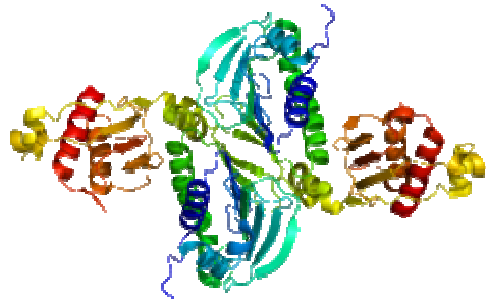




# Detección de mutaciones germinales en el gen *PMS2* asociado a Síndrome de Lynch



Alumna: Virginia Álvarez Río  
Tutora: Dra. Mercedes Durán Domínguez

Septiembre 2014



## AGRADECIMIENTOS

Bueno, pues ya estamos aquí... Ha sido un año duro y difícil pero al final todo en esta vida se consigue. Por ello, quiero agradecer a toda esa gente que de manera directa o indirecta han hecho posible que esto salga a la luz.

A mi familia por ese apoyo incondicional que siempre me muestran en todo lo hago y he hecho en mi vida, gracias a ellos soy quien soy.

A mi profes del Master, en especial a M<sup>a</sup> Carmen, Teresa y Rosalba por esa capacidad de comprensión que tienen. Gracias Teresa por iluminarme en el túnel.

A los “biobichos” de mis compañeros de clase, por lo bien que han tratado a la “abuela”.

A mis chicas del laboratorio B7: Eva, Mónica, Carolina, Mar, Lara y Noe, porque aparte de ser mis compañeras de laboratorio han sido mis confidentes, las que me han ayudado a levantarme cuando me he caído y porque sé que cuando acabe este máster me llevaré unas buenas amigas con las que podré contar siempre, más de lo que me han demostrado no se puede.

A mi Teacher y tutora, Mercedes Durán gracias por tu paciencia, tu don para enseñar, tu ánimo y comprensión, por hacerlo todo tan fácil y bonito, y sobre todo, por enseñarme con ilusión el mundillo de la investigación... Gracias Merche por ser como eres...

Por último, agradecer a los pacientes y familiares que hacen posible que se lleve a cabo este trabajo, juntos podemos ganar esta batalla.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	5
Introducción.....	6
1. Cáncer colorrectal.....	6
1.1 Generalidades.....	6
1.2. Cáncer colorrectal.....	6
1.3. Clasificación de los distintos tipos de cáncer.....	7
1.4. Cáncer de colon hereditario no polipósico o síndrome de Lynch.....	8
1.5. Sistema de reparación del ADN (SISTEMA MMR).....	9
1.6. Características del gen y proteína PMS2.....	10
1.7. Inmunohistoquímica (IHQ).....	11
1.8. Análisis de inestabilidad de microsatélites (IMS).....	12
1.9. Grandes reordenamientos genómicos.....	12
1.10. Variantes de efecto desconocido (VED).....	13
2. Objetivos.....	13
Material y métodos.....	14
1. Selección de casos y controles.....	14
2. Extracción de ADN y ARN total de sangre periférica.....	14
3. Extracción de ADN de muestras de tejido embebidas en parafina.....	14
4. Cuantificación de Ácidos Nucleicos.....	14
5. Analisis mutacional en línea germinal.....	15
PCR-long.....	15
PCR específica de exones.....	16
Electroforesis en gel de agarosa.....	16
Secuenciación.....	16
Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación MLPA.....	17
6. Estudio de ADN tumoral.....	18
Inmunohistoquímica (IHQ).....	18
Inestabilidad de microsatélites (IMS).....	18
Resultados.....	20
Discusión.....	27
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30

## ABREVIATURAS

**A:** Antisentido (oligonucleótido)

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario

**ADNg:** ADN genómico.

**APC:** Gen *Adenomatous polyposis coli*

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** ARN mensajero.

**bp:** Pares de bases

**CCHNP:** Cáncer de Colon Hereditario no polipósico

**CCR:** Cáncer colorrectal.

**del:** Deleción

**DNTPs:** Deoxinucleósido trifosfato

**ExoI:** Exonucleasas I

**FAM:** 6-carboxyfluoresceína

**HNPCC:** Cáncer colorrectal no polipósico.

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IMS:** Inestabilidad de microsatélites

**IMS +:** Inestabilidad de microsatélites

**IMS-H:** Alta inestabilidad de microsatélites

**IMS-L:** Baja inestabilidad de microsatélites

**LOVD:** Leiden Open Variation Database

**MLH1:** Gen homólogo humano 1 de *MutL* de *E.coli*.

**MLPA:** Multiplex ligation-dependent probe amplification

**MMR:** Sistema Mismatch Repair o de reparación de bases desapareadas.

**MMR +:** Mutación patogénica en genes *MMR*

**MSH2:** Gen homólogo humano 2 de *MutS* de *E.coli*.

**MSH6:** Gen homólogo humano 6 de *MutS* de *E.coli*.

**MSS:** Estabilidad de microsatélites

**NV:** No valorable

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**Pb:** Pares de bases

**PCNA:** Antígeno nuclear de proliferación celular

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**RER +:** Replication errors

**RFC:** Factor de replicación C

**RPA:** Proteína de replicación A

**RT:** Retrotranscripción

**RT-PCR:** Transcripción reversa

**S:** Sentido (oligonucleótido)

**UV:** Variante no clasificada

**VED:** Variantes de Efecto Desconocido.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. CÁNCER COLORRECTAL

#### 1.1. GENERALIDADES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer se define como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.

El problema: que es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012. (OMS, 2014).

#### 1.2. CÁNCER COLORRECTAL

El carcinoma colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres en nuestro medio después del cáncer de pulmón y de mama, respectivamente. En España, es el tercer tipo de tumor más frecuente entre los hombres (tras los tumores de pulmón y próstata) y el segundo entre las mujeres (después del cáncer de mama). Desde el punto de vista de las alteraciones genéticas, la mayoría (90%) de los CCR presenta activación de determinados oncogenes (*K-ras*) e inhibición de genes supresores (*DCC*, *APC*, *TP53*). Los tumores originados por esta asociación de alteraciones, denominada vía supresora, muestran entre sus características el ser aneuploides (inestabilidad cromosómica). Existe una segunda vía oncogénica caracterizada por la alteración del sistema de reparación de errores durante la replicación del ADN, controlado por los genes MMR (mismatchrepair), principalmente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Los tumores desarrollados por esta vía presentan cientos de mutaciones en secuencias altamente repetitivas denominadas microsatélites. Para denominarlos se han aplicado en la literatura diversos términos como tumores con inestabilidad de microsatélites (IMS+), tumores con alteración de la vía reparadora (MMR+), tumores con fenotipo RER+ (replicationerrors) o tumores con fenotipo mutador. Los tumores MMR+ presentan un mejor pronóstico que los tumores sin alteración de la vía reparadora. Además, no se benefician de los tratamientos quimioterápicos basados en terapias con 5-fluorouracilo. La IMS se observa en el 7,4% de los CCR de población no seleccionada en España. La gran mayoría de tumores con IMS (83% aproximadamente) son esporádicos, y el 17% restante se desarrolla en pacientes con Carcinoma Colorrectal Hereditario no Polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch. (PayáRomá et al., 2006).

El tipo de cáncer colorrectal más frecuente es el adenocarcinoma. Aparece en el 90-95% de los casos y se produce en la mucosa que recubre el interior del colon y recto, son bastante comunes en la población general, pero sólo 5-10% progresan a tumor maligno. (Winawer, 1999).

La enfermedad tiene múltiples etapas, las células normales se transforman progresivamente en tumorales malignas, inmortales e invasivas, estas etapas comienzan como un pólipo adenomatoso benigno, se transforma en adenoma avanzado con alto grado de displasia y por último a cáncer invasivo. A este proceso multipaso se le denomina Secuencia Adenoma-Carcinoma (Figura 1).

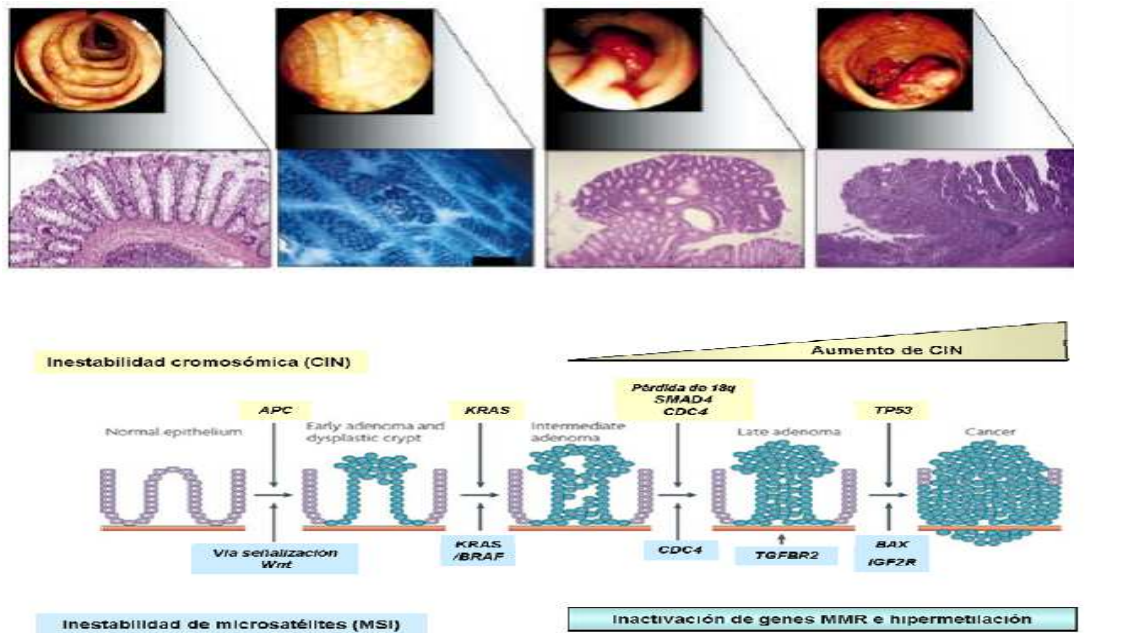
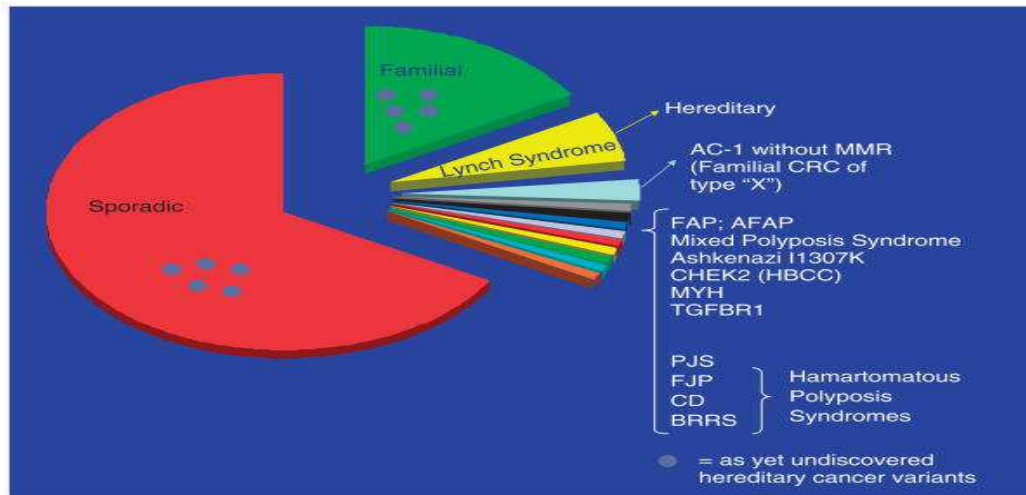


Figura 1. Secuencia adenoma-carcinoma. Vías de carcinogénesis. Papel de los genes reparadores de ADN. Representaciones macro y microscópicas de la progresión de los cambios. (Volgstein et al., 1996).

### 1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER.

La etiología genética del cáncer colorrectal es heterogénea (Figura 2). Podemos agruparlos en tres tipos en base a los antecedentes familiares: CCR esporádico, familiar y hereditario.

- El **CCR Esporádico**: supone alrededor del 75% de todos los casos de CCR y es el resultado de mutaciones somáticas adquiridas. Suele aparecer en personas mayores de 50 años (65-68%) y no se asocia a ningún patrón de herencia determinado.
- El **CCR Hereditario** representa un 10 % de todos los casos, de los cuales un 5% se asignan al **Síndrome de Lynch** (CCHNP, Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico). Estos CCR se dividen a su vez en Síndromes polipósicos y no polipósicos. En ellos se expone su patrón de herencia, mutación germinal conocida e información sobre los pólipos en el Síndrome.
- El **CCR Familiar**: hasta en un 15 % de todos los casos de CCR. Se caracteriza por un gran número de casos de CCR en la familia en los que el patrón de herencia no ha podido ser determinado y no cumplen los criterios diagnósticos y/o moleculares que identifican a las formas hereditarias. Por lo tanto, sin conocer los factores genéticos que subyacen a estas agrupaciones familiares, este grupo pueden incluir a variantes de CCR hereditario de los que aún no se conoce su base genética.



**Figura 2. Clasificación gráfica de los distintos tipos de CCR. Representa la marcada heterogeneidad genotípica y fenotípica en Síndromes de cáncer de colorrectal hereditario. Los círculos indican que aún no han sido determinadas las variantes genéticas implicadas (Lynch HT et al., 2009)**

#### 1.4. CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSIPO O SÍNDROME DE LYNCH

El Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico (CCHNP) fue descrito en 1966 por Dr. Henry T. Lynch, al publicar dos familias caracterizadas por presentar cáncer de colon en ausencia de pólipos en adultos jóvenes, que se acompañaban de una constelación de tumores en otras localizaciones. El estudio de cientos de familias similares a las descritas por el Dr. Lynch, ha ayudado a describir las características principales de éste síndrome.

Es un síndrome de cáncer hereditario relativamente común, que supone entre un 3-5% de todos los casos de CCR (Chapelle, 2003; Lynch et al., 2003; Salovaara et al., 2000). La susceptibilidad a este tipo de cáncer es heredada de una manera autosómica dominante, causado por defectos en los genes reparadores del ADN (genes MMR *MLH1* 41%, *MSH2* 40%, *MSH6* 12%, *PMS2* 7%), que se desarrolla a una edad temprana (edad media 45 años), puede presentar cánceres asociados: cáncer colorrectal, de estómago, de uréter/pelvis renal, de cerebro (glioblastoma en la variante del Síndrome de Turcot), del intestino delgado, del conducto hepato biliar, páncreas, carcinomas sebáceos y queratoacantomas (variante del Síndrome de Muir-Torre).

También presentan un mayor riesgo (25-30%) de tumores colónicos metacrónicos; aunque en términos globales presenta una mayor supervivencia que el CCR. Anatomopatológicamente es poco diferenciado, con un exceso de moco y linfocitos infiltrando al tumor, la presencia de células en anillo de sello o reacción tipo Crohn-like.

El análisis genético de los individuos con riesgo de presentar síndrome de Lynch es costoso y complejo. En 1991, el International Collaborative Group for HNPCC desarrolló los denominados criterios de Amsterdam (Vasen HFA et al., 1991) que definían este síndrome. Sin embargo, 8 años después estos criterios fueron revisados por el mismo grupo para incluir en los mismos la posibilidad de aparición de tumores extracolónicos, los denominados criterios de Amsterdam modificados (Vasen HFA et al., 1999).



Además de estos criterios clínicos para la identificación de familias CCHNP existen los denominados criterios de Bethesda (Umar A, 2004) que nos orientan sobre qué tumores colorrectales requieren ser estudiados para detectar si existe inestabilidad de microsatélites o no. (Tabla 1)

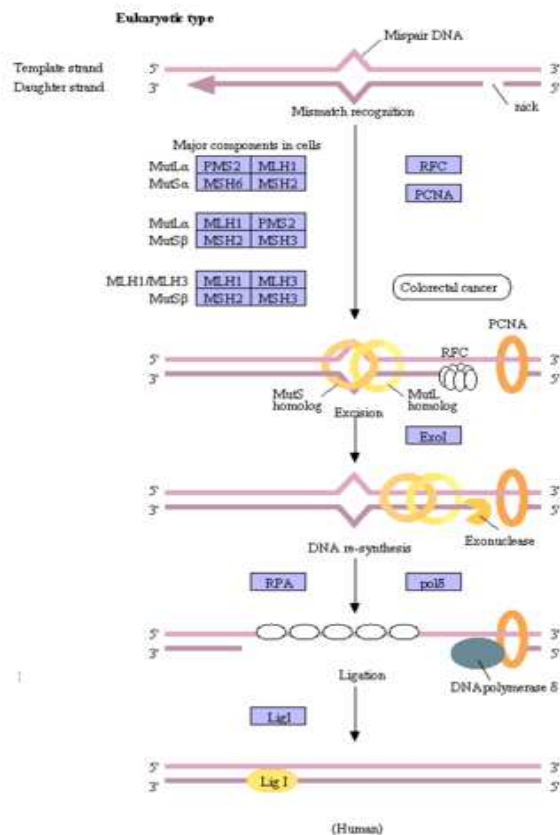
**Tabla 1. Criterios de Ámsterdam II y Criterios de Bethesda (Payá Romá et al, 2006).**

Criterios de Ámsterdam II	Criterios de Bethesda revisados
<p>Tres o más familiares afectados de CCR o neoplasia asociada al CCHNP (endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos, y</li> <li>- Afectación de 2 generaciones consecutivas, y</li> <li>- Como mínimo un caso diagnosticado antes de los 50 años, y</li> <li>- Se excluye la Poliposis Adenomatosa Familiar</li> <li>- Confirmación histopatológica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CCR en paciente con &lt; 50 años de edad.</li> <li>- Presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otra neoplasia de la esfera asociada al CCHNP (estómago, intestino delgado, páncreas, vía biliar, endometrio, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, adenomas sebáceos, querato-acantomas) con independencia de la edad.</li> <li>- CCR con infiltración linfocitaria, diferenciación mucinosa/ células en anillo de sello o patrón de crecimiento medular en paciente con &lt; 60 años de edad.</li> <li>- Uno o más familiares de 1.º grado con CCR o neoplasia de la esfera asociada al CCRHNP diagnosticada antes de los 50 años de edad.</li> <li>- Dos o más familiares de 1.º ó 2.º grado con CCR o neoplasia de la esfera asociada al CCHNP con independencia de la edad.</li> </ul>

## 1.5. SISTEMA DE REPARACIÓN DEL ADN (SISTEMA MMR)

Los procesos reparadores del ADN son cruciales para mantener la integridad del genoma. Los genes reparadores del ADN o genes MMR (mismatchrepair system)

forman parte de un sistema de reconocimiento y reparación de apareamiento erróneo de bases que pueden surgir durante la replicación del ADN. Consiste en un sistema de escisión/resíntesis que se puede dividir en cuatro fases. (Figura 3). La primera fase consiste en el reconocimiento de bases desapareadas. Este reconocimiento se lleva a cabo por una familia de proteínas denominadas hMSH, para designar a los homólogos humanos de MutS (descubiertos por primera vez en las bacterias). Existen dos complejos que reconocen bucles de bases desapareadas: MutS $\alpha$  es un heterodímero formado por MSH2/MSH6 que reconoce los desapareamientos de una sola base; y MutS $\beta$  (heterodímero MSH2/MSH3) que se une predominantemente a las zonas de inserción/delección de 2-4 bases. Las proteínas hMSH precisan unirse a ATP para realizar el cambio



**Figura 3. Sistema de reparación del ADN (Mismatch repair system). (Kanehisa Laboratories 2010)**

conformacional que les permita unirse a modo de abrazadera al bucle de desapareamiento. La

segunda fase consiste en el reclutamiento de las enzimas reparadoras. El complejo ADN-MutS-ATP recluta al complejo MutL, heterodímero formado por dos proteínas MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) o MLH1/PMS1 (MutL $\beta$ ). El dímero MutL aparece para funcionar como marcador molecular del desapareamiento, desplazando a la ADN polimerasa y al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) desde la hebra hija naciente. El complejo de reparación debe buscar una señal que le permita identificar cual es la hebra correcta (parental) y cual la hebra errónea (hija) que debe ser corregida. Finalmente recluta la exonucleasa I (ExoI) y otras proteínas para la escisión de varios nucleótidos de la hebra errónea (tercera fase: escisión del desapareamiento). En la última fase, se produce la resíntesis de la cadena de ADN, mediante la polimerasa de ADN  $\delta$  en humanos. La escisión y resíntesis de la nueva cadena se realiza con la acción de otras proteínas, entre las que destacan, PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), RPA (proteína de replicación A), RFC (Factor de replicación C), endonucleasa FEN1, entre otros factores. (Hoeijmakers, 2001; Jiricny, 2006).

## 1.6. CARACTERÍSTICAS DEL GEN Y PROTEINA PMS2

El gen *PMS2* se localiza en el cromosoma 7, en concreto en la banda p22.1, tiene un tamaño de 35.867 pb y está compuesto de 15 exones. Codifica una proteína formada por 862 aminoácidos. (Figura 4).

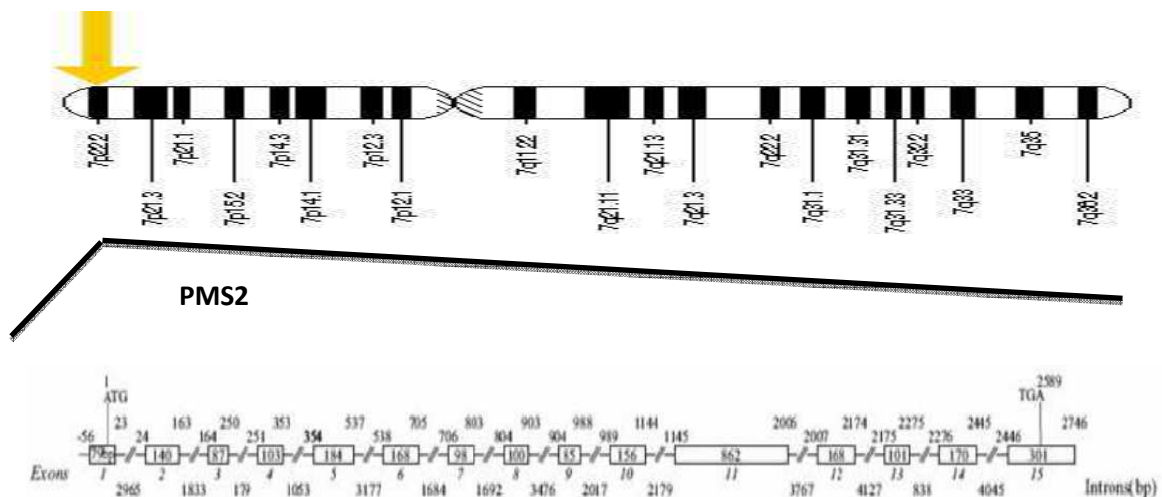
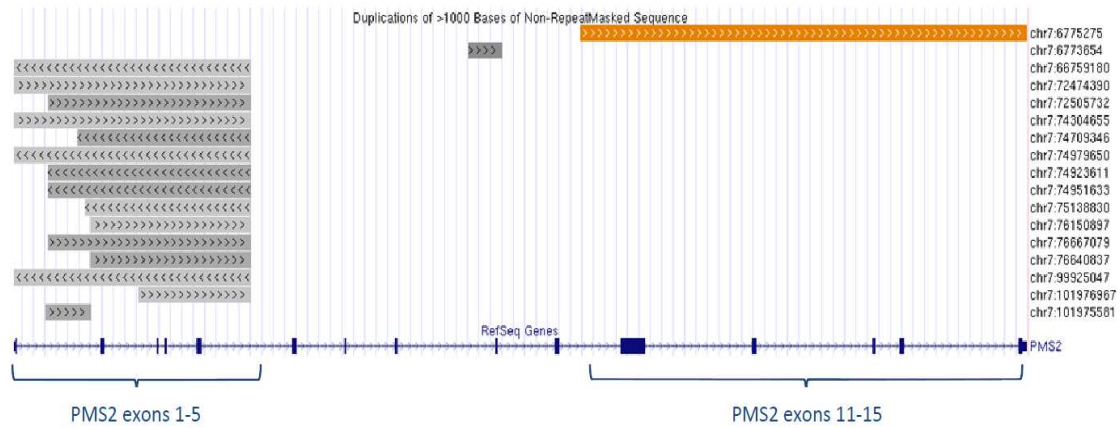


Figura 4. Localización del gen *PMS2* en el cromosoma humano 7. ( Mismatch Repair Genes Variant Database).

El análisis de este gen se ve comprometido por la existencia de un número de pseudogenes que muestran una alta homología con la secuencia del gen normal u original.

Existe un total de 15 pseudocopias parálogas del gen en el mismo cromosoma (Figura 5). Catorce de estos pseudogenes ( $\Psi$ 1- $\Psi$ 14), contienen las pseudocopias de los exones 1-5, que se encuentran en 7q y puede resultar útil evitar su co-amplicación involuntaria mediante el diseño de cebadores de PCR-exón específicos.

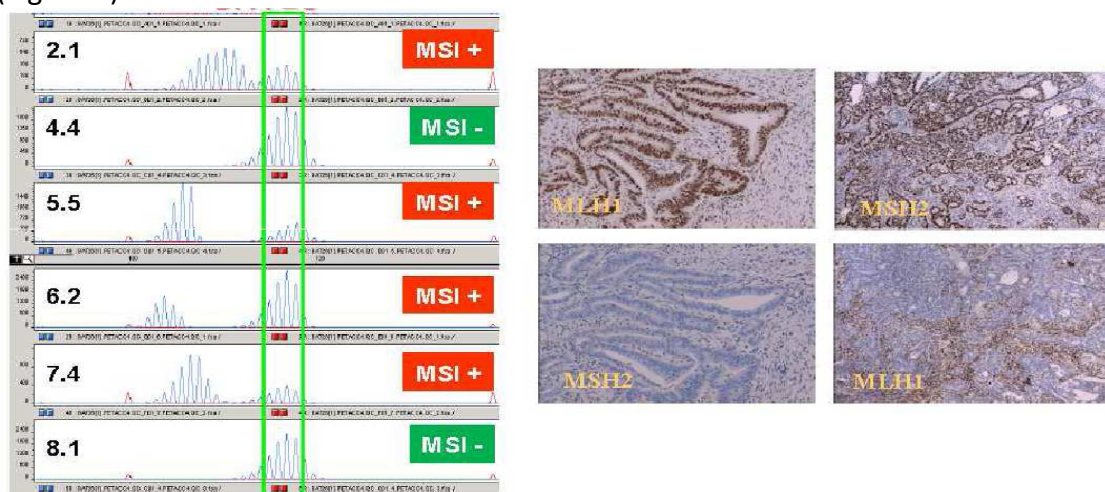


**Figura 5. Representación esquemática de los diferentes pseudogenes del gen *PMS2* y su situación cromosómica. (Support HNPCC MASTR analysis PMS2-PMS2-CL-2012, Multiplicon).**

Existe un pseudogen adicional, llamado *PMS2CL* (formalmente  $\Psi 0$ ), que se encuentra en 7p22. *PMS2CL* resulta de la duplicación invertida de un elemento de repetición de 100 kb que se incluye en la región 3' de *PMS2* (exón 9-15). *PMS2CL* contiene seis de estos exones de *PMS2* (exón 9 y exones 11-15), pero carece de exón 10 debido a una delección de 2,7 kb mediada-Alu.

## 1.7. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La inmunohistoquímica es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos específicos para la identificación de proteínas. Los anticuerpos monoclonales contra las proteínas MMR (MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6) empezaron a estar disponibles alrededor de 1996, proporcionando una metodología alternativa para la detección de deficiencias en los genes *MMR* (Leach et al., 1996; Wilson et al., 1995). El análisis de la IHQ revela qué gen en particular del sistema MMR puede estar alterado y permite un análisis mutacional dirigido hacia el gen de interés. (Figura 6).



**Figura 6. Imagen izquierda de estabilidad (MSI-) e inestabilidad de Microsatélites (MSI+). Imagen derecha de expresión e inexpressión de proteínas mediante técnica de inmunohistoquímica. (J Mol Diagn, 2008).**

En los tumores del síndrome de Lynch puede observarse pérdida de expresión de cualquiera de las proteínas MMR (MLH1 50%, MSH2 39%, MSH6 7%, PMS2<4%). Un mínimo porcentaje (5% aproximadamente) de pacientes con mutación germinal puede mostrar expresión conservada de las cuatro proteínas. Esto puede ser debido a la expresión de una proteína no funcional pero con conservación del epítipo reconocido por el anticuerpo, o bien, que la mutación esté en alguno de los otros genes que controlan el MMR (*PMS1* o *MLH3*).

La pérdida de expresión de MLH1 generalmente se asocia a pérdida secundaria de PMS2. De la misma forma, la pérdida de MSH2 suele asociarse a pérdida secundaria de MSH6. Las pérdidas aisladas de PMS2 o MSH6, indicativas de mutación en estos genes, son poco frecuentes y sólo deben considerarse tras haber observado expresión de MLH1 y MSH2 (PayáRomá et al., 2006).

### 1.8. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (IMS)

Los microsatélites son secuencias de ADN de longitud variable (generalmente cortas) constituidas por uno (mononucleotídicos) o dos (dinucleotídicos) nucleótidos que se repiten un número variable de veces a lo largo de todo el genoma, pudiéndose encontrar tanto dentro como fuera de los genes. Las polimerasas de ADN durante la replicación “patinan” sobre estas secuencias repetitivas, generando que la hebra replicada varíe en número de repeticiones respecto a la hebra molde. (Figura 6). Este error replicativo generalmente es reparado por los sistemas de reparación de errores del apareamiento (MMR genes). Mientras que en las células sanas la longitud de las repeticiones de microsatélites es constante, en el síndrome de Lynch, debido a la alteración de alguno de los genes del sistema de reparación se produce una gran variabilidad en la longitud de repeticiones de secuencia en los microsatélites, denominada **inestabilidad de microsatélites**. Se calcula que 85% de los carcinomas colorrectales en pacientes con CCHNP presenta inestabilidad de microsatélites (Umar et al, 2004).

En 1998 se acordó un panel de 5 marcadores microsatélites consenso que incluye y los criterios para definir la inestabilidad.

Los marcadores son dos con repeticiones de mononucleótidos (BAT-25 y BAT-26) tres de dinucleótidos (NR-21, NR-24 y NR-27) (Boland et al., 1998). Se considera que un tumor presenta alta IMS (IMS-H) si muestra inestabilidad en 2 o más marcadores y baja IMS (IMS-L) si aparece en un marcador (Figura 6). Actualmente tiende a abandonarse el concepto de IMS-L porque se ha demostrado que este grupo presenta características superponibles a las de los tumores sin IMS. (PayáRomá et al., 2006).

### 1.9. GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS

Los **grandes reordenamientos genómicos**, son mutaciones en las que se pierde o en las que se aumenta el número de exones del gen e incluso los alelos. Son una parte importante del espectro mutacional de Síndrome de Lynch que deben ser incluidos en el test diagnóstico (Di et al., 2004). A nivel global se ha estimado que la frecuencia de grandes reordenamientos en genes *MMR* en pacientes con Síndrome de Lynch oscila 10%-20% (van der et al., 2005) (Nakagawa et al., 2003), siendo los genes más frecuentemente afectados *MSH2* (60%), *MLH1* (27%) mientras que es menor en *MSH6* (4%) y *PMS2* (8%). La proporción de familias que presentan estos grandes

reordenamientos depende de la población estudiada, de los criterios de selección empleados y de las técnicas de detección.

Por otro lado, los reordenamientos genómicos son una causa importante del Síndrome de Lynch que no se detectan por secuenciación (Charbonnier et al., 1995), que implica tanto a los genes *MMR* como al gen *EPCAM*.

Los últimos cambios tecnológicos han permitido el desarrollo de la técnica MLPA (multiplex ligation probe amplification) (Schouten et al., 2002), la cual está basada en la detección por fluorescencia de la amplificación cuantitativa de los diferentes exones de un gen. Sin embargo, ésta técnica no está validada para su uso diagnóstico de modo que los resultados obtenidos han de ser analizados por técnicas complementarias como MLPA de comprobación o mediante RT-PCR.

## 1.10. VARIANTES DE EFECTO DESCONOCIDO (VED)

Todos los cambios genómicos encontrados son potencialmente deletéreos (Lynch and dela, 2003). Sin embargo, a diferencia de las mutaciones sin sentido, las deleciones y las variantes que afectan al splicing (las cuales crean un codón de parada prematura o producen un cambio en la pauta de lectura), las mutaciones missense no siempre son interpretables, adicionalmente, cuando nos encontramos con una variante no descrita previamente, su interpretación resulta compleja. Estas variantes de ADN, sin una naturaleza patogénica clara, son llamadas **Variantes de Efecto Desconocido** (VED). Considerando la importancia del diagnóstico temprano del Síndrome de Lynch para la prevención del cáncer, resulta esencial evaluar sus consecuencias por ello, se cuenta con bases de datos internacionales en las que se recogen mutaciones germinales, y que son accesibles de manera on-line. Muchos criterios pueden ser usados para evaluar las VED en los genes *MMR* (frecuencia en controles, cosegregación variante-enfermedad en la familia, estudios in silico y estudios funcionales) y todos coinciden en que estas variantes deberían ser exploradas tanto a nivel del ARNm como a nivel de la proteína.

## 2. OBJETIVOS

1. Puesta a punto de una técnica de análisis mutacional del gen *PMS2* con evasión de los pseudogenes.
2. Analizar la contribución del gen *PMS2* al Síndrome de Lynch
3. Poder establecer una correlación genotipo-fenotipo que nos guie en el diagnóstico genético
4. Valorar la inclusión del análisis genético del gen *PMS2* en la rutina diagnóstica del Síndrome de Lynch.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. SELECCIÓN DE CASOS Y CONTROLES

En el laboratorio de genética del cáncer del IBGM, donde se lleva a cabo el programa de prevención de Cáncer Hereditario, se han analizado más de 600 familias para genes implicados en Cáncer de Colon Hereditario no-polipósico (CCHNP) o Síndrome de Lynch. Estas familias fueron seleccionadas según criterios establecidos por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, en base a criterios internacionales de Amsterdam II o de Bethesda.

Se han seleccionado 9 familias, a través de la Consulta de Consejo Genético del Hospital General Yagüe de Burgos, con la aportación del consentimiento informado firmado. Los casos índice de estas 9 familias presentaban IHQ deficiente, 6 de ellos en los genes MLH1 y PMS2 y, los otros 3 sólo en PMS2.

### 2. EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN TOTAL DE SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre a analizar llegan al laboratorio en tubos de 10 ml anticoaguladas con EDTA-K<sub>3</sub> y se extraen por venopunción.

Se aísla el ADN<sub>g</sub> de linfocitos de sangre periférica usando el QIAamp ADN Blood y posteriormente se introduce en la máquina Roche Magna Pure<sup>®</sup> Compact usando el kit Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I Large Volume (Laboratorios Roche) de acuerdo a las instrucciones que indica dicho laboratorio.

Para extraer el ARN total se hace a partir de 3 ml de los tubos de sangre anticoagulada con EDTA-K<sub>3</sub> mediante el kit QIAamp RNA Blood Mini (Quiagen) y luego con el kit MagNAPure Compact RNA Isolation kit para el robot MagNAPure Compact (Roche). Eliminamos los glóbulos rojos empleando el reactivo de lisis Red Blood Cell Lysis Buffer y, posteriormente, homogenizamos con el tampón de lisis de tejidos que contiene el kit.

De cada muestra se conserva un pellet de linfocitos a -80°C de ADN y ARN para su posible uso en un futuro.

### 3. EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE TEJIDO EMBEBIDAS EN PARAFINA

Las muestras llegan al laboratorio embebidas en parafina. Se retira la mayor parte de la parafina de manera mecánica haciendo cortes de unos 8µm que se introducen en tubos Eppendorf. Estas son tratadas con Xileno para desparafinar y luego se sigue el protocolo comercial de QIAamp and mini kit (Quiagen, en el apartado de tejidos).

### 4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Tras la extracción de los ácidos nucleicos se cuantificó la cantidad de ADN y ARN en un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (ThermoScientific, Walkman, MA, EEUU) utilizando entre 1-1,5µl de muestra. Se tomaron las medidas de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm; considerando que una unidad de A260 equivale a 50 µg de ADN. La relación de los valores obtenidos para A260/A280 nos da una estimación de la pureza de la muestra, siendo óptima para estudio genético si se encuentra entre 1.7-1.9.

## 5. ANÁLISIS MUTACIONAL EN LÍNEA GERMINAL

### 5.1. PCR-LONG

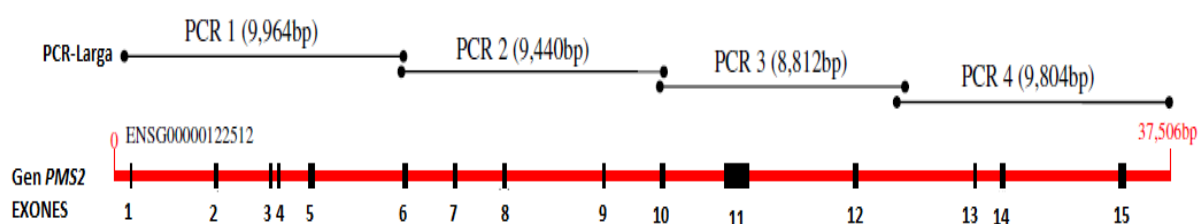
La presencia de una gran familia de pseudogenes altamente homólogos a *PMS2* ha resultado muy difícil para su secuenciación. Utilizando PCR de largo alcance (PCR long) se logra amplificar *PMS2* y no los pseudogenes.

Este método se usa en pacientes cuyos tumores eran negativos para la proteína *PMS2* por inmunohistoquímica y no mostraban mutación alguna en el gen *MLH1*.

De cada muestra se toma un volumen final de 50  $\mu$ l: ADN, Buffer B 10x, DNTPs, Primer correspondientes, Taq EURx. Los exones fueron amplificados en 4 PCR: exones 1 al 5 (LR1), exones 6 al 9 (LR2), exones 10 al 12 (LR3) y exones 13 al 15 (LR4) seguido de una nested PCR. Los primers de *PMS2* fueron utilizados en el estudio de Mark Clendenning et al., 2006, con ciertas modificaciones. (Tabla2 y Figura 7).

**Tabla 2. Secuencia de los primers para amplificación de *PMS2*. (S:sentido, A: antisentido) (Mark Clendenning et al., 2006).**

NOMBRE PRIMER	SECUENCIA	Tm°C	NOMBRE PRIMER	5'-SECUENCIA- 3'	Tm°C
LRPCR1 For	S-ACGTGCGAAAGCAGCCAATGGGAGTT	65	PMS2exon7 For	S-ACCCACGAGTTTGACATTGCAGTGA	60
LRPCR1 Rev	A-CTTCCACCTGTGCATACCACAGGCT	65	PMS2exon7 Rev	A-GTAGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATA	60
LRPCR2 For	S-GGTCCAGGCTTACATGCATACTGT	65	PMS2exon8 For	S-AGATTTGGAGCACAGATACCCGTGA	60
LRPCR2 Rev	A-CTGACTGACATTTAGCTTGTGACA	65	PMS2exon8 Rev	A-TGCGGTAGACTTCTGTAAATGCACA	60
LRPCR3 For	S-GCGTTGATATCAATGTTACTCCAGA	65	PMS2exon9 For	S-CCTTCTAAGAACATGCTGGTTGGTT	60
LRPCR3 Rev	A-AGTAGTCAGGGTAAAACATTCCAGT	65	PMS2exon9 Rev	A-ATCTCATTCCAGTCATAGCAGAGCT	60
LRPCR4 For	S-AAAATTAGTCAGACTTGATGGTGTG	65	PMS2exon10 For	S-AGCCCTCCGTATTTGTCTATTCA	60
LRPCR4 Rev	A-CCTTCCATCTCAAACCAGCAAGA	65	PMS2exon10 Rev	A-GCTTTAGAAGCTGTTGTACTGT	60
PMS2exon1 For	S-ACGTGCGAAAGCAGCCAATGGGAGTT	60	PMS2exon11 For	S-GCTTTAGAAGCTGTTGTACTGT	60
PMS2exon1 Rev	A-CAGGTAGAAAGGAAATGCATTCAGT	60	PMS2exon11 Rev	A-GCAACAGAGCAAGACTCTGTCTCAA	60
PMS2exon2 For	S-ACAGTGTTGAGTCATTTCCACAGT	60	PMS2exon12 For	S-GCCAAGATTGTGCCATTGCACTGTA	60
PMS2exon2 Rev	A-TTCTTAGCATAACACCTGCCTGGCA	60	PMS2exon12 Rev	A-AGTAGATACAAGGCTTGTCTGTGTT	60
PMS2exon3 For	S-TAGTCTGGGCTAGTAAATAGCCAGA	60	PMS2exon13 For	S-GTGACACTTAGCTGAGTAGTGTGT	60
PMS2exon4 Rev	A-TATGACTTAGATTGGCAGCGAGACA	60	PMS2exon13 Rev	A-GTGACACTTAGCTGAGTAGTGTGT	60
PMS2exon5 For	S-CTTGATTATCTCAGAGGGATCGTCA	60	PMS2exon14 For	S-GGTCTGTATCTCCTGACCTCATGAT	60
PMS2exon5 Rev	A-TCTCACTGTGTGCCAGTCCTAAT	60	PMS2exon14 Rev	A-GCACGTAGCTCTGTGTAAAATGA	60
PMS2exon6 For	S-TGCTTCCCTTGATTTGTGCGATGAT	60	PMS2exon15 For	S-GCTGAGATCTAGAACCTAGGCTTCT	60
PMS2exon6 Rev	A-TGAGGCAGGAGAATTGCTTGAATCT	60	PMS2exon15 Rev	A-ACACACGAGCGCATGCAAACATAGA	60



**Figura 7. Representación gráfica del diseño de PCR.**

Se introducen en el termociclador respetando las siguientes condiciones:

- 94°C durante 1 minuto (Desnaturalización inicial)
- 35 ciclos {
  - 94°C durante 15 segundos (Desnaturalización)
  - 65°C durante 30 segundos (Anillamiento)
  - 68°C durante 15 minutos (Extensión)
  - 72°C durante 10 minutos (Elongación)

Como control se hace un blanco con agua.

### 5.2. PCR ESPECÍFICA DE EXONES

Cada exón fue amplificado con su primer correspondiente. Para cada muestra se toma un volumen final de 50  $\mu$ l: Master Mix, Primers junto con la muestra de la PCR Long. (Vaughn, 2010). Los oligonucleótidos específicos de amplificación se tomaron del trabajo de Clendenning et al., pero los correspondientes a los exones 6, 7 y 12 fueron rediseñados usando el programa Oligo.

Las condiciones del termociclador son:

30 ciclos	{	95°C durante 15 minutos (Desnaturalización inicial)
		95°C durante 30 segundos (Desnaturalización)
		60°C durante 30 segundos (Anillamiento)
		72°C durante 45 minutos (Extensión)
		60°C durante 9 minutos (Elongación)

Como control se hace un blanco con agua.

Los resultados de la PCR exones se confirman a través de electroforesis en gel de agarosa.

### 5.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Todas las reacciones de PCR de amplificación de los exones se confirmaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa al 2.0% de concentración en tampón TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2 mM pH=8). Al gel se le añade 5ul de RedSafe (Nucleic Acid Staining Solution, 20,000x) por cada100ml gel. Se aplican voltajes de 190 voltios durante aproximadamente 30-45 min. En cada pocillo del gel se cargan 4  $\mu$ l de la reacción de PCR junto con 1  $\mu$ l de tampón de carga (6x DNA loadingDye, Abnova)

Tras dejar el tiempo suficiente de carrera, se observa el gel en un transiluminador de luz ultravioleta que lleva acoplado un procesador de imágenes (Gel Doc 2000, BIO-RAD). Las imágenes pueden ser visualizadas y editadas utilizando el software "QuantityOne 4.3.0" (BIO-RAD), confirmando la existencia de bandas de migración nítidas con el tamaño esperado por comparación con patrones de tamaño molecular, lo que permitió optimizar las condiciones de amplificación.

### 5.4. SECUENCIACIÓN

La secuenciación es un método enzimático de terminadores marcados desarrollado por Sanger con una polimerasa termoestable que permite una reacción de secuenciación cíclica. El producto de la reacción se separa mediante electroforesis capilar y detección de fluorescencia inducida por láser.

*Purificación post-PCR:*

Purificación de productos de ADN amplificados por PCR para eliminar los restos de nucleótidos y de cebadores que pueden interferir en la secuenciación.

Los productos de PCR se purifican a través de la placa 96 Well Millipore Multiscreen (Millipore) diluidas con agua miliQ de manera que queda el producto suspendido sobre la membrana y es recuperado saliendo a flote con el agua miliQ.



### *Cuantificación:*

El DNA obtenido en suspensión se cuantifica mediante el Nano-Drop, con ello, calcularemos la cantidad de ADN que echaremos en el siguiente paso, pues va a estar en función de la cantidad de ADN que tengamos.

### *PCR secuenciación:*

Las muestras fueron secuenciadas con BigDye®, las muestras de la PCR correspondiente, el buffer y mix del kit, los primers correspondientes y completado con H<sub>2</sub>O. El programa usado en el termociclador: 94° 2 minutos seguido de 25 ciclos a 96° 10 segundos, 60° 5 segundos y 60° 4 minutos y finalmente 4°.

### *Purificación de la reacción de secuenciación:*

Las muestras son purificadas de nuevo con la placa 96 Well Millipore Multiscreen (Millipore).

### *Electroforesis capilar:*

Las muestras son analizadas mediante electroforesis capilar con el secuenciador automático ABI 3130 (4 capilares, Applied Biosystems).

### *Análisis de los resultados de secuenciación.*

Las señales registradas son transformadas en un diagrama de picos (cromatograma) que son leídas mediante un software específico Sequencing Analysis Software v5.1 (Applied Biosystems).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas son interpretadas mediante el programa Chromas Lite 2.1 .1.

## **5.5. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTES DE LIGACIÓN (MLPA)**

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplificación) es un método de PCR múltiple de detección de número de copias anormales de hasta 50 secuencias de ADN o ARN genómicos diferentes, que es capaz de distinguir secuencias que difieren en un solo nucleótido, es decir, estudiar deleciones o duplicaciones en un exón o de un conjunto de exones (grandes reordenamientos genómicos).

Se utilizó el kit "SALSA MLPA KIT P008-B1 PMS2, (MRC-HOLLAND)".

El principio de la MLPA se basa en la hibridación del ADN a estudio con dos oligonucleótidos o sondas, seguida por una unión (*ligation*) de ambas sondas y posterior amplificación por PCR de los productos ligados. Como se observa en la figura adjunta (Figura 8) la sonda de la izquierda presenta una secuencia de unión específica para cada fragmento a estudio y una secuencia terminal que es común a todas las sondas y que posteriormente servirá de región de unión para los cebadores en la PCR. La sonda de la derecha es más larga y está compuesta por las dos regiones presentes en la sonda de la izquierda más una secuencia espaciadora. Esta secuencia espaciadora, diferente para cada fragmento, es la que determina el tamaño final de la sonda y por lo tanto de cada uno de los productos amplificados por PCR, lo que permite diseñar múltiples fragmentos diferentes que, tras migrar en un secuenciador, se separaran según su tamaño. La técnica del MLPA fue llevada a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*MRC-Hollandb.v.*)(Ashida et al., 2009). En resumen, 125 ng de ADN genómico fue desnaturalizado e hibridado durante 18h a 60°C con la mezcla de sondas (*probe mix*). Las muestras fueron entonces tratadas con ligasa-65 a 54°C durante 15min. Las reacciones de PCR subsecuentes fueron realizadas usando un primer marcado con 6-carboxyfluoresceína (FAM). Los productos de PCR se resolvieron usando un secuenciador ABI3130, mediante electroforesis capilar y el

resultado fue analizado con el *software Genescan* (Applied Biosystems) para análisis de fragmentos. Los límites relativos normales se establecieron entre 0.75 y 1.30. Las sondas que mostraban un valor por debajo de 0,75 se consideraron que existía una deleción y las sondas por encima de 1.30 una duplicación respecto a la altura de pico de los controles normales.

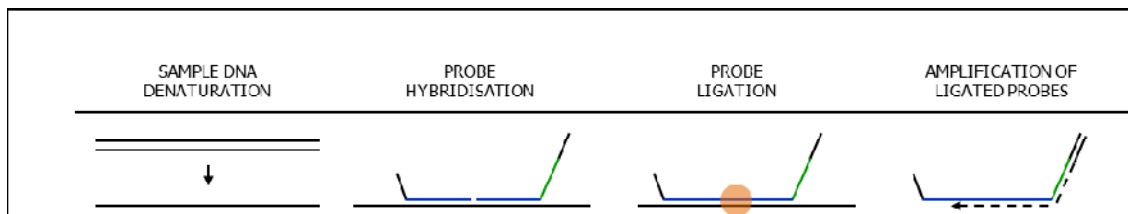


Figura 8. Fundamento de la técnica MLPA. (MLPA® DNA protocol version MDP-v003, MRC-Holland MLPA).

## 6. ESTUDIO DE ADN TUMORAL

### 6.1. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La Inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica de marcaje de proteínas que aprovecha la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales de referencia (Hospital Universitario de Burgos y Hospital Río Hortega de Valladolid) realizaron el estudio de inmunohistoquímica de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 para comprobar la presencia o ausencia de las mismas en tejido somático de individuos con sospecha de Síndrome de Lynch. Los resultados fueron remitidos al Laboratorio de Genética del Cáncer del IBGM.

El **resultado** del estudio para cada una de las proteínas analizadas se clasifica en:

- **expresión normal** de la proteína
- **expresión no valorable (NV)** cuando la expresión era débil y observada por una tinción localizada en algún foco concreto del tumor.
- **déficit de expresión** si no se detectó tinción nuclear en el tumor respecto a la tinción del control.

### 6.2. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (IMS)

La inestabilidad de microsatélites es un cambio en la longitud de un alelo en la secuencia microsatélite debido a la inserción o deleción de unidades repetitivas durante la replicación del ADN y el fracaso del sistema de reparación de apareamientos erróneos del ADN para corregir estos errores.

Estos alelos se presentan en la muestra tumor pero no se encuentran en la muestra de referencia indicando la presencia de inestabilidad de microsatélites.

Las muestras de tejido embebido en parafina fueron cortadas en microláminas con el microtomo.

El ADN de tejido se extrajo siguiendo el protocolo comercial *QIAamp ADN mini kit* (Quiagen). Se analizaron los cinco marcadores de repetición monocucleótidos BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y NR-27 mediante su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Tabla 3). Los oligonucleótidos utilizados fueron marcados con el

## MATERIALES Y MÉTODOS

fluorocromo 6-FAM y los fragmentos fueron resueltos en un secuenciador automático *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), mediante la comparación del tamaño de los alelos del tejido tumoral con su correspondiente ADN de tejido sano en los electroferogramas.

Se considera que un tumor presenta alta IMS (IMS-H) si muestra inestabilidad en dos o más marcadores. Dado que estudios recientes han demostrado que la inestabilidad en un solo marcador (IMS-L) presenta características superponibles al grupo sin inestabilidad de microsatélites (MSS), se han considerado ambos grupos de modo conjunto.

**Tabla 3. Marcadores microsatélites mononucleótidos y dinucleótidos empleados. (S:sentido, A: antisentido).**

MICROSATÉLITES Mononucleótidos	MARCADOR FLUORESCENCIA	COLOR	CEBADORES	Tm	PRODUCTO PCR (pb)
BAT-25	FAM	AZUL	S-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT A-TCTGGATTTTAACTATGGCTC	56°C	124
BAT-26	FAM	AZUL	S-TGACTACTTTTGACTTCAGCC A-AACCATTCAACATTTTAAACC	55°C	119
NR-21	HEX	VERDE	S-TAAATGTATGTCTCCCTGG A-ATTCCTACTCCGCATTCAACA	55°C	98
NR-24	HEX	VERDE	S-CCATTGCTGAATTTTACCTC A-ATTGTGCCATTGCATTCCAA	55°C	127
NR-27	HEX	VERDE	S-AACCATGCTTGCAAACCACT A-CGATAATACTAGCAATGACC	55°C	83

## IV. RESULTADOS

Para la realización de este trabajo se han utilizado 14 muestras en total, a la hora de iniciar el estudio ya teníamos en el laboratorio 7 de ellas en las que se había realizado las extracciones de ADN, el estudio de IMS y el análisis mutacional de otros genes (*MLH1* y/o *MSH2* y/o *MSH6*) y el resto de muestras llegaron durante el proceso de ejecución del presente trabajo, por lo que en estas últimas he realizado el procesamiento completo de: extracción de ADN de sangre periférica, extracción de ADN tumoral y estudio de inestabilidad de microsatélites. A posteriori, he realizado el estudio mutacional de las 14 muestras.

### 1. Características clínicas y anatomopatológicas de las muestras estudiadas.

En este tipo de estudios genéticos donde se busca la mutación de un gen causante de la enfermedad, es también muy importante recabar toda la información posible sobre las características clínicas del paciente (edad, sexo, edad al diagnóstico, tipo de tumor, historia familiar) y las particularidades de las muestras tumorales (expresión de proteínas, inestabilidad de microsatélites, grado) y así poder establecer una correlación genotipo-fenotipo.

Las 14 muestras analizadas pertenecen a 9 familias diferentes. En lo referente al sexo, 6 son mujeres y 8 varones, el rango de edad al diagnóstico es de 32-75 años con una media de edad de 45,6 años. Los porcentajes correspondientes a estas características se reflejan en la tabla 4.

**Tabla 4. Porcentaje de muestras estudiadas según características clínicas de sexo y edad.**

	CASOS
<b>SEXO</b>	
Varón	57,14%
Mujer	48,86%
<b>EDAD</b>	
>45 años	28,57%
<45 años	71,43%

En la tabla 5 se muestran las características anatomopatológicas (IHQ, IMS) de las muestras tumorales que se disponían, así como del tipo de tumor y el sexo de las muestras.

Se puede observar una asociación entre la pérdida de expresión de las proteínas *MLH1-PMS2* y una alta inestabilidad de microsatélites (IMS-H); sin embargo las muestras con pérdida de expresión sólo de la proteína *PMS2* puede asociarse con estabilidad o con inestabilidad de microsatélites. También se refleja en la tabla cómo de los 9 casos índices estudiados, 8 de ellos presentan cáncer colorrectal como tumor primario y 1 de los casos cáncer de endometrio; también se recoge que 6 de los casos índices son varones y los otros 3 son mujeres.

**Tabla 5. Características anatomopatológicas (IHQ, IMS) y clínicas (Tumor primario y sexo) de las muestras estudiadas.**

FAMILIA	ADN	IHQ*	IMS**	TIPO DE CANCER***	SEXO
36	69	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-44	VARON
448	710	PMS2	IMS-H	CCR-35	VARON
	925			SANO-21	MUJER
	948			SANO-23	VARON
	990			I.DELGADO-39	VARON
487	760	PMS2	MSS	CCR-62	VARON
514	797	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-75	MUJER
529	823	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-58	MUJER
552	857	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-32	VARON
563	874	PMS2	IMS-H	CCR-34	VARON
574	889	MLH1-PMS2	IMS-H	ENDOMETRIO-40, CCR-68	MUJER
582	902	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-37	VARON
	1033			SANO-64	MUJER
	1034			SANO-35	MUJER

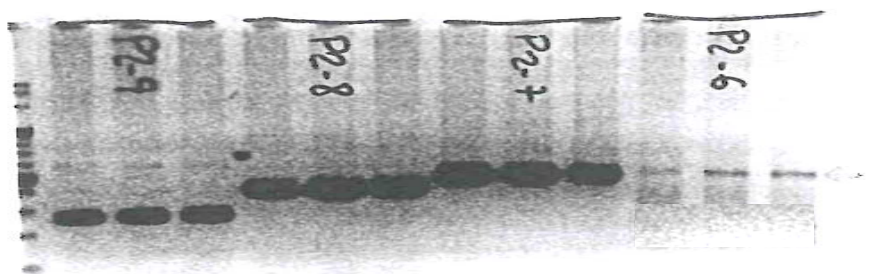
\*El nombre de la proteína o proteínas que aparecen en esta columna es la que no se expresa o expresan.

\*\*IMS-H: Alta inestabilidad de microsatélites (más de un microsatélite inestable); MSS: microsatélites estables (ningún microsatélite presenta inestabilidad).

\*\*\*Tipo de cáncer primario: CCR: cáncer colorrectal, I.Delgado: Intestino delgado, Sano: no ha desarrollado cáncer en el momento del estudio. El número representa la edad al diagnóstico y en el caso de los sanos la edad en el momento de recogida de la muestra.

## 2. Puesta a punto de PCR específica del gen *PMS2*

La gran problemática del estudio mutacional de este gen es la presencia de pseudogenes que ya hemos explicado en la introducción y en materiales y métodos de este texto. Esto ha hecho que durante muchos años este gen no se analizara. El diseño de primers específicos del gen para PCR larga ha servido de molde para la posterior amplificación de los exones específicos del gen. Esta técnica es laboriosa ya que las long-PCR son muy largas y posteriormente hay que hacer PCR de PCR; además luego hay que hacer secuenciación directa y esto es laborioso y caro. La puesta a punto de este apartado ha sido el gran éxito del trabajo que aquí presentamos puesto que es a lo que más tiempo hemos dedicado hasta que todo ha sido ajustado y ha salido como queríamos. (Figura 9).



**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa. De izquierda a derecha: Pocillo 1: marcador de peso molecular 100bp. Pocillos 2,3 y 4: exón 9 de 272 pb, Pocillos 5, 6 y 7: exón 8 de 347 pb, Pocillos 8, 9 y 10 exón 7 de 414 pb y Pocillos 11,12 y 13 exón 6 de 362 pb.**

## 3. Análisis mutacional del gen *PMS2*

Usando las técnicas de PCR\_Long-PCR específica-secuenciación para el análisis de mutaciones puntuales y MLPA para la detección de reordenamientos genómicos, se han encontrado 14 cambios diferentes en la secuencia del gen *PMS2* en las muestras de ADN de los 14 pacientes analizados. Todos los cambios son puntuales, no se han detectado reordenamientos mediante el uso de la técnica MLPA. (Figura 10 y 11).

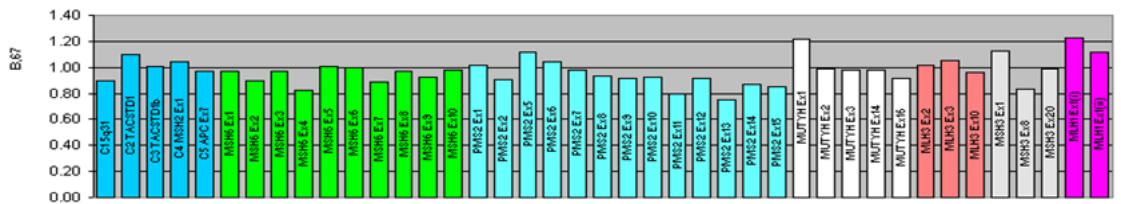


Figura 10. MLPA de los ADNs estudiados 69, 797, 889, 925 y 948. Las bandas azules corresponden a los exones de *PMS2* donde no se aprecia ninguna deleci3n (barra menor de 0,6) ni duplicaci3n (barra superior a 1,4).

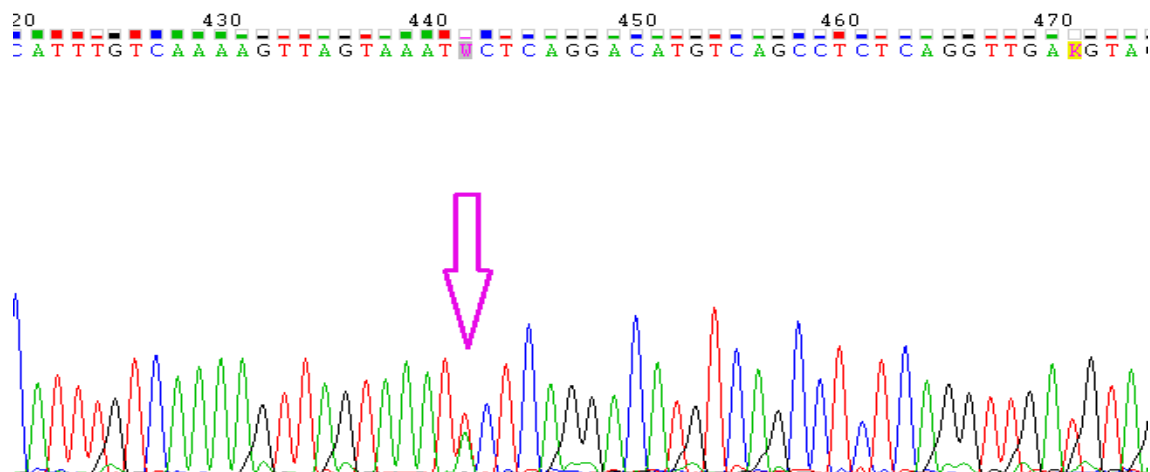


Figura 11. Secuencia donde se aprecia el cambio de una base Adenina por Timina.

Estas variantes genéticas est3n repartidas a lo largo del gen como se muestra en la figura 12.

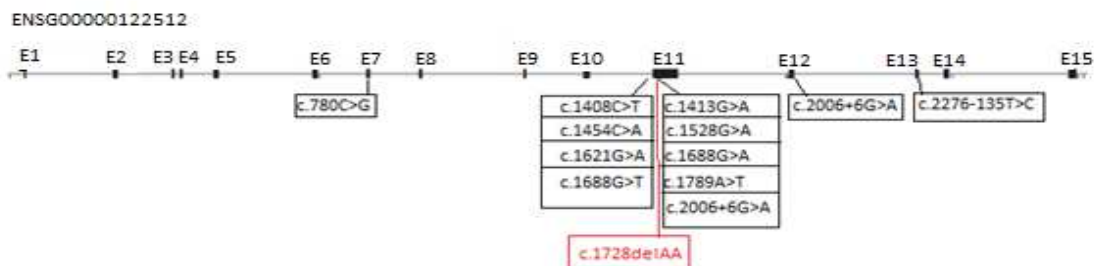


Figura 12. Distribuci3n de las variantes genéticas detectadas a lo largo del gen *PMS2*. La lnea representa la secuencia intr3nica del gen, las cajas: negras los exones y roja la patogénica.

Del total de las 14 variantes detectadas, 6 han sido clasificadas como variantes polimórficas, 7 como variantes no clasificadas (UV) y 1 de ellas como patogénica o causante de enfermedad.

En la tabla 6 se muestran los 6 cambios polimórficos detectados, 2 de ellos son cambios sinónimos (la variante no produce cambio de aminoácido a nivel de proteína), uno de ellos está descrito en la base de datos internacional Leiden Open Variation Database (LOVD). Los otros 4 son cambios de tipo missense o de cambio de aminoácido, todos ellos anteriormente descritos y clasificados recientemente como Class1 o variante polimórfica.

**Tabla 6. Descripción de las variantes polimórficas detectadas**

MUESTRA	EXON	ADNc	PROTEINA	LOVD*
760, 857	7	c.780C>G	p.Ser260Ser	PMS2_00030
823, 857	11	c.1408C>T	p.Pro470Ser	PMS2_00116
760	11	c.1413G>A	p.Gln471Gln	No descrito
857	11	c.1454C>A	p.Thr485Lys	PMS2_00138
797,823,874	11	c.1621G>A	p.Glu541Lys	PMS2_00028
760,874	15	c.2570G>C	p.Gly857Ala	PMS2_00113

\*LOVD: Base de datos Leiden Open VariationDatabase. Referencia de cada variante descrita

En la tabla 7 describimos las 7 variantes clasificadas como de efecto desconocido. 4 de ellas son mutaciones exónicas (todas en el exón 11) de tipo missense (producen cambio de aminoácido), anteriormente descritas y clasificadas por LOVD como Class3 o de tipo UV. Las otras 3 variantes son intrónicas, una en intrón 11, otra en el 12 y otra en el 13; estos cambios no están descritos en LOVD y por esto las clasificamos como UV.

**Tabla 7. Descripción de las variantes no clasificadas (UV) detectadas**

ADN	EXON*	ADNc	PROTEINA	LOVD**
797,823,857,874	11	c.1528G>A	p.Asp510Asn	PMS2_03344
797,857	11	c.1688G>A	p.Arg563Gln	PMS2_00083
823	11	c.1688G>T	p.Arg563Leu	PMS2_00053
797,823,857	11	c.1789A>T	p.Thr597Ser	PMS2_00153
797,823,857	I-11	c.2006+6G>A	Intrónica	PMS2_00153
857	I-12	c.2175-117T>C	Intrónica	No descrita
760	I-13	c.2276-135T>C	Intrónica	No descrita

\*I: Intrón. \*\*No descrita: no aparece registrada en LOVD

Sólo hemos encontrado una muestra con mutación patogénica (7,14%), consiste en una deleción de dos nucleótidos que da lugar a un codón STOP y por tanto a una proteína truncada. Esta mutación se detectó en la muestra 710, caso índice de la familia 448. A posteriori se recibió muestra en el laboratorio de su hermano y de dos hijos, muestras 925, 948 y 990 respectivamente (Figura 13).

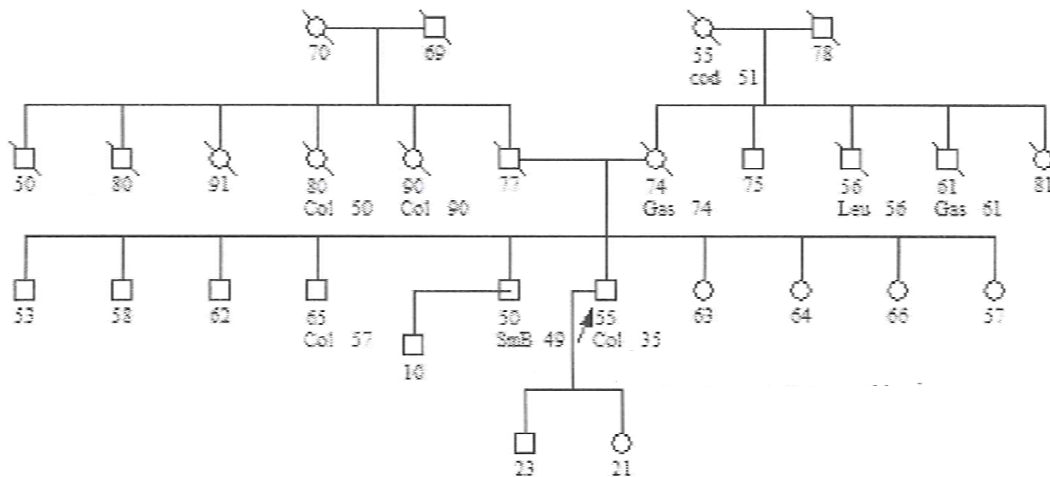


Figura 13. Árbol familiar. La flecha indica la muestra 710 y el parentesco con las muestras 925 (hermano), 948 y 990 (hijos).

La muestra del 948 y 990 resultaron positivas para la mutación y la muestra 925 negativa (Tabla 8).

Tabla 8. Mutaciones patogénicas detectadas y muestras portadoras.

FAMILIA	MUESTRAS	ADNc	PROTEINA	TIPO VARIANTE	LOVD
448	710,948,990	c.1728delAA	p.Lys577fsX3	STOP580	NUEVA

#### 4. Correlación Genotipo-Fenotipo.

En la mayoría de los estudios mutacionales en genes implicados en una enfermedad se intenta establecer una correlación entre los resultados genéticos y las características clínicas y patológicas, el poder establecer una correlación genotipo-fenotipo puede ayudar en el diagnóstico clínico, en la detección de portadores y en la detección de mutaciones, de ahí la importancia de este tipo de análisis.

En la tabla9 relacionamos nuestros resultados genéticos con las características de nuestra población. Lo más importante, que coincide con lo esperado, es que las familias portadoras de mutación patogénica (Familia 448) presentan un tumor con déficit de expresión únicamente en la proteína PMS2. Con esta característica tenemos otras dos muestras, pero en ninguna de ellas se ha encontrado mutación causante de enfermedad. Respecto a la IMS en estas 3 familias PMS2 deficientes, las familias 448 y 563 mostraban alta inestabilidad, mientras que la familia 487 manifestaba estabilidad. En estas mismas familias, los casos índices de los tumores inestables presentan una edad al diagnóstico mucho más inferior que en el caso del tumor estable (35 y 34 respecto a 62).

Respecto a las muestras que presentan variantes no clasificadas y no estaban descritas previamente, realizamos análisis in silico (Mutation Taster) y no parecen ser patogénicas, la más interesante de las intrónicas es la c.2006+6G>A por si pudiera afectar al procesamiento del ARN (splicing), pero el hecho de que apareciera en tres de nuestras muestras descartaba esta idea. La variante p.Arg563Leu sólo la hemos detectado en una de nuestras muestras (823), pero también han aparecido otras variantes UV en esta muestra, además el caso índice presenta defectuosa la IHQ no



sólo de la proteína PMS2 sino también de MLH1. Esta variante sigue apareciendo en LOVD como UV.

**Tabla 9. Características clínicas y genéticas de las muestras analizadas.**

FAMILIA	ADN	IHQ	IMS	TIPO DE CANCER	SEXO	VARIANTES
36	69	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-44	VARON	
448	710	<b>PMS2</b>	IMS-H	CCR-35	VARON	<b>p.Lys577fsX3</b>
	925			SANO-21	MUJER	
	948			SANO-23	VARON	<b>p.Lys577fsX3</b>
	990			I.DELGADO-39	VARON	<b>p.Lys577fsX3</b>
487	760	<b>PMS2</b>	MSS	CCR-62	VARON	c.2276-135T>C
514	797	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-75	MUJER	p.Asp510Asn p.Arg563Gln c.2006+6G>A
529	823	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-58	MUJER	p.Asp510Asn <b>p.Arg563Leu</b> p.Thr597Ser c.2006+6G>A
552	857	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-32	VARON	p.Asp510Asn p.Arg563Gln p.Thr597Ser c.2006+6G>A c.2175-117T>C
563	874	<b>PMS2</b>	IMS-H	CCR-34	VARON	p.Asp510Asn
574	889	MLH1-PMS2	IMS-H	ENDOMETRIO-40, CCR-68	MUJER	
582	902	MLH1-PMS2	IMS-H	CCR-37	VARON	
	1033			SANO-64	MUJER	
	1034			SANO-35	MUJER	

### V. DISCUSIÓN

Aunque el fenotipo clínico del síndrome de Lynch ha sido bien caracterizado, hasta ahora se sabía muy poco de las características clínicas del síndrome causado por mutaciones en el gen *PMS2*. La dificultad del diagnóstico molecular del gen *PMS2* es lo que ha dificultado este hecho. En la actualidad, la puesta a punto de técnicas de PCR larga específicas del gen, el estudio mutacional evitando falsos positivos es posible (Clendenning et al, 2006).

En este trabajo hemos conseguido poner a punto una de estas técnicas y hemos podido estudiar un número de muestras, con ciertas características, que han ayudado al diagnóstico de unas pocas familias.

#### **Características clínicas de los portadores**

Este estudio muestra, aunque se han estudiado pocas familias, cómo mutaciones en *PMS2* pueden explicar ciertos casos de síndrome de Lynch que estaban desestimados debido a la dificultad del estudio del gen. Trabajos de la bibliografía realizados en mayor número de muestras reflejan estos resultados (Senter et al., 2008).

En nuestro estudio, hemos detectado una familia portadora de mutación patogénica y el tumor del caso índice presentaba déficit de expresión únicamente de la proteína *PMS2*. No hemos encontrado mutación patogénica en las muestras que mostraban déficit de expresión de la proteína *MLH1* y *PMS2*. Estos resultados son similares a otras series más largas anteriormente estudiadas (Gill S et al. 2005). La explicación a esto puede ser que *MLH1* además de formar un heterodímero con *PMS2* también podría unirse a *MLH3* e incluso a *PMS1* y así podría compensarse la pérdida de funcionalidad de *PMS2* (Boland CR et al. 2007). Este fenómeno también podría explicar el hecho de que este tipo de tumores pueda presentar inestabilidad de microsatélites o no (Nakagawa H et al. 2004).

Otro tema importante es el referente a la penetrancia de las mutaciones en el gen *PMS2*, nosotros no podemos concluir nada respecto a este tema de nuestro trabajo, debido a que el número de muestras estudiadas es muy bajo, pero el caso índice portador de mutación patogénica es un varón que ha desarrollado cáncer colorrectal a los 35 años. Según la literatura, unos trabajos concluyen que la penetrancia es menor que la de otros genes como *MLH1* y *MSH2*; otras series como la escocesa refiere un riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal o cáncer de endometrio en hombres y mujeres respectivamente del 75% y 86% a los 35 años (Carayol J et al. 2002).

#### **Detección de mutaciones específicas en el gen *PMS2***

El estudio mutacional del gen *PMS2* implicado en el Síndrome de Lynch, se ha ido posponiendo durante décadas debido a la dificultad en la interpretación de los resultados asociada a la existencia de pseudogenes en el mismo cromosoma.

En la actualidad el abordaje de este gen sigue siendo problemático, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han diseñado kits en los que se incluye el análisis de este gen (HNPCC MASTR, Multiplicon 454 GS-Junior), pero la interpretación de resultados es complicada, así se describen las regiones o puntos de homología entre el gen *PMS2* y el pseudogen *PMS2-CL* y es necesario comprobar cada cambio en ambas secuencias, lo que hace tedioso el análisis (Support Multiplicon: *PMS2* and its homologous regions).

En este trabajo hemos desarrollado una técnica basada en PCR larga y nested-PCR, anteriormente descrita (Clendenning et al, 2006) y con oligonucleótidos modificados por nosotros, para poder solucionar el problema de los falsos positivos surgidos con técnicas anteriores (Hayward et al., 2004).

Aunque el número de muestras estudiadas no es muy grande, podemos concluir que el método combinado de PCR-Larga y MLPA es efectivo en la detección de mutaciones en el gen *PMS2*. Aunque sólo hemos detectado una mutación patogénica (sólo dos familias presentaban únicamente déficit de expresión de la proteína PMS2), se han caracterizado varios cambios puntuales que han resultado ser polimorfismos y variantes de significado incierto, todo esto nos indica que es necesario incluir el estudio del gen *PMS2* en la práctica diagnóstica del síndrome de Lynch y redefinir el papel del gen *PMS2* en la enfermedad, tal y como recientemente han apuntado otros autores (Borras et al. 2013).

Estudios recientes en población española (Brea-Fernández A et al. 2014) han confirmado la existencia de una alta frecuencia de grandes deleciones detectadas mediante el uso de la técnica MLPA; sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado ningún gran reordenamiento ni grandes deleciones ni duplicaciones, esto puede ser debido al tamaño muestral o a que estos reordenamientos puedan ser mutaciones fundadoras de poblaciones españolas determinadas tal y como ha ocurrido en el estudio de otros genes como *MSH2* (Perez-Cabornero et al. 2011).

### VI. CONCLUSIONES

1. Se ha podido poner a punto una técnica de análisis de mutaciones específica para el gen *PMS2* basada en PCR\_Long-PCR específica-Secuenciación y MLPA.
2. De nueve familias analizadas, se ha detectado una (11,1%) con mutación patogénica y, por tanto, ha sido diagnosticada de Síndrome de Lynch. En todas las familias restantes se han encontrado variantes de tipo missense de efecto desconocido pendientes de validar.
3. Se ha comprobado que el grupo de muestras con déficit de expresión sólo de la proteína *PMS2*, junto con alta inestabilidad de microsatélites y la edad de aparición del cáncer Colorrectal más temprana, es donde más variantes patogénicas y posiblemente variantes de significado incierto (UV) patogénicas se han detectado.
4. Aunque el análisis genético del gen *PMS2* es complicado debido a la presencia de alto número de pseudogenes, es posible su inclusión en la rutina diagnóstica tanto por técnicas de secuenciación Sanger como mediante las nuevas tecnologías de secuenciación masiva.

- Ashida S, Hadley DW, Vaughn BK, KuhNR, Jenkins JF, Koehly LM. The impact of familial environment on depression scores after genetics testing for cancer susceptibility. Clin Genet. 2009; 75(1):43-9.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of International criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. 1998; 58(22):5248-57.
- Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside. FamCancer. 2007; 7(1):41-52.
- Brea-Fernández AJ, Cameselle-Teijeiro JM, Alenda C, Fernández-Rozadilla C, Cubiella J, Clofent J, Reñé JM, Anido U, Milá M, Balaguer F, Castells A, Castellvi-Bel S, Jover R, Carracedo A, Ruiz-Ponte C. High incidence of large deletions in the PMS2 gene in Spanish Lynch syndrome families. Clin Genet. 2014; 85(6):583-8.
- Carayol J, Khat M, Maccario J, et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: current risks of colorectal cancer largely overestimated. J Med Genet. 2002; 39(5): 335–339.
- Cecily P. Vaughn, Jorge Robles, Jeffrey J. Swensen, Christine E. Miler, Elaine Lyon, Rong Mao, Pinar Bayrak-Toydemir, Wade S. Samowitz. Clinical Analysis of PMS2: Mutation Detection and Avoidance of Pseudogenes. Hum Mutat. 2010; 31(5):588-93.
- Chapelle Albert. Inherited human diseases: victories, challenges, disappointments. Am J Hum Genet. 2003; 72(2): 236-240.
- Charbonnier F, Martin C, Scotte M, Sibert L, Moreau V, Frebourg T Alternative splicing of MLH1 messenger RNA in human normal cells. Cancer Res. 1995; 55(9):1839-41.
- Clendenning M, Hampel H, LaJeunesse J, et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. Hum Mutat. 2006; 27 (5):490-5.
- Di FF, Charbonnier F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Buissine MP, Nibert M, Lindblom A, Frebourg T. Screening for genomic rearrangements of MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. J Med Genet. 2004; 41(1):18-20.
- Gill S, Lindor NM, Burgart LJ, et al. Isolated loss of PMS2 expression in colorectal cancers: frequency, patient age, and familial aggregation. Clin Cancer Res. 2005; 11(18):6466-71.
- Hayward BE, De Vos M, Sheridan E, Bonthron DT. PMS2 mutations in HNPCC. Clin Genet. 2004; 66:566–567.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature. 2001; 411(6835):366-74.
- Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7(5):335-46.
- Leach FS, Polyak K, Burrell M, Johnson KA, Hill D, Dunlop MG, Wyllie AH, Peltomaki P, de la CA, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. Cancer Res. 1996; 56:235-240
- Lynch HT, de la CA. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003; 348:919-932.
- Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. Clin Genet. 2009; 76(1):1-18.
- Nakagawa H, Hampel H, de la CA. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. Hum Mutat. 2003; 22:258.
- Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, Hampel H, Steenblock K, Burgart LJ, Thibodeau SN, de la Chapelle A. Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. Cancer Res. 2004; 64:4721–7.

- Payá Romá Artemio, Alenda Gonzalez Cristina, Jover Martínez Rodrigo, Aranda Lopez F. Ignacio. Mismatch-repairdeficiencycolorrectal carcinoma. Identificationkeys and clinicalrelevance. RevEsp Patol. 2006; 4:201-208.
- Pérez-Cabornero L, Infante Sanz M, Velasco Sampedro E, Lastra Aras E, Acedo Becares A, Miner Pino C, Durán Domínguez M. Frequency of rearrangements in Lynch syndrome cases associated with MSH2: characterization of a new deletion involving both EPCAM and the 5' part of MSH2.CancerPrev Res (Phila). 2011; 4(10):1556-62.
- Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kaariainen H, Ahtola H, Eskelinen M, Harkonen N, Julkunen R, Kangas E, Ojala S, Tukioura J, Valkamo E, Jarvinen H, Mecklin JP, Aaltonen LA, de la CA. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposiscolorectal cancer. J ClinOncol. 2000; 18(11):2193-200.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002; 30(12):e57.
- Senter L, Clendenning M, Sotamaa K et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. Gastroenterology. 2008; 135(2):419-28.
- Umar A. Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability. Dis Markers. 2004; 20:179-180.
- van der KH, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R, Kohonen-Corish M, Vasen H, Oliani C, Barana D, Moller P, ozier-Blanchet C, Hutter P, Foulkes W, Lynch H, Burn J, Moslein G, Fodde R. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6 and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). Genes Chromosomes Cancer. 2005; 44(2):123-38.
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). Dis Colon Rectum. 1991; 34(5):424-5.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposiscolorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology. 1999; 116:1453-1456
- Volgstein B, Kinzler KW. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell. 1996; 87(2):159-70.
- Wilson TM, Ewel A, Duguid JR, Eble JN, Lescoe MK, Fishel R, Kelley MR. Differential cellular expression of the human MSH2 repair enzyme in small and large intestine. Cancer Res. 1995; 55:5146-5150
- Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. Am J Med. 1999; 106(1A):3S-6S.