmídeos, 300 ng de DNA plasmidial foi submetida a gel de agarose 1% para verificação da integridade, tamanho e quantidade real dos clones gerados. Por conseguinte, 300 ng de plasmídeo foram sequenciados. Os iniciadores do inserto e do vetor foram utilizados para o sequenciamento direto, com 0,5 µl de *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems, SP, Brasil). O sequenciamento foi realizado no Sequenciador Automático de DNA, ABI 3130xl (Applied Biosystems). A análise das sequências obtidas foi realizada no programa *CLC Genomics Workbench* (CLC bio), utilizando as sequências de referência para MLH1(NM_000249) e MSH2(NM_000251).

4.3 ENSAIOS FUNCIONAIS

4.3.1 Cultura de Células

Para os ensaios funcionais foram escolhidas linhagens de células de câncer de cólon humano, utilizadas em trabalhos de caracterização de variantes em *hMLH1* e *hMSH2*. Todas as linhagens foram adquiridas para este estudo no ATCC (american type culture collection). A linhagem HCT-116 (ATCC CCL-247™) e SW-480 (CCL-228™) são células de câncer de cólon humano, sendo cultivada em *RPMI-1640*, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Enquanto que LoVo (CCL-229™) são células de adenocarcinoma de cólon humano, cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10 % de soro de fetal bovino. A linhagem HCT-116 não expressa a proteína hMLH1, enquanto a LoVo não expressa hMSH2, já SW-480 expressa hMLH1 e hMSH2. Os plasmídeo de expressão purificados contendo os cDNA *full length MLH1* ou *MSH2* (pcDNA3.1/myc-His A) foram transfectados em células HCT-116 e LoVo, respectivamente, com *Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent* segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

Como controle para os experimentos foram utilizados as linhagens HCT-116 ou LoVo, transfectadas com o plasmídeo contendo o cDNA do gene selvagem, e a linhagem SW-480 que expressa ambas as proteínas.

Quadro 2 - Linhagens de adenocarcinoma humanos utilizadas para os estudos funcionais. Suas características moleculares são apresentadas e referências

Linhagem	ATCC	Tipo histológico	Gene	Referência
SW-480	CCL-228™	Adenocarcinoma de cólon humano	MLH1 (+/+), MSH2 (+/+)	Gayet et al. 2001
HCT-116	CCL-247™	Adenocarcinoma de cólon humano	MLH1 (-/-) Mutação nonsense (stop códon no éxon 9)	Brieger et al. 2002; Gayet et al. 2001
LoVo	CCL-229™	Adenocarcinoma de cólon humano	MSH2 (-/-) Deleção do éxon 3 ao 8	Brieger et al. 2002

4.3.2 Transfecção transitória

Com o objetivo de otimizar a transfecção dos plasmídeos nas linhagens escolhidas foi realizado inicialmente um ensaio para determinar a quantidade de plasmídeo e lipofectamina a serem utilizados. O pcDNA3.1/myc-His/LacZ é fornecido como vetor controle positivo para a transfecção e expressão em células de mamíferos. Sendo utilizado para otimizar as condições de transfecção de linhagens celulares. As células de mamíferos transfectadas com o pcDNA3.1/myc-His/LacZ expressão β -galactosidade sob ação do promotor CMV. Uma transfecção eficiente resulta na expressão de β -galactosidade que pode ser facilmente quantificada. As células que expressão β -galactosidade após serem fixadas e reveladas apresentam uma cor azul, podendo ser facilmente quantificadas. O percentual de transfecção é obtido pelo número de células transfectadas “azuis” em relação ao número de células totais multiplicado por 100.

4.3.3 Expressão das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes e suas variantes nas linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano ATCC foi realizada conforme segue descrito: 2×10^5 células/ml foram plaqueadas em placas de 6-well, após 24 horas, as células foram transitoriamente transfectadas com 4 μ g de vetor (selvagem, mutante ou vetor vazio) e 16 μ l de *lipofectamine 2000*. 48 horas após a transfecção, as células foram coletadas por tripsinização, lavadas com PBS estéril. O extrato protéico total foi obtido por incubar as células por 30 minutos no gelo com tampão *RIPA* (RadiolImmunoPrecipitation Assay [50mM Tris HCl pH 8.0 150 mM NaCl 1% Nonidet-P40, 0.5% de Deoxicolato de sódio, 0.1% de SDS 1X Inibidor de protease (Complete Mini, Roche) e 1X Inibidor de fosfatase (PhosSTOP, Roche)]). A suspensão celular foi centrifugada 14.000 rpm por 30 minutos a 40°C, após o sobrenadante foi coletado e armazenado. A concentração de proteína foi determinada utilizando *BioRad Protein Assay* (BioRad), de acordo com as especificações do fabricante, com o uso de *BSA* (Bovine Serum Albumine, Sigma) como padrão.

Os níveis de expressão e os tamanhos corretos das proteínas recombinantes foram examinados em gel de SDS-poliacrilamida 8% (SDS-PAGE) e análise de *western blotting*. Resumidamente, as amostras de proteínas (40 μ g) por poço, foram sujeitas a eletroforese em gel denaturante de SDS-poliacrilamida 8%. As bandas de proteína foram transferidas para membranas de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) (BioRad) e o *Western blot* realizados com anticorpos anti-MLH1 (BD - clone G168-728) ou anti-MSH2

(Calbiochem - clone Fe11), na diluição de 1:1000. O anticorpo anti-mouse (ECL anti-mouse HRP clone Na931, GE Healthcare), na diluição de 1:3000, foi utilizado como anticorpo secundário. As bandas imunocoradas foram visualizadas utilizando Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore), como substrato para a reação da peroxidase.

A quantidade de proteína naturalmente expressa, GAPDH (anti-GAPDH, clone 3E8AD9, Invitrogen) ou PCNA (anti-PCNA, mAB#2586) foram utilizados como controle de carregamento quando os níveis de expressão das variantes produzidas foram comparados.

4.3.4 Co-imunoprecipitação de hMLH1 e hPMS2

A co-imunoprecipitação foi realizada com o *Protein G Immunoprecipitation Kit* (Sigma, cat#IP50-1KT), conforme protocolo do fabricante. Resumidamente 1mg de extrato total das células transfectadas transitoriamente, foi submetido a uma etapa de limpeza, que consiste no tratamento do extrato com as *beads* de proteína G, para retirar ligações inespecíficas. Após lavagem e descarte das *beads* com ligações inespecíficas 2 ug (anti-MLH1, clone 168-728, BD Pharmigen) de anticorpo foi adicionado ao extrato, incubados *overnight* a 40⁰C. Seguido da adição de *beads*, incubados novamente, *overnight* a 40⁰C. O extrato foi lavado exaustivamente, por 5 vezes. O imunoprecipitado coletado, seguido de análise em SDS-PAGE 8% e *Western blot*, para seus parceiros funcionais, PMS2 (clone A16-4, BD Pharmigen).

4.3.5 Localização sub-celular das variantes

A localização das proteínas recombinantes foi verificada por meio de imunofluorescência indireta, com anticorpos dirigidos as proteínas alvo. Um total de 1×10^5 células/ml foram plaqueados em placas de 24 poços, contendo lamínulas previamente tratadas com poli-lisina 0.01%. 24 horas após o plaqueamento, as células foram transfectadas transitoriamente com 0,8 μg de vetor de expressão (selvagem, mutante ou vetor vazio), tendo como agente 3,2 μl de lipofectamina (*Lipofectamine* 2000 Reagente, Invitrogen). 48 horas seguidas a transfecção as células foram lavadas com *PBS* gelado, incubadas por 15 minutos com *PFA* 4% (Paraformaldeído, cat# P1648, Sigma). Novamente lavadas 3X com *PBS* e feito bloqueio dos sítios aldeídos livres com glicina (cat#15527-013, Invitrogen) 0.1 M, por 30 minutos. Lavadas 3X com *PBS*, as células foram permeabilizadas com TritonTM X-100 (cat# 8787, Sigma) 0.5% por 15 minutos. Seguido de nova lavagem com *PBS* e bloqueio de sítios inespecíficos com *BSA* 2% (cat# A2153, Sigma) por 30 minutos. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com os anticorpos primários anti-MLH1 (BD - clone G168-728) ou anti-MSH2 (Calbiochem - clone Fe11), na diluição de 1:1000, a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente com *PBS*, e incubadas com anticorpo secundário por 1 hora e em seguida as lâminas foram montadas. Para MLH1, o anticorpo secundário foi o *Alexa Flúor 546 Goat Anti-Mouse IgG* (H+L) (cat# A11003, Invitrogen), sendo utilizado meio de montagem com *DAPI*, para marcação de núcleos (Vectashield[®] with *DAPI*, cat# H-1200, Vector Laboratories). Enquanto, para MSH2 o anticorpo secundário foi o

Alexa Flúor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (cat#A11003, Invitrogen), os núcleos foram marcados com *DRAQ5™ Fluorescent Probe* (cat#62254, Thermo Scientific). As lâminas foram montadas com *FluorSave™ Reagent* (cat#345789, Calbiochem).

4.4 ANÁLISE DA PRESENÇA DE OUTRAS ALTERAÇÕES GENÔMICA

4.4.1 Avaliação de rearranjos genômicos

A presença de rearranjos para os dois pacientes foi realizada por meio da técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (MRC Holland). O kit SALSA MLPA probemix P003-C1 MLH1/MSH2 contém sondas para os 19 éxons de hMLH1 e para os 16 éxons de hMSH2, além de sondas para a região 3' do último éxon de EPCAM. Isto porque deleção deste éxon está envolvida com silenciamento de hMSH2.

A reação MLPA pode ser dividida em cinco etapas principais, dentre as quais: desnaturação do DNA e hibridação de sondas MLPA, reação de ligação, PCR, separação dos produtos amplificados por eletroforese, e a análise dos dados. Um total de 100 ng de DNA foi utilizado para o MLPA, em um volume total de reação de 50 µl. Os produtos da reação de MLPA foram identificados por meio do sequenciador *ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems)*, com filtros específicos, conforme protocolo desenvolvido pela *MRC Holland*, detentora do MLPA.

Após sequenciamento os fragmentos gerados foram analisados pelo *software* MRC Coffalyser (MRC Holland). Os resultados foram expressos como a razão entre a área do pico de cada região identificada pela sonda sobre a média das áreas correspondentes, em amostras controles sabidamente negativas para rearranjos gênicos. Razões entre 0,7 e 1,3 foram consideradas normais, enquanto que menor que 0,7 foi considerada indicativa de deleção, e quando maior ou igual a 1,3, sugestiva de duplicação.

4.4.2 Preparação das bibliotecas e Sequenciamento de regiões alvo

HaloPlex Target Enrichment System (*Agilent Technologies*), consiste em uma técnica para o sequenciamento de regiões alvo. Essas regiões alvo são delimitadas por sondas, dessa forma um painel customizado de genes envolvidos em síndromes hereditárias de câncer foi criado. Neste painel há 17 genes (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *CTNNB1*, *ECAD*, *FANCI*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51* e *TP53*). Este painel foi customizado para cobrir os principais genes da síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (HBOC) e SL, além de outros genes cujas mutações podem predispor ao aparecimento de tumores.

De forma geral o protocolo consiste de 5 etapas, como segue.-: Amostras de DNA genômico (200 ng) foram digeridas por 16 diferentes enzimas de restrição, para criar uma biblioteca de fragmentos de restrição de gDNA (DNA genômico). Os fragmentos gerados nesta etapa foram submetidos a uma etapa de controle de qualidade que é a corrida em um

chip High Sensitivity DNA no 2100 Bioanalyzer System, os fragmentos devem estar na faixa de 100 a 400 pares de base. Na segunda etapa, a biblioteca de gDNA é hibridizada com as sondas customizadas do *Haloplex*, resultando na circularização dos fragmentos. A terceira etapa, foi caracterizada pela captura das sondas hibridizadas com os fragmentos da biblioteca. Essa captura é facilitada pela presença de biotina nas sondas, facilitando a captura pelas *beads* de estreptavidina. Em seguida, é feita uma reação de PCR para amplificação das regiões alvo.

O sequenciamento massivo paralelo foi realizado na plataforma *Ion Personal Genome Machine*® (PGM™) System (*Life Technologies*). O sequenciamento nessa plataforma ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH da solução onde ocorre a reação de sequenciamento. Quando há a incorporação de uma base, uma molécula de hidrogênio é liberada, alterando assim, o pH da solução, e permite a identificação de um sinal dessa pequena alteração pelo software do equipamento.

As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de referência, com a utilização do programa *CLC Genomics Workbench*. Alterações que: a) apresentarem ao menos 50 sequências cobrindo a base alterada, b) tiverem essa alteração em no mínimo 15% das sequências foram anotadas e verificadas por sequenciamento capilar.

5 RESULTADOS

5.1 PREDIÇÃO DE PATOGENICIDADE *IN SILICO*

Para a análise inicial das alterações de estudo foram escolhidos três programas de predição de patogenicidade, SIFT, Polyphen-2 e MAPP-MMR. O SIFT e o Polyphen-2 podem ser utilizados para diversos genes, e o MAPP-MMR é exclusivo para genes do sistema MMR (MLH1 e MSH2). Os três programas foram concordantes quanto à análise das alterações, duas alterações foram classificadas como patogênicas uma em *MLH1* (Leu676Pro) e a outra em *MSH2* (Met729Ile). A alteração Thr8Met, em *MSH2* foi classificada como não patogênica pelos programas de predição.

Baseado nos dados *in silico*, realizamos um rastreamento em 96 amostras de DNA de voluntários sadios, sem histórico de câncer na família, para eliminar a possibilidade de serem polimorfismos frequentes em nossa população. Esse rastreamento consistiu no sequenciamento das regiões exônicas específicas onde estão localizadas as alterações, no caso, éxon 18 de *MLH1* (Leu676Pro) e éxons 1 (Thr8Met) e 13 (Met729Ile) de *MSH2*. As alterações classificadas como patogênicas na análise *in silico* (*MLH1* Leu676Pro e *MSH2* Met729Ile) não foram encontradas nessa população controle. Entretanto, a alteração *MSH2* Thr8Met, classificada como não patogênica nos programas de predição, foi encontrada em duas amostras dos indivíduos controles. A concordância dos dados *in silico*, com a

presença da alteração *MSH2* Thr8Met na população controle, sugere que se trata de um polimorfismo, portanto não relacionado com a doença. Dessa forma, essa alteração foi retirada dos ensaios *in vitro*. Para as variantes hMLH1 e hMSH2 aumentamos o número de amostras para 280, sendo que as variantes não foram encontradas. A tabela a seguir apresenta as características dos portadores e dados referentes as variantes.

Tabela 1 - Dados das alterações missenses encontradas em *MLH1* e *MSH2*, com os dados das trocas de nucleotídeos e aminoácidos.

Gene	Nucleotídeo	Aminoácido	Critério clínico	SIFT	Polyphen-2	MAPP-MMR	População controle
MLH1	c.2027 T>C	p.Leu676Pro	Amsterdã I	Afeta função	Poss. prej	17,72	0/280
MSH2	c.23 C>T	p.Thr8Met	Bethesda	Benigna	Tolerante	0,00	2/96
	c.2187 G>T	p.Met729Ile	Amsterdã I	Afeta função	Poss. prej	21,99	0/280

Análise *in silico* com os principais programas de predição de patogenicidade: SIFT, Polyphen-2 e MAPP-MMR. Escore MAPP-MMR: 0-2 neutras, 3-5 borderline, > 5 patogênicas. Poss. Prej (possivelmente prejudicial)



Figura 3 - Sequenciamento de 96 amostras de DNA controle de voluntários sem histórico de câncer familiar, para rastreamento da presença das alterações de estudo em indivíduos saudáveis. Cromatogramas estão alinhados em relação a sequência de referência de *MSH2*, o segundo cromatograma apresenta uma troca de citosina para timina na posição 23. Esta alteração foi encontrada em duas amostras de DNA controle.

5.2 HEREDOGRAMA DOS PACIENTES PORTADORES DAS ALTERAÇÕES EM *hMLH1* Leu676Pro E *hMUNOPRECIPITAÇÃO* *MSH2* Met729Ile E LOCALIZAÇÃO NO DOMÍNIO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS

A alteração em *MLH1*, Leu676Pro foi encontrada em uma paciente que preencheu critério clínico de Amsterdã I, apresentando câncer de cólon aos 42 anos e de mama aos 50 anos, como observado no heredograma a seguir. (Figura 4). Esta substituição do aminoácido leucina por prolina no

códon 676, está localizada no domínio responsável pela interação com hPMS2 e hPMS1 (Figura 6).

A variante de *MSH2*, Met729Ile, também foi encontrada em paciente que preencheu critério de Amsterdã I, apresentando câncer de cólon aos 71 anos. A análise de imunistoquímica para MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 foi positiva para ambos os complexos. Na figura 5, podemos ver o heredograma resumido da família. Esta alteração está localizada no códon 729, sendo a troca de uma metionina por isoleucina, no domínio ATPase (Figura 7).

Para ilustrar a conservação dos aminoácidos nas posições entre espécies diferentes, alinhamos seis sequências, provenientes de seis espécies diferentes, obtidas no GenBank (figura 6 e 7). Os programas de predição de patogenicidade, utilizados anteriormente, são capazes de realizar alinhamentos múltiplos entre milhares de sequências.

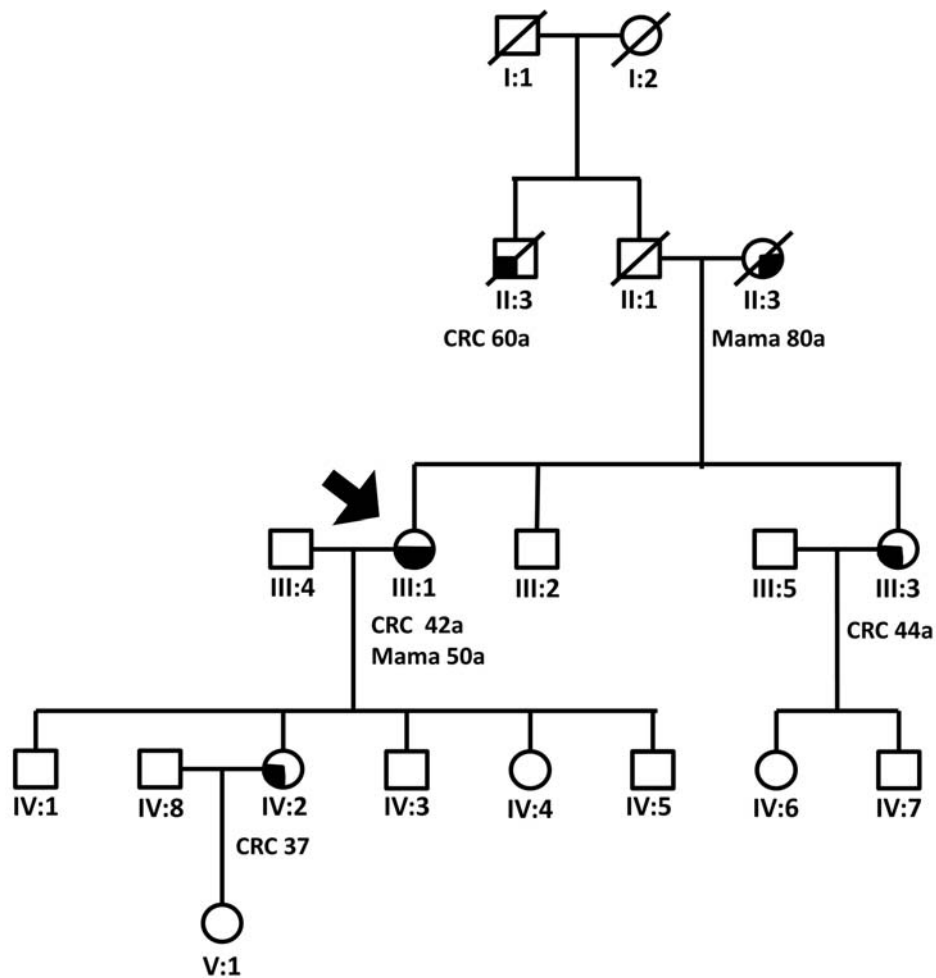


Figura 4 - Heredograma do paciente portador da alteração *MLH1* Leu676Pro, demonstrando sistema de órgãos acometido e idade de diagnóstico. O probando é indicado pela seta. Algarismo romano indica a geração, a idade do diagnóstico é demonstrada ao lado do tipo de câncer: colorretal (CCR), mama.

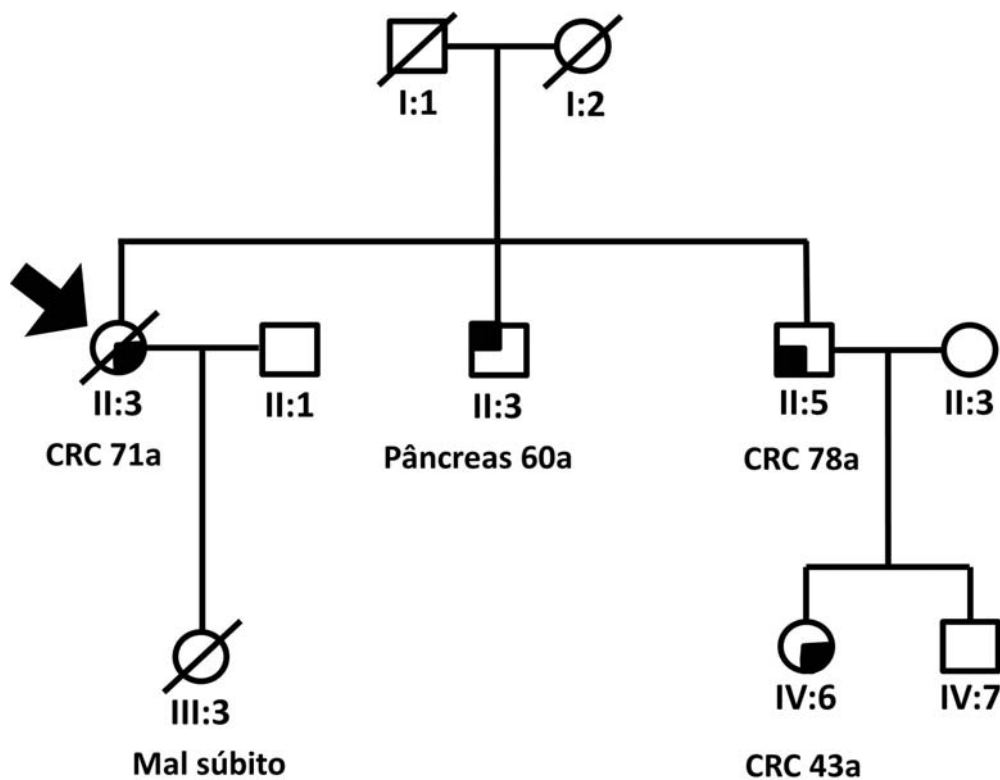


Figura 5 - Heredograma resumido do paciente portador da variante *MSH2* Met729Ile, demonstrando sistema de órgãos acometido e idade de diagnóstico. O probando é indicado pela seta. Algarismo romano indica a geração, a idade do diagnóstico é demonstrada ao lado do tipo de câncer: colorretal (CCR), pâncreas.

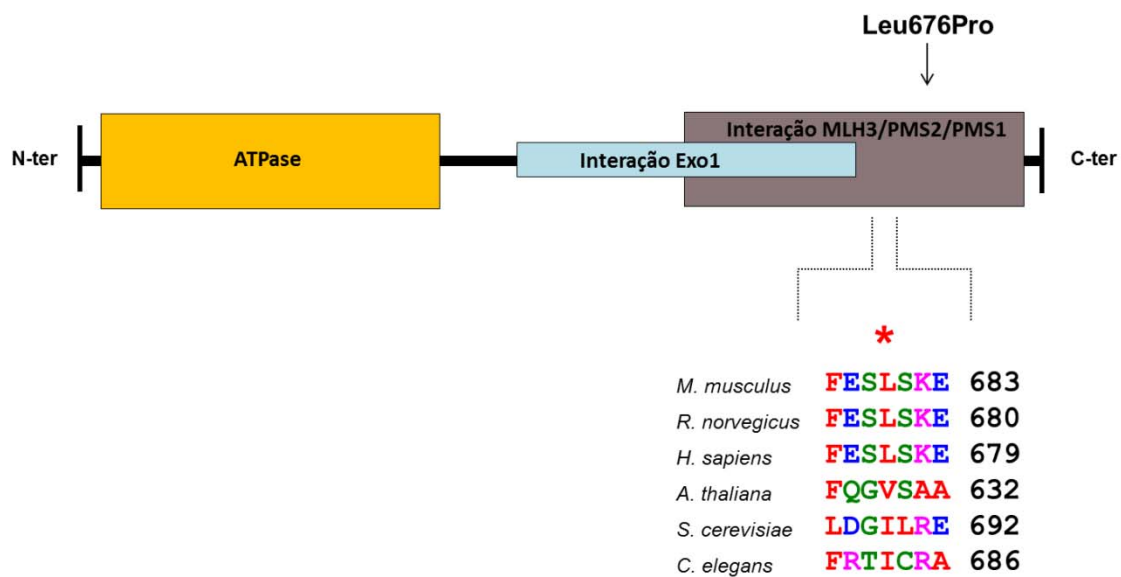


Figura 6 - Esquematização dos domínios funcionais da proteína hMLH1. A alteração Leu676Pro está localizada no domínio funcional responsável pela interação com PMS2, PMS1 e MLH3. Na mesma posição, está apresentado o alinhamento da sequência de 8 aminoácidos, construído pelo programa Clustal W, mostrando grande conservação entre espécies. Os números se referem as posições relativas ao último aminoácido.

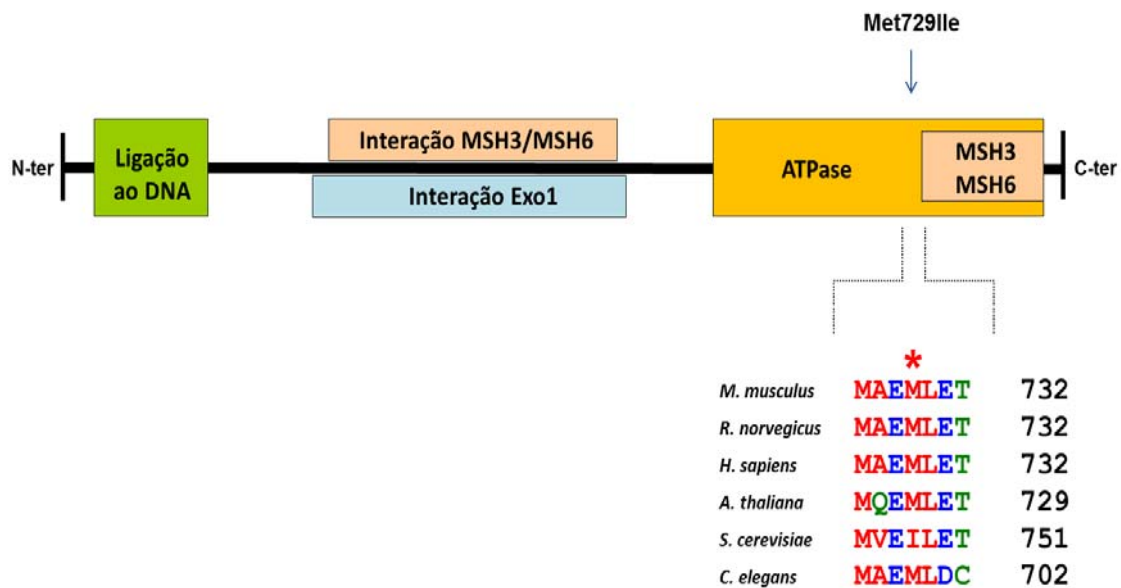


Figura 7 - Esquematização dos domínios funcionais da proteína hMSH2. A alteração Met729Ile está localizada no domínio funcional responsável pela atividade ATPase. Na mesma posição, está apresentado o alinhamento da sequência de 7 aminoácidos, construído pelo programa Clustal W, mostrando grande conservação entre espécies. Os números se referem as posições relativas ao último aminoácido.

5.3 CLONAGEM DOS GENES SELVAGENS

O DNA de um voluntário sadio, sem histórico de câncer na família, previamente sequenciado para os genes *MLH1* e *MSH2* foi re-sequenciado para confirmação da classificação selvagem para ambos genes. Após a confirmação dos dados do sequenciamento, uma amostra de RNA total, do mesmo voluntário, serviu como molde para a síntese de cDNA. Para esta síntese foi utilizado iniciadores específicos dos genes.

Com a obtenção dos cDNAs, a estratégia de clonagem adotada foi realizada em duas etapas, onde a primeira consistiu na síntese de dois fragmentos para cada gene, estes fragmentos 1 e 2, possuem uma região em comum sobreposta e que possui um sítio único de enzima de restrição, que são para *XmaI* e *HindIII*, para *MLH1* e *MSH2*, respectivamente. Após a obtenção destes fragmentos, foram sub-clonados no plasmídeo pTZ57R/T, para posteriormente serem purificados e inseridos no vetor de expressão.

A segunda etapa foi composta pela digestão dos fragmentos e ligação ao vetor de expressão, pcDNA3.1 HisA. Na extremidade 5' do fragmento 1 foi inserido, através de PCR, um sítio de enzima de restrição para *KpnI*, e, na extremidade 3' do fragmento 2 foi inserido um sítio de *XbaI*. Estes sítios de enzima de restrição inseridos são ferramentas úteis para tornar a clonagem no vetor de expressão mais fácil. Todas as etapas de síntese e digestão foram confirmadas por sequenciamento direto dos fragmentos. Os fragmentos 1 e 2 de cada gene foram sequenciados e alinhados com as suas sequências de referência. Os vetores de expressão

de *MLH1* e *MSH2* foram obtidos pela ligação dos fragmentos ao pcDNA3.1 HisA, e confirmados por sequenciamento direto.

As Figuras 8 e 9 ilustram a estratégia de clonagem, e os iniciadores utilizados, para *hMLH1* e *hMSH2* respectivamente.

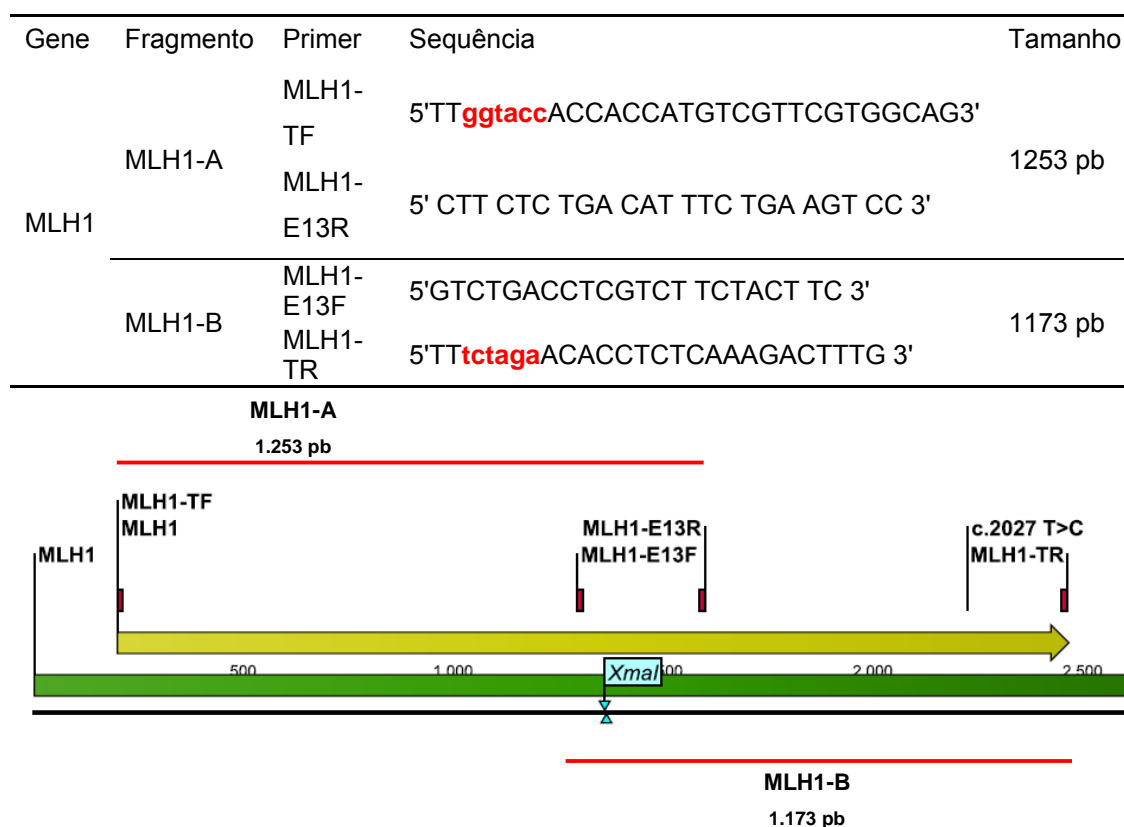


Figura 8 - Iniciadores utilizados para a síntese dos fragmentos 1 e 2 de *MLH1*. As condições utilizadas encontram-se presente na tabela. O sítio de enzima de restrição, *KpnI* está presente no fragmento 1 e para *XbaI* no 2, na tabela estão marcados com a cor vermelha. Conforme mostrado na figura os fragmentos compartilham o sítio de restrição para a enzima *XmaI*.

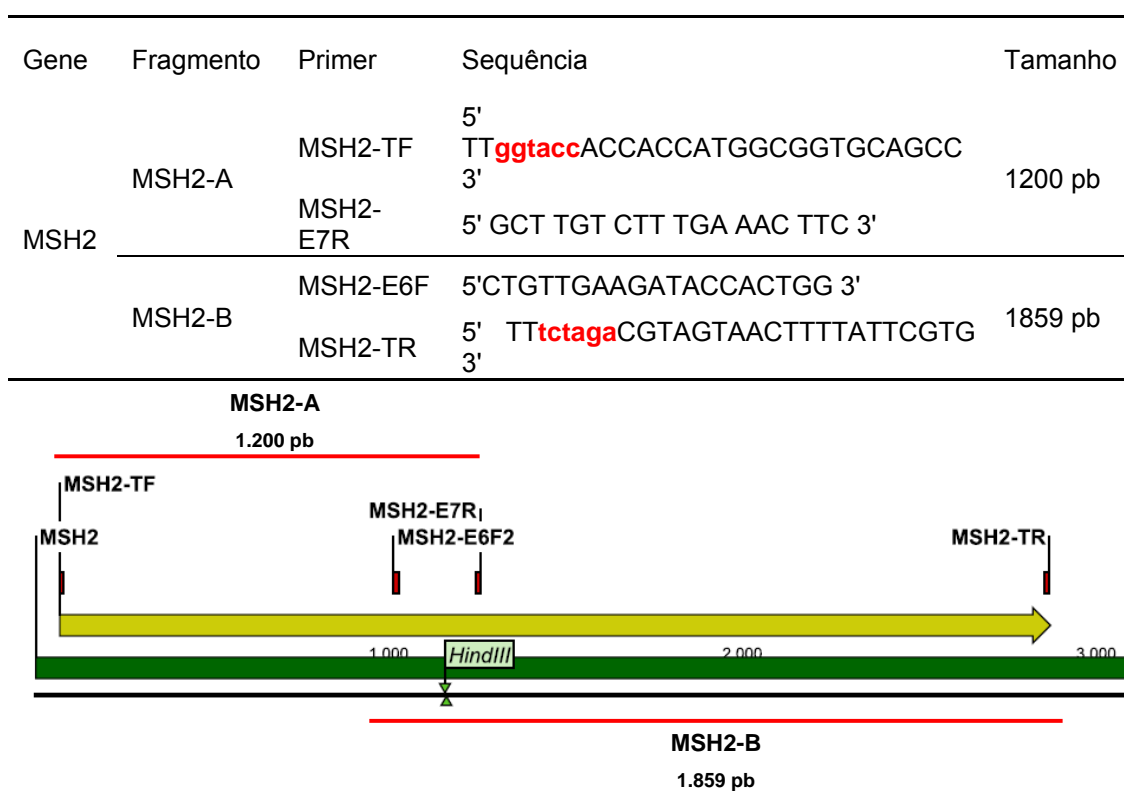


Figura 9 - Iniciadores utilizados para a síntese dos fragmentos 1 e 2 de *MSH2*. As condições utilizadas encontram-se presente na tabela. O sítio de enzima de restrição, *KpnI* está presente no fragmento 1 e para *XbaI* no 2, na tabela estão marcados com a cor vermelha.. Conforme mostrado na figura, os fragmentos compartilham o sítio da enzima de restrição para *HindIII*.

5.4 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA: CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO COM AS VARIANTES

Com a construção dos vetores de expressão dos genes selvagens, realizamos por mutagênese sítio-dirigida a geração das alterações em hMLh1 Leu676Pro e hMSH2 Met729Ile. Os plasmídeos construídos anteriormente foram utilizados como molde para a reação de mutagênese e a reação foi purificada e transformada em bactéria XL-blue. Após seleção e purificação dos plasmídeos, estes foram sequenciados para a confirmação da presença das alterações. A seguir é mostrado uma figura representativa construída com a sequência dos plasmídeos, evidenciando suas características, assim como os cromatogramas de sequenciamento das alterações (Figuras 10 e 11).

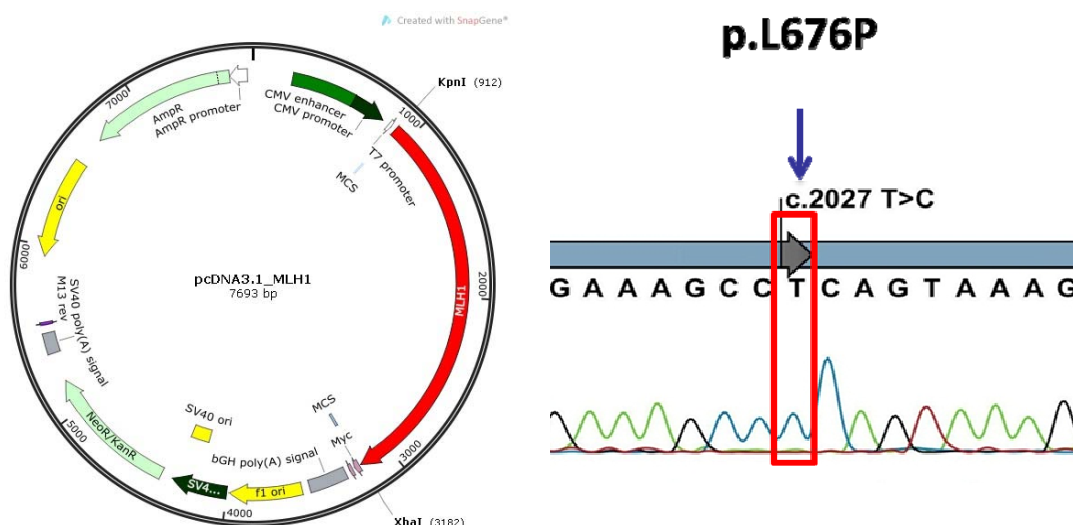


Figura 10 – Construção vetor der expressão MLH1. (A) Esquemática da construção do vetor, com 7,7 Kb. (B) Cromatograma confirmando a construção do vetor com a alteração c.2027 T>C em *MLH1*, originando a variante p. Leu676Pro.

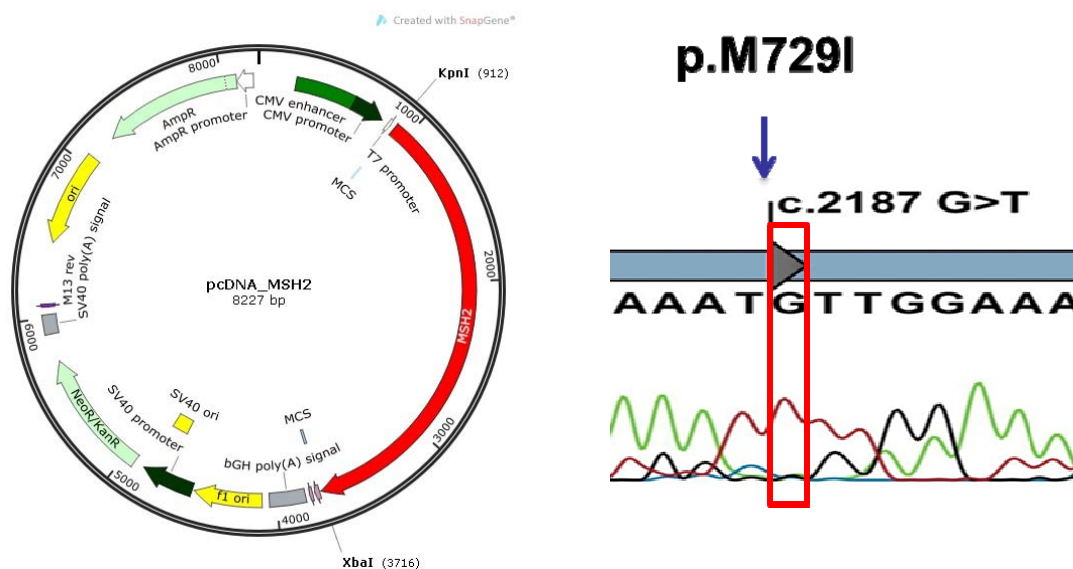


Figura 11 - Construção vetor der expressão MSH2. (A) Esquemática da construção do vetor de expressão para *MSH2*, com 8,2 Kb. (B) Cromatograma confirmando a construção do vetor com a alteração c.2187 G>T em *MSH2*, originando a variante p. Met729Ile.

5.5 EXPRESSÃO DOS CONSTRUCTOS DE *HMLH1* E *HMSH2* E SUAS VARIANTES EM MODELO CELULAR

Com a construção dos vetores de expressão contendo os insertos selvagens e as alterações de estudo, utilizamos um modelo experimental em linhagens de adenocarcinoma de cólon humano. Primeiramente, realizamos um *western blot* para verificar o conteúdo das proteínas do sistema MMR naturalmente expressas nas linhagens. Como mostrado pela Figura 12, a linhagem SW-480 expressa todas as proteínas de estudo, sendo utilizada como controle positivo. A linhagem HCT-116 não expressa hMLH1 e hPMS2, enquanto a LoVo não expressa hMSH2 e hMSH6. Assim, HCT-116 foi utilizada para a transfecção de hMLH1 e sua variante hMLH1 Leu676Pro e as células LoVo, foram transfectadas com hMSH2 ou hMSH2 Met729Ile.

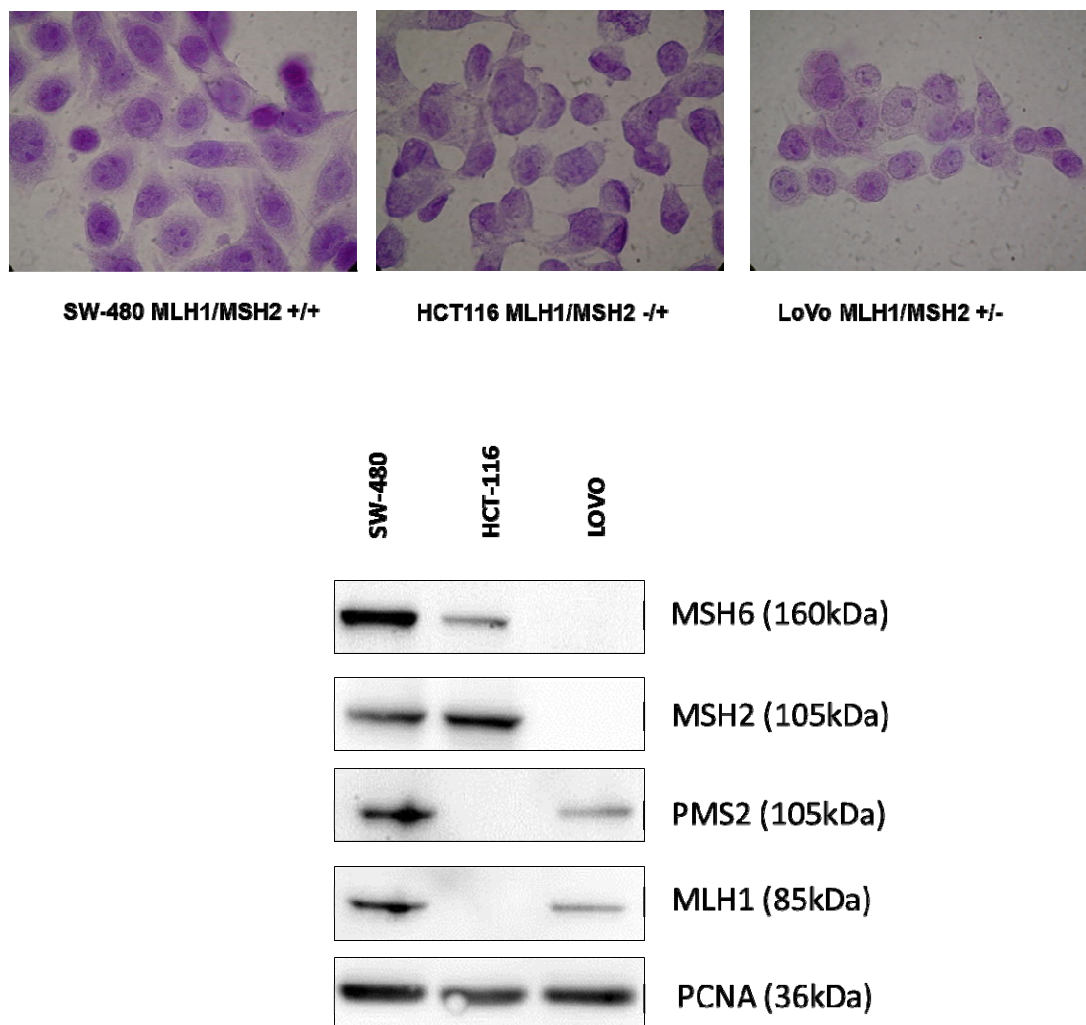


Figura 12 – Caracterização das linhagens celulares. (A) Coloração HE demonstrando a morfologia das linhagens de adenocarcinoma de cólon humano utilizadas para estudo. (B) Expressão basal do conteúdo de proteínas do sistema MMR das linhagens SW-480, HCT-116 e LoVo. Para o *western blot*, 40 ug de extrato total em gel de SDS-PAGE 8%. Os anticorpos foram utilizados na diluição de 1:1000, exceto anti-PCNA (1:2000).

5.6 EXPRESSÃO DAS VARIANTES DE HMLH1 Leu676Pro E HMSH2 Met729Ile

Escolhida a linhagem de estudo e os apropriados controles, expressamos as construções e suas variantes. Como controle positivo foi utilizado a linhagem SW-480 que expressa todos os componentes do sistema MMR e uma linhagem transfectada com o vetor de expressão dos genes selvagens. Para os controles negativos utilizamos as linhagens utilizadas para a transfecção que não expressão hMLH1 (HCT-116) e hMSH2 (LoVo), transfectadas com o plasmídeo sem inserto (*mock*). Como controle de carregamento das amostras GAPDH ou PCNA foram utilizados. A expressão e a imunoprecipitação (MLH1/PMS2) dos constructos de hMLH1 pode ser visualizada na Figura 13. A Figura 14 demonstra a expressão dos constructos de hMSH2 nas linhagens transfectadas.

A imunoprecipitação de hMLH1 com hPMS2 foi realizada com a co-transfecção de ambos os vetores, visto que HCT-116 também não expressa hPMS2. O extrato protéico total (1mg), foi imunoprecipitado com anticorpos anti-MLH1 ou anti-PMS2 e a presença do parceiro funcional, hPMS2, no precipitado foi verificada por *western blot*. As células LoVo transfectadas com hMSH2wt ou sua variante hMSH2 Met729Ile apresentaram igual expressão. Como estas células também não expressão hMSH6, não foi possível realizar a imunoprecipitação

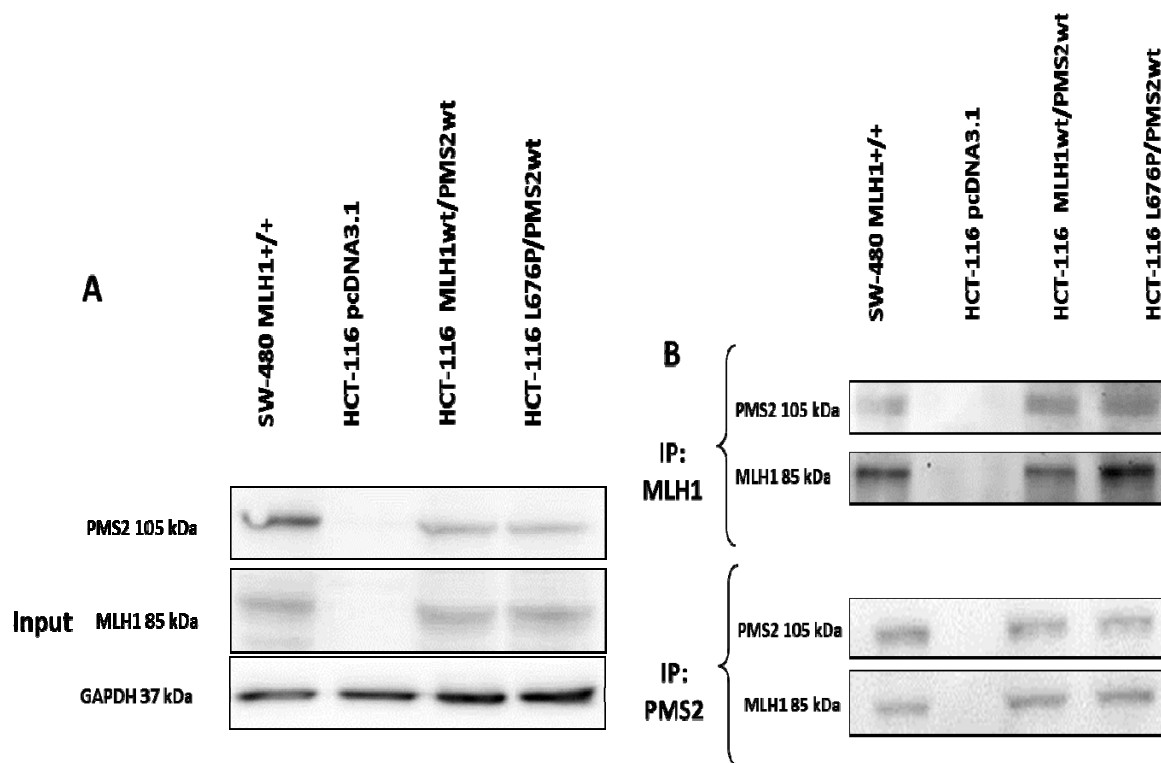


Figura 13 – Expressão e imunoprecipitação das construções de MLH1. (A) Expressão da variante hMLH1 Leu676Pro. A linhagem HCT-116 foi co-transfectada com PMS2 e o vetor de MLH1 selvagem (MLH1/wt) ou mutante (MLH1 Leu676Pro), 40ug de extrato foi submetido a SDS-PAGE 8%, e revelados com anticorpos anti-MLH1 e anti-PMS2, na diluição de 1:1000. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento dos extratos. SW-480 foi utilizada como controle positivo. (B) SDS-PAGE 8% dos imunoprecipitados dos extratos totais (1 mg) realizados com anti-MLH1 ou anti-PMS2. Demonstrando a presença de PMS2 nos imunoprecipitados.

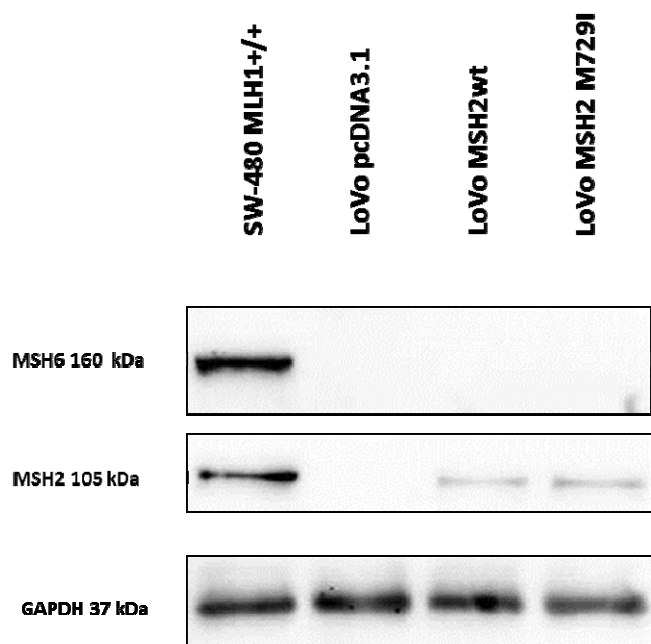


Figura 14 - Expressão da variante hMSH2 Met729Ile. A linhagem LoVo foi transfectada com hMSH2 selvagem ou hMSH2 Met729Ile. O extrato total (40 ug) foi submetido a SDS-PAGE 8% e revelados com anticorpos na diluição 1:1000 (anti-MSH2, anti-MSH6), e 1:3000 (anti-GAPDH).

5.7 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

As variantes foram transfectadas transitoriamente e após 48 h foi realizada a imunofluorescência indireta com anticorpos específicos dirigidos as proteínas hMLH1 (Figura 15) e hMSH2 (Figura 16). A marcação dos núcleos foi realizada com DAPI ou DRAQ5, a sobreposição de imagens, feita com o software livre GIMP (GNU Image Manipulation Program).

A alteração hMLH1 Leu676Pro marcou o núcleo igualmente ao selvagem, como demonstrado pela sobreposição das imagens com o DAPI. A alteração hMSH2 Met729Ile marcou tanto núcleo e citoplasma, padrão este, semelhante ao observado na linhagem transfectada com o vetor hMSH2 wt. Diferentemente, na linhagem SW-480, a proteína hMSH2 marcou fortemente o núcleo, todavia, também se mostrou presente no citoplasma. Este grande acúmulo nuclear foi relacionado a presença de hMSH6.

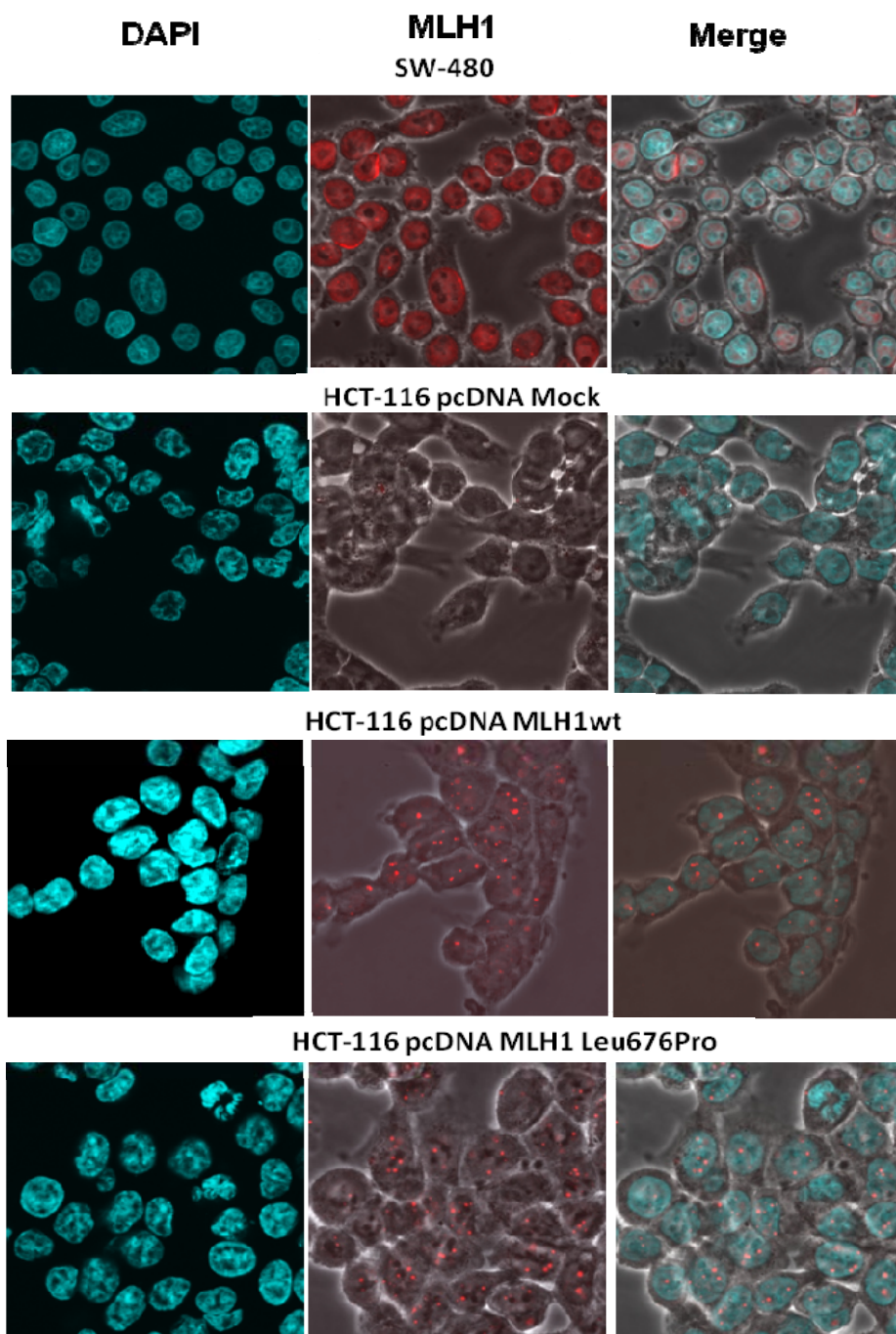


Figura 15 - Localização subcelular da variante Leu676Pro hMLH1. Células HCT-116 foram transitoriamente transfectadas com constructos selvagem (pcDNA MLH1wt) ou mutante (pcDNA MLH1 Leu676Pro). Células SW-480 foram utilizadas como controle positivo. A proteína MLH1 foi visualizada 48 h após a transfecção com goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594, o núcleo foi marcado com DAPI. A sobreposição das imagens é mostrada na coluna da direita.

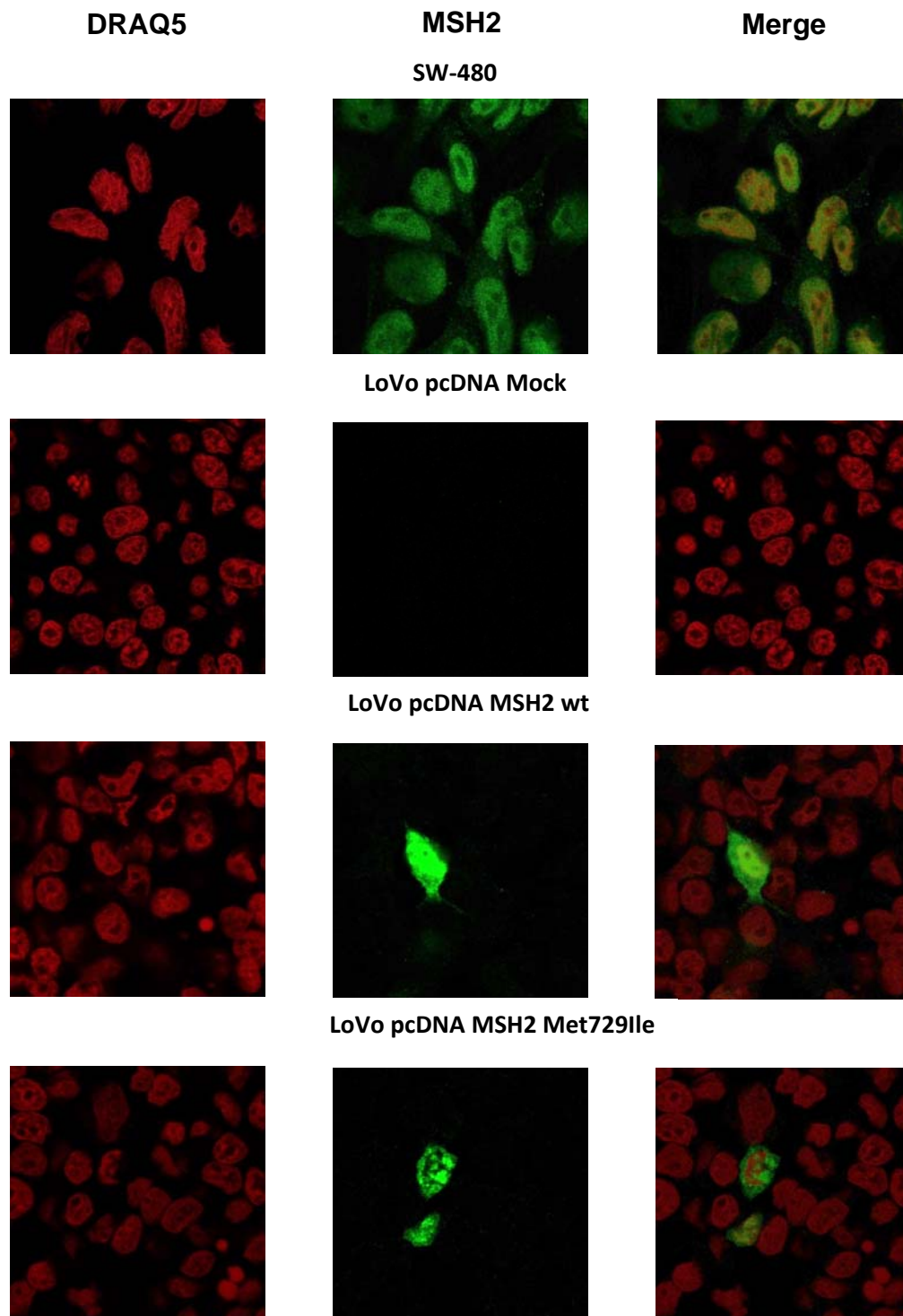


Figura 16 - Localização subcelular da variante Met729Ile. Células LoVo foram transitoriamente transfectadas com os constructos selvagem (pcDNA MSH2wt) ou mutante (pcDNA MSH2 Met729Ile). Células SW-480 foram utilizadas como controle positivo. hMSH2 foi visualizada 48 h após a transfecção com goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488, o núcleo foi marcado com DRAQ5. A sobreposição das imagens é mostrada na coluna da direita.

5.8 RASTREAMENTO DE REARRANJOS GENÔMICOS NOS GENES *MLH1* E *MSH2* E DE MUTAÇÃO PONTUAL EM OUTROS GENES DE SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER

Como as duas variantes analisadas, hMLH1 Leu676Pro e hMSH2 Met729Ile, se mostraram não deléteras, de acordo com os ensaios realizados, e portanto, não associadas com o aparecimento de CCR nestes pacientes, foram utilizadas outras abordagens para identificar alterações genéticas que pudessem estar envolvidas com a SL. Assim, foi realizada a análise de rearranjos genômicos por MLPA e sequenciamento da região codificadoras de 17 genes que predispõem ao câncer.

A análise de MLPA não revelou qualquer rearranjo no paciente portador da alteração hMLH1 Leu676Pro (Figura 17). Para o paciente portador da alteração hMSH2 Met729Ile, foi encontrada uma duplicação no éxon 5 de hMSH2 (Figura 18).

O sequenciamento de regiões alvo usando o kit customizado Haloplex inclui 17 genes (região alvo de 67 kb), quatro deles que predispõem ao CCR, como MLH1, MSH2 e MSH6, CHEK2, assim como genes que predispõem a outros tipos de tumores, como TP53 e BRCA1 e BRCA2, entre outros. O sequenciamento dos dois pacientes na plataforma Ion-PGM gerou 57 milhões de sequências para os pacientes. A cobertura média para cada paciente foi de 420 vezes.

Nos dois pacientes não foram encontradas nenhuma alteração nos genes sequenciados, apenas foram confirmadas as variantes já identificadas

para os pacientes hMLH1 Leu676Pro (c.2027 T>C) e hMSH2 Met729Ile (c.2187 G>T). No entanto, foi encontrado um aumento de cobertura de seqüências no éxon 5 de MSH2, no paciente hMSH2 Met729Ile, sugestivo de duplicação da região, e que foi confirmada pelo ensaio de MLPA. De acordo com os bancos de dados a duplicação encontrada nunca foi descrita, sendo identificada por nosso grupo.

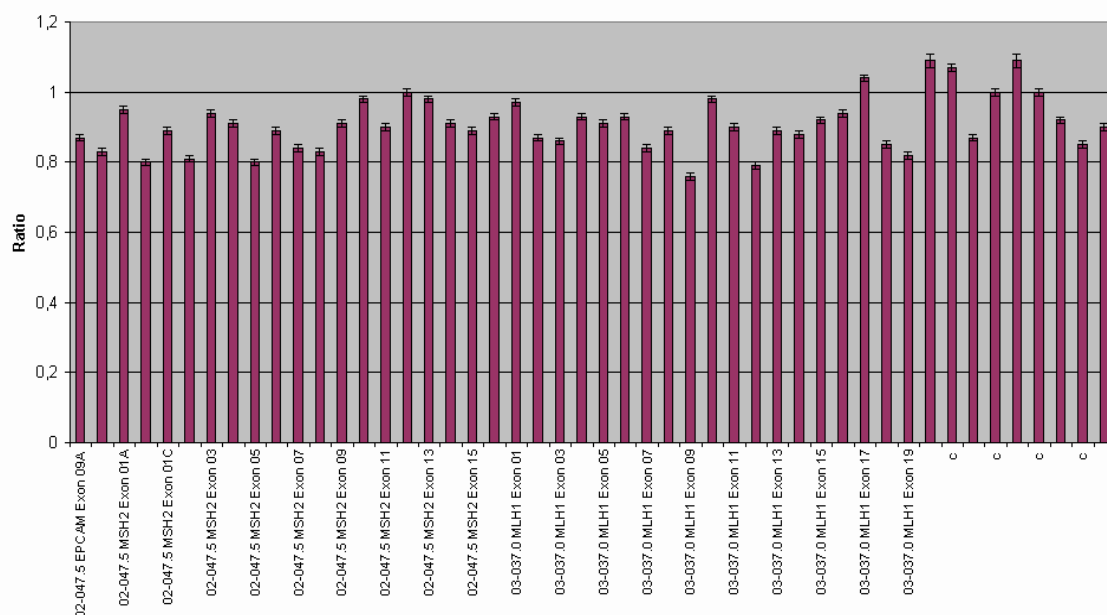


Figura 17 - Representação gráfica dos picos relativos da dosagem gênica do paciente portador da alteração hMLH1 Leu676Pro das sondas para os genes EPCAM, MLH1 e MSH2. Os resultados são expressos como a razão entre a área do pico de cada região identificada pela sonda sobre a média das áreas correspondentes, em amostras controles sabidamente negativas para rearranjos gênicos. Razões entre 0,7 e 1,3 são consideradas normais. Enquanto que menor que 0,7 indicativa de deleção, e quando maior ou igual a 1,3, seria sugestivo de duplicação. Análise realizada pelo software Coffalyze (MRC - Holland).

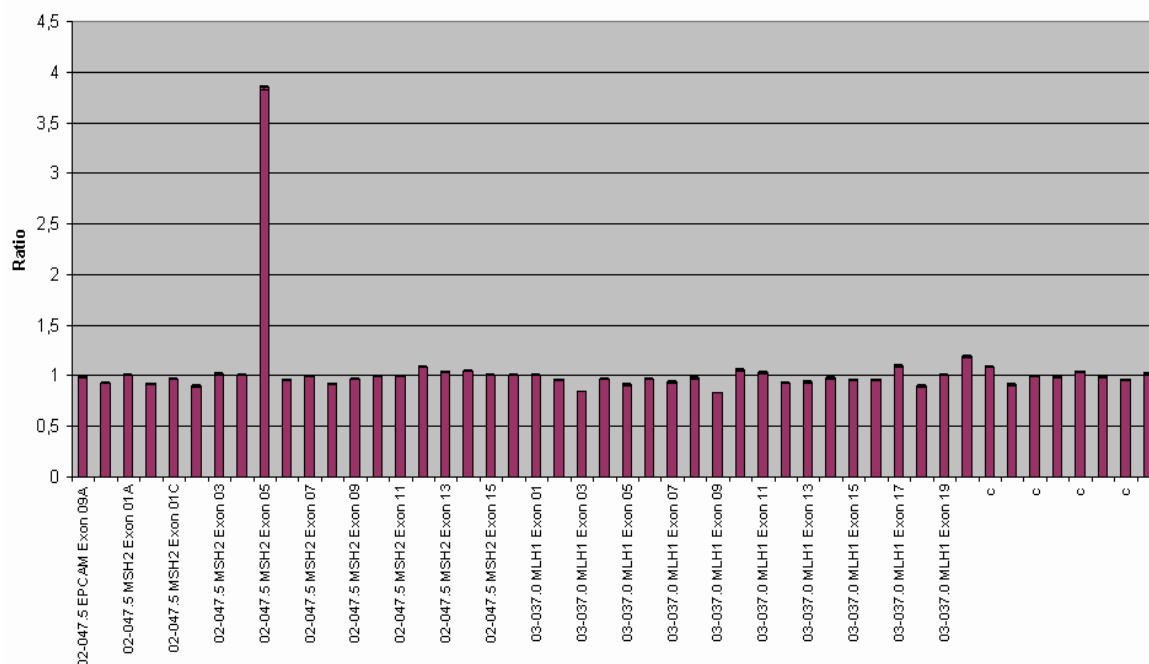


Figura 18 - Representação gráfica dos picos relativos à dosagem gênica do paciente portador da alteração hMSH2 Met729Ile das sondas para os genes *EPCAM*, *MLH1* e *MSH2*. Os resultados são expressos como a razão entre a área do pico de cada região identificada pela sonda sobre a média das áreas correspondentes, em amostras controles sabidamente negativas para rearranjos gênicos. Razões entre 0,7 e 1,3 são consideradas normais. Enquanto que menor que 0,7 indicativa de deleção, e quando maior ou igual a 1,3, seria sugestivo de duplicação. Análise realizada pelo software Coffalyze (MRC - Holland).

6 DISCUSSÃO

A síndrome de Lynch (SL) é causada por mutações germinativas deletérias nos genes de reparo de erros de pareamento de bases e o teste genético é utilizado para o diagnóstico dessa desordem nos pacientes que apresentem histórico familiar (LYNCH 2011). Um diagnóstico definitivo de SL pode direcionar a conduta médica necessária para controlar a doença, bem como prevenir futuros cânceres para o paciente e sua família (MOREIRA et al. 2012). Um desafio surge, todavia, quando mutações *missenses* na linhagem germinativa são identificadas em um gene MMR, num paciente suspeito de SL. O resultado da alteração de um único aminoácido não é imediatamente óbvio para a função da proteína, sendo então denominadas variantes de patogenicidade incerta. Uma importante estratégia para solucionar esta incerteza é determinar se a variante resulta em uma proteína não funcional (HEINEN e RASMUSSEN 2010).

Na primeira parte deste trabalho, realizamos uma análise *in silico*, com programas de predição de patogenicidade. O objetivo destes programas é servir como uma pré-triagem das alterações que podem prejudicar a função da proteína. Para isso, estes programas são capazes de realizar alinhamentos múltiplos entre a sequência de uma proteína em várias espécies e calcular a conservação de um dado aminoácido na posição, e sua conservação. Os três programas utilizados (SIFT, Polyphen-2 e MAPP-MMR), apesar de utilizarem algoritmos diferentes, foram concordantes

quanto ao resultado das variantes. Duas variantes foram classificadas como patogênicas, sendo uma em hMLH1 (p.Leu676Pro) e a outra em hMSH2 (p.Met729Ile).

A variante hMSH2 Thr8Met foi classificada como não patogênica, tolerante ou não prejudicial. Esta mesma variante, foi encontrada em uma população controle, sugerindo que não esteja relacionada com a SL. Um aspecto importante quanto a esta variante, é que foi encontrada em um paciente que preenche critério de Bethesda para SL, enquanto as outras em pacientes que preenchem critério de Amsterdã I. O critério de Amsterdã I é mais restritivo, enquanto o de Bethesda é reconhecido por ser mais abrangente, visto que inclui casos isolados de câncer abaixo dos 50 anos, sem considerar história familiar positiva para o desenvolvimento de tumores. O fato de Amsterdã I ser restritivo possibilita uma maior taxa de identificação de mutações, como já demonstrado em outros trabalhos de nosso grupo (DOMINGUEZ et al. 2008; SILVA et al. 2010).

As outras variantes Leu676Pro (hMLH1) e Met729Ile (hMSH2), não foram encontradas nessas 96 amostras controle iniciais. Poucos estudos com SL têm realizado o sequenciamento de indivíduos controles, e o tamanho amostral é bem variável (25 -180 indivíduos). Decidimos então, para estas duas variantes, aumentar o número de indivíduos controles rastreados para 280, sendo que mesmo assim as duas variantes não foram encontradas em nenhuma amostra controle.

As duas variantes escolhidas para o estudo estão localizadas em importantes domínios funcionais da proteína selvagem. A alteração hMLH1

Leu676Pro está localizada no domínio de interação com PMS2, e a hMSH2 Met729Ile no domínio ATPase, diversos estudos têm reportado alterações patogênicas e não patogênicas também localizadas nesses domínios. Para exemplificar a conservação entre espécies diferentes, utilizamos o alinhamento de sequências múltiplas obtidas do GenBank construído pelo programa Clustal W. Para a clonagem e expressão das variantes e genes selvagens, utilizamos como abordagem inicial inserir o cDNA *full length* de um indivíduo saudável, sem histórico de câncer familiar, e previamente sequenciado para hMLH1 e hMSH2 no vetor de expressão pcDNA 3.1 HisA. A estratégia de clonagem foi subdividida em duas etapas, onde o cDNA de cada gene foi gerado em dois fragmentos e então sub-clonado em vetor pTZ55R/T. A segunda etapa consistiu em unir os fragmentos gerados na primeira etapa e inserir no vetor de expressão de mamíferos. Todos os passos foram seguidos por sequenciamento direto. As alterações foram geradas *in vitro* por mutagênese sítio-dirigida, utilizando como molde o vetor de expressão contendo os genes selvagens. Esta técnica é muito utilizada nos estudos funcionais com VUS em SL. A confirmação da presença das alterações foi feita por sequenciamento.

A principal limitação de um ensaio bioquímico *in vitro*, é que eles não exatamente recapitulam o ambiente em que as proteínas MMR funcionam e, por consequência, podem não refletir completamente como a variante irá se comportar em uma célula humana. Proteínas recombinantes expressas em bactérias ou leveduras para métodos de investigação funcional possuem limitações diversas, que podem decorrer do próprio ensaio, bem como da

espécie utilizada, tal como a ausência de extensas modificações pós-transducionais (RÄSCHLE et al 2002).

Nesse contexto, as linhagens de adenocarcinoma de cólon humano foram escolhidas para a realização dos experimentos funcionais. As linhagens HCT-116 (hMLH1^{-/-}) e LoVo (hMSH2^{-/-}) foram sugeridas por BRIEGER et al. 2002, como modelo experimental para a transfecção transitória de hMLH1 ou hMSH2, e suas variantes para análise funcional. A re-expressão de hMLH1 e hMSH2, em HCT-116 e LoVo, para estudo funcional já está bem caracterizada e é utilizado por diversos grupos, sendo considerado como método que melhor mimetiza o contexto em que a proteína está inserida. A SW-480 foi escolhida por expressar todas as proteínas do sistema MMR, sendo um excelente controle positivo endógeno. A maior parte dos trabalhos faz uso de apenas a linhagem transfectada com o gene selvagem como controle positivo. Para este estudo, elegemos como controle positivo uma linhagem de cólon que expressa endogenamente as proteínas hMLH1 e hMSH2, e uma linhagem transfectada com os vetores contendo o cDNA dos genes selvagens. Como será discutido em alguns pontos deste trabalho, a presença ou ausência do parceiro funcional (hPMS2 e hMSH6) afeta a expressão, estabilidade e localização. Logo, a inclusão da linhagem SW-480 fornece informações do que seria encontrado em níveis de expressão e localização comuns onde o sistema MMR opera de forma orquestrada.

A partir da confirmação da construção dos vetores de expressão para os genes selvagens e suas variantes, investigamos o efeito destas alterações em ensaios de expressão, interação e localização sub-celular.

A heterodimerização constitutiva de MLH1 com outro MutL parálogo é de especial interesse, porque MLH1 necessita ligar a PMS2 para formar um heterodímero corretamente localizado e catalicamente funcional denominado MutL α (hMLH1-hPMS2) (GUERRETTE et al. 1998; NYSTRÖM-LAHTI et al. 2002; PLOTZ et al. 2003). Células que perdem MLH1 são praticamente desprovidas da proteína PMS2, em um nível detectável, apesar de níveis normais de mRNA de PMS2 serem produzidos, como comprovado nas células HCT-116. Isto ocorre, porque hPMS2 necessita de hMLH1 para ser estabilizado (CHANG et al. 2000; BRIEGER et al. 2005; MOHD et al. 2006). Por essas razões ensaios que avaliam a estabilização de PMS2, com a co-transfecção de MLH1, avaliam tanto a capacidade de interação quanto a habilidade de estabilizar PMS2.

Dados que corroboram essa capacidade de estabilização, são originados da prática clínica, onde a imunistoquímica para hMLH1, hMSH2, hPMS2 e hMSH6, é utilizada rotineiramente como ferramenta de rastreamento para identificação de indivíduos suspeitos de SL (HAMPEL et al. 2008). Marcação negativa para hMLH1 ou hMSH2 indica que estes genes não estão sendo expressos, um mecanismo que pode envolver múltiplos fatores, como hipermetilação do promotor, mutações que alteram o quadro de leitura ou inserem um códon de parada prematuro, ou até mesmo alterações do tipo *missense* (COUCH et al. 2008).

Um caso interessante apresentado na literatura foi a identificação de uma família com aparecimento precoce de tumor endometrial e colorretal em duas irmãs, sugerindo predisposição genética. Esta família não preenchia nenhum critério clínico para SL, entretanto as duas apresentaram alta instabilidade de microssatélites, sem hipermetilação de *MLH1*. A IHC das proteínas MMR nos tumores, revelou ausência isolada de PMS2, com marcação para MLH1, um achado claramente sugestivo de defeito em PMS2. A busca por mutações germinativas não revelou qualquer alteração pontual ou rearranjo em PMS2, porém, o sequenciamento de MLH1 revelou uma deleção do éxon 14 e 15, produzindo uma proteína MLH1 c-terminal reativa (ZIGHELBOIM et al. 2009). Logo, a proteína truncada era capaz de produzir uma região c-terminal reativa ao anticorpo, todavia incapaz de interagir e estabilizar hPMS2. Outras alterações que originam proteínas truncadas na região C-terminal de hMLH1 (L749X e Y750X) também foram identificadas como incapazes de interagir e estabilizar hPMS2 (MOHD et al. 2006).

Um grande número de alterações em *MLH1* estão localizadas em seu domínio C-terminal, que é responsável pela dimerização constitutiva com seu parceiro funcional PMS2. A alteração Leu676Pro em MLH1 esta localizada nesse domínio de interação com PMS2 e outras proteínas parceiras. Para analisar se essa alteração poderia resultar em um defeito patogênico interferindo com a dimerização e/ou estabilização de hPMS2, MLH1 selvagem e sua variante MLH1 Leu676Pro foram co-expressos com PMS2 tipo selvagem. Os níveis de expressão de PMS2 foram

correspondente aos níveis de MLH1, tanto para pcDNA MLH1wt quanto para pcDNA MLH1 Leu676Pro. Mutações que interferem na dimerização hMLH1-hPMS2 não são capazes de estabilizar hPMS2, desta forma a estabilização deste, em um sistema de co-expressão, serve como parâmetro para investigar alterações que afetem a formação de hMutS α (MOHD et al. 2006; HINRICHSEN et al. 2013).

Diversos estudos têm investigado alterações em MLH1 (missenses e pequenas deleções) na dimerização com PMS2 por métodos de afinidades, ensaio duplo híbrido e co-imunoprecipitação (YUAN et al. 2002; KONDO et al. 2003; BELVEDERESI et al. 2006) e somente três estudos (KOSINSKI et al. 2010; MOHD et al. 2006; HINRICHSEN et al. 2013) utilizaram a estabilização de PMS2 como medida de interação. No trabalho de KOSINSKI et al. (2010) 19 alterações localizadas no domínio de interação ou próximas a este foram caracterizadas funcionalmente. Três alterações (p.Gln542Leu, p.Leu749Pro, p.Tyr750X) causaram diminuição da expressão de PMS2, sugerindo que estas alterações interferem com a dimerização, pois são incapazes de estabilizar PMS2, conseqüentemente um menor número de complexo funcional hMutL α é formado, diminuindo o reparo.

Um outro estudo (HINRICHSEN et al. 2013), avaliou um grupo de alterações em *MLH1* localizadas no domínio de interação, fazendo uso dos ensaios de *Pull down* e Duplo híbrido. Neste estudo, encontraram algumas variantes como patogênicas (L550P, L582F, A589D, P654L e R659P) e outro set como não patogênicas (E578G, K618A e V716M). Tanto o ensaio duplo-híbrido, quanto o *pull down* são baseados na interação física entre as

proteínas. Sendo assim, estudos desse tipo somente podem analisar interações que interferem com a propriedade de ligação, não podendo detectar todos os possíveis defeitos funcionais, o que, em geral, levam a resultados conflitantes com outros tipos de ensaios.

Para avaliar o impacto da alteração Leu676Pro na heterodimerização do complexo MLH1 – PMS2 realizamos uma avaliação de imunoprecipitação, que não demonstrou nenhum forte defeito na ligação com PMS2 passível de ser detectado pelo ensaio.

A variante hMSH2 Met729Ile está localizada no domínio ATPase. Diversas variantes também localizadas nesse domínio já foram caracterizadas. MutS α (hMSH2-hMSH6) contém dois sítios de ATPase que são localizados na região C-terminal de hMSH2 e hMSH6, com resíduos conservados de cada subunidade contribuindo para o sítio ativo do outro. Os dois sítios não são equivalentes, com o sítio em hMSH6 tendo alta afinidade por ATP e o sítio em hMSH2 tendo alta afinidade por ADP. Ambos, MutS α e MutS β são membros da família de ATPases de transportadores ABC, e sua habilidade de ligar e hidrolisar ATP é essencial para a função de reparo (CYR et al. 2008).

Durante o reconhecimento e sinalização para a cascata de reparo MMR, o heterodímero MutS α (hMSH2-hMSH6) se liga ao DNA, para se desprender do DNA necessita processar ATP para ADP, para assim liberar o DNA (HEINEN et al. 2011). Mutações que levem a um erro no processamento de ATP, podem se ligar ao DNA, contudo, permanecem constantemente ligadas (GENG et al. 2012). MARTÍN-LÓPEZ et al. 2012

estudaram duas alterações no mesmo códon, 688, sendo a troca de uma metionina por uma arginina (Met688Arg) ou isoleucina (Met688Ile). A alteração Met688Arg foi encontrada em quatro famílias na Espanha e nos ensaios funcionais foi capaz de interagir com hMSH6 e se ligar ao DNA. Todavia, foi incapaz de processar o ATP a ADP, não dissociando do DNA quando ATP foi adicionado. A alteração Met688Ile não demonstrou qualquer sinal de comprometimento nos ensaios realizados.

Neste trabalho não foi possível avaliar a atividade ATPase de hMSH2, tendo em vista que ensaios que avaliam a eficiência catalítica ATPase de hMutS α necessitam que hMSH2 e hMSH6 sejam co-expressos *in vitro*. Não foi possível obter a tempo o vetor de expressão de hMSH6, para este trabalho. O que inviabilizou também a imunoprecipitação.

Mesmo uma alteração estando localizada no domínio ATPase, é possível que interfira com a expressão e localização sub-celular. Como bem exemplificado no trabalho de LÜTZEN et al. (2008), dentre as sete alterações em hMSH2 estudadas, as alterações P622L e C697F, localizadas no domínio ATPase, apresentaram redução na ligação ao DNA, redução na interação com hMSH6 e hEXO1, e localização sub-celular aberrante. A alteração P622L foi incapaz de se ligar ao DNA contendo um erro de pareamento (G-T), entretanto esta foi capaz de interagir com hMSH6 no ensaio *pull-down* e incapaz de interagir pelo duplo híbrido. Como discutido anteriormente, estes dois ensaios avaliam a capacidade de interação física entre as proteínas. O resultado conflitante pode advir da *tag* utilizado para o *pull down* ou de modificações pós-traducionais que podem ter ocorrido na

levedura. Independentemente dos defeitos bioquímicos conflitantes, a variante hMSH2 Pro622Leu foi incapaz de ser direcionada para o núcleo, comprovando que exibe defeitos na sua habilidade de dimerização com hMSH6, e no endereçamento nuclear.

No trabalho de BRIEGER et al. (2002), com a transfecção transitória de hMSH2 em células LoVo, a expressão de hMSH6 foi restaurada e detectável por *western blot*. Todavia, esse dado não foi reproduzido por outros trabalhos, pois os níveis de expressão de hMSH6 produzidos pela restauração de hMSH2 são insuficientes (RASMUSSEN et al. 2012). Um dado interessante é que no mesmo trabalho foi encontrado uma redução nos níveis de mRNA de MSH6 após a transfecção com hMSH2, indicando regulação na transcrição, o que poderia explicar a incapacidade em detectar hMSH6 nas células transfectadas com hMSH2, embora tenha sido previamente atribuída a estabilização pós-transducional de hMSH6 por hMSH2.

No presente trabalho, a variante hMSH2 Met729Ile foi expressa transitoriamente em células LoVo e não demonstrou defeito na expressão. A Avaliação da imunoprecipitação não foi realizada pela ausência de expressão de hMSH6, corroborando com os dados de RASMUSSEN et al. (2012) que afirmaram que a expressão de hMSH6 foi insuficiente quando não co-transfectado.

A localização sub-celular correta das proteínas MMR é essencial para uma correta função de todo o sistema (KNUDSEN et al. 2007; BRIEGER et al. 2005). Moléculas menores que 60kDa podem passivamente difundir para

o núcleo, através de complexos poros nucleares, enquanto que transporte de grandes moléculas requer sinais específicos de localização nuclear (NLS). A via clássica de translocação nuclear é mediada pelo complexo importina alfa/beta. Proteínas que possuem um clássico sinal de localização nuclear (NLS) são importadas pelo receptor heterodimérico que consiste da beta-carioferina e importina beta, que medeiam a interação com o complexo poro nuclear, e a proteína adaptadora importina alfa, que se liga diretamente ao clássico NLS (LANGE et al. 2007).

O reconhecimento de erros de pareamento de bases em eucariotos é realizado por dois heterodímeros Mut α (MSH2/MSH6) e Mut β (MSH2/MSH3), enquanto que a função de recrutamento de outras proteínas é realizada por Mut α (MLH1/PMS2), que devem residir no núcleo para desempenharem sua função (HERNANDEZ-PIGEON et al. 2005; HAYES et al. 2009). O mecanismo de endereçamento nuclear das proteínas do sistema MMR ainda não está claro. Estudos diversos propõem a avaliação de diferentes NLS e modos diferentes (WU et al. 2003; RAEVAARA et al. 2005; MOHD et al. 2006; LEONG et al. 2009; BRIEGER et al. 2012), contudo, há um consenso que ambos, hMLH1 e hPMS2, possuem NLS funcionais e independentes e que o heterodímero Mut α é importado de forma mais eficiente do que os monômeros hMLH1 ou hPMS2 (HAYES et al. 2009). Estes dados sugerem que a formação do heterodímero “desmascare” NLS adicionais, necessários ao sistema (LEONG et al. 2009).

Em nosso estudo, a variante Leu676Pro foi expressa sozinha para o estudo de localização, sem co-transfecção, e apta a ser translocada para o

núcleo. Como pode ser observados na figura 13, dois diferentes padrões de marcações foram observados entre as células transfectadas e o controle positivo. Uma coloração nuclear praticamente difusa foi observada para as células SW-480, enquanto as células transfectadas com hMLH1wt ou hMLH1 Leu676Pro apresentaram distintos focos fortemente marcados.

Comumente, estudos de localização sub-celular utilizam as proteínas de interesse fusionadas a *tags* fluorescentes. Porém, a fusão de uma proteína com outra pode gerar defeitos na expressão e dobramento (*folding*), que certamente influenciam os dados. Ao iniciar este trabalho, em 2010, não havia qualquer estudo que indicasse algum prejuízo em relação ao uso de *tags* GFP (*Green Fluorescent Protein*) ou RFP (*Red Fluorescent Protein*). Todavia, optamos por utilizar para os experimentos de localização a imunofluorescência indireta, com anticorpos direcionados as proteínas de estudo. Os vetores de expressão utilizados neste trabalho possibilitam o uso de *tags* de uma cauda de histidina, onde seis aminoácidos histidinas são adicionados na região C-terminal. Uma *tag* GFP, por exemplo, pode adicionar 280 aminoácidos.

Em 2012, um trabalho de BRIEGER et al., demonstrou que *tags* (RFP e GFP) na região C ou N-terminal das proteínas do complexo hMutL α (MLH1-PMS2), podem ter efeito deletério na função e localização das proteínas. Para hMLH1 independente se a *tag* foi N ou C-terminal, houve uma diminuição nos níveis de expressão, quando comparados a proteína sem *tag*. Enquanto, hPMS2 foi prejudicado apenas pela *tag* C-terminal, porque teve uma expressão diminuída e foi capaz de ser translocado para o núcleo,

mesmo na ausência de hMLH1. A proteína hPMS2, somente é translocada para o núcleo quando interage com hMLH1, o constructo PMS2-GFP-C foi endereçado ao núcleo, mesmo quando transfectado sozinho.

O trabalho de ANDERSEN et al. (2012) com variantes em *MLH1*, verificou que a localização sub-celular mostrou distintos padrões, tais como: localização estritamente nuclear, fraca fluorescência e visível no citoplasma e uma distribuição citoplasmática e nuclear. Notavelmente, a co-expressão de hMLH1 com hPMS2 resultou em um número maior de células com hMLH1 nuclear, estando de acordo com o encontrado por outros autores (MOHD et al. 2006; LUO et al. 2009). Outro trabalho identificou algumas variantes como a hMLH1 D63E, foi expressa principalmente no citoplasma quando expressa sozinha, cuja proporção nuclear aumentou apenas ligeiramente quando co-expressa com hPMS2. O segundo grupo, consistia de variantes como hMLH1 L550P, que foi expressa principalmente nuclear e que a proporção não foi alterada quando co-expressa com hPMS2 (RAEVAARA et al. 2005). Este dado ilustra o fato que hPMS2, é capaz de resgatar variantes de hMLH1 incapazes de irem para o núcleo sozinhas.

Estímulos endógenos (ciclo celular) ou exógenos (dano ao DNA) também são capazes de induzir recrutamento de hMLH1 e hMSH2 para o núcleo. À medida que a célula progride na fase S, há um aumento da concentração nuclear das proteínas MMR, também por um aumento na atividade de reparo, assim aumentando a fidelidade da replicação do DNA (EDELBRÖCK et al. 2009). As proteínas MMR são sintetizadas ao longo de todo o ciclo celular, sendo mais expressas na fase S (síntese do DNA) e em

G2 (gap), porém são pouco ativas em G2, sugerindo um mecanismo pos-transducional de regulação da atividade em G2.

Um dado interessante foi a demonstração de uma marcação típica de co-localização de proteínas MMR em focos de replicação ao final da fase S, representado por pontos fortemente corados e co-localizados com PCNA ou BrDu. Ao tratar as células Hela com N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG), um agente alquilante do DNA, em uma concentração que não inibe a síntese de DNA e também não induz morte celular, os focos de MutL α são desfeitos, sugerindo que complexos de MutS α são recrutados para sítios alquilados randomicamente ao longo do DNA. O mesmo padrão difuso é observado em células que não estão na fase S. Este trabalho também demonstrou que hMSH2 possui localização citoplasmática e nuclear, sendo recrutado para o núcleo na presença de dano ao DNA ou em síntese ativa (SCHROERING et al. 2007; SCHROERING e WILLIAMS 2008).

A variante hMSH2 Met729Ile foi expressa eficientemente em células LoVo, apresentou marcação nuclear e citoplasmática, igualmente a transfectada com hMSH2 tipo selvagem. Estes experimentos foram realizados sem a co-transfecção com hMSH6, o que justifica o padrão diferente do observado nas células SW-480. Estas células apresentam marcação citoplasmática e nuclear, sendo a nuclear fortemente marcada. Todavia, SW-480 expressa hMSH6, e este está relacionado com a expressão, estabilização e um maior importe de hMSH2 para o núcleo (GASSMAN et al. 2011). Em um estudo com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), MSH2 foi capaz de ir para o núcleo independente da presença

ou ausência de seus parceiros. Todavia, a ausência das proteínas parceiras diminui a quantidade de proteína nuclear e a de proteína total, o que sugere um mecanismo de estabilização para prevenir a acumulação de monômeros livres no citoplasma. O fato de MSH2 ser capaz de translocar para o núcleo na ausência de seus parceiros heterodímeros sugere que MSH2 possuem sequências de localização nuclear suficientes para o importe para o núcleo (CHRISTMANN et al. 2002). Outro importante fator para determinar a localização nuclear de MutS α é a fosforilação de seus componentes, que resulta em uma maior atividade catalítica. MutS α fosforilado é predominantemente encontrado no núcleo, sendo que MSH6 é mais extensivamente fosforilado que MSH2. Esta modificação pós-transducional também está envolvida na resposta a dano e agentes alquilantes do DNA (CHRISTMANN et al. 2000; EDELBROCK et al. 2013).

Estudos que buscam caracterizar funcionalmente variantes nos genes do sistema MMR fazem uso de diferentes sistemas recombinantes e espécies que apresentam backgrounds que podem influenciar o resultado (HEINEN et al. 2011). A medida que mais estudos funcionais com VUS são realizados, a probabilidade de algumas VUS serem testadas por metodologias e grupos diferentes ao longo do tempo aumenta. Isso tem sido claramente demonstrado pelos bancos de dados disponíveis, que coletam informações dos trabalhos e ensaios funcionais utilizados, onde há uma diversidade de resultados conflitantes. Como exemplo, a variante hMSH2 D167H, obteve efeito intermediário na reparação de erros in vitro. Contudo, quando expressa em linhagem celular que não expressa MSH2, foi capaz de

reparar o DNA e obter níveis de resposta a agentes alquilantes, próximos ao tipo selvagem. Estes resultados sugerem que defeitos bioquímicos nessas variantes não são suficientes para contribuir com a doença. Todavia, a variante hMSH2 P622L, foi demonstrada diminuir drasticamente a função bioquímica de MSH2-MSH6 *in vitro*, apresentando defeitos celulares claros quando expressos em leveduras ou em cultura de células de mamíferos.

Múltiplos estudos com a mesma variante nem sempre resultam em uma clara interpretação. A reintrodução da variante hMLH1 R265C em células Hek-293T, *null* para hMLH1 (hipermetilação do promotor), resultou em níveis normais de expressão e restauração da função de reparo. Entretanto, estudos expressando a mesma variante em HCT-116, demonstraram uma redução na estabilidade e uma capacidade de reparo intermediária. Outro estudo demonstrou que a variante falhou em restaurar o reparo em extratos de células deficientes em hMLH1. Os resultados conflitantes sugerem que VUS podem possuir diferentes atividades dependendo do sistema do ensaio e do *background* da linhagem celular utilizada ou de outros fatores entre os laboratórios.

Os resultados obtidos dos ensaios funcionais devem ser combinados com dados clínicos disponíveis, tais como segregação com a doença em familiares e ausência da variante em uma população controle. Análise de segregação nem sempre é possível, pela recusa dos familiares, inviabilidade técnicas de conseguir material, a família pode morar muito distante e etc. Não foi possível recrutar os pacientes e familiares para a análise de segregação das alterações. Nesse sentido, há uma busca por ensaios que

melhor validem a patogenicidade de uma alteração. Contudo, até que ponto, um ensaio que informe que uma alteração é 10% patogênica, é realmente válido.

Alguns trabalhos buscam criar critérios para a investigação funcional de alterações, como o de COUCH et al. (2008), onde foi sugerido um modelo de três passos: o primeiro consiste no sequenciamento e identificação das VUS; o segundo passo seria a análise *in silico* em programas de patogenicidade, em conjunto com ensaio de reparo *in vitro*, e no terceiro passo, caso a alteração apresente algum defeito no passo anterior, seria investigado a interação proteína-proteína, expressão e localização sub-celular. Este modelo foi validado, por outro grupo em 2011, onde foi recomendado que apenas o passo 1 e 2, seriam suficientes para a verificação de patogenicidade (KANSIKAS et al. 2011).

Dessa forma, apenas o ensaio de reparo e análise *in silico* seriam suficientes.

Todavia, este modelo é falho, visto que uma alteração pode manter a atividade de reconhecer e reparar o DNA com erros, porém não ser translocada para o núcleo. Isto ocorre com a variante patogênica hMSH2 P622L (LÜTZEN et al. 2008). Outras variantes podem ser classificadas como reparo deficiente erroneamente, enquanto que na verdade, os níveis de proteína são baixos devido à rápida degradação pelo proteossoma ou baixa estabilidade (HERNANDEZ-PIGEON et al. 2004; PERERA et al. 2008; ARLOW et al. 2013).

Há uma pluralidade na literatura de VUS caracterizadas como não patogênicas encontradas em pacientes que preenchem critérios clínicos, que segregam com a doença na família e em ensaios bioquímicos não apresentam defeito algum. Esta problemática começou a vislumbrar uma solução quando um trabalho (MARTINEZ et al. 2010) estudou o efeito de polimorfismos e mutações missenses em genes do sistema MMR em *S. cerevisiae*. Encontrado e reportando pela primeira vez, que alelos fracos e polimorfismos de genes MMR são capazes de interagir para produzir um forte defeito poligênico no sistema MMR. Dessa forma, o defeito funcional de algumas VUS podem não ser suficientes para conduzir eficientemente a formação do câncer por conta própria, mas combinados com outros alelos que afetam a fidelidade de replicação do DNA pode gerar níveis de instabilidade genômica necessária para dirigir a tumorigênese (LIU et al. 2003).

Coerente com este modelo, um estudo em 2011 descreveu variantes germinativas de hMSH3 e hMSH2 em uma família SL, onde os membros da família portadores de alterações tanto em hMSH3 e hMSH2, desenvolveram tumores de cólon em idade precoce, com instabilidade microssatélite. Neste trabalho, 79 famílias italianas, que não possuem mutações pontuais patogênicas ou grandes rearranjos, foram sequenciadas para MSH3, sendo encontradas 13 variantes. Em uma família foi encontrado uma alteração em hMSH2 (c.984 C>T, éxon 6) e duas em hMSH3 (éxon 4 c.693 G>A; éxon 20 c. 2732 T>G), os programas de predição classificam as variantes como de baixo risco. Todavia, o sequenciamento dos familiares, revelou que: o

portador que possui apenas uma alteração, independente que esteja em hMSH2 ou hMSH3, não desenvolveu câncer. De forma bem interessante, nesta família, os familiares que desenvolveram câncer em idade precoce eram portadores de duas alterações, uma em hMSH2 e outra em hMSH3.

Outro trabalho conduzido por WANG et al. (2014), identificaram duas variantes, P53 V157D e PMS2 R20Q, que segregam com a doença. E nos ensaios funcionais foram capazes de promover a tumorigênese, aumentando o número de colônias e a formação de tumores em um modelo de *Drosophila*.

Estas situações podem suportar a hipótese de que alelos fracos podem ser capazes de interações poligênicas para produzir um forte defeito que pode levar a progressão tumoral em SL (DURATURO et al. 2011). Um modelo hipotético foi criado, onde variantes que possuem um comportamento de alelos de baixo risco possam contribuir para o desenvolvimento de câncer de colón em famílias SL, quando associadas com outras variantes de baixo risco (MARTINEZ et al. 2010).

Como as alterações estudadas não apresentaram defeito algum em expressão, interação e localização, buscamos outras possíveis explicações para a SL nestes pacientes. Com esse intuito, buscamos os eventos mais raros, como os rearranjos genômicos em *MLH1*, *MSH2* e o último éxon de *EPCAM*, que está envolvido com silenciamento de *MSH2*. A análise de rearranjos em pacientes com SL é somente indicada em casos negativos para mutações pontuais nos genes MMR (BAERT-DESURMONT et al. 2007). O paciente portador de hMLH1 Leu676Pro não possui qualquer

rearranjo nos genes estudados, mas para nossa surpresa, o paciente portador da alteração hMSH2 Met729Ile, apresentou uma amplificação do éxon 5, sendo esta provavelmente a causa genética da SL, e fortalecendo a evidencia que a variante estudada não é patogênica.

A contribuição de duplicações genômicas em MSH2 ou MLH1 foi estimada ser aproximadamente 1% de todos os casos, sendo muito menor que em deleções genômicas, que é de 10 a 4% (CHARBONNIER et al. 2002; DI FIORE et al. 2004). O rastreio de mutações pontuais não consegue detectar alterações patogênicas em uma porcentagem considerável de famílias que atendem os critérios *Amsterdã*, com grandes rearranjos genômicos (LGRs), particularmente no gene MSH2, o que representa uma fração significativa de mutações germinativas em famílias SL (ROMERO et al. 2013).

Rearranjos genômicos como deleções e amplificações são considerados assumidamente patogênicos, e podem não levar a expressão da proteína. Em trabalho anterior realizado aqui no A.C. Camargo Cancer Center, OLIVEIRA (2008), utilizou tecido parafinado do paciente MSH2 Met729Ile, para imunistoquímica das proteínas de MMR. Os dados cedidos gentilmente pela Dra Ligia Petrolini de Oliveira e que foram publicados na sua tese de doutorado (OLIVEIRA 2008), demonstram imunistoquímica positiva para as todas as proteínas de reparo, surpreendentemente, para hMSH2 e hMSH6. Infelizmente, a ausência de tecido congelado ou parafinado do paciente para a realização de um *western blot*, inviabilizou a

possibilidade de avaliarmos a presença de uma possível proteína de tamanho maior que a proteína MSH2 selvagem.

Notavelmente, um dado da imunistoquímica que também chamou a atenção, foi a presença de marcação positiva para hMSH6. Como discutido anteriormente, a estabilidade de hMSH6 depende da interação com hMSH2 e formação do complexo hMutS α . A imunistoquímica positiva, indica que as proteínas estão interagindo, e hMSH2, mesmo com éxon 5 amplificado, seria capaz de estabilizá-lo.

As contínuas buscas por algum indício que explique o desenvolvimento de SL nesses pacientes, nos estimulou a realizar o sequenciamento de outros genes envolvidos diretamente com a SL, como *MSH6*, *CHEK2*, além de *MLH1* e *MSH2*. O painel customizado permitiu o sequenciamento desses genes, além de outros envolvidos com síndromes de câncer hereditário como *TP53*, *BRCA1* e *BRCA2*. Nenhuma alteração foi encontrada, apenas foram confirmadas as variantes hMLH1 Leu676Pro (c.2027 T>C) e hMSH2 Met729Ile (c.2187 G>T) nos pacientes. Foi encontrado apenas um aumento de cobertura de sequências no éxon 5 de MSH2, no paciente hMSH2 Met729Ile.

Nenhuma das alterações estudadas apresentou algum defeito bioquímico nos ensaios realizados. A duplicação do éxon 5 de *MSH2*, pode estar relacionada ao desenvolvimento da SL nesta família.

7 CONCLUSÃO

As variantes hMLH1 Leu676Pro (c.2027 T>C) e hMSH2 Met729Ile (c.2187 G>T) foram construídas por mutagênese sítio-dirigida e caracterizadas funcionalmente, quanto a expressão, localização e interação. As VUS de estudo não apresentam defeitos bioquímicos nos ensaios realizados. hMLH1 Leu676Pro foi capaz de interagir e estabilizar hPMS2, seu parceiro funcional. E ambas variantes hMSH2 Met729Ile e hMLH1 Leu676Pro não apresentaram alteração em sua localização ou expressão. No paciente portador da variante hMSH2 Met729Ile foi detectado amplificação do éxon 5 de MSH2 sugerindo fortemente que está é a causa genética associada com a SL e reforçando que a variante hMSH2 Met729Ile não é patogênica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Colorectal cancer facts e figures 2008-2010**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/acs/.../f861708finalforwebpdf.pdf>> [2013 dez 10]

Aggarwal M, Brosh RM Jr. Functional analyses of human DNA repair proteins important for aging and genomic stability using yeast genetics. **DNA Repair (Amst)** 2012; 11:335-48.

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol** 2012; 27:1423-31.

Andersen SD, Liberti SE, Lützen A, et al. Functional characterization of MLH1 missense variants identified in Lynch syndrome patients. **Hum Mutat** 2012; 33:1647-55.

Arlow T, Scott K, Wagenseller A, Gammie A. Proteasome inhibition rescues clinically significant unstable variants of the mismatch repair protein Msh2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:246-51.

Arnold S, Buchanan DD, Barker M, et al. Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, splicing assays, segregation, and tumor characteristics. **Hum Mutat** 2009; 30:757-70.

Baert-Desurmont S, Buisine MP, Bessenay E. Partial duplications of the MSH2 and MLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Eur J Hum Genet** 2007; 15:383-6.

Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nat Rev Genet** 2011; 12:745-55.

Belvederesi L, Bianchi F, Loretelli C, et al. Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. **Eur J Hum Genet** 2006; 14:853-9.

Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2073-2087.e3.

Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. **JAMA** 2011; 305:2304-10.

Borràs E, Pineda M, Brieger A, et al. Comprehensive functional assessment of MLH1 variants of unknown significance. **Hum Mutat** 2012; 33:1576-88.

Brieger A, Plotz G, Hinrichsen I, Passmann S, Adam R, Zeuzem S. C-terminal fluorescent labeling impairs functionality of DNA mismatch repair proteins. **PLoS One** 2012; 7:e31863.

Brieger A, Plotz G, Raedle J, et al. Characterization of the nuclear import of human MutLalpha. **Mol Carcinog** 2005; 43:51-8.

Brieger A, Trojan J, Raedle J, Plotz G, Zeuzem S. Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants. **Gut** 2002; 51:677-84.

Castells A, Castellví-Bel S, Balaguer F. Concepts in familial colorectal cancer: where do we stand and what is the future? **Gastroenterology** 2009; 137:404-9.

Chahwan R, Edelmann W, Scharff MD, Roa S. Mismatch-mediated error prone repair at the immunoglobulin genes. **Biomed Pharmacother** 2011; 65:529-36.

Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. **J Biol Chem** 2000; 275:18424-31.

Chao EC, Velasquez JL, Witherspoon MS. Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR). **Hum Mutat** 2008; 29:852-60.

Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, et al. MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 2002; 62:848-53.

Christmann M, Tomicic MT, Kaina B. Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutS α mismatch-binding activity. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:1959-66.

Clark AB, Valle F, Drotschmann K, Gary RK, Kunkel TA. Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. **J Biol Chem** 2000; 275:36498-501.

Coppedè F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation. **Cancer Lett** 2014; 342:238-47.

Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, et al. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. **Hum Mutat** 2008; 29:1314-26.

Cyr JL, Heinen CD. Hereditary cancer-associated missense mutations in hMSH6 uncouple ATP hydrolysis from DNA mismatch binding. **J Biol Chem** 2008; 283:31641-8.

Di Fiore F, Charbonnier F, Martin C, et al. Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. **J Med Genet** 2004; 41:18-20.

Dominguez MV, Bastos EP, Santos EM, et al. Two new MLH1 germline mutations in Brazilian Lynch syndrome families. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:1263-4.

Drotschmann K, Yang W, Brownwell FE, Kool ET, Kunkel TA. Asymmetric recognition of DNA local distortion. Structure-based functional studies of eukaryotic Msh2-Msh6. **J Biol Chem** 2001; 276:46225-9.

Duraturro F, Liccardo R, Cavallo A, De Rosa M, Grosso M, Izzo P. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: probability of synergistic effects. **Int J Cancer** 2011; 129:1643-50.

Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ. DNA mismatch repair efficiency and fidelity are elevated during DNA synthesis in human cells. **Mutat Res** 2009; 662:59-66.

Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. **Mutat Res** 2013; 743-744:53-66.

Farrell MP, Hughes DJ, Drost M, et al. Multivariate analysis of MLH1 c.1664T>C (p.Leu555Pro) mismatch repair gene variant demonstrates its pathogenicity. **Fam Cancer** 2013; 12:741-7.

Ferreira FO, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. **Fam Cancer** 2004; 3:41-47.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell** 1993; 75:1027-38.

Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:104-20.

Gammie AE, Erdeniz N, Beaver J, Devlin B, Nanji A, Rose MD. Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 2007; 177:707-21.

Gassman NR, Clodfelter JE, McCauley AK, Bonin K, Salsbury FR Jr, Scarpinato KD. Cooperative nuclear localization sequences lend a novel role to the N-terminal region of MSH6. **PLoS One** 2011; 6:e17907.

Gayet J, Zhou XP, Duval A, et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. **Oncogene** 2001; 20:5025-32.

Geng H, Sakato M, DeRocco V, et al. Biochemical analysis of the human mismatch repair proteins hMutS α MSH2(G674A)-MSH6 and MSH2-MSH6(T1219D). **J Biol Chem** 2012; 287:9777-91.

Green RC, Parfrey PS, Woods MO, Younghusband HB. Prediction of Lynch syndrome in consecutive patients with colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:331-40.

Grilley M, Welsh KM, Su SS, Modrich P. Isolation and characterization of the Escherichia coli mutL gene product. **J Biol Chem** 1989; 264:1000-4.

Grover S, Stoffel EM, Mercado RC, et al. Colorectal cancer risk perception on the basis of genetic test results in individuals at risk for Lynch syndrome. **J Clin Oncol** 2009; 27:3981-6.

Guerrette S, Wilson T, Gradia S, Fishel R. Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Mol Cell Biol** 1998; 18:6616-23.

Gupta S, Gellert M, Yang W. Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutS β bound to unpaired DNA loops. **Nat Struct Mol Biol** 2011; 19:72-8.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:5783-8.

Hassen S, Ali N, Chowdhury P. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **World J Gastrointest Pathophysiol** 2012; 3:71-9.

Hayes AP, Sevi LA, Feldt MC, Rose MD, Gammie AE. Reciprocal regulation of nuclear import of the yeast MutS α DNA mismatch repair proteins Msh2 and Msh6. **DNA Repair (Amst)** 2009; 8:739-51.

Heinen CD. Genotype to phenotype: Analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. **Mutat Res** 2010; 693:32-45.

Heinen CD, Cyr JL, Cook C, et al. Human MSH2 (hMSH2) protein controls ATP processing by hMSH2-hMSH6. **J Biol Chem** 2011; 286:40287-95.

Hernandez-Pigeon H, Laurent G, Humbert O, Salles B, Lautier D. Degradation of mismatch repair hMutS α heterodimer by the ubiquitin-proteasome pathway. **FEBS Lett** 2004; 562:40-4.

Hernandez-Pigeon H, Quillet-Mary A, Louat T, et al. hMutS α is protected from ubiquitin-proteasome-dependent degradation by atypical protein kinase C zeta phosphorylation. **J Mol Biol** 2005; 348:63-74.

Hinrichsen I, Brieger A, Trojan J, Zeuzem S, Nilbert M, Plotz G. Expression defect size among unclassified MLH1 variants determines pathogenicity in Lynch syndrome diagnosis. **Clin Cancer Res** 2013; 19:2432-41.

Hofstra RM, Spurdle AB, Eccles D, et al. Tumor characteristics as an analytic tool for classifying genetic variants of uncertain clinical significance. **Hum Mutat** 2008; 29:1292-303.

Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev** 2008; 129:391-407.

Hsieh P. DNA mismatch repair: Dr. Jekyll and Mr. Hyde? **Mol Cell** 2012; 47:665-6.

Iyer RR, Pluciennik A, Genschel J, Tsai MS, Beese LS, Modrich P. MutL α and proliferating cell nuclear antigen share binding sites on MutS β . **J Biol Chem** 2010; 285:11730-9.

Iyer RR, Pohlhaus TJ, Chen S, Hura GL, Dzantiev L, Beese LS, Modrich P. The MutS α -proliferating cell nuclear antigen interaction in human DNA mismatch repair. **J Biol Chem** 2008; 283:13310-9.

Izumchenko E, Saydi J, Brown KD. Exonuclease 1 (Exo1) is required for activating response to S(N)1 DNA methylating agents. **DNA Repair (Amst)** 2012; 11:951-64.

Javaid S, Manohar M, Punja N, et al. Nucleosome remodeling by hMSH2-hMSH6. **Mol Cell** 2009; 36:1086-94.

Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5:a012633.

Kansikas M, Kariola R, Nyström M. Verification of the three-step model in assessing the pathogenicity of mismatch repair gene variants. **Hum Mutat** 2011; 32:107-15.

Kariola R, Hampel H, Frankel WL, Raevaara TE, de la Chapelle A, Nyström-Lahti M. MSH6 missense mutations are often associated with no or low cancer susceptibility. **Br J Cancer** 2004; 91:1287-92.

Knudsen NØ, Nielsen FC, Vinther L, et al. Nuclear localization of human DNA mismatch repair protein exonuclease 1 (hEXO1). **Nucleic Acids Res** 2007; 35:2609-19.

Kondo E, Suzuki H, Horii A, Fukushige S. A yeast two-hybrid assay provides a simple way to evaluate the vast majority of hMLH1 germ-line mutations. **Cancer Res** 2003; 63:3302-8.

Kosinski J, Hinrichsen I, Bujnicki JM, Friedhoff P, Plotz G. Identification of lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair. **Hum Mutat** 2010; 31:975-82.

Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. **Annu Rev Biochem** 2005; 74:681-710.

Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. **J Biol Chem** 2007; 282:5101-5.

Larrea AA, Lujan SA, Kunkel TA. SnapShot: DNA mismatch repair. **Cell** 2010; 141:730.e1.

Lee SD, Alani E. Analysis of interactions between mismatch repair initiation factors and the replication processivity factor PCNA. **J Mol Biol** 2006; 355:175-84.

Leong V, Lorenowicz J, Kozij N, Guarné A. Nuclear import of human MLH1, PMS2, and MutLalpha: redundancy is the key. **Mol Carcinog** 2009; 48:742.

Li F, Mao G, Tong D, et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α . **Cell** 2013; 153:590-600.

Liberti SE, Andersen SD, Wang J, et al. Rasmussen LJ. Bi-directional routing of DNA mismatch repair protein human exonuclease 1 to replication foci and DNA double strand breaks. **DNA Repair (Amst)** 2011; 10:73-86.

Lin DP, Wang Y, Scherer SJ, et al. An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. **Cancer Res** 2004; 64:517-22.

Liu HX, Zhou XL, Liu T, et al. The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. **Cancer Res** 2003; 63:1894-9.

Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell** 2009; 136:823-37.

Lützen A, de Wind N, Georgijevic D, Nielsen FC, Rasmussen LJ. Functional analysis of HNPCC-related missense mutations in MSH2. **Mutat Res** 2008; 645:44-55.

Lynch PM. How helpful is age at colorectal cancer onset in finding HNPCC? **Dis Colon Rectum** 2011; 54:515-7.

Mao G, Lee S, Ortega J, Gu L, Li GM. Modulation of microRNA processing by mismatch repair protein MutL α . **Cell Res** 2012; 22:973-85.

Martinez SL, Kolodner RD. Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:5070-5.

Martín-López JV, Barrios Y, et al. The hMSH2 (M688R) Lynch syndrome mutation may function as a dominant negative. **Carcinogenesis** 2012; 33:1647-54.

Masih PJ, Kunnev D, Melendy T. Mismatch Repair proteins are recruited to replicating DNA through interaction with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Nucleic Acids Res** 2008; 36:67-75.

Mastrocola AS, Heinen CD. Lynch syndrome-associated mutations in MSH2 alter DNA repair and checkpoint response functions in vivo. **Hum Mutat** 2010; 31:E1699-708.

McCulloch SD, Kunkel TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. **Cell Res** 2008; 18:148-61.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <URL:http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> [2014 jan 12]

Mohd AB, Palama B, Nelson SE, et al. Truncation of the C-terminus of human MLH1 blocks intracellular stabilization of PMS2 and disrupts DNA mismatch repair. **DNA Repair(Amst)** 2006; 5:347-61.

Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **JAMA** 2012; 308:1555-65.

Mvundura M, Grosse SD, Hampel H, Palomaki GE. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. **Genet Med** 2010; 12:93-104.

Nielsen FC, Jäger AC, Lützen A, Bundgaard JR, Rasmussen LJ. Characterization of human exonuclease 1 in complex with mismatch repair proteins, subcellular localization and association with PCNA. **Oncogene** 2004; 23:1457-68.

Nyström-Lahti M, Perrera C, Räschle M, et al. Functional analysis of MLH1 mutations linked to hereditary nonpolyposis colon cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 33:160-7.

O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. **Carcinogenesis** 2006; 27:682-92.

Oliveira LP. **Avaliação de Instabilidade de Microssatélites e Expressão Imunoistoquímica das proteínas hMLH1 e hMSH2 em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose.** São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Ou J, Niessen RC, Lützen A, et al. Functional analysis helps to clarify the clinical importance of unclassified variants in DNA mismatch repair genes. **Hum Mutat** 2007; 28:1047-54.

Ou J, Niessen RC, Vonk J, Westers H, Hofstra RM, Sijmons RH. A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. **Hum Mutat** 2008; 29:1337-41.

Parsons R, Li GM, Longley MJ, et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. **Cell** 1993; 75:1227-36.

Pastrello C, Pin E, Marroni F, et al. Integrated analysis of unclassified variants in mismatch repair genes. **Genet Med** 2011; 13:115-24.

Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. **Dis Markers** 2004; 20:269-76.

Peña-Díaz J, Jiricny J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? **Trends Biochem Sci** 2012; 37:206-14.

Perera S, Bapat B. The MLH1 variants p.Arg265Cys and p.Lys618Ala affect protein stability while p.Leu749Gln affects heterodimer formation. **Hum Mutat** 2008; 29:332.

Perevoztchikova SA, Romanova EA, Oretskaya TS, Friedhoff P, Kubareva EA. Modern aspects of the structural and functional organization of the DNA mismatch repair system. **Acta Naturae** 2013; 5:17-34.

Petersen SM, Dandanell M, Rasmussen LJ. Functional examination of MLH1, MSH2, and MSH6 intronic mutations identified in Danish colorectal cancer patients. **BMC Med Genet** 2013; 14:103.

Pino MS, Chung DC. Application of molecular diagnostics for the detection of Lynch syndrome. **Expert Rev Mol Diagn** 2010; 10:651-65.

Pistorius S, Görgens H, Plaschke J, et al. Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. **Cancer Lett** 2007; 248:89-95.

Plotz G, Raedle J, Brieger A, Trojan J, Zeuzem S. N-terminus of hMLH1 confers interaction of hMutLalpha and hMutLbeta with hMutSalpha. **Nucleic Acids Res** 2003; 31:3217-26.

Plotz G, Welsch C, Giron-Monzon L, et al. Mutations in the MutSalpha interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. **Nucleic Acids Res** 2006; 34:6574-86.

Power DG, Glogowski E, Lipkin SM. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. **Hematol Oncol Clin North Am** 2010; 24:837-59.

Prolla TA, Baker SM, Harris AC, et al. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. **Nat Genet** 1998; 18:276-9.

Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. **Gastroenterology** 2005; 129:537-49.

Räschle M, Dufner P, Marra G, Jiricny J. Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutLalpha mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutSalpha. **J Biol Chem** 2002; 277:21810-20.

Rasmussen LJ, Heinen CD, Royer-Pokora B, et al. Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. **Hum Mutat** 2012; 33:1617-25.

Roesner LM, Mielke C, Fähnrich S, et al. Stable expression of MutLy in human cells reveals no specific response to mismatched DNA, but distinct recruitment to damage sites. **J Cell Biochem** 2013; 114:2405-14.

Romero A, Garre P, Valentin O, et al. Frequency and variability of genomic rearrangements on MSH2 in Spanish Lynch Syndrome families. **PLoS One** 2013; 8:e72195.

Schroering AG, Edelbrock MA, Richards TJ, Williams KJ. The cell cycle and DNA mismatch repair. **Exp Cell Res** 2007; 313:292-304.

Schroering AG, Williams KJ. Rapid induction of chromatin-associated DNA mismatch repair proteins after MNNG treatment. **DNA Repair (Amst)** 2008; 7:951-69.

Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. **J Mol Diagn** 2008; 10:293-300.

Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Med J** 2009; 127:46-51.

Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. **Fam Cancer** 2010; 9:563-70.

Stigliano V, Assisi D, Cosimelli M, et al. Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. **J Exp Clin Cancer Res** 2008; 27:39.

Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond lynch syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2013 Aug 17. [Epub ahead of print]

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature** 1993; 365:274-6.

Takahashi M, Shimodaira H, Andreutti-Zaugg C, Iggo R, Kolodner RD, Ishioka C. Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. **Cancer Res** 2007; 67:4595-604.

Tavtigian SV, Greenblatt MS, Goldgar DE, Boffetta P, IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. **Hum Mutat** 2008; 29:1261-4.

Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. **Hum Mutat** 2003; 22:428-33.

Tennen RI, Haye JE, Wijayatilake HD, Arlow T, Ponzio D, Gammie AE. Cell-cycle and DNA damage regulation of the DNA mismatch repair protein Msh2 occurs at the transcriptional and post-transcriptional level. **DNA Repair (Amst)** 2013; 12:97-109.

Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer JP, et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. **Nat Genet** 2013 Dec 22. [Epub ahead of print].

Tran PT, Fey JP, Erdeniz N, Gellon L, Boiteux S, Liskay RM. A mutation in EXO1 defines separable roles in DNA mismatch repair and post-replication repair. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:1572-83.

Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, et al. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. **Gastroenterology** 2002; 122:211-9.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Umar A, Buermeyer AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. **Cell** 1996; 87:65-73.

Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:153-8.

Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, et al. Revised guidelines for the clinical management of lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. **Gut** 2013; 62:812-23.

Valentin MD, da Silva FC, dos Santos EM, et al. Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. **Fam Cancer** 2011; 10:641-7.

Wanat JJ, Singh N, Alani E. The effect of genetic background on the function of *Saccharomyces cerevisiae* mlh1 alleles that correspond to HNPCC missense mutations. **Hum Mol Genet** 2007; 16:445-52.

Wang JY, Edelmann W. Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. **Cancer Cell** 2006; 9:417-8.

Wang Z, Sun Y, Gao B, et al. Two co-existing germline mutations P53 V157D and PMS2 R20Q promote tumorigenesis in a familial cancer syndrome. **Cancer Lett** 2014; 342:36-42.

Wernstedt A, Valtorta E, Armelao F, et al. Improved multiplex ligation-dependent probe amplification analysis identifies a deleterious PMS2 allele generated by recombination with crossover between PMS2 and PMS2CL. **Genes Chromosomes Cancer** 2012; 51:819-31.

Win AK, Young JP, Lindor NM, et al. Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. **J Clin Oncol** 2012; 30:958-64.

Wu X, Platt JL, Cascalho M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. **Mol Cell Biol** 2003; 23:3320-8.

Yuan ZQ, Gottlieb B, Beitel LK, et al. Polymorphisms and HNPCC: PMS2-MLH1 protein interactions diminished by single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat** 2002; 19:108-13.

Zhang H, Richards B, Wilson T, et al. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. **Cancer Res** 1999; 59:3021-7.

Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. **J Mol Diagn** 2008; 10:301-7.

Zhang T, Huang J, Gu L, Li GM. In vitro repair of DNA hairpins containing various numbers of CAG/CTG trinucleotide repeats. *DNA Repair (Amst)*. 2012; 11:201-9.

Zigelboim I, Powell MA, Babb SA, et al. Epitope-positive truncating MLH1 mutation and loss of PMS2: implications for IHC-directed genetic testing for Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2009; 8:501-4.

Zhong Z, Dong Z, Yang L, Chen X, Gong Z. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. **Tumour Biol** 2013; 34:1959-65.

Anexo 1 - Carta de aprovação co Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 12 de Julho de 2010.

À
Dra. Dirce Maria Carraro

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1423/10
“Análise funcional de isoformas protéicas não classificáveis codificadas nos genes MLH1 e MSH2.”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 08/06/2010, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Carta de Esclarecimento referente à Fonte Financiadora do projeto;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro de Ensino, Pesquisa e Treinamento – Laboratório de Genômica e Biologia Molecular.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1