

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOCHIMICA BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

TESI DI DOTTORATO

XVII CICLO

**ANALISI MUTAZIONALE DEI GENI DEL
MISMATCH REPAIR (MMR) MEDIANTE
TECNICHE INNOVATIVE IN PAZIENTI AFFETTI
DA CANCRO EREDITARIO NON POLIPOSICO
DEL COLON-RETTO (HNPCC)**

RELATORE

Ch. mo Prof.

PAOLA IZZO

COORDINATORE

Ch. mo Prof.

GIUSEPPE D'ALESSIO

CANDIDATA

FRANCESCA

DURATURO

RIASSUNTO

Il cancro ereditario non poliposico del colon-retto (HNPCC) è una sindrome autosomica dominante, che include circa il 6% delle forme di cancro coloretale (CRC) ereditarie ed è associato alla presenza di una mutazione germinale in uno dei geni del “Mismatch Repair” (MMR), MSH2, MLH1, PMS2, MSH6 e MLH3. I geni MMR più frequentemente mutati sono MLH1 e MSH2, che risultano mutati rispettivamente nel 49% e 38% dei casi HNPCC, mentre mutazioni nei geni MMR detti “minori”, hPMS1, hPMS2, MSH6 e MLH3 rendono conto complessivamente del 10-13% dei casi. L’alterazione di uno di questi geni nella linea germinale si riflette in un’ aumentata velocità di accumulo di errori di replicazione, che si traduce nel fenotipo RER (Replication Errors), particolarmente evidente a livello dei microsatelliti, corte sequenze nucleotidiche ripetute, che possono nel tessuto tumorale, a causa di delezioni o inserzioni, presentare variazioni nella lunghezza. L’accumulo di alterazioni si verifica sia in geni non espressi che in geni direttamente coinvolti nella tumorigenesi coloretale. Tuttavia, essendo il tumore sporadico del colon-retto molto frequente, è necessaria un’attenta e corretta anamnesi clinica per l’identificazione di famiglie HNPCC. Sulla base dei “Criteri di Amsterdam” una famiglia è definita HNPCC se vi sono almeno 3 familiari affetti appartenenti a due generazioni successive, uno dei quali deve essere parente di primo grado ad uno degli altri due e se almeno in un caso il tumore (anche in sedi extracoloniche) insorge prima dei 50 anni. Nel nostro studio sono stati analizzati 77 soggetti di 54 famiglie con diagnosi clinica di HNPCC nei quali è stata condotta un’indagine genetico-molecolare dei 2 geni MMR maggiormente coinvolti, MLH1 e MSH2. L’analisi diretta di mutazione è stata effettuata mediante la cromatografia liquida ad alta prestazione in condizioni denaturanti (DHPLC) e successiva analisi di sequenza per la caratterizzazione molecolare della mutazione. Utilizzando queste due metodiche è stato possibile identificare 10 mutazioni responsabili della malattia (8 nel gene MLH1 e 2 nel gene MSH2) in 16 delle 54 famiglie HNPCC. Tre di queste sono nuove mutazioni non ancora descritte in letteratura. Una nuova mutazione, la 2246 T_C, consiste in una sostituzione al nucleotide 2246 nell’esone 19 del gene MLH1, che determina il cambio amminoacidico Leu_Pro; due nuove mutazioni nel gene

MSH2: la 191/192insC nell'esone 1, che crea uno stop precoce tra i codoni 80/81, e la 1467 G_T, che determina il cambio della tripletta GAA in TAA, con conseguente formazione di uno stop.

Sui soggetti negativi per mutazioni in MLH1 e MSH2 è stata condotta l'analisi mutazionale del gene MSH6. Attraverso analisi mediante DHPLC e sequenza abbiamo identificato 7 mutazioni, di queste 5 sono nuove mutazioni non descritte in letteratura. Nell'esone 5 del gene MSH6 sono state identificate 2 nuove mutazioni, la 3261/62insC al codone 1088 e la 3294-95delTT al codone 1104, che creano un prematuro codone di stop; sono nuove mutazioni anche la 2941 A_G nell'esone 4 che determina il cambio amminoacidico Ile_Val, la 3378 T_A nell'esone 7 che determina il cambio Asp_Glu e l'inserzione GTGT al nucleotide 544+33 nell'introne 2 del gene.

Per valutare il grado di instabilità dei microsatelliti è stato analizzato il cosiddetto "pannello di Bethesda" che comprende 3 ripetizioni dinucleotidiche e 2 ripetizioni mononucleotidiche. In più sono state analizzate tre nuove ripetizioni mononucleotidiche quasimonomorfe NR21, NR22 e NR24, apparse più instabili in linee cellulari del colon con mutazioni in MSH6. I tessuti tumorali dei pazienti portatori di mutazioni in MSH6 hanno presentato un fenotipo MSI-L con maggiore instabilità a livello delle sequenze mononucleotidiche: in particolare, NR21 e NR22. Questo indica che tali ripetizioni potrebbero essere analizzate per individuare i pazienti portatori di mutazioni nel gene MSH6.

Allo scopo di verificare se l'alterazione fosse dovuta ad ampie delezioni o duplicazioni è stata messa a punto una nuova metodica la Multiplex Ligation-Probe Dependent Amplification (MLPA), che permette di analizzare fino a quaranta diverse sequenze nucleotidiche mediante l'impiego di una singola reazione di amplificazione. Mediante tale metodica sono state identificate 2 delezioni nel gene MSH2 e una nel gene MLH1 e la duplicazione di 2 esoni nel gene MSH2.

Questo studio conferma l'estrema eterogeneità genotipo-fenotipo che caratterizza l'HNPCC e l'estrema variabilità fenotipica tra i familiari affetti. Inoltre, l'MLPA è risultato un metodo sensibile e specifico per l'identificazione di ampi riarrangiamenti nei geni MLH1 e MSH2 e dunque,

potrebbe essere considerato una tappa fondamentale nel protocollo da seguire per la diagnosi di cancro ereditario non poliposico del colon.

SUMMARY

Hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC) is an autosomal dominantly inherited predisposition for early onset colorectal cancer; it accounts for at least 6% of all colorectal malignancies and it is associated with germline mutations in mismatch repair (MMR) genes: MSH2, MLH1, PMS2, MSH6 and MLH3. Until now 477 point mutations predisposing to HNPCC have been characterized; so far, few large genomic rearrangements within MMR genes have been described. In this work we present 8 novel mutations in MLH1, MSH2 and MSH6 genes and 4 large rearrangements in MLH1 and MSH2 genes.

The identification of mutations in MLH1, MSH2 and MSH6 genes have been performed by a combination of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) and DNA sequencing techniques. Moreover, we set up a novel technique, the multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), for detection of genomic deletions in MLH1 and MSH2 genes, notoriously undetectable using conventional diagnostic techniques.

We have analysed the DNA of seventy-seven patients of 54 families with clinical diagnosis of HNPCC and identified the specific mutation in 27/54 families: eight mutations are located in MLH1 gene, 3 in MSH2 and 7 in MSH6; of these, eight are novel germline mutations. One novel mutation, the 2246 T→C, consists in a substitution at nucleotide 2246 in the MLH1 gene (exon 19) that changes a Leu in a Pro residue; two mutations map in MSH2 gene, the 191/192 insC mutation in exon 1, that creates an early stop between codons 80/81, and the 1467 G→T, that changes the aminoacid 489 Glu (GAA) in a stop codon (TAA); five new mutations are in MSH6 gene: the 3261/62insC at codon 1088 and the 3294/3295 delTT at codon 1104 in exon 5, both creating an early stop, the 2941 A→G in exon 4, that changes an Ile in Val residue, the 3378 T→A at codon 1126 of the exon 7, that changes an Asp in a Glu residue and the GTGT insertion in intron 2, that has been identified only in affected patients.

The microsatellite instability (MSI) phenotype is a characteristic of the HNPCC (95%). To evaluate MSI, a reference panel was proposed at an

international consensus meeting, comprised of 2 mononucleotide and 3 dinucleotide repeats. Moreover we have analysed 3 new mononucleotide repeats that are quasimonomorphic and that appear unstable in colon cell lines that show mutations in MSH6. The patients carriers of MSH6 mutations presented MSI-Low, with more instability at the mononucleotide markers. This indicates that the mononucleotide quasimonomorphic repeats might also be used for the detection of tumors mutated in MSH6.

Finally, using the MLPA technique, we have identified a deletion of exon 19 in MLH1 gene and two deletions in MSH2 gene: a deletion exons 4 and 5 in one case and of exon six in another; moreover we identified a duplication of exon 1-2 in MSH2 gene.

This study reinforces the notion of the remarkable heterogeneity of the mutational spectrum in HNPCC that gives rise to an extreme variability of the clinical expression between affected familiars. Moreover, MLPA appears to be a sensitive, specific and simple method for the detection of genomic deletion in MLH1 and MSH2 and might be considered as a part of the mutation detection protocols in the molecular diagnosis of hereditary non polyposis colorectal cancer.

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.3
1.1 Tumorigenesi colorettales	pag.4
1.2 Cancro ereditario non poliposico del colon-retto (HNPCC)	pag.7
1.2.1 Genetica molecolare: i geni MMR	pag.8
1.2.2 Basi molecolari dell'HNPCC: mutazioni nei geni MMR	pag.10
1.2.3 Instabilità dei microsatelliti e tumorigenesi colorettales nella HNPCC	pag.11
1.2.3 Caratteristiche clinico-patologiche dell' HNPCC	pag.14
SCOPO DELLA TESI	pag.17
2. MATERIALI E METODI	
2.1 Materiali	pag.18
2.2 Metodi	
2.2.1 Estrazione di DNA da sangue periferico	pag.18
2.2.2 Amplificazione delle regioni codificanti dei geni MLH1, MSH2 ed MSH6	pag.19
2.2.3 Single strand conformation polymorphism (SSCP)	pag.20
2.2.4 Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)	
2.2.4.1 La tecnica	pag.21
2.2.4.2 La strumentazione DHPLC	pag.22
2.2.4.3 Analisi dei campioni al DHPLC	pag.23
2.2.5 Sequenziamento diretto del DNA	pag.24
2.2.6 Estrazione di DNA da tessuto incluso in paraffina	pag.24
2.2.7 Analisi dei microsatelliti	pag.24
2.2.8 Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)	pag.25
3. RISULTATI	
3.1 Ricerca diretta di mutazioni nei geni MLH1 e MSH2	pag.28
3.1.1 Correlazioni genotipo fenotipo	pag.31

3.2	Analisi del gene MSH6	pag.31
3.3	Analisi di ampi riarrangiamenti genici mediante MLPA	pag.35
3.4	Analisi dell'instabilità dei microsatelliti	pag.36
3.5	Test genetico predittivo per l'HNPCC	pag.38
4.	DISCUSSIONE	pag.39
5.	BIBLIOGRAFIA	pag.47

1. INTRODUZIONE

Il cancro del colon-retto (CRC) è una patologia caratteristica della popolazione occidentale e rappresenta la causa più frequente di mortalità per patologie tumorali (1), dopo il carcinoma del polmone e della mammella nella donna e quelli della prostata e del polmone nell'uomo.

Sebbene i complessi meccanismi della carcinogenesi non siano stati ancora del tutto chiariti, vari studi indicano che si tratta di una malattia multifattoriale, nella cui patogenesi sono coinvolti fattori ambientali, genetici ed epigenetici (2). Soggetti già affetti da patologie del colon presentano un'elevata predisposizione allo sviluppo del cancro, specialmente se appartenenti ad una classe socio-economica alta. L'assunzione di alimenti ad elevato apporto calorico, grandi quantitativi di acidi grassi saturi, fumo ed alcol affiancati ad un basso consumo di frutta, fibre, vitamine antiossidanti A, C, D, E, calcio e selenio aumentano il rischio di CRC (3). Circa il 15% dei totali CRC è rappresentato dalle forme ereditarie, tra cui le più frequenti e quindi le più studiate sono la Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP) ed il Cancro Ereditario Non Poliposico del Colon-retto (HNPCC), entrambe ad ereditarietà autosomica dominante (Fig.1).

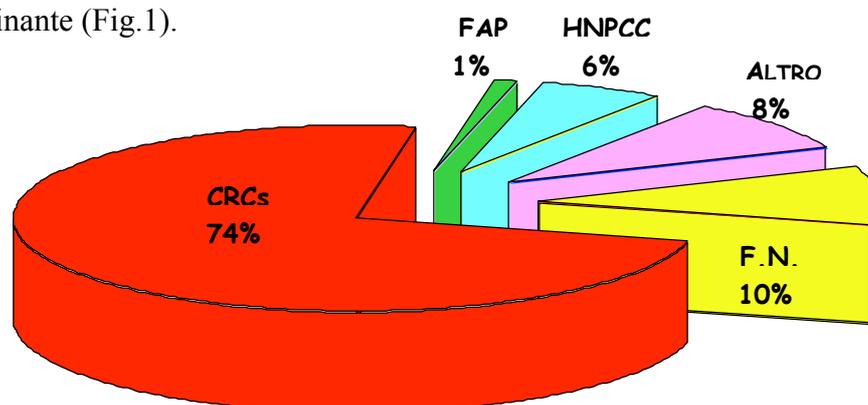


Fig.1: Ripartizione dei vari tipi di cancro colo-rettale (CRCs = cancro coloretale sporadico; altro = varie forme ereditarie; F.N. = familiarità neoplastica).

FAP ed HNPCC rendono conto, rispettivamente, dell'1% e del 6% dei tumori del colon. Da alcuni anni sono state delucidate le basi genetiche di queste due

sindromi, permettendo nella maggior parte dei casi di effettuare una diagnosi presintomatica nei soggetti appartenenti a famiglie a rischio (4).

1.1 Tumorigenesi coloretale

Il tumore può essere considerato il risultato di un processo evolutivo a livello delle cellule somatiche, che agisce attraverso il classico meccanismo di mutazione e selezione. Questo processo conferisce un vantaggio selettivo alle cellule mutate che acquisiscono una maggiore capacità proliferativa e di sopravvivenza e si espandono rispetto alle altre; all'interno di questa popolazione cellulare mutata si avrà, poi, un ulteriore evento mutazionale che conferirà a queste cellule un ulteriore vantaggio selettivo ed una ulteriore espansione. Il processo di tumorigenesi, dunque, può essere considerato come l'insieme di una serie di singole alterazioni geniche che, accumulandosi in un ben preciso ordine cronologico, danno luogo al processo neoplastico (5).

Poiché i tumori coloretali evolvono attraverso stadi morfologici ben precisi, è stato possibile determinare l'ordine in cui, molto probabilmente, le mutazioni si susseguono nel dare luogo alla trasformazione neoplastica nella cellula.

Dati clinici ed istopatologici suggeriscono che la maggior parte dei carcinomi coloretali deriva da polipi inizialmente piccoli che si ingrandiscono dando luogo ad adenomi, tumori benigni, che gradualmente progrediscono, attraverso un aumento nelle dimensioni, nel grado di displasia e nell'acquisizione di una morfologia villosa, passando per gli stadi di adenoma precoce, intermedio e tardivo, fino a divenire carcinoma (6).

Il processo neoplastico richiede un periodo di circa dieci anni ed almeno sette eventi genetici per il suo completamento (7).

Il totale accumulo di cambiamenti, piuttosto che l'ordine con cui si presentano, è importante nella determinazione delle proprietà biologiche del tumore.

Fearon e Vogelstein hanno suggerito un modello di tumorigenesi coloretale (Fig. 2) in cui, nello stadio iniziale di formazione del polipo, avvengono mutazioni nel gene oncosoppressore APC, seguite, durante lo stadio di adenoma, da mutazioni nell'oncogene K-ras e, all'atto della transizione alla malignità, da delezioni sul cromosoma 18 e da mutazioni di TP53 (8).

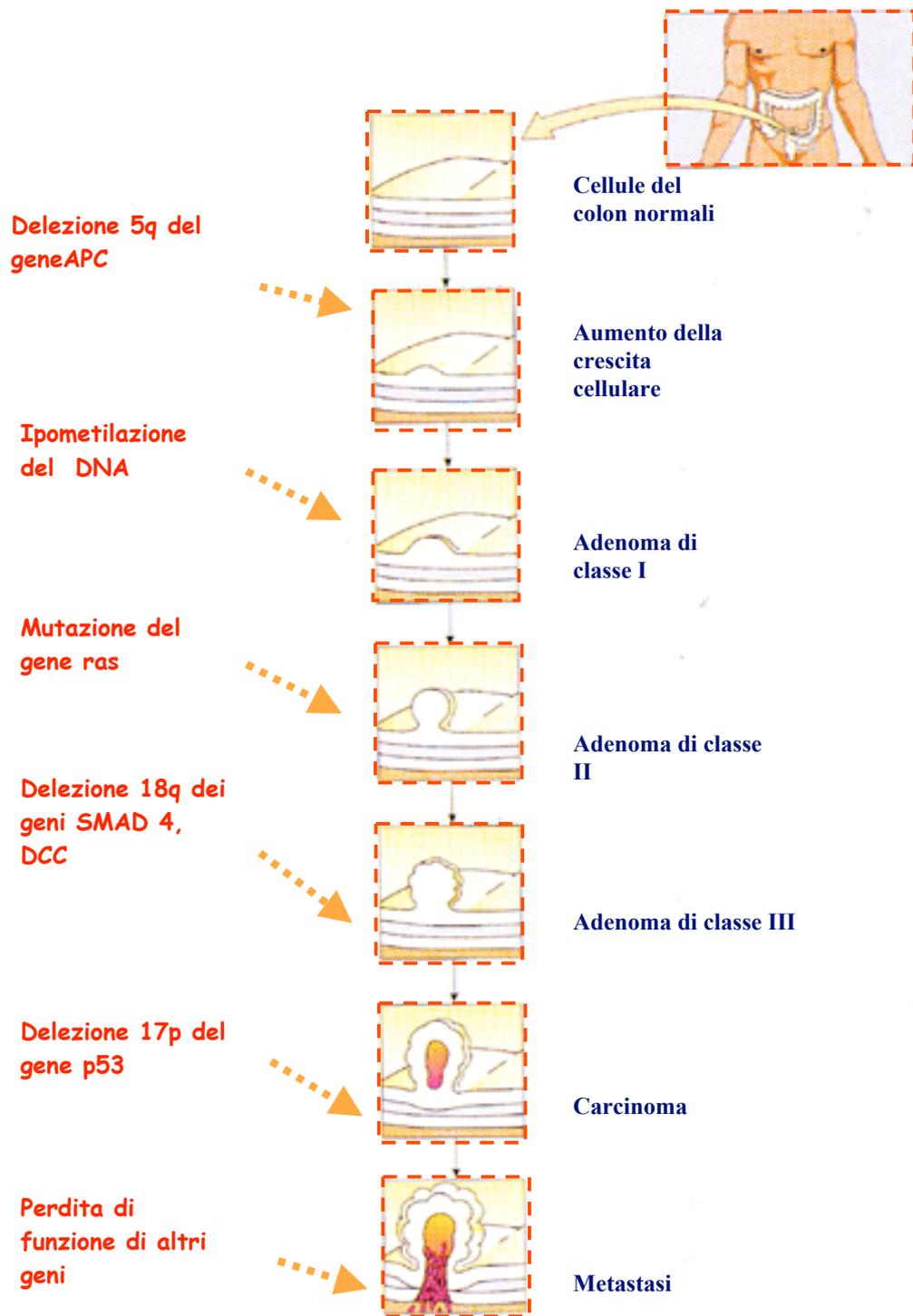


Fig.2: Alterazioni geniche coinvolte nella tumorigenesi coloretale.

Sono necessarie due mutazioni per l'inizio della carcinogenesi coloretale: nella maggior parte dei casi queste mutazioni avvengono a carico del gene oncosoppressore APC (9). Alcuni studi indicano che già nelle cellule degli adenomi precoci entrambe le copie del gene APC risultano alterate. Nonostante le mutazioni nel gene APC rappresentino l'evento iniziale nella tumorigenesi coloretale, queste mutazioni sono probabilmente insufficienti per la progressione dell'adenoma, che quindi prevede il coinvolgimento di altri geni. Il primo candidato per la progressione tumorale è l'oncogene K-ras. In cellule normali, le proteine ras sono attivate in risposta a segnali extracellulari e funzionano come interruttori molecolari nella proliferazione cellulare. Mutazioni di k-ras sono frequentemente (~45%) rilevate nel cancro coloretale (CRC). Il passaggio da adenoma intermedio ad adenoma tardivo è rappresentato da mutazioni nel gene oncosoppressore DCC (Deleted in Colon Cancer). Il gene codificante DCC è localizzato sul cromosoma 18q21, la cui perdita di eterozigotità è stata trovata in una larga frazione di tumori colorettali. In più del 90% dei casi, DCC è incluso nella regione di perdita allelica (10). Altri geni candidati soppressori tumorali, localizzati sempre sul cromosoma 18, sono SMAD2 e SMAD4, la cui inattivazione somatica è comune in vari casi di cancro al colon-retto. Queste proteine funzionano da trasduttori di segnali e un difetto nella loro espressione risulta nell'incapacità di rispondere a questi segnali (11,12).

Nella definitiva evoluzione metastatica è coinvolta la proteina TP53. Mutazioni di TP53 sono state identificate nel 50%, o più, dei tumori colorettali. Il gene oncosoppressore TP53, localizzato sul braccio corto del cromosoma 17, codifica per una fosfoproteina nucleare da 53Kd che regola il ciclo cellulare e l'apoptosi. L'attività antioncogenica della p53 è attivata da vari stress cellulari e si esplica nell'arresto della crescita cellulare, nella riparazione dei danni al DNA e nell'apoptosi. Quest'ultimo meccanismo è cruciale nell'eliminare le cellule potenzialmente tumorali. Infatti, la p53 regola direttamente una serie di geni apoptotici (13,14).

Nelle forme ereditarie di cancro, le mutazioni che si presentano in ogni cellula del corpo coinvolgono anche le cellule germinali, per cui possono essere trasmesse alle successive generazioni.

Il principio che sta alla base del rischio genetico ereditario è fondato sulla “ipotesi dei due hit di Knudson”: tutte le cellule somatiche contengono due copie (due alleli) di ogni gene; gli individui a rischio ereditario possono nascere con una copia difettosa di un gene, per cui basta una sola mutazione nell’altro allele per dare inizio alla tumorigenesi (15).

Recentemente, sono state chiarite le basi genetiche delle forme ereditarie FAP ed HNPCC, nelle quali l'alterazione di un singolo gene, trasmessa attraverso la linea germinale, provoca una marcata predisposizione familiare allo sviluppo del tumore colorettales. Sia nella FAP che nell'HNPCC il tumore insorge ad un'età media di 42 anni (16), circa 25 anni prima dell'età media di insorgenza del tumore colorettales sporadico. Tuttavia, mentre nella FAP il difetto molecolare provoca l'insorgenza del tumore, nell'HNPCC il difetto molecolare provoca la progressione del tumore. Nei pazienti FAP il primo evento mutazionale che porta allo sviluppo del tumore è una mutazione nel gene oncosoppressore APC. Poiché il gene APC costituisce il primo meccanismo di controllo della crescita nelle cellule del colon, la prima manifestazione fenotipica della malattia è la formazione di migliaia di piccoli tumori benigni, in alcuni dei quali lentamente si accumulano le successive mutazioni. Tutto ciò comporta che uno o più di tali adenomi evolverà certamente in carcinoma. Mutazioni germinali in uno dei geni della riparazione del DNA, invece, causano la sindrome HNPCC, in cui gli adenomi si formano con una frequenza paragonabile a quella che si ha nei casi sporadici; tuttavia, le cellule di adenomi che presentano deficienze nei geni del riparo del DNA accumulano mutazioni con una frequenza circa tre volte superiore a quella delle cellule normali. Il risultato di questo processo è una rapida progressione dell'adenoma verso il tumore (Fig. 3).



Fig.3: Progressione tumorale nella Fap e nell'HNPCC

1.2 Cancro Ereditario Non Poliposico Del Colon-Retto (Hnpcc)

L'HNPCC, detta anche sindrome di Lynch, nasce da un'osservazione fatta da Warthin nel 1895, il quale studiò una famiglia, nota poi come "famiglia G", in cui il cancro era molto comune (17).

Nel 1964 Lynch riportò i suoi studi fatti su una famiglia, "famiglia N" (proveniente dal Nebraska), che aveva una predisposizione genetica al CRC e ad altri cancri. Tale condizione fu allora denominata sindrome di cancro familiare (CSF). Successivamente, fu preferito il termine di HNPCC (Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer) per sottolineare l'assenza di polipi al colon e distinguere questa sindrome dalla poliposi familiare (18). In realtà i polipi sono presenti in più del 30% dei pazienti affetti; il termine, infatti, indica che una poliposi estesa non è una caratteristica distintiva. I polipi associati all'HNPCC si presentano ad una giovane età, istologicamente tendono ad essere villosi, con un alto livello di displasia. Inoltre, sembrano comportarsi in maniera aggressiva, progredendo verso il cancro più rapidamente di altri adenomi (19).

E' importante sottolineare che la sindrome implica una predisposizione non solo al colon, ma anche ad altri organi quali endometrio, stomaco, ovaie, piccolo intestino, epitelio epatobiliare, epitelio uroepiteliale e cervello (20).

L'assenza o la presenza di tumori extra-colici, ha portato a suddividere l'HNPCC, rispettivamente, in sindrome di Lynch I e sindrome di Lynch II (17). La sindrome di Lynch I è caratterizzata dalla tendenza a sviluppare un carcinoma del colon in epoca precoce, di solito nella porzione ascendente (60-70% dei casi), e dall'eccesso di carcinomi primari multipli sincroni o metacroni (30-40% dei casi).

La sindrome di Lynch II, oltre le caratteristiche su riportate, manifesta lo sviluppo di carcinomi primari in altre sedi dell'organismo (endometrio, stomaco, intestino, vie epato-biliari, reni, ureteri ed ovaio).

Inoltre, appartengono alla sindrome di Lynch II: la malattia di Muir-Torre, caratterizzata dalla presenza di manifestazioni cutanee (adenomi sebacei multipli, epiteliomi, carcinomi talvolta associati con cheratoacantomi) associate al cancro coloretale ed endometriale e la sindrome di Turcot in cui, associati al CRC, sono presenti carcinomi cerebrali (glioblastomi) (21).

1.2.1 Genetica molecolare: i geni MMR

Da alcuni anni sono stati identificati i geni responsabili dell'HNPCC, che causano la suscettibilità al tumore (22).

Nel 1993, i gruppi di Peltomaki e Lindblom, mediante analisi di linkage, hanno individuato sui cromosomi 2p e 3p, rispettivamente, i siti genici associati alla sindrome di Lynch (23).

Fino ad oggi sono stati isolati sei diversi geni, appartenenti al sistema del "Mismatch Repair" (MMR), le cui mutazioni causano il fenotipo HNPCC (24).

I geni identificati sono:

- ❖ MLH1 localizzato sul cromosoma 3p21 e, costituito da 19 esoni e 756 codoni (25,26);
- ❖ MSH2 localizzato sul cromosoma 2p22-p21 e, costituito da 16 esoni e 934 codoni (27,28);
- ❖ PMS2 localizzato sul cromosoma 7p22 e, costituito da 15 esoni e 862 codoni (29,30);
- ❖ MSH6 (detto anche GTBP) localizzato sul cromosoma 2p16 e, costituito da 10 esoni e 1360 codoni (31,32);
- ❖ MSH3 localizzato sul cromosoma 5q11-13 e, costituito da 24 esoni e 1466 codoni (33,34).

Altri due geni del complesso del riparo, talvolta coinvolti nella patogenesi dell'HNPCC, sono MLH3 (14q24.3) e PMS1 (2q31-33).

Ognuno di questi geni codifica una proteina implicata nella riparazione dei "mismatches" del DNA, un complesso enzimatico "proofreading" in grado di correggere l'errato appaiamento di basi che si può verificare durante la replicazione del DNA (10).

Il sistema MMR fu originariamente identificato nei procarioti, in cui sono state individuate tre proteine, MutS, MutL e MutH, in grado di riconoscere e riparare tutti gli appaiamenti errati, tranne la coppia C-C. Tale sistema è in grado di riparare anche piccole inserzioni o delezioni non superiori a quattro basi.

MutS riconosce l'appaiamento errato e lega, in quel sito, il DNA; successivamente, si associa la proteina MutL. Il complesso MutS-MutL va ad attivare MutH, una endonucleasi che riconosce, più a monte, la sequenza

GATC metilata sul filamento genomico parentale e taglia a questo livello il filamento neosintetizzato non ancora metilato. Quest'ultimo viene, quindi, rimosso, dal punto di rottura fino al sito mutato, mediante l'intervento della UvrD elicasi e di una ssDNA esonucleasi; il vuoto viene, poi, riempito dalla DNA polimerasi III (Fig. 4).

Nell'uomo, il sistema di riparazione presenta, anche se più complesso, una forte analogia con quello batterico (35). Nel sistema di riparazione umano le proteine MSH2, MSH3 e MSH6 si associano in due complessi eterodimerici così formati: MSH2-MSH6 (chiamato MutS α) e MSH2-MSH3 (chiamato MutS β), omologhi alla proteina MutS batterica.

Il primo complesso è richiesto per riconoscere e legare il DNA nel sito di erroneo appaiamento, dovuto a sostituzione, inserzione o delezione di una singola base; il secondo complesso è responsabile del riconoscimento di inserzioni o delezioni di 2-4 basi.

Il complesso, poi, recluta le proteine omologhe alla MutL batterica, per attivare i successivi eventi di riparo. Nell'uomo, sono state descritte quattro diverse proteine MutL: MLH1, PMS1, PMS2 e MLH3. Anche queste formano complessi eterodimerici: MLH1-PMS2 (MutL α), MLH1-PMS1 (MutL β) e MLH1-MLH3 (MutL γ) (36). MutL α e MutL γ funzionano principalmente nella riparazione di inserzioni o delezioni, mentre il ruolo di MutL β non è stato ancora chiarito. Il complesso MutL coordina la reciproca azione tra il complesso di riconoscimento del "mismatch" e le altre proteine necessarie per la escissione e la re-sintesi del filamento errato.

Queste ulteriori proteine includono le DNA polimerasi δ e ϵ , il fattore PCNA (proliferative cell nuclear antigen), una esonucleasi (EXO1), un fattore di replicazione (single-strand DNA-binding protein, RPA) ed una elicasi (37) (Fig. 5). Recenti dati suggeriscono che, oltre il riparo post-replicazione, le proteine MMR hanno varie altre funzioni che sono altamente rilevanti nella carcinogenesi, quali la sorveglianza al danno del DNA, causato da ammine eterocicliche o da agenti ossidanti, la prevenzione della ricombinazione tra sequenze non identiche e la partecipazione ai processi meiotici (25). Inoltre, esiste anche una correlazione tra il sistema MMR e la fase G2/M del ciclo cellulare (38).

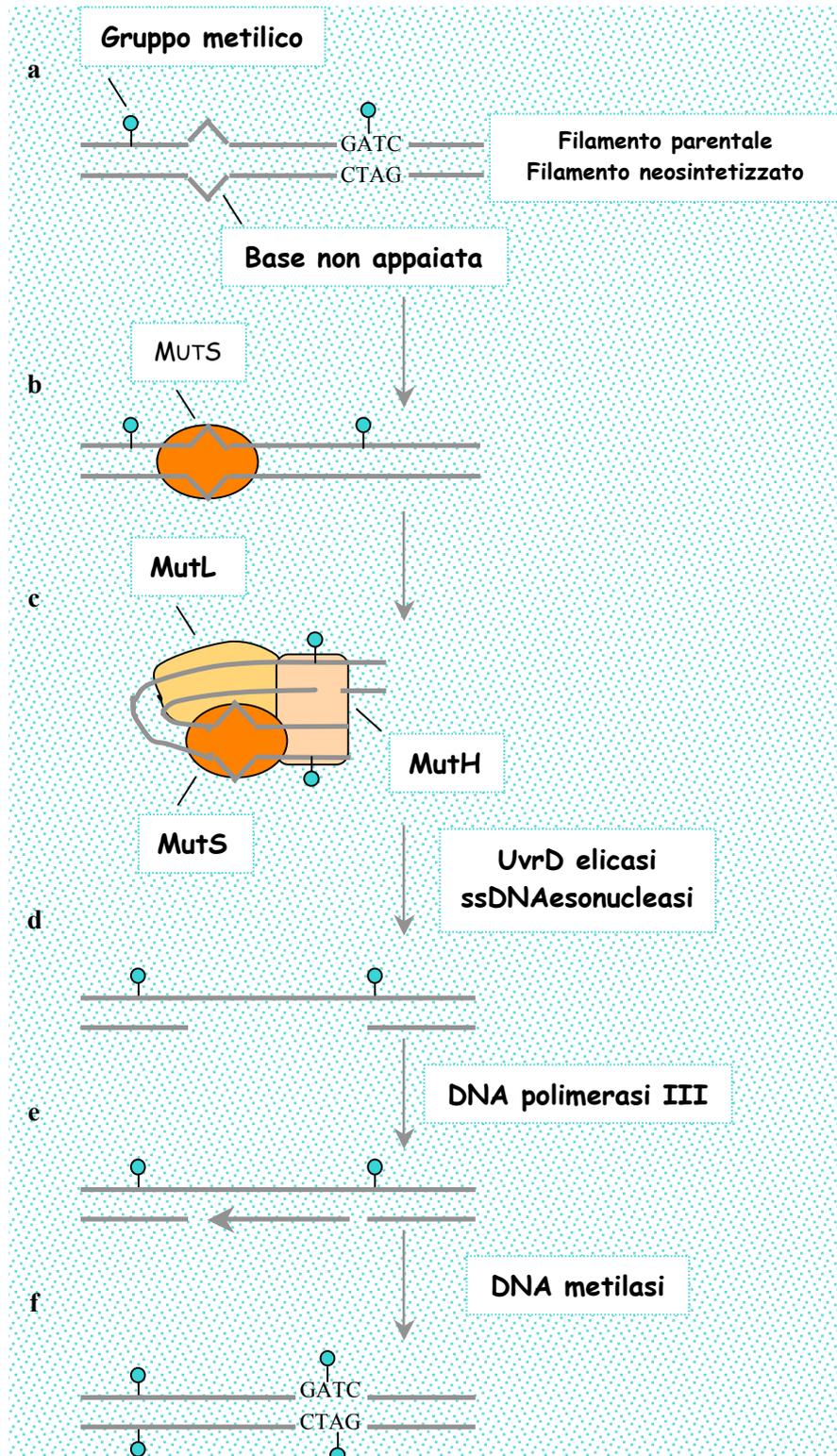
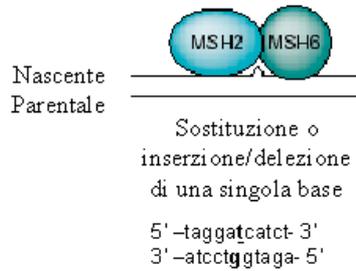


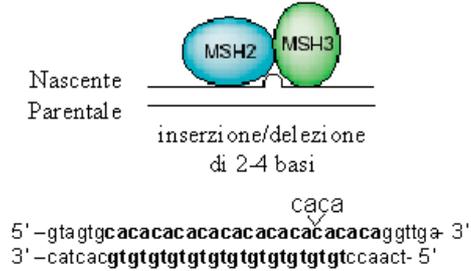
Fig. 4 Meccanismo di funzionamento del complesso di riparo del DNA in *E. Coli*.
 a) Errato appaiamento che si può formare durante la replicazione del DNA batterico; b) la proteina MutS riconosce e lega il DNA in corrispondenza dell'appaiamento errato; c) MutL si lega a MutS e, insieme attivano MutH che riconosce e taglia il filamento nuovo non mutilato in un punto a monte dell'errore; d) la UvrD elicasi e una ssDNA esonucleasi rimuovono una parte del filamento neosintetizzato, incluso l'appaiamento errato; e) il vuoto viene riempito dalla DNA polimerasi III; f) una DNA metilasi rende il filamento neosintetizzato metilato come quello parentale

Riconoscimento del mismatch

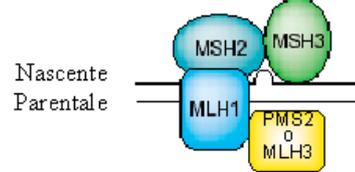
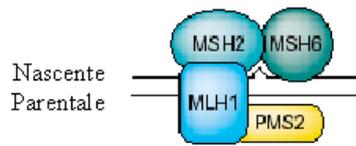
MutS α



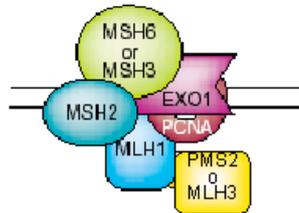
MutS β



Recrutamento di MLH1-PMS2



Escissione, re-sintesi e ligazione



5' -tagga**C**catc- 3'
3' -atcctg**g**taga- 5'

5' -gtagtgc**acacacacacacacacacacac**aggttg- 3'
3' -catcac**gtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt**tccaact- 5'

Fig. 5: Modello per il complesso di riparo del DNA (MMR) eucariotico

1.2.2 Basi molecolari dell'HNPCC: mutazioni nei geni MMR

I tumori HNPCC sono associati a mutazioni genetiche a carico del complesso di riparazione (MMR).

Mutazioni germinali in MLH1, MSH2 e MSH6 rendono conto di circa il 50%, 40% e 10%, rispettivamente, di tutte le mutazioni riportate in letteratura; mentre PMS1, PMS2 e MLH3 contribuiscono in misura minore all'insorgere del cancro (39). Fino ad oggi sono state individuate nei geni MMR circa 500 diverse mutazioni che predispongono all'HNPCC.

Un elenco di tali mutazioni, aggiornato al 2004, è stato pubblicato dall'International Collaborative Group (ICG) sul sito www.insight-group.org, dove sono riportate 256 mutazioni in MLH1, 180 in MSH2, 32 in MSH6, 12 in PMS2 ed 1 in PMS1. Inoltre, nove mutazioni missenso ed una mutazione frameshift sono state individuate nel gene MLH3 di pazienti con CRC, sebbene il significato funzionale e clinico di queste alterazioni non è chiaro; forse potrebbero essere associate con un ritardato insorgere dell'HNPCC (40).

In tutti i geni implicati le mutazioni sono distribuite in modo eterogeneo, denotando l'assenza di "hot spot" mutazionali. Anche la natura delle alterazioni germinali è estremamente variabile (16).

In MSH2, il 10-20% delle mutazioni è rappresentato da ampie delezioni genomiche, il 48% da piccole delezioni, il 12% da inserzioni e il 40% da sostituzioni di singole basi.

In MLH1 sono meno frequenti le ampie delezioni, mentre si riscontrano delezioni (27%), inserzioni (15%) e singole sostituzioni di basi (58%).

A livello trascrizionale, queste alterazioni risultano in mutazioni frameshift e missenso, soprattutto nel caso di MSH2 e mutazioni missenso ed alterazioni dei siti di splicing, nel caso di MLH1. In MSH6 si riscontra soprattutto un accumulo di sostituzioni nucleotidiche.

Vari studi indicano che le mutazioni in MSH2 sono più spesso associate a cancro gastrico, ovario e renale, rispetto alle mutazioni in MLH1, anche se non è ancora possibile stabilire definitive correlazioni tra genotipo e fenotipo (19).

Diverso è il discorso per quanto riguarda MSH6, le cui mutazioni causano una forma "attenuata" di HNPCC, caratterizzata da una più bassa penetranza, una

maggior età d'insorgenza della malattia, in genere intorno ai 60 anni, ed un basso grado di instabilità dei microsatelliti (41).

Difetti nel gene PMS2 causano uno sviluppo precoce del tumore, che presenta instabilità dei microsatelliti, pur mostrando caratteristiche diverse rispetto ai tumori causati da mutazioni in MLH1, MSH2 e MSH6.

Mutazioni in MSH3 causano l'insorgere del tumore ad un'età piuttosto avanzata, in parallelo alla limitata implicazione di questo gene nell'HNPCC. Tuttavia, tali alterazioni accelerano lo sviluppo tumorale quando sono combinate con mutazioni in MSH6 (42).

1.2.3 Instabilità dei microsatelliti e tumorigenesi coloretale nell'HNPCC

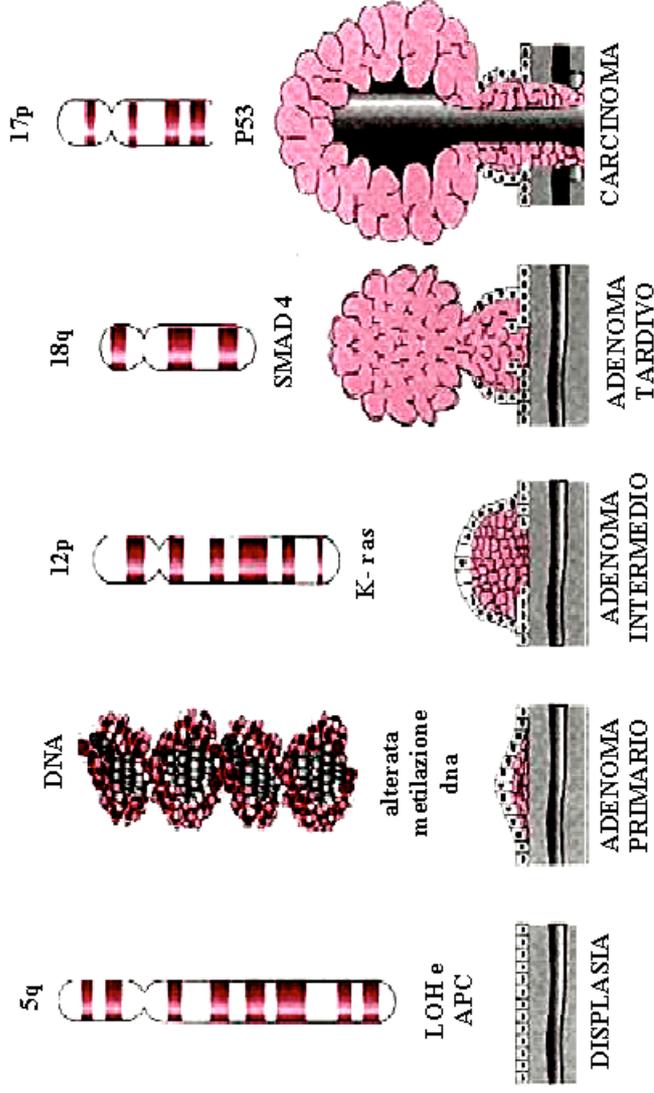
Il modello proposto per lo sviluppo del tumore HNPCC prevede, come evento iniziale, una mutazione germinale che colpisce una copia di uno dei geni MMR. A tale evento segue l'inattivazione dell'altro allele in una cellula somatica bersaglio (Fig. 6). La perdita di funzionalità del complesso del riparo innesca una cascata di mutazioni somatiche che coinvolgono diversi geni (43). L'instabilità genetica che ne risulta, provoca alterazioni in oncosoppressori, oncogeni ed altri geni che presiedono al controllo del ciclo cellulare (44).

Questo fenotipo, detto RER+ (replication errors in repeat), riflette l'incapacità di riparare piccole inserzioni o delezioni nucleotidiche, causate da una non corretta replicazione del DNA. Tumori RER+ mostrano un elevato livello di variabilità, soprattutto a livello dei microsatelliti (44,45).

I microsatelliti sono corte sequenze di DNA che consistono nella ripetizione variabile (da 15 a 30 volte) di mono-, di-, tri- e tetranucleotidi dispersi nel genoma umano. La loro natura ripetitiva li rende particolarmente suscettibili ad errori durante la replicazione. L'instabilità dei microsatelliti (MSI) è stata riscontrata in circa il 90-95% dei tumori HNPCC e solo nel 15% dei tumori coloretali sporadici (46).

Inoltre, mostrano instabilità genetica anche i tumori, come il cancro dello stomaco, dell'ovaio, dell'endometrio, del sistema biliopancreatico e del tratto urinario, associati al cancro del colon in famiglie HNPCC (47).

Mutazioni CRC sporadici



Mutazioni HNPCC

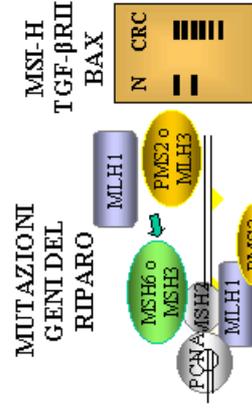


Fig. 6: Modello per lo sviluppo del tumore HNPCC

La maggior parte delle sequenze microsatelliti sono localizzate nel genoma, all'interno di sequenze non codificanti. Tuttavia, molti geni contengono microsatelliti nelle loro regioni codificanti e alcuni di questi geni sono importanti nella regolazione della crescita cellulare. Mutazioni nei geni TGF β RII e TCF-4, entrambi contenenti ripetizioni mononucleotidiche, sembrano essere particolarmente selettive per il cancro al colon (37).

La frequenza delle mutazioni nel tratto poliadeninico del recettore TGF β RII è estremamente alta in pazienti HNPCC.

Recente è l'identificazione di altri due bersagli, associati al fenotipo RER+, il recettore IGF-RII ed il gene BAX. Il primo è richiesto per l'attivazione extracellulare del recettore TGF β . Il secondo codifica per una proteina che, poi, eterodimerizza con la proteina anti-apoptotica Bcl2 e induce l'apoptosi (48,49). Mutazioni di APC sono, invece, presenti solo nel 21% dei tumori con MSI, ancor meno quelle che coinvolgono la p53.

I tumori con MSI mostrano caratteristiche istologiche aggressive ma, paradossalmente, esiti favorevoli. L'instabilità dei microsatelliti è infatti associata ad un significativo vantaggio di sopravvivenza. Inoltre, i carcinomi coloretali con MSI mostrano un'elevata prevalenza di linfociti intraepiteliali, attivati forse da un accumulo di mutazioni in geni codificanti proteine di superficie. Questo potrebbe contribuire ad incrementare l'apoptosi delle cellule neoplastiche (37).

Le famiglie HNPCC possono essere suddivise in tre principali gruppi, caratterizzate da: alta (MSI-H), bassa (MSI-L) o assente (MSS) instabilità dei microsatelliti (MSI). Almeno una frazione dei tumori MSI-H è legata a mutazioni in MLH1/MSH2. Tumori MSI-L e MSS sono causati soprattutto da difetti nei geni minori, MSH6 e MSH3 (50).

Nel 1997, il National Cancer Institute raccomandò, per la determinazione della MSI, un pannello, noto come "pannello di Bethesda", di cinque microsatelliti comprendenti due ripetizioni mononucleotidiche (BAT-25 e BAT-26) e tre ripetizioni dinucleotidiche (D2S123, D5S346 e D17S250). Tumori con instabilità in due o più di queste ripetizioni sono definiti ad alta instabilità (MSI-H); quelli con una ripetizione instabile sono detti a bassa instabilità (MSI-L); tumori senza alterazioni sono stabili (MSS) (51).

L'analisi di questo gruppo di microsatelliti ha, tuttavia, delle limitazioni, dovute alle ripetizioni dinucleotidiche che sono meno sensibili e meno specifiche per la determinazione di tumori con difetti nei geni MMR "minori" e può risultare in una errata classificazione del livello di stabilità dei tumori (52).

Nei tumori classificati come MSI-L, si raccomanda di analizzare un secondo gruppo di sequenze microsatelliti (53).

Alcuni tumori MSI, con mutazioni del gene MSH6, non mostrano alterazioni nelle ripetizioni dinucleotidiche. Nella maggioranza dei tumori, l'analisi di BAT-25 e BAT-26 è sufficiente a stabilire il loro stato MSI-H, tuttavia, poiché diversi polimorfismi sono stati individuati in queste due sequenze mononucleotidiche, è necessario analizzare ulteriori microsatelliti. Recentemente, è stato suggerito di utilizzare, oltre BAT-25 e BAT-26, altre tre ripetizioni mononucleotidiche quasi-monomorfiche, NR21, NR22 e NR24, per garantire la giusta classificazione del grado di instabilità dei tumori caratterizzati, principalmente, da mutazioni in MSH6 (54). Mentre difetti in MLH1 e MSH2 danno instabilità principalmente in ripetizioni dinucleotidiche, difetti in MSH6 mostrano alterazioni in ripetizioni mononucleotidiche. Tale dato è in accordo alle funzioni biologiche di tali geni: mentre MLH1 e MSH2 riparano anche errori dovuti ad inserzioni o delezioni di 2-4 basi, MSH6 è coinvolto nel riparo di singole sostituzioni e inserzioni o delezioni di singole basi (39).

Dati recenti indicano che nei pazienti HNPCC circa il 95% dei casi MSI-H è dovuto a perdita di espressione di MLH1 (45%), MSH2 (40%), MSH6 (10%) o PMS2 (5%) (53).

Per generare il fenotipo MSI-H, è necessaria l'inattivazione di entrambi gli alleli di MSH2 o MLH1. L'inattivazione di MSH2 è strettamente correlata alla presenza di mutazioni geniche. Invece, l'inattivazione di MLH1 è principalmente dovuta a mutazione genica, nel caso di HNPCC con MSI, ma anche a cambiamenti epigenetici, come l'ipermetilazione del promotore, presente nei casi sporadici che mostrano MSI (19). Infatti, i CRCs che esibiscono un fenotipo MSI-H sono associati a mutazioni somatiche dei geni MMR che cadono, cioè, all'interno di cellule tumorali, senza interessare le linee germinali (31).

Più dell'80% di CRCs con MSI mostrano ipermetilazione del promotore di MLH1 e perdita di espressione della proteina, suggerendo che questo potrebbe essere un primo meccanismo che sta alla base della MSI nei tumori sporadici (55).

Oltre alla metilazione del promotore, altra caratteristica e, quindi possibile causa, dei tumori coloretale sporadici è la perdita di eterozigotà (LOH), cioè la perdita di un intero allele frequentemente associata all'inattivazione mutazionale puntiforme nell'allele wild-type (56).

1.2.4 Caratteristiche Clinico-patologiche dell'HNPCC

L'HNPCC, sindrome ereditaria a trasmissione autosomica dominante, presenta una penetranza per il CRC dell'85-90%. L'insorgenza del CRC rispetto alla popolazione generale è più precoce, circa 45 anni nell'HNPCC rispetto ai 63 anni nelle forme sporadiche. Altre caratteristiche più frequentemente osservate nei cancri HNPCC rispetto ai tumori coloretali sporadici, oltre alla localizzazione preferenziale al colon prossimale e ad un elevato numero di carcinomi coloretali multipli sincroni e metacroni, sono l'aspetto istologico mucinoso, un basso grado di differenziazione e la presenza di una marcata flogosi linfocitaria peritumorale con le caratteristiche della cosiddetta "Crohn's reaction" (56). I tumori HNPCC, inoltre, presentano una migliore prognosi rispetto al CRCs, un rischio aumentato per tumori extracolici, una carcinogenesi accelerata dovuta al rapido accumulo di mutazioni nel genoma e l'instabilità dei microsatelliti.

Tuttavia, essendo il tumore sporadico del colon retto frequente (presenza di più tumori sporadici in una stessa famiglia) e mancando per i casi familiari dei sintomi e dei marcatori clinici ben definiti, è necessaria un'attenta e corretta anamnesi per l'identificazione di famiglie HNPCC. A tale scopo nel 1989, l'International Collaborative Group on HNPCC (ICG-HNPCC) ha stabilito i criteri di Amsterdam I per l'identificazione di famiglie HNPCC.

Negli anni successivi, questi criteri si sono mostrati insufficienti per una corretta diagnosi, poiché non tengono conto dei tumori extra-colici, che pur fanno parte della sindrome. Per cui, onde evitare di escludere erroneamente,

dalla consulenza genetica, famiglie a rischio, nel 1998, l'ICG-HNPCC ha rivisto i precedenti criteri, aggiungendovi delle correzioni che hanno portato alla definizione dei criteri di Amsterdam II (19):

- ❖ almeno tre familiari devono essere affetti da un cancro associato all'HNPCC (colon-retto, endometrio, piccolo intestino, vie renali o uretere), ed uno di essi deve essere parente di primo grado ad uno degli altri due;
- ❖ almeno due generazioni successive devono risultare affette;
- ❖ uno dei pazienti affetti deve sviluppare il tumore prima dei cinquant'anni;
- ❖ deve essere esclusa l'ipotesi di poliposi adenomatosa familiare;
- ❖ la presenza del tumore dovrebbe essere verificata mediante esame patologico.

Poiché un'importante caratteristica dell'HNPCC è l'instabilità dei microsatelliti (MSI), è consigliabile analizzare, nel tessuto tumorale, tale alterazione e definirne il grado di instabilità.

Nel 1996, il National Cancer Institute (NCI), sulla base di un lavoro internazionale sull'HNPCC ha sviluppato le linee guida di Bethesda che racchiudono i criteri per identificare tumori coloretali che potrebbero essere analizzati per MSI (57):

- ◆ individui con cancro appartenenti a famiglie che soddisfano i criteri di Amsterdam;
- ◆ individui con due o più cancri associati all'HNPCC, compreso i CRC sincroni e metacroni e cancri extra-colici;
- ◆ individui con CRC e un membro della famiglia di primo grado con CRC e/o cancro extra-colico associato all'HNPCC e/o adenoma coloretale; uno dei cancri deve essere diagnosticato prima dei 45 anni e, l'adenoma prima dei 40 anni;
- ◆ individui con CRC o carcinoma endometriale diagnosticato prima dei 45 anni;
- ◆ individui con CRC al colon destro con istopatologia non differenziati diagnosticato prima dei 45 anni;
- ◆ individui con adenomi diagnosticati prima dei 40 anni.

Anche questi criteri hanno subito una revisione, che ha portato a formulare una versione aggiornata delle linee guida di Bethesda adattata alle nuove scoperte (51):

- ◆ cancro diagnosticato prima dei 50 anni;
- ◆ carcinomi coloretali sincroni e metacroni o, altri tumori associati all'HNPCC, indipendentemente dall'età;
- ◆ CRC con MSI-H diagnosticato prima dei 60 anni;
- ◆ CRC in uno o più parenti di primo grado con cancro coloretale e/o cancro associato all'HNPCC, diagnosticato prima dei 50 anni;
- ◆ CRC diagnosticato in due o più parenti di primo o secondo grado con tumore associato all'HNPCC, indipendentemente dall'età.

La diagnosi precoce, negli individui appartenenti a famiglie a rischio, rimane una tappa di fondamentale importanza nella prevenzione dello sviluppo del cancro in quanto i polipi, se non asportati in tempo, evolvono inevitabilmente in carcinoma intorno ai quarant'anni. Sulla base di tali considerazioni, gli individui appartenenti a famiglie con diagnosi clinica di HNPCC devono sottoporsi ad un rigoroso programma di sorveglianza clinica, che prevede una colonscopia completa ogni 2 anni dopo i 20/25 anni. Attualmente tali indagini possono essere precedute, nei familiari a rischio, dalla diagnosi molecolare per l'identificazione di mutazioni germinali nei geni MMR, che rappresenta un utile mezzo diagnostico non invasivo per la diagnosi precoce.

Scopo della Tesi

Scopo di questa tesi è stata l'analisi molecolare dei geni MLH1 e MSH2 in 54 famiglie con diagnosi clinica di HNPCC, per individuare la mutazione causa di malattia ed effettuare la diagnosi molecolare presintomatica nell'ambito dei familiari a rischio, nonché stabilire una possibile correlazione fra genotipo e fenotipo. Tutte le famiglie risultate negative per mutazioni in MLH1 e MSH2 sono state successivamente analizzate per la ricerca di mutazioni nel gene MSH6.

Inoltre, poiché la prima conseguenza fenotipica di errori nei geni MMR è rappresentata dall'instabilità dei microsatelliti, che determinano il cosiddetto fenotipo RER+ presente nel 90% dei tumori HNPCC, ai fini del riconoscimento di tali famiglie e della conferma della diagnosi clinica viene effettuata l'analisi di 5 microsatelliti, che costituiscono il "pannello di Bethesda". Studi recenti hanno suggerito che, oltre tali microsatelliti, sarebbe importante anche l'analisi di altre ripetizioni mononucleotidiche (NR-21, 22, 24), risultate instabili in linee cellulari del colon che presentavano mutazioni nel gene MSH6 (54). Scopo di questa tesi è stato, quindi, anche verificare il grado d'instabilità di tali ripetizioni mononucleotidiche nei tessuti tumorali di pazienti portatori di mutazioni nel gene MSH6.

Altro scopo di questa tesi è stato mettere a punto tecniche innovative quali la DHPLC per la ricerca di mutazioni puntiformi e l'MLPA per la ricerca di ampi riarrangiamenti genici in MLH1 e MSH2, al fine di poter effettuare una diagnosi molecolare più rapida, sensibile ed efficiente nei pazienti affetti da HNPCC.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

I reattivi adoperati provengono dalle ditte Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK), Roche (Basilea, CH), Qiagen (Valencia, USA), Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA), Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA), Transgenomic (Crewe, UK).

L'enzima Taq Polimerasi è stato fornito dalla Roche, la Taq Gold polimerasi dalla Perkin-Elmer. Il Kit P003 è stato fornito da MRC-Holland (Amsterdam).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate utilizzando un'apparecchiatura "Biorad My Cycler Thermal Cycler" Biorad Laboratories (Richmond, USA).

I primers sono stati sintetizzati utilizzando un DNA Synthesizer PCR-Mate, modello 3912 dell'Applied Biosystem.

2.2 Metodi

2.2.1 Estrazione di DNA da sangue periferico

Il DNA genomico dei soggetti in esame è stato estratto da sangue periferico raccolto, durante il prelievo, in una provetta di tipo vacutainer contenente, come anticoagulante, EDTA. Si è proceduto, quindi, con l'estrazione utilizzando i reattivi forniti dal kit "Nucleon BACC2" (Amersham Life Science).

Il contenuto della provetta, circa 3 ml di sangue, è stato diluito con 4 volumi di reagente A (una soluzione di lisi eritrocitaria contenente 10 mM Tris-HCl, 320 mM saccarosio, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 pH 8.0) e mescolato mediante lenta inversione per 4 minuti, a temperatura ambiente.

Dopo centrifugazione a 2400 g per 5 minuti, in una centrifuga “Beckman Allegra 6R”, il sovrantante è stato decantato ed il pellet risospeso in 2 ml di reagente B (buffer di lisi dei leucociti).

Le proteine sono state allontanate con l’aggiunta di 500 µl di sodio perclorato 5 M. Dopo aggiunta di 2 ml di cloroformio, che determina la separazione in due fasi, sono stati aggiunti 300 µl di resina Nucleon. Dopo centrifugazione a 2400 g, per 5 minuti, è stata prelevata la fase acquosa superiore a cui sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto freddo per precipitare il DNA.

Con l’ausilio di un uncino è stato recuperato il pellet, fatto asciugare brevemente per allontanare gli eccessi di etanolo e risospeso in 300-500 µl di soluzione TE sterile (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

2.2.2 Amplificazione delle regioni codificanti dei geni MLH1, MSH2 ed MSH6

L'intera regione codificante dei geni MLH1, MSH2 ed MSH6 è stata amplificata in 19, 16 e 24 frammenti rispettivamente. I prodotti di amplificazione sono stati ottenuti mediante una reazione di Polymerase Chain Reaction (PCR) in Touchdown. Tale PCR consiste in 10 cicli iniziali di amplificazione programmati in modo tale che, ad ogni ciclo, la temperatura di annealing scende, a partire da quella impostata, di 1°C. Gli altri cicli seguono come in una PCR classica.

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 50 µl, utilizzando 0,5-1 µg di DNA genomico estratto da sangue periferico e 2.0 unità di Taq DNA polimerasi in una miscela di reazione contenente 200 mM di ciascun dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 2,0 mM MgCl₂ e 50 pmol degli opportuni oligonucleotidi, applicando il seguente profilo termico:

1 ciclo	95°C per 8'		
Touchdown 10 cicli	94° per 30'' T ₁₀ per 30'' 72°C per 30''	30 cicli	94° per 30'' T _m per 30'' 72°C per 30''
	1 ciclo	72°C per 5'	

la temperatura di touchdown (T_{10}) parte da 60°C fino ad arrivare a 50°C, mentre le temperature di annealing (T_m) sono specifiche per i vari esoni (57). L'esone 1 del gene MSH6, per la sua sequenza particolarmente ricca in GC, è stato amplificato utilizzando il kit "HotStarTaqMasterMix" (Qiagen). La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 50 μ l, utilizzando 200 ng di DNA, 10 μ l di Q-solution (fornita dalla casa produttrice), 50 pmol degli opportuni oligonucleotidi e 25 μ l di HotStarTaq Master Mix, contenente la HotStarTaq DNA polimerasi e un buffer PCR con 3,0 mM $MgCl_2$ e 400 μ M di ogni dNTP. Il programma di amplificazione utilizzato è il seguente: 1 ciclo a 96°C per 15' seguito da 35 cicli effettuati con una denaturazione a 98°C per 40'', un appaiamento a 63°C per 30'' e un allungamento a 72°C per 40'', infine 1 ciclo a 72°C per 5'.

2.2.3 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

L'analisi mediante SSCP si basa sul principio che una molecola di DNA a singolo filamento assume, in un gel di poliacrilammide non denaturante, una struttura secondaria specifica, dipendente dalla sequenza del frammento stesso. Frammenti di DNA anche con una sola sostituzione nucleotidica hanno una migrazione elettroforetica differente dal frammento con sequenza normale.

Il DNA amplificato, miscelato nel rapporto di 7:9 con tampone denaturante (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilencianolo, 30% glicerolo e formammide), è stato denaturato per 5 min. a 95°C e sottoposto ad elettroforesi in un gel di poliacrilammide all'8-10%, in presenza di glicerolo al 5%, alla temperatura costante di 4°C in tampone di corsa TBE 0,5 X, ad un voltaggio costante di 300 Volts per circa 4 ore.

Dopo la migrazione il gel è stato posto in etanolo al 10% per 5 min. e, successivamente, ossidato in una soluzione di acido nitrico all'1% per 3 min. Il gel sciacquato in acqua distillata per pochi secondi, è stato posto in una soluzione di nitrato di argento 12 mM per 20 min. Dopo un rapido lavaggio in acqua distillata, il gel è stato ridotto in una soluzione di carbonato di sodio anidro 0,28 M e 0,019% di formaldeide, cambiando la soluzione riducente ogni volta che diventa scura e incubando il gel fino a quando l'immagine raggiunge

l'intensità desiderata. Il processo di riduzione viene bloccato ponendo il gel in acido acetico glaciale al 10% per 2 min. Infine, il gel viene posto in acqua distillata per pochi secondi e essiccato nel "gel dryer" per avere un'immagine permanente.

2.2.4 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

2.2.4.1 La tecnica

La Cromatografia ad alta prestazione in condizioni denaturanti DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) impiega un meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (RP-IP-HPLC). Esso, infatti, separa le molecole di DNA e le fluisce sulla base della loro dimensione crescente.

La colonna cromatografica contiene una fase stazionaria (o matrice), formata da particelle di polistirene-divinilbenzene (diametro medio 2.3 μ m), che viene sottoposta alla reazione di alchilazione, necessaria per un'analisi ad alta risoluzione degli acidi nucleici. La fase mobile è costituita da una miscela di due soluzioni A e B. La soluzione A consiste in un reagente carico positivamente, il trietilammonioacetato (TEAA) 100 mM pH 7,0, mentre la soluzione B contiene TEAA 100mM e 25% di acetonitrile pH 7,0.

Il TEAA, costituito da una porzione idrofobica ed una idrofilica, permette alle molecole di DNA, cariche negativamente, di interagire con la matrice idrofobica della colonna facendo da ponte; la porzione idrofilica (carica positivamente) interagisce con i gruppi fosfato (carichi negativamente) delle molecole di DNA, mentre quella idrofobica interagisce con la fase stazionaria della colonna. Variando appositamente la temperatura della colonna si determina il disappaiamento della eliche negli eteroduplex in corrispondenza della mutazione. Il DNA eteroduplex si genera quando un frammento amplificato di DNA mutato ed uno non mutato vengono denaturati termicamente e poi fatti raiassociare. Nel punto della mutazione, poichè le due singole eliche non sono in grado di formare legami a idrogeno perché le basi risultano non correttamente appaiate, si formano delle porzioni di DNA a singola elica (bolle) (Fig. 7). La proprietà fondamentale di tali bolle, nel DNA

a doppia elica (dsDNA), è quella di avere una minore densità di gruppi fosfato e, quindi, una minore densità di carica rispetto al doppio filamento, garantendo una minore ritenzione della molecola di acido deossiribonucleico sulla fase stazionaria e un tempo di eluizione inferiore a quello dell'omoduplex.

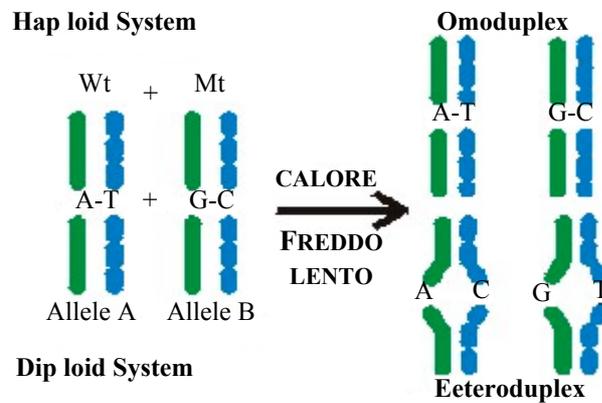


Fig.7: Modalità di formazione delle molecole di DNA eteroduplex ed omoduplex, in seguito a riscaldamento e lento raffreddamento

L'utilizzo di un gradiente di solvente organico (acetonitrile ACN), che compete nel legame alla resina del TEAA, porta all'eluizione dei frammenti di DNA in funzione della sequenza (in condizioni di parziale denaturazione).

La concentrazione crescente dell'ACN è in grado di separare le molecole a singola elica da quelle a doppia elica. Infatti, il DNA, presente sotto forma di singola elica, crea meno interazioni con il TEAA e, quindi, viene eluito per primo. Successivamente, eluisce il DNA parzialmente denaturato ed infine il DNA a doppia elica. L'eluizione del picco viene seguita da un sistema spettrofotometrico, corredato di microcella a flusso, che rileva in continuo l'assorbanza a 260nm.

2.2.4.3 La strumentazione DHPLC

I diversi elementi che compongono l'apparecchiatura per la DHPLC comprendono:

- ✓ colonna cromatografia;
- ✓ piastra sulla quale possono essere posizionati fino a 96 campioni di DNA da analizzare;
- ✓ sistema di iniezione del DNA;

- ✓ sensore spettrofotometrico di rivelamento del DNA, che trasforma il segnale analogico in un valore digitale;
- ✓ pompa che assicuri un flusso costante (900 µl/minuto) attraverso la colonna di separazione cromatografica.

2.2.4.6 Analisi dei campioni al DHPLC

I prodotti amplificati vengono denaturati a 95°C per 5 min, e poi vengono fatti riappaiare gradualmente mediante un decremento di temperatura, che raggiunge i 20°C finali per 50 min e quindi posizionati nella piastra della DHPLC; la siringa preleva 5-8 µl del campione e li immette nel flusso di tampone di corsa pompato verso la colonna. Per gli ampliconi dei geni MLH1, MSH2 e MSH6 è stato utilizzato un flusso di 0,9 µl/min con un tempo di eluizione del frammento di 7 min. Le condizioni di corsa di ciascun amplicone, temperatura di quasi denaturazione e gradiente dei buffers A e B, sono determinate mediante l'utilizzo del software Wavemaker 3.4.4 (Transgenomic, Crewe, UK) sulla base della sequenza del DNA da analizzare. Per gli ampliconi dei geni MLH1 e MSH2 le condizioni sono riportate da HelKe-Holinski (57), per MSH6 sono state messe a punto in questo studio e riportate in tabella 1. Il campione attraversando la colonna è separato alla sua temperatura di quasi denaturazione; il rivelatore agli UV registra il passaggio delle molecole di DNA, riportando i risultati delle migrazioni in un cromatogramma. Nel caso di un DNA senza mutazione il cromatogramma riporta un solo picco ulteriori picchi segnalano la presenza di una mutazione (nella separazione ideale si osservano quattro picchi, due che corrispondono agli eteroduplex e due agli omoduplex). I primi picchi, in ordine di tempo di eluizione, corrispondono agli eteroduplex, i successivi contengono gli omoduplex.

Infine, la colonna e la siringa vengono lavate con una soluzione al 75% di ACN per rimuovere le varie contaminazioni ancora legate alla resina, preparandola così per la successiva analisi; la colonna viene equilibrata con tampone 50 % A e 50 % B.

ESONE	Temp. (°C)	%A	%B
2	54,3 e 57,1	44,2	55,8
3	57,9	45,5	54,5
4A	58,3	45,4	54,6
4C	58,9	47,0	53,0
4D	58,2	50,2	49,8
4E	58,1	47,3	52,7
4F-G	58,4	44,2	55,8
4H	55,6	45,6	54,4
4I	57,8	48,3	51,7
4L	57,3	47,6	52,4
4M	55,5	46,4	53,6
4N	57,9	46,5	53,5
4P	56,6	45,9	54,1
4Q	56,5	48,5	51,5
4R	58,2	47,0	53,0
4S	58,5	50,7	49,3
4T	54,3	50,6	49,4
5	56,5	43,7	56,3
6	57,4	47,4	52,6
7	57,0	51,3	48,7
8	56,2	45,7	54,3
9	54,5	43,8	56,2
10	52,9	49,2	50,8

Tab.1: Temperatura di quasi denaturazione e gradienti dei buffers A e B, determinati sulla base della sequenza di ciascun amplicone.

2.2.5 Sequenziamento diretto del DNA

Il DNA amplificato è sottoposto ad analisi di sequenza mediante l'uso del sequenziatore automatico "Genetic Analyser 3100". Gli oligonucleotidi che fungono da innesco della reazione polimerasica sono coniugati all'estremità 5' con fluorocromi, uno diverso per ciascuno nucleotide. Al termine della reazione di polimerizzazione si ottengono frammenti con una diversa fluorescenza a seconda che terminino con A, T, G o C.

2.2.6 Estrazione di DNA da tessuto incluso in paraffina

Dai soggetti analizzati che hanno sviluppato un tumore del colon-retto è stato estratto il DNA dalla mucosa normale e dal tessuto tumorale inclusi in paraffina, quando questi erano disponibili.

Per tale estrazione sono utilizzate fette di tessuto da 50 µm. Le fettine di tessuto sono state de-paraffinate manualmente e poi immerse in 1 ml di soluzione contenente: 0,1 M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 1 M NaCl, 1% SDS, 400 µg/ml di Proteinasi K. Sono state, quindi, pestate in tale soluzione e lasciate a 48°C per una notte. Il DNA è stato, quindi, estratto con una soluzione volume/volume di fenolo/cloroformio/isoamilico (25:24:1), successivamente con una soluzione volume/volume cloroformio/alcol isoamilico (24:1), ed infine il DNA è stato precipitato con due volumi di alcol etilico assoluto e 1/3 di acetato di sodio.

Dopo incubazione a -20°C, per tutta la notte, il pellet è stato lavato con etanolo al 70% e risospeso in tampone TE sterile.

2.2.7 Analisi dei microsatelliti

L'analisi di instabilità dei microsatelliti è stata eseguita su DNA estratto da tessuto normale o tumorale, incluso in paraffina.

I microsatelliti analizzati consistono in ripetizioni di mononucleotidi (BAT 25, BAT 26, NR21, NR22, NR24) o dinucleotidi (D2S123, D17S250, D5S346).

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono descritte in letteratura da Suraweera (54).

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un volume finale di 50 µl, utilizzando 0,1-0,2 µg di DNA genomico. Il programma di amplificazione per le ripetizioni mononucleotidiche ha previsto una denaturazione a 95°C per 5', 40 cicli a 95°C per 40'', 55°C per 45'' e 72°C per 30'', e l'allungamento finale di 72° per 5'. Per le ripetizioni dinucleotidiche il programma è il seguente:

1 ciclo	95°C per 3'		
5 cicli	95°C per 40''	+ 40 cicli	95°C per 40''
	64°C per 20''		58°C per 20''
	72°C per 30''		72°C per 30''
1 ciclo	72°C per 5'		

I frammenti amplificati sono stati, successivamente, analizzati mediante elettroforesi su gel di acrilammide. 10 µl di ciascuna reazione di amplificazione sono stati miscelati con 5 µl di tampone denaturante (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilencianolo, 30% glicerolo e formammide), denaturati a 95°C per 5' e sottoposti a migrazione elettroforetica in un gel di poliacrilammide all'8-10% (acrilammide/bis acrilammide 29:1), 7M urea, in tampone di corsa TBE 1X (TBE = Tris 0,44 M, Acido Borico 0,44 M, EDTA 10 mM) per circa 90' a 40mA.

Al termine della migrazione i frammenti sono stati visualizzati con il metodo del "Silver Staining".

2.2.8 Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

L'MLPA è essenzialmente un metodo per rendere i campioni di DNA adatti ad una reazione di PCR multiplex, in cui fino a 45 specifiche sequenze possono essere amplificate simultaneamente con l'utilizzo di una sola coppia di primers. Questa tecnica si basa principalmente sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze geniche, formate ognuna da due oligonucleotidi che si ibridano a regioni adiacenti della stessa sequenza target e che vengono successivamente uniti mediante "ligazione" enzimatica. Tutte le sonde presentano le stesse sequenze terminali 5' e 3', che ne permette la

simultanea amplificazione con un'unica coppia di primers. Inoltre, l'oligonucleotide che ibrida alla regione al 3' della sequenza target è stato realizzato in modo da avere differente lunghezza per ogni specifico target, permettendo la formazione di una miscela di prodotti di amplificazione di lunghezza variabile, analizzabili mediante elettroforesi capillare. La peculiarità dell'MLPA, che consiste nel fatto che non i campioni genomici bensì le sonde aggiunte a tali campioni sono amplificate e quantizzate (Fig. 8). Il kit P003 MLPA (MRC-Holland) (58), specifico per l'HNPCC, è qualitativamente atto ad analizzare tutti gli esoni dei geni hMLH1 ed hMSH2, e quantitativamente adatto ad effettuare fino a 100 reazioni di multiplex-PCR. La miscela utilizzata per l'ibridazione contiene in totale 42 differenti sonde, suddivise in:

16 sonde per i 16 esoni di hMSH2;

19 sonde per i 19 esoni di hMLH1;

7 sonde controllo specifici per sequenze del DNA genomico esterne ai geni MSH2 e MLH1, utili per valutare per ogni reazione l'affidabilità dei reagenti e della tecnica, a prescindere dalla qualità e quantità di DNA da analizzare.

La reazione di MLPA è stata effettuata utilizzando il seguente protocollo:

- ❖ denaturazione di 20-500 ng di DNA mediante riscaldamento nel termociclatore a 98°C per 5';
- ❖ aggiunta delle sonde e del buffer per l'ibridazione e successiva incubazione nel termociclatore a 60°C per 16h (O.N.);
- ❖ aggiunta della ligasi-65 e del buffer per la ligazione delle sonde a 54°C per 15';
- ❖ inattivazione della ligasi mediante riscaldamento a 98°C;
- ❖ aggiunta delle sonde, dNTPs e polimerasi, per iniziare la reazione di amplificazione delle sonde legate;
- ❖ analisi e quantizzazione dei prodotti di amplificazione mediante elettroforesi capillare.

Aliquote di DNA, ad una concentrazione di 50-100 ng, sono state diluite con acqua sterile in un volume finale di 5 µl e denurate ad una temperatura di 98°C per 5 minuti. Dopo aggiunta di 1,5 µl di soluzione salina, contenente 1,5 M KCl, 300 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, e di 1,5 µl di Probe-mix, contenente 1-4 fmol di ciascun oligonucleotide (probe), i campioni sono stati

- DNA genomico denaturato è ibridizzato con una miscela di 40 probe.
- Ciascun probe MLPA consiste di due oligonucleotidi.

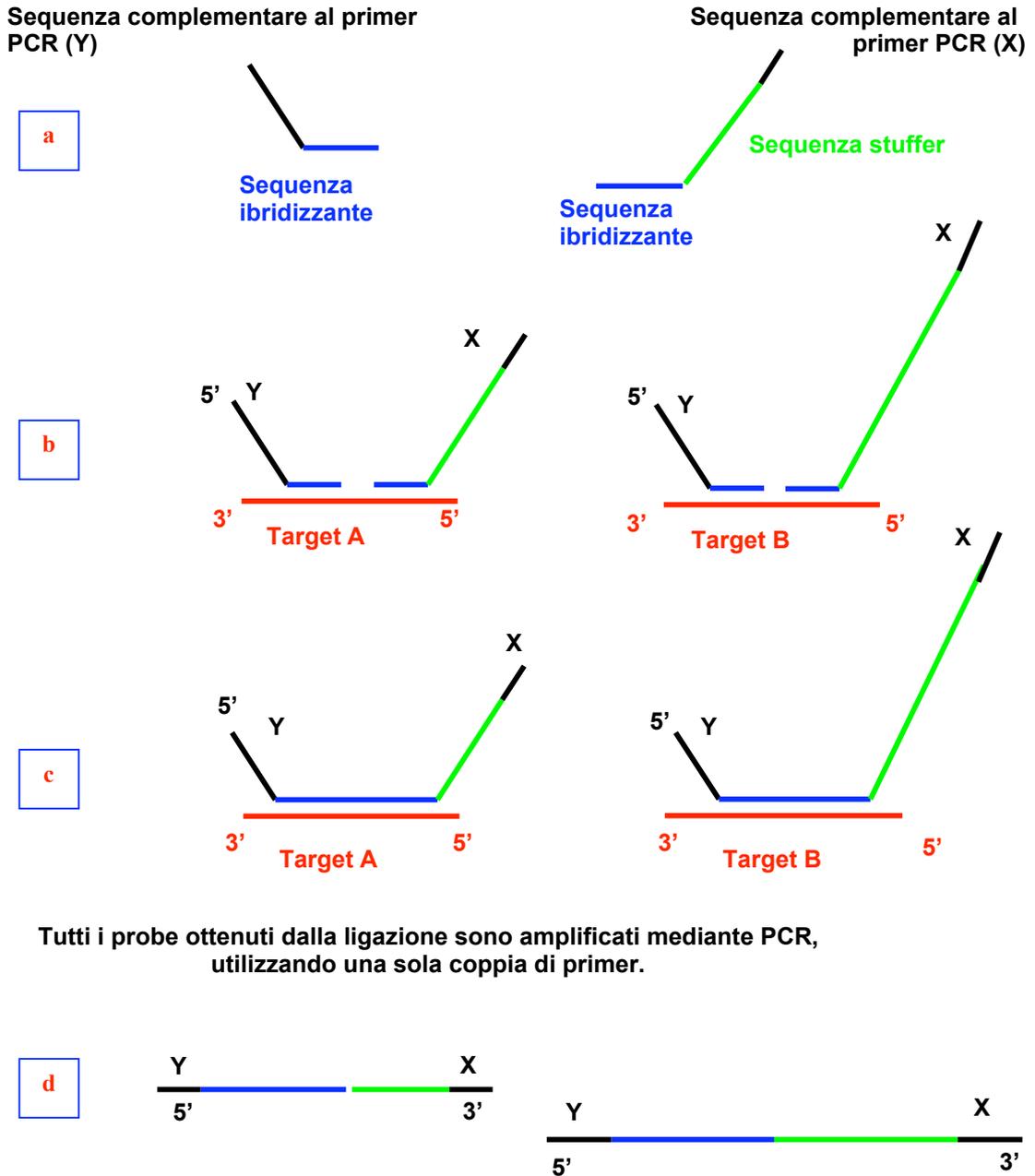


Fig. 8: In figura è mostrato lo schema del funzionamento dell'MLPA; a) ciascun lungo semi-probe ha una differente sequenza stuffer; b) le due regioni di ciascun probe ibridizzano a zone adiacenti della sequenza target; c) le due regioni ibridizzate di ciascun semiprobe sono unite mediante una ligasi termostabile; d) i prodotti di amplificazione hanno una lunghezza compresa in un range di 130-480 bp. I prodotti di amplificazione sono separati mediante elettroforesi; le quantità relative dei probe amplificati riflettono il numero di copie relativo delle sequenze target.

denaturati per 1 minuto a 95°C per la completa denaturazione e poi incubati per 16 h a 60°C per la fase di ibridazione delle sonde alle specifiche sequenze esoniche dei geni MLH1 e MSH2. La reazione di “ligazione” degli oligonucleotidi ibridanti la sequenza target è stata effettuata diluendo i campioni in un volume finale di 40 µl con una miscela di reazione (2,6 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,013% di detergenti non-ionici, 0,2 mM di NAD) contenente 1 U di enzima Ligasi-65 e incubando a 54°C per 15 minuti. L’inattivazione termica dell’enzima Ligasi avviene mediante riscaldamento a 98°C per 5 minuti. 10 µl di tale reazione di “legazione” sono diluiti con 30 µl di una miscela di reazione costituita da 4µl PCR-Buffer (fornito dalla ditta produttrice) e 26µl di acqua sterile, per effettuare la reazione di amplificazione. Mentre tali campioni raggiungono nel termociclatore la temperatura di 60°C, sono addizionati 10 µl di una soluzione contenente 10 pmoli dei primers, 2.5 nmol di dNTPs e 2.5 U della polimerasi fornita dalla MRC-Holland.

L’unica coppia di primers utilizzata per questa miscela è costituita da un Forward-primer marcato con fluorescente FAM (*) e da un Reverse-primer non marcato, le cui sequenze (5’-3’) sono rispettivamente:

*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA

GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA.

La PCR è stata effettuata con il seguente programma di amplificazione: mentre i campioni si trovano a 95°C si effettua l’hot start, quindi segue

33 cicli 30" a 95°C (denaturazione)

30" a 60°C (appaiamento)

60" a 72°C (allungamento)

1 ciclo 20' di incubazione a 72°C (allungamento finale)

I prodotti di amplificazione sono stati separati su capillare elettroforetico del tipo ABI PRISM 310. Per l’elettroforesi capillare è stata preparata una miscela contenente 0,75 µl di reazione PCR, 0,75 µl di acqua, 0,5 µl di standard interno (ROX-500 Genescan) e 12 µl di formammide deionizzata (ABI), incubata a 94°C per 3 minuti e poi iniettata nel capillare per 5s a 15 kV e fatta migrare alla stessa velocità per 30 minuti a 60°C. L’analisi dei risultati è stata effettuata utilizzando il software Genescan e i fogli di lavoro Excel.

3. RISULTATI

3.1 Ricerca diretta di mutazioni nei geni MLH1 e MSH2

La ricerca diretta delle mutazioni è stata effettuata sui prodotti di amplificazione della regione codificante dei geni MLH1 e MSH2 mediante il “Single Strand Conformation Polymorphism” (SSCP) e successivamente mediante la “Denaturing High Performance Liquid” (DHPLC), mentre la caratterizzazione del difetto molecolare è stata determinata mediante sequenziamento diretto, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Sono stati analizzati campioni di DNA di 77 soggetti appartenenti a 54 famiglie con diagnosi clinica di HNPCC. Le 54 famiglie sono state selezionate sulla base delle linee guida di Bethesda; in particolare, 29 di queste rientravano nei Criteri Diagnostici di Amsterdam, presentando un’età media d’insorgenza del cancro intorno ai 40 anni, mentre le altre 25 famiglie, definite “non Amsterdam”, sono state classificate sulla base dell’instabilità dei microsatelliti, ottenuta mediante l’analisi dei cinque microsatelliti che costituiscono il cosiddetto “pannello di Bethesda”. Le 25 famiglie “non Amsterdam” sono state così suddivise:

17 famiglie con alta e/o bassa instabilità dei microsatelliti, ricorrenza del tumore in più generazioni affette e presenza di tumori tipici dell’HNPCC, ma con un’età media di insorgenza del cancro molto più avanzata, intorno ai 60 anni;

2 famiglie in cui erano presenti aggregazioni neoplastiche con tumori tipici e non dello spettro tumorale dell’HNPCC, ma sempre con alta instabilità;

6 soggetti, senza una significativa storia familiare, con cancro del colon diagnosticato in media a 32 anni con alta instabilità dei microsatelliti.

L’utilizzo combinato delle tecniche prima descritte ha reso possibile l’identificazione di 11 diverse mutazioni (Fig. 9 e 10) in 16 delle 54 famiglie selezionate (30%). Le mutazioni identificate risultano così distribuite: 8 nel gene MLH1 (73%) e 3 nel gene MSH2 (27%). Di queste 3 sono nuove mutazioni non ancora descritte in letteratura.

Le mutazioni identificate, il fenotipo prodotto e la storia familiare dei soggetti analizzati sono riportate in tabella 2.

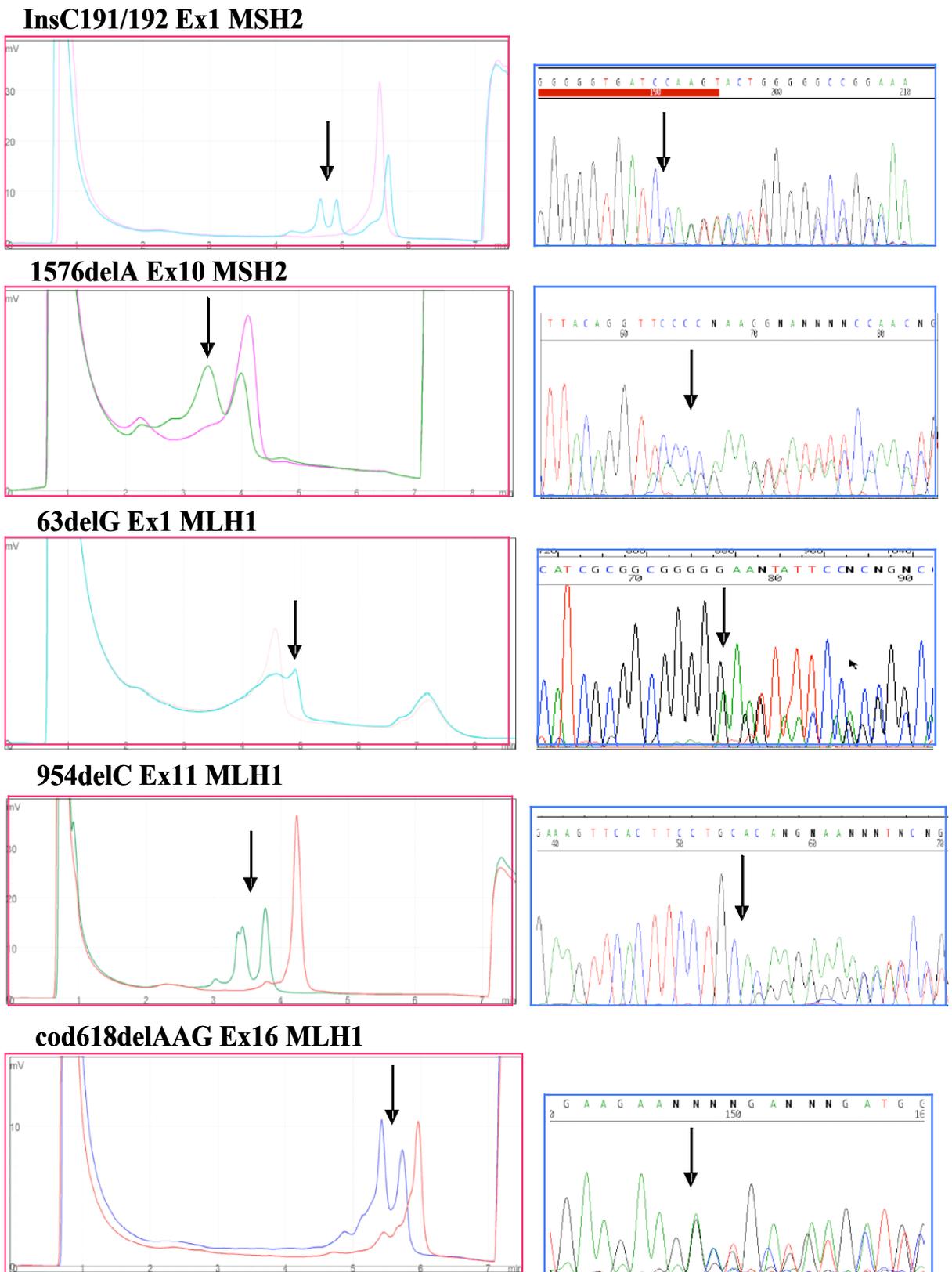


Fig.9: Risultati ottenuti con le metodiche DHPLC e sequenziamento, per le mutazioni troncanti identificate nei geni MLH1 e MSH2, in questo studio.

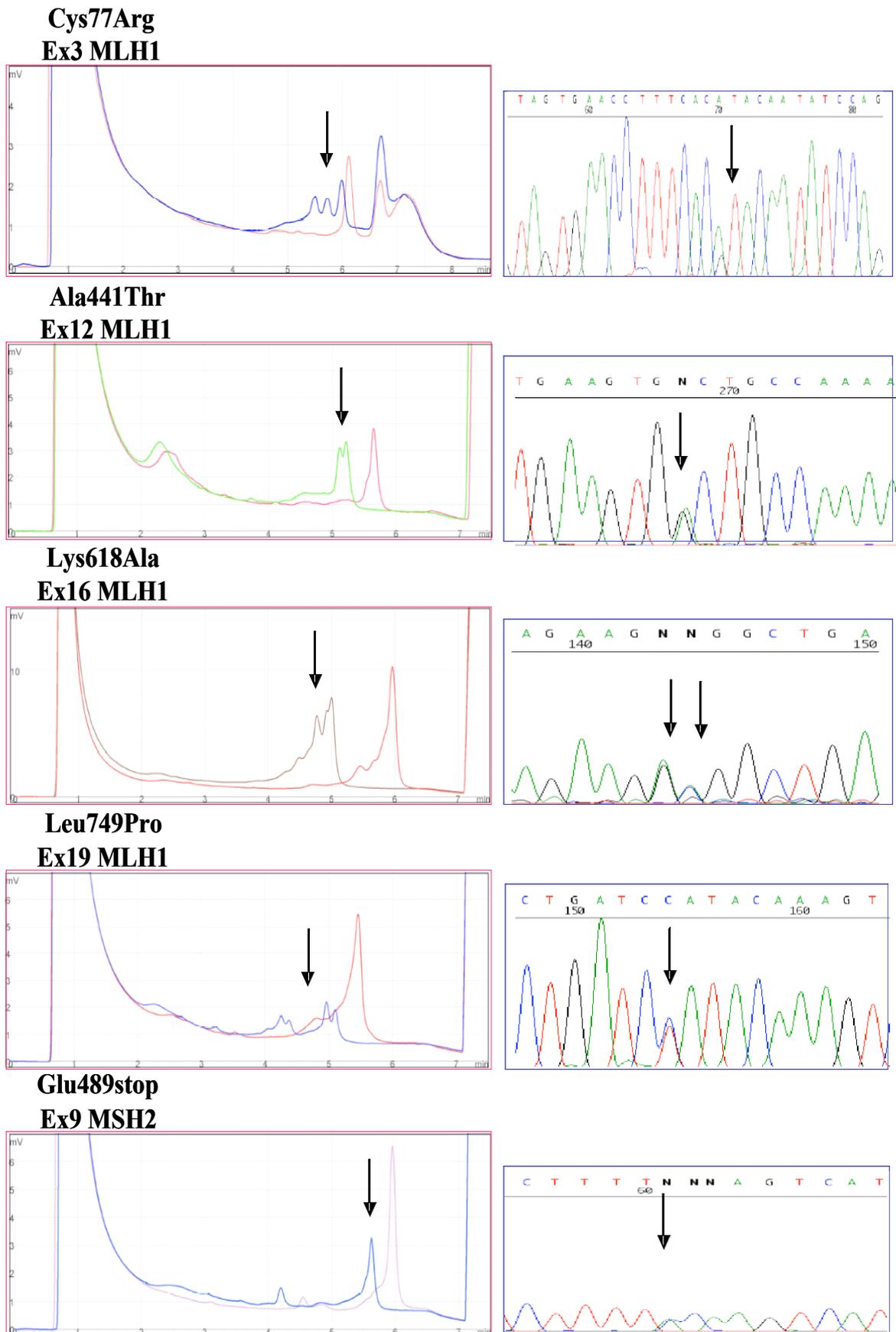


Fig.10: Mutazioni missenso identificate nei geni MLH1 e MSH2, in questo studio, mediante analisi di DHPLC e sequenziamento.

FAM.	MUTAZ. CONS. MOL.	PAZ.	STORIA CLINICA -età d'insorgenza	STORIA FAMILIARE -età d'insorgenza-
1 7 13 46	954delC ex11 MLH1 Stop al cod366	956 9909 003 032	Kcolon+utero -40- kcolon -42- Kcolon -39- Kcolon -32-	La storia familiare è riportata negli aberi genealogici in Fig.11.
2	TCA→CCA Ex7MLH1 Cod193 Ser→Pro	9510	Kcolon -38-	Madre: Kcolon+ut -53-, mut+ Sorella:Kcolon - 34-, mut+ Sorella : Kcolon-42-, mut+ Fratello: Kcolon -40- mut+
3 49	TGT→CGT Ex3MLH1 Cod77 Cys→Arg	963 0319	Kcolon -36- Kcolon -39-	Fam3: Padre Kcolon -70; Sorella Kcolon -50 mut+; Fratello Kcolon -39 mut+; Sorella Kcolon-51 mut+ Fam49: Nonno Mat. Kcolon-45; Madre Kcolon-37; Zio Mat. Kcolon-46; Fratello Kcolon -32.
37	AAG→GCG Ex16MLH1 Cod618 Lys→Ala	0210	Kcolon + utero -42-	Madre: Kcolon+ut -55- Fratello: Kcolon -47- mut+ Cugina materna: Kcolon -45-
28	GCT→ACT Ex12MLH1 Cod441 Ala→Thr	0202	Cancro del colon destro -43-	Padre: Cancro al colon -57- Sorella : cancro colon+utero -50- mut+ Fratello: cancro al colon e allo stomaco -40
32	*CTA→CCA Ex19MLH1 Cod749 Leu →Pro	011	Cancro al colon destro -35- Cancro al colon discendente e trasverso -64-	Madre: buona salute 92 anni Padre : deceduto a 79 anni trauma cranico Zia materna: cancro stomaco -47- Cugino materno: cancro al colon -40- mut+ Cugina materna: cancro al colon - 45- mut+
34 52	*InsC191/92 Ex1 MSH2 Stop cod81/82	0212 0421	Kcolon destro -31- K-retto -48- Kcolon -39-	La storia familiare è riportata negli aberi genealogici in Fig.11.
10	*GAA →TAA nt 1467 Ex9MSH2 Stop cod 489	9714	Adenocarcinoma al colon ascendente e al sigma -40-	Madre: cancro al colon -48- Padre: cancro al colon -51- Zia paterna: cancro al colon -47- Zia paterna: cancro al colon -30- Zio paterno: cancro al colon -50- Zio paterno: cancro al colon -51- 1 Sorella: cancro all'endometrio -46- 2 Sorella: cancro al colon -44-
27	63delG Ex1 MLH1 Stop cod 380	005	Kcolon-40-	Padre: Kstomaco-43- Zio paterno: Kcolon 50- Fratello: kcolon -60- Cugino paterno: Kstomaco -29-
48	1576delA Ex10 MSH2 Stop cod 542	0321	Kcolon destro -38- Kutero -42-	Madre: cancro alla vescica-65- 1 Fratello: cancro del colon-49- 2 Fratello: cancro al colon e uretere -40- -70 3 Fratello: cancro del colon -38- Nipote: cancro del colon -28-
16	Del AAG Ex16 MLH1 Del cod618 delLYS	9835	Cancro del colon sinistro -36-	Soggetto senza storia familiare Non Amsterdam

Tab.2: Mutazioni identificate nei geni MLH1 e MSH2: fenotipo prodotto e storia familiare dei soggetti analizzati; * = mutazione identificata in questo studio.

Dieci delle mutazioni identificate sono causa della malattia in 15 delle 29 famiglie Amsterdam (52%), mentre solo 1 mutazione è risultata patogenetica in un soggetto non Amsterdam (4%).

Le mutazioni identificate nel gene MSH2 sono tutte troncanti (100%), mentre quelle in MLH1 sono mutazioni missenso (63%), troncanti (25%), e una piccola delezione (12%). Per tutte le mutazioni missenso individuate e riportate in tabella 2, è stata condotta l'indagine molecolare su 100 cromosomi normali, per escludere l'ipotesi che fossero polimorfismi presenti nella popolazione normale. Inoltre, per poter evidenziare la cosegregazione della mutazione con la malattia, sono stati analizzati tutti i soggetti affetti nelle famiglie in cui il difetto molecolare identificato era una mutazione missenso. Le cinque mutazioni missenso identificate in questo studio sono state individuate in tutti i soggetti affetti analizzati. La mutazione, Ser193Pro, identificata nella famiglia 2 mediante diretto sequenziamento, è stata individuata in quattro soggetti affetti ed è risultata assente in due soggetti sani. La mutazione, Cys77Arg, nella famiglia 3, è stata identificata in tre soggetti affetti mentre non risultava presente in quello sano. Nella famiglia 37 è stato analizzato solo un soggetto affetto, risultato portatore della mutazione Lys618Ala. Nella famiglia 12 sono stati analizzati un soggetto affetto, in cui è stata identificata la mutazione Ala441Thr, e un soggetto sano che non presentava la mutazione. Nella famiglia 32 sono stati analizzati solo due soggetti affetti, nei quali è stata identificata la mutazione Leu749Pro.

In questo studio sono state identificate tre nuove mutazioni descritte in tabella 1 e contrassegnate dall'asterisco. La mutazione, denominata Glu489Stop, nell'esone 9 del gene MSH2, è una mutazione missenso che determina una tripletta di stop prematura al codone 489, con conseguente formazione di un protto proteico tronco. Tale mutazione è stata identificata mediante SSCP e caratterizzata mediante sequenziamento. La mutazione denominata 191/192 InsC nell'esone 1 del gene MSH2, che provoca uno stop precoce al codone 64/65, e la mutazione missenso, denominata Leu749Pro, che consiste in una sostituzione CTA→CCA al nucleotide (nt) 2247, nell'esone 19 del gene MLH1, non sono state rivelate mediante SSCP, in quanto non erano visibili i conformeri varianti. Entrambe le mutazioni sono state identificate mediante la DHPLC e il sequenziamento diretto (Fig.11).

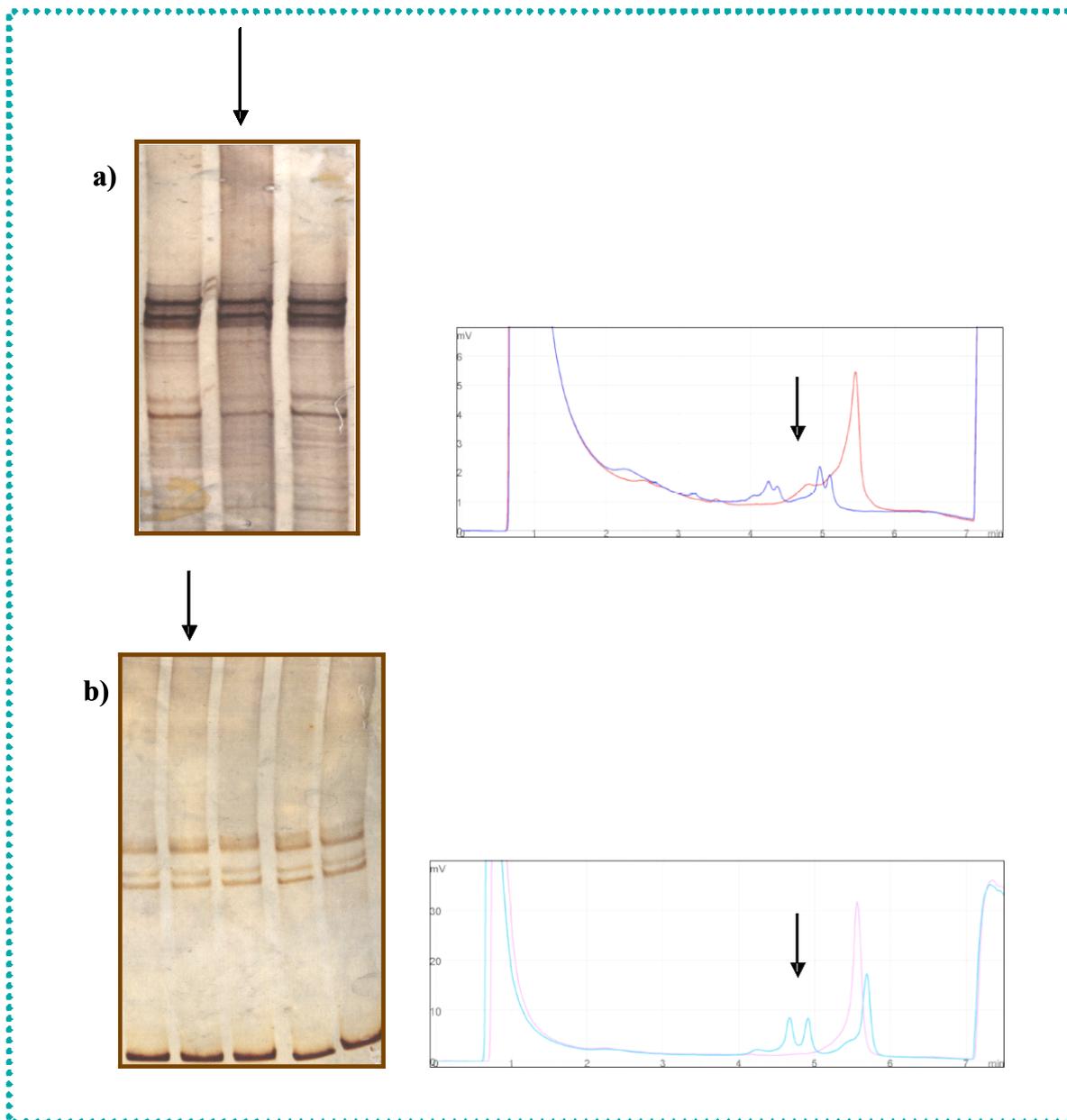


Fig. 11: a) Mutazione Leu749Pro nell'esone 19 del gene MLH1, confronto fra SSCP e DHPLC; b) mutazione 191/192 insC nell'esone 1 del gene MSH2, confronto fra SSCP e DHPLC. La freccia indica il paziente analizzato.

3.1.2 Correlazioni genotipo fenotipo

Non sono state notate significative differenze fra l'incidenza di un fenotipo Lynch I o Lynch II a seconda della mutazione nei geni MLH1 o MSH2. Delle undici famiglie con mutazioni in MLH1, sette sono Lynch I e quattro sono Lynch II. Delle quattro famiglie con mutazioni in MSH2, due sono Lynch I e due sono Lynch II. Inoltre, è stato osservato un diverso fenotipo per la mutazione denominata 954delC, che cade nell'esone 11 del gene MLH1, identificata in quattro famiglie (fam. 1-7-13-46) giunte alla nostra osservazione in tempi differenti e provenienti da diversi luoghi del sud Italia. Dall'anamnesi della storia familiare è stato osservato che tale mutazione nella famiglia 1 ha determinato una Lynch II con tumori in altre sedi extra-coliche, mentre le famiglie 7-13-46 sono state classificate come Lynch I. Nella famiglia 46, inoltre, si nota in tutte le generazioni un'età d'insorgenza molto precoce (Fig.12). La mutazione, denominata 191/192 InsC, nell'esone 1 del gene MSH2, è stata identificata in due famiglie (34 e 52), che presentavano un diverso spettro tumorale: in particolare, nella famiglia 34 erano presenti tumori extra-colici (Lynch II), mentre nella famiglia 52 erano presenti solo carcinomi del colon (Lynch I) (Fig.12).

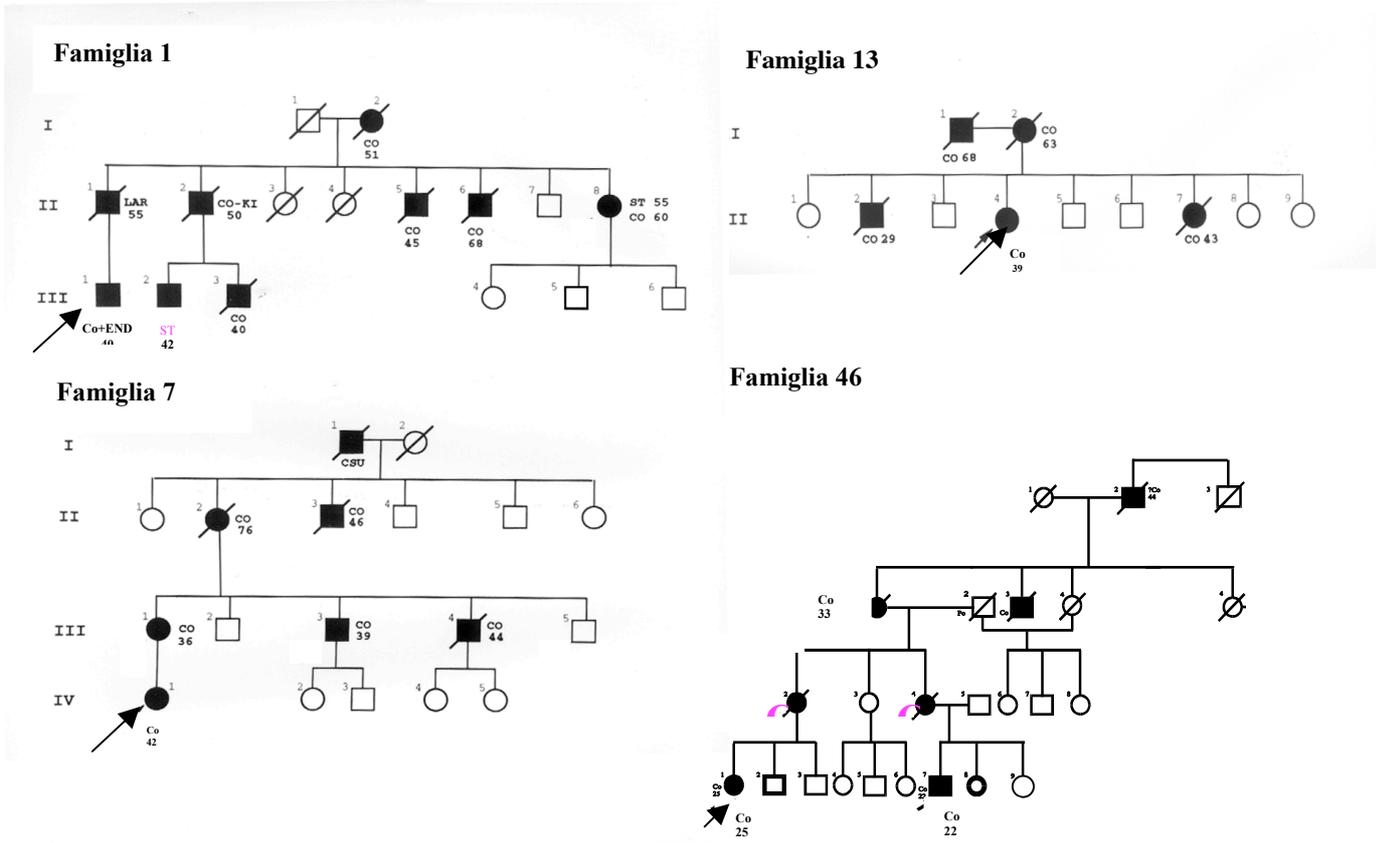
Non sono state notate differenze significative per quanto riguarda l'età d'insorgenza del tumore, che appare in media intorno ai 50 anni sia nei pazienti con mutazioni in MLH1 sia con mutazioni in MSH2.

3.2 Analisi del gene MSH6

L'analisi dei geni MLH1 e MSH2 ha consentito di identificare il difetto molecolare, causa della malattia, nel 30% delle famiglie analizzate. Nel restante 70% l'indagine non ha fornito risultati informativi. In tali pazienti è stata condotta la ricerca di mutazione del gene MSH6, che dati della letteratura riportano essere responsabile del 10% delle famiglie HNPCC.

La ricerca di mutazioni nel gene MSH6 è stata effettuata mediante la tecnica del DHPLC, che recentemente ha completamente sostituito quella dell'SSCP, in quanto è risultata più sensibile ed efficace. La caratterizzazione molecolare

954delC Ex 11 MLH1



191/192insC Ex 1 MSH2

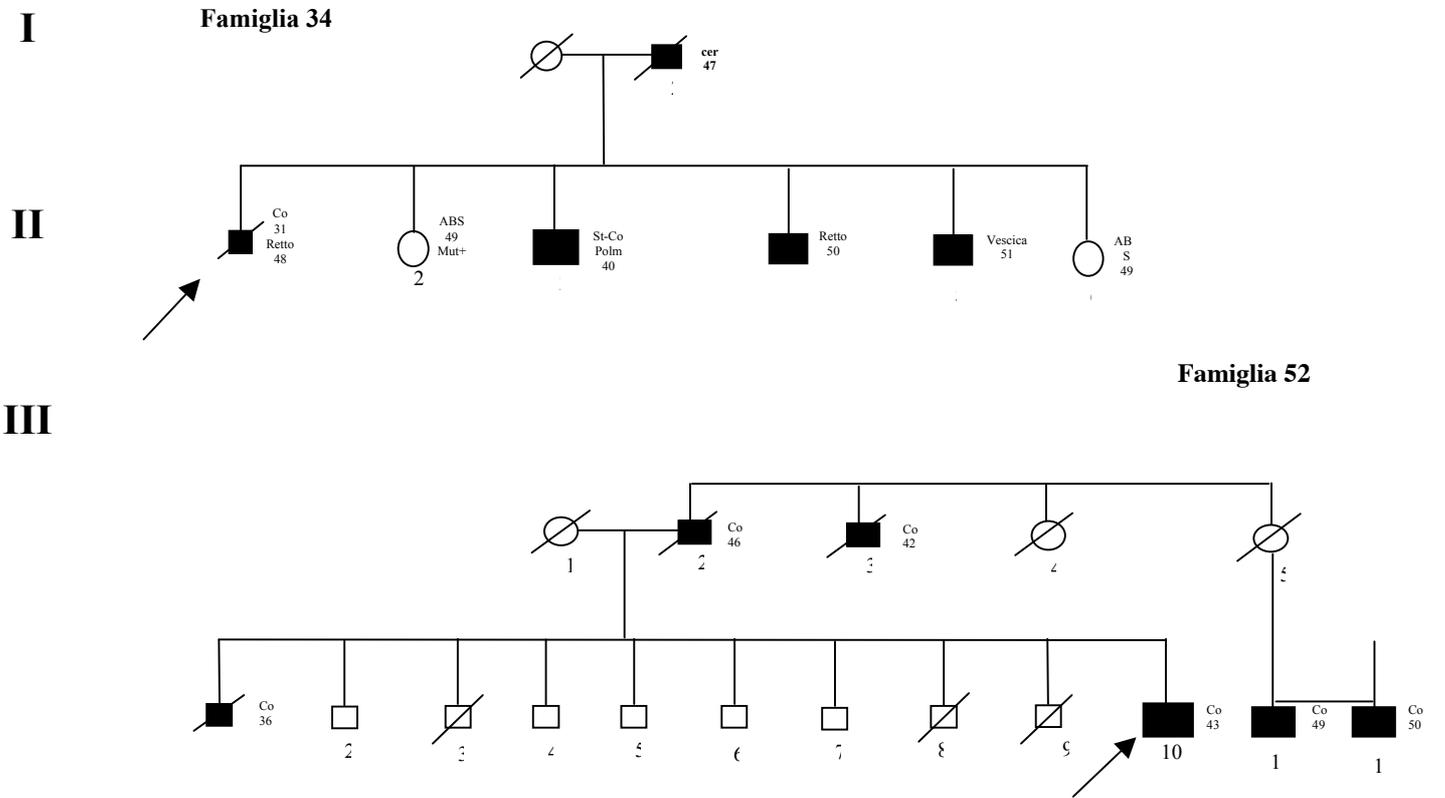


Fig. 12: Alberi genealogici delle famiglie 1-7-13-46 e delle famiglie 34-52.

della mutazione è stata effettuata mediante sequenziamento diretto (Fig13). Sono state identificate nel gene MSH6 7 mutazioni, delle quali 5 sono nuove mutazioni, non descritte in letteratura. Le mutazioni, il fenotipo prodotto e la storia familiare dei soggetti analizzati sono riportate in tabella 3.

FAM	MUTAZ	PAZ	STORIA CLINICA -ETÀ D'INSORGENZA	STORIA FAMILIARE -ETÀ D'INSORGENZA
45	AGC→ATC al nt 431 Ex2 MSH6 Sost. Ser → Ile	0501	Carcinoma del colon con metastasi epatiche -36-	Soggetto senza significativa storia familiare. Presenza nella famiglia di tumori al seno.
5 43	GTT→GCT al nt 2633 Ex4 MSH6 Sost. Val → Ala	978 0414	Paz 978 Affetto da Kcolon -42- Paz 0414 affetto da Kcolon -39-	Famiglia 5 chiara corrispondenza con i Criteri di Amsterdam I Famiglia 43 soddisfatti i criteri di Amsterdam
37	*ATT→GTT al nt 2941 EX4 MSH6 Sost. Ile →Val	0310 0311	Paz 0310 Affetto da Kcolon -42-	Madre: cancro al colon -43- Fratello: caoncro colon -57- Sorella: polipi adenomatosi -40-
23	*Ins. di c al nt 3261-62 Ex5 MSH6 Stop al cod 3273	0103	Soggetto con Kcolon -60-	Madre: cancro al colon -47- Padre: infarto del miocardio -62- Fratello: caoncro alla flessura epatica + 2 adenomi al cieco e al trasverso -60- Sorella: adenomi al colon destro e al retto -62-
24	*Delez. di TT al nt 3295 Ex5 MSH6 Stop al cod 3321	0105 0415	0105 Kcolon -43	Madre: cancro del colon -58- Padre: ictus -70- Zio paterno: cancro al colon -69- 0415 Cugino paterno: cancro al colon destro -39- mut-
7	*GAT→GAA al nt 3639 Ex7 MSH6 Sost. Asp → Glu	0013	Soggetto con kcolon e utero -39-	Madre: cancro al cieco -58- Padre: cancro al colon -70- Zia materna: cancro alla mammella -50- Zia paterna: cancro al fegato -62- Zia paterna: cancro all'utero -77-
50	*Ins. di GTGT al nt 544+33-53 del 3' Intr2 MSH6	049	Soggetto con adenocarcinoma del colon destro -70-	Madre: Kcolon -75- Sorella: Kcolon sx -54- mut+ Sorella: pol. adenomatosi -67- mut+ Sorella: soggetto sano -79- mut-

Tab.3: Mutazioni identificate nel gene MSH6: conseguenze molecolari e storia familiare dei soggetti analizzati; * = mutazione identificata in questo studio.

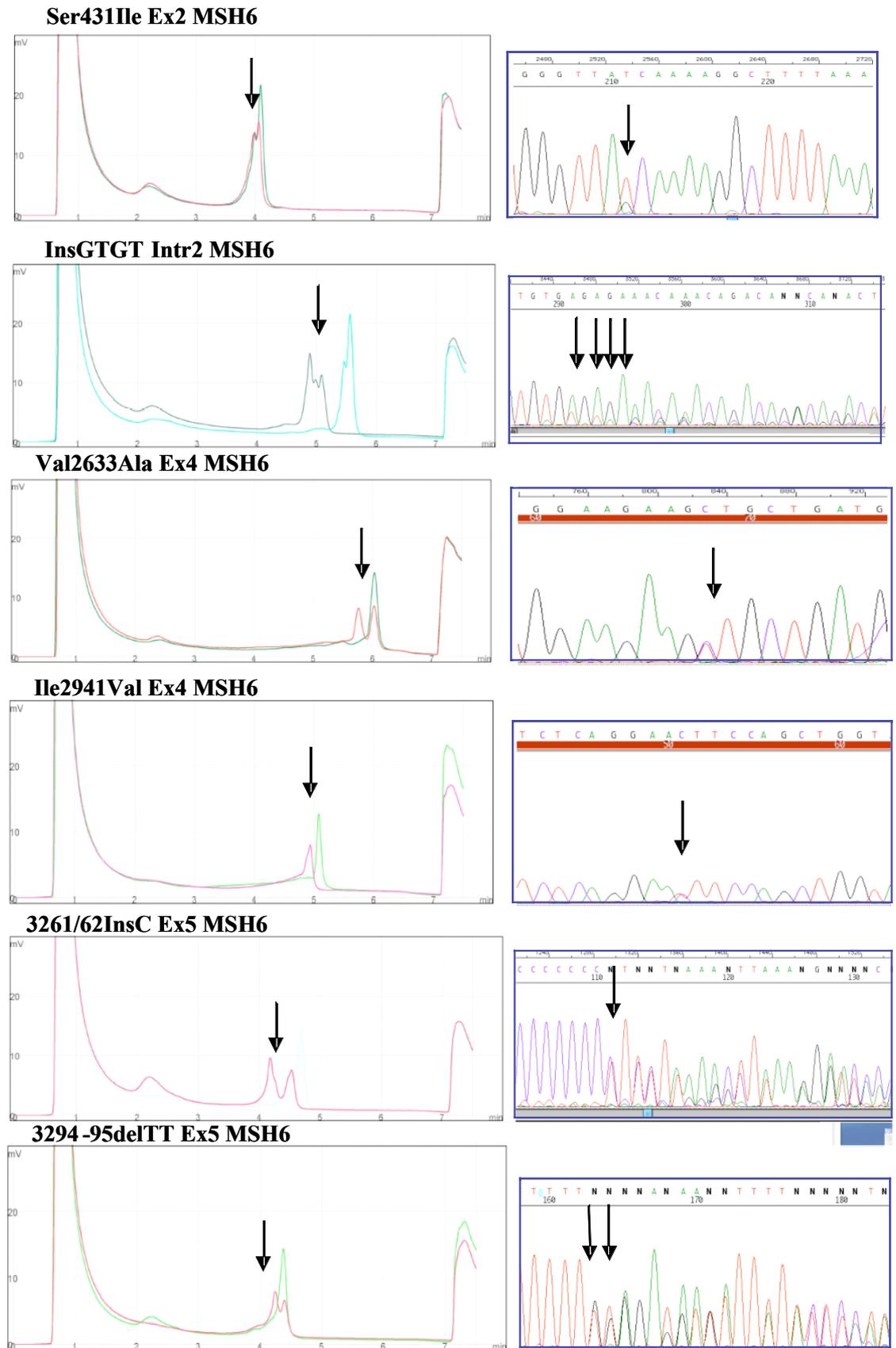


Fig.13: Mutazioni identificate nel gene MSH6, mediante DHPLC e sequenziamento.

La mutazione missenso nell'esone 2, AGC_ATC al nucleotide (nt) 431, che determina la sostituzione di una Ser_Ile, è stata identificata in soggetto di 36 anni con cancro del colon e senza familiarità, ma con alta instabilità dei microsatelliti. L'analisi condotta su 90 soggetti sani ha mostrato la presenza della mutazione con una frequenza di 1/180 alleli analizzati; questa mutazione è stata già descritta in letteratura e definita patogenetica.

La mutazione nell'esone 4, GTT_GCT al nt 2633, che determina il cambio amminoacidico Val_Alà, è stata identificata in due famiglie che soddisfano i criteri di Amsterdam. Anche questa mutazione è stata già descritta in letteratura come patogenetica.

La nuova mutazione ATT_GTT al nt 3028, che determina il cambio amminoacidico Ile_Val, è stata identificata in due soggetti affetti della famiglia 37, che rispetta i Criteri di Amsterdam, mentre è assente nei soggetti sani. Tale mutazione, dunque, può essere definita patogenetica in quanto segrega con la malattia.

Nell'esone 5 sono state identificate due mutazioni troncanti, un'inserzione di una base "citosina" al nt 3261/62, che provoca lo scivolamento della cornice di lettura e la formazione di un codone di stop precoce al nt 3273, e una delezione di due basi, delTT ai nt 3294-95, che crea un codone di stop prematuro al nt 3321. La prima di queste mutazioni è stata identificata in un soggetto appartenente alla famiglia 23, in cui sono presenti tumori coloretali diagnosticati a circa 60 anni, mentre la seconda è stata trovata in un soggetto appartenente alla famiglia 24, che rispetta i Criteri di Amsterdam. Tuttavia, tale mutazione non è stata identificata nel soggetto 0415 appartenente alla stessa famiglia, che pure ha presentato un fenotipo HNPCC. Infine, la mutazione GAT_GAA al nt 3639, che determina il cambio amminoacidico Asp_Glu, è stata identificata in un soggetto della famiglia 20, che soddisfa i Criteri di Amsterdam, e non è stata riscontrata nel DNA di 50 soggetti sani, presentando una frequenza allelica di 0/100.

Inoltre, in questo studio sono state identificate 5 sostituzioni nucleotidiche introniche (Tab.4) e un'inserzione di 4 basi nell'introne 2 del gene MSH6. Questo difetto molecolare è stato identificato nel paziente 0409 appartenente alla famiglia 50, in cui compaiono polipi del colon e tumori in tarda età, in media 66 anni (Tab.3). Dall'analisi di sequenza condotta sui DNA di 3 soggetti

affetti e di 1 sano, presenti nella famiglia 50, è stato evidenziato che tale mutazione è presente solo nei soggetti affetti. L'amplificazione degli esoni 1-4 dal cDNA dei soggetti analizzati e successiva analisi di sequenziamento, non ha rivelato la presenza di splicing alternativi o aberranti.

ESONE	CODONE	NUCLEOTIDE	RIF. BIBL.
2*	-46 di 5' ex 2	A_c al nt 348-46	Questo studio
2*	+50 di 3' ex 2	T_A al nt 544+50	Questo studio
2	+52 di 3' ex 2	T_A al nt 544+52	Plaschke et al. (2000)
4T*	+43 di 3' ex 4T	T_G al nt 544+43	Questo studio
5	+14 di 3' ex 5	A_T al nt 3524+14	Kolodner et al. (1999)

Tab.4: Sostituzioni introniche individuate nel gene *MSH6*.

Nel DNA del paziente 0409 è stata, inoltre, identificata la sostituzione GGG_GAG al nt116, che determina il cambio Gly_Glu. Tale mutazione è descritta in letteratura come polimorfismo per l'elevata frequenza allelica con cui si ritrova in soggetti normali. Infine, con la ricerca di mutazione nel gene *MSH6* sono state identificate 6 mutazioni silenti (Tab.5).

ESONE	CODONE	NUCLEOTIDE	CONSEGUENZA	RIF. BIBL.
1	62	CGA_CGT al nt 186	Arg	Nicolaides et al. (1996)
1	39	GGG_GAG al nt 116	Gly →Glu	Nicolaides et al. (1996)
2	92	CCA_CCG al nt 276	Pro	Nicolaides et al. (1996)
3	180	GAT_GAC al nt 540	Asp	Kolodner et al. (1999)
4A	214	TAC_TAT al nt 642	Tyr	Wijnen et al. (1999)
4C*	330	TCA_TCT al nt 990	Ser	Questo studio
4D	388	CAC_CAT al nt 1164	His	Kolodner et al. (1999)
4F-G*	465	GCA_GCT al nt 1395	Ala	Questo studio

Tab.5: Mutazioni silenti identificate nel gene *MSH6*.

Da questo studio è emerso che: le mutazioni trovate nel gene MSH6 sono nel 29% dei casi troncanti e nel 57% dei casi missenso; delle 7 mutazioni identificate 4 sono presenti in 5 famiglie Amsterdam (17%) e 3 in soggetti appartenenti a 3 famiglie non Amsterdam (12%).

In conclusione, l'analisi molecolare effettuata sui geni MLH1, MSH2 e MSH6 ha consentito di identificare 18 mutazioni in 24 delle 54 famiglie selezionate (45%); in particolare, è stato identificato il difetto molecolare causa della malattia in 19 delle 29 famiglie Amsterdam (65%) e in 4 delle 25 famiglie non Amsterdam (16%).

3.3 Analisi di ampi riarrangiamenti genici mediante MLPA

I 30 campioni risultati negativi per la ricerca delle mutazioni puntiformi in MLH1, MSH2 e MSH6, sono stati selezionati per identificare l'eventuale presenza di ampie delezioni o duplicazioni nei geni hMLH1 ed hMSH2 mediante la metodica MLPA. Per tale analisi è stato eseguito il protocollo riportato nella sezione Materiali e Metodi e sono stati adoperati, come controlli esterni, campioni di DNA di soggetti normali.

Sono state identificate tre ampie delezioni, di cui una nel gene MLH1 e due nel gene MSH2, e una duplicazione di due esoni nel gene MSH2 in quattro dei 30 pazienti analizzati.

Nel gene MLH1 è stata riscontrata la delezione dell'esone 19, mentre nel gene MSH2 sono state identificate le delezioni degli esoni 4-5 e dell'esone 6, rispettivamente nel DNA dei soggetti 0410, 0412, 0411 che, come descritto nel paragrafo successivo, presentavano instabilità dei microsatelliti, e appartenevano a famiglie rispondenti ai Criteri di Amsterdam.

La duplicazione degli esoni 1 e 2 del gene MSH2 è stata identificata nel soggetto 0508, nel quale tutti i microsatelliti del pannello di Bethesda sono risultati instabili (Tab.6). Tale soggetto 0508, senza una significativa storia familiare, ha sviluppato un cancro del colon all'età di 25 anni.

L'analisi dei risultati è stata effettuata esportando la tabella, ottenuta con il software Genscan, contenente i valori delle aree e delle altezze dei picchi dell'elettroferogramma, nei fogli di lavoro Excel. Gli istogrammi, riportati in figura 14, rappresentano il rapporto fra l'area relativa del picco di ciascun

probe (ottenuta dividendo l'area del picco di ciascun probe per la media delle aree dei picchi di tutti i probe-controllo interni) e la media relativa delle aree dei picchi dello stesso probe in tutti i campioni controllo-esterno utilizzati. Come si osserva dall'istogramma il valore del rapporto normalizzato per gli esoni che presentano una delezione è inferiore all'intervallo di valori relativi ad una condizione di normalità in quanto si abbassa di circa il 50%, mentre nel caso della duplicazione si alza di circa un 50%.

Gli ampi riarrangiamenti genici sono stati identificati in pazienti appartenenti a famiglie Amsterdam nel 10% dei casi e in un soggetto senza familiarità nel 3% dei casi. I risultati ottenuti indicano che l'8% delle 54 famiglie selezionate, in accordo con i dati della letteratura, presenta ampi riarrangiamenti nei geni del riparo MLH1 e MSH2. Tutti gli esperimenti riportati sono stati eseguiti in triplicato.

3.4 Analisi dell'instabilità dei microsatelliti

Per eseguire tale analisi è stato utilizzato il DNA estratto da sangue periferico e DNA estratto da tessuto tumorale, incluso in paraffina. I microsatelliti analizzati consistono in ripetizioni di mononucleotidi (BAT 25, BAT 26) e dinucleotidi (D2S123, D17S250, D5S346). Inoltre, sono state analizzate anche le ripetizioni mononucleotidiche quasimonomorfiche NR21, NR22, NR24.

L'analisi del fenotipo RER è stata condotta su 35 tessuti provenienti da pazienti appartenenti alle 54 famiglie selezionate. La condizione di instabilità viene definita se almeno 2 dei 5 microsatelliti analizzati risultano instabili, mentre la condizione di bassa instabilità viene soddisfatta se almeno 1 su 5 microsatelliti risulta alterato. I risultati riportati in tabella 6 sono ottenuti dall'analisi di instabilità effettuata sul tessuto tumorale dei pazienti portatori di mutazioni nei geni MMR. Il tessuto tumorale dei soggetti con mutazioni nei geni MLH1 e MSH2 presenta indifferentemente instabilità nelle ripetizioni dinucleotidiche e mononucleotidiche, mentre nel DNA dei tessuti tumorali che presentano mutazioni in MSH6 sono apparse più instabili le ripetizioni mononucleotidiche rispetto a quelle dinucleotidiche. Le ripetizioni mononucleotidiche quasimonomorfiche hanno presentato nei pazienti portatori di mutazioni in MSH6

una maggiore instabilità rispetto a quella mostrata nei pazienti con mutazioni in MLH1 e MSH2.

PAZ	D2S123	D17S250	D5S346	BAT 25	BAT 26	NR 21	NR 22	NR 24
9510	+	+	+	+	+	+	-	-
0319	+	+	-	+	-	-	-	+
9835	+	+	+	+	+	-	-	-
0212	+	-	-	-	-	-	-	-
0421	+	-	-	+	+	-	-	-
0508	+	+	+	+	-	-	-	-
0105	+	+	+	+	+	+	-	+
0415	-	-	-	-	+	-	-	-
0103	-	-	-	+	-	+	-	+
0414	-	-	-	+	+	+	+	+
0411	+	-	-	+	-	-	-	-
0501	+	+	+	+	+	+	+	+
0412	+	+	-	+	+	-	-	-
049	-	+	-	-	-	+	-	-
002	+	-	+	-	+	-	+	-
0424	-	+	+	+	+	-	+	-
0425	+	+	+	+	-	-	-	-
9529	-	-	-	+	+	+	-	+

Tab.6: Risultati dell'analisi di instabilità dei microsatelliti eseguita sul tessuto tumorale dei soggetti portatori di mutazioni nei geni MMR; “+” = instabile; “-”= stabile; in fucsia sono rappresentati i pazienti portatori di mutazioni puntiformi nei geni MLH1 e MSH2; in verde i pazienti portatori di ampi riarrangiamenti nei geni MLH1 e MSH2; in rosso i pazienti portatori di mutazioni nel gene MSH6 e in rosa i pazienti nei quali è stato identificato una sostituzione intronica e/o una mutazione silente nel gene MSH6; l'instabilità delle ripetizioni mononucleotidiche NR21, 22 e 24 sono evidenziate con il colore giallo per i portatori di mutazioni nel gene MSH6 e con l'azzurro per tutti gli altri pazienti.

3.5 Test genetico predittivo per l'HNPCC

I risultati ottenuti in questo studio e riportati nei paragrafi precedenti, hanno reso possibile la messa a punto di una strategia ottimale di “screening” per la ricerca di mutazioni nei geni MMR in pazienti appartenenti a famiglie con diagnosi clinica di HNPCC. Di seguito viene riportato la “flow-chart” delle procedure da eseguire per effettuare la diagnosi molecolare della malattia (Fig.15). Questa strategia ha consentito di caratterizzare la mutazione patogenetica in 27 delle 54 famiglie analizzate. Nei soggetti a rischio, appartenenti a tali famiglie, è stato possibile effettuare una diagnosi molecolare presintomatica. In 8 delle 27 famiglie in cui è stata identificata la mutazione causa di malattia, è stata effettuata la ricerca di tale mutazione in 84 soggetti apparentemente sani, mediante DHPLC e sequenziamento diretto dei frammenti amplificati. Quarantasei degli 84 soggetti analizzati sono risultati portatori del difetto molecolare individuato nella famiglia, mentre 38 soggetti sono risultati negativi per la mutazione caratteristica della famiglia di appartenenza.

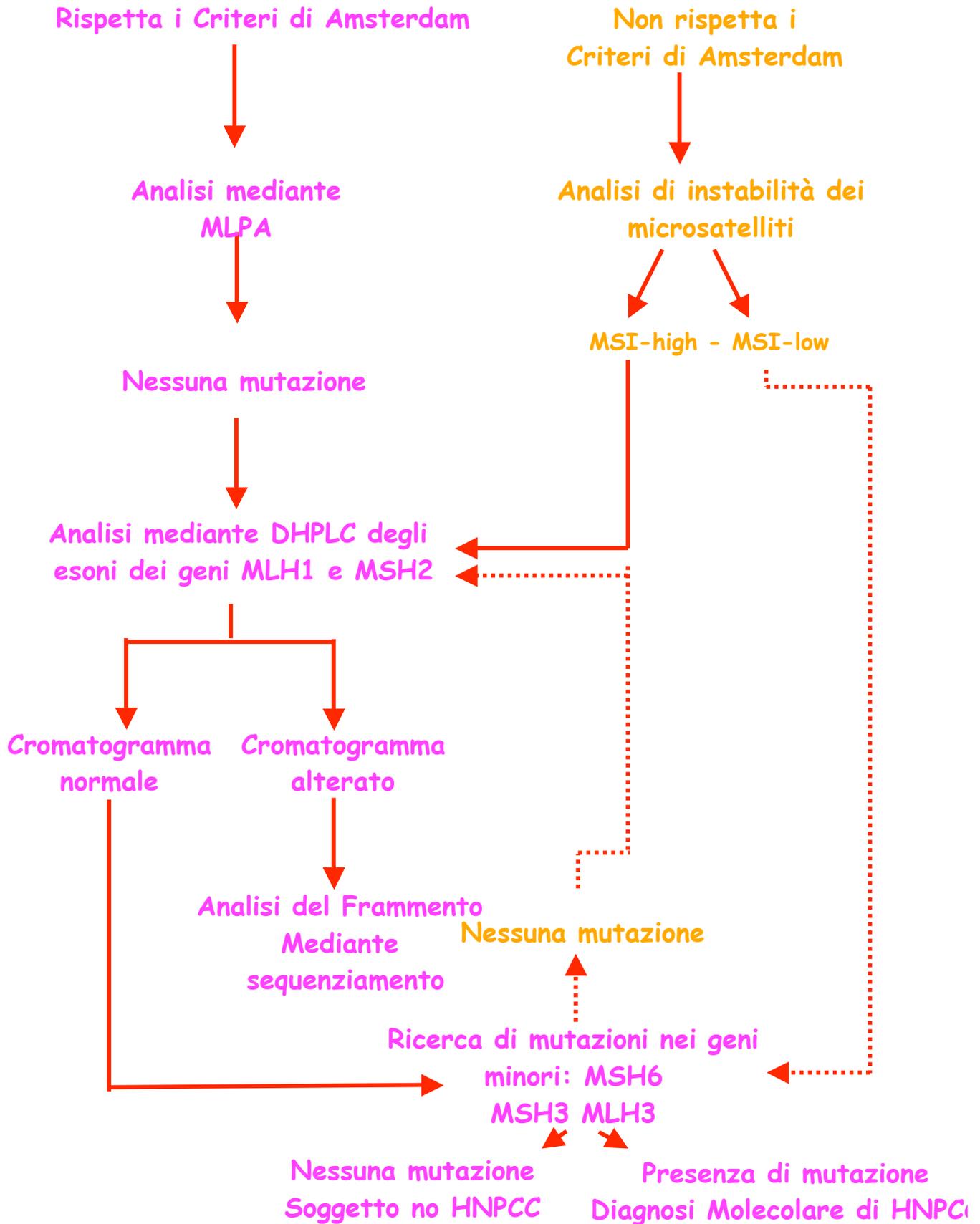


Fig.15: Flow-chart proposta per la diagnosi molecolare i HNPCC; la linea tratteggiata rappresenta il percorso alternativo per i soggetti con fenotipo MSI-L.

4. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in seguito all'analisi mutazionale condotta nei geni MMR, MLH1, MSH2 e MSH6, nonché l'analisi di instabilità dei microsatelliti e la ricerca di ampi riarrangiamenti genici in pazienti HNPCC confermano ed estendono i dati riportati in letteratura. Infatti, la maggior parte delle mutazioni finora individuate nella nostra casistica sono localizzate nei geni MLH1 e MSH2 e consistono essenzialmente in mutazioni puntiformi; un significativo numero di mutazioni è stato identificato nel gene MSH6, nel 15% delle famiglie analizzate, mentre i riarrangiamenti genici sono presenti nell'8% dei casi.

Nei geni MLH1 e MSH2 sono state identificate 11 mutazioni, di cui 8 nel gene MLH1 e 3 nel gene MSH2. In accordo con i dati della letteratura nel gene MSH2 sono più frequenti alterazioni troncanti, mentre nel gene MLH1 sono prevalentemente presenti mutazioni missenso. Mentre in seguito alle mutazioni troncati la funzione della proteina è del tutto compromessa, in quanto si generano prodotti proteici tronchi, non è possibile stabilire l'effetto delle mutazioni missenso, per le quali sarebbe opportuno studiare la funzionalità della proteina mediante saggi funzionali (59).

In questo studio, l'unico criterio seguito per definire patogenetica una mutazione missenso è stato quello di seguirne la segregazione con la malattia nell'ambito di una famiglia. Tutte le mutazioni missenso identificate in questo studio si è visto che segregavano con la malattia e non sono state riscontrate negli alleli dei soggetti sani di controllo analizzati. Inoltre alcune di queste mutazioni cadono in regioni del gene altamente conservate. In particolare la mutazione missenso Cys77Arg, nell'esone 3 del gene MLH1, che è stata definita patogenetica (60), cade in un dominio altamente conservato che sembra critico per le funzioni di riparo. La sostituzione di una cisteina con arginina (Cys77Arg) potrebbe, quindi, causare un drammatico cambiamento della struttura secondaria in tale dominio e di conseguenza la formazione di una proteina funzionalmente alterata. Anche la mutazione Leu749Pro, nell'esone 19 del gene MLH1, identificata in questo lavoro di tesi, cade in un

dominio del gene in cui è presente il sito d'interazione di MLH1 con PMS2 (61), per cui tale mutazione potrebbe interferire con la formazione del complesso MutL α .

Sino ad oggi sono state identificate circa 480 mutazioni a carico dei geni MMR che ne alterano in maniera più o meno significativa la funzione. Questa eterogeneità genotipica si riflette nella varietà fenotipica caratteristica della sindrome, ciò potrebbe indicare che altri fattori, genetici e/o ambientali, possano influenzare la penetranza del difetto molecolare. Infatti, ciò che viene messo in evidenza in questo studio l'estrema eterogeneità ritrovata nelle correlazioni genotipo-fenotipo dei pazienti analizzati. Di particolare interesse sono risultate quelle famiglie in cui una stessa mutazione è causa della sindrome. Per le famiglie 1-7-13-46 in cui la causa patogenetica è la mutazione 954delC nell'esone 11 del gene MLH1, si osserva infatti una notevole variabilità fenotipica. Dall'anamnesi della storia familiare di queste quattro famiglie si osserva che nella famiglia 1, oltre la comparsa di carcinomi coloretali, sono presenti tumori in altre sedi extra-coliche, assenti nelle altre tre famiglie. Nella famiglia 46 si nota in tutte le generazioni un'età d'insorgenza molto più precoce rispetto alle altre famiglie.

La mutazione 191/192 insC, nell'esone 1 del gene MSH2, causa di malattia nelle famiglie 34-52, determina nella famiglia 34 uno spettro di tumori tipico delle famiglie in cui sono soddisfatti i Criteri di Amsterdam II, mentre nella famiglia 52 compaiono solo carcinomi coloretali; in entrambe le famiglie l'età d'insorgenza è abbastanza precoce, in media 40 anni.

Invece, la mutazione Cys77Arg, nell'esone 3 del gene MLH1, è causa di malattia in due famiglie (Tab.2) che presentano uno spettro tumorale simile, con presenza solo di cancro coloretale ed età d'insorgenza precoce.

Queste osservazioni indicano, dunque, che non è possibile prevedere il tipo di mutazione che caratterizza la malattia soltanto in base alle caratteristiche fenotipiche presentate dai pazienti. Inoltre, dall'anamnesi della storia familiare delle famiglie in cui è stato identificato il difetto molecolare non si notano sostanziali differenze fra il fenotipo determinato da mutazioni missenso e quello dovuto a mutazioni troncanti.

Come gli altri geni MMR, MLH1 e MSH2, anche MSH6 è responsabile del fenotipo HNPCC ma le famiglie con mutazioni germinali in MSH6 presentano

caratteristiche cliniche piuttosto atipiche, quali l'incompleta penetranza, la tardiva insorgenza della malattia, in media intorno ai 60 anni, il basso grado di instabilità dei microsatelliti, con coinvolgimento preferenziale delle ripetizioni mononucleotidiche, e maggiore predisposizione per le donne a sviluppare carcinoma endometriale (62,63).

Le mutazioni in MSH6 rendono conto di circa il 10% di tutte le mutazioni germinali dei geni MMR e la maggior parte di queste sono state identificate in pazienti che non soddisfano a pieno i criteri di Amsterdam e, quindi, solo "sospettati" di appartenere a famiglie HNPCC (64).

Recentemente, sono stati riportati dati di mutazioni nel gene MSH6 in una piccola, seppur significativa, frazione di famiglie rispondenti ai criteri di Amsterdam (65,66). E' da sottolineare che finora la ricerca di mutazioni nei geni MMR è stata effettuata principalmente in pazienti che mostrano fenotipo MSI-H, per cui è spiegabile la minore frequenza di mutazioni riscontrate in MSH6 che, invece, sono caratterizzate da una più bassa penetranza (MSI-L), (67). Ciò è dovuto al fatto che il mancato riparo operato da MSH6 causa un accumulo di sostituzioni, piuttosto che mutazioni frameshift inattivanti, e ciò sembra prolungare il tempo richiesto per lo sviluppo del tumore e, quindi, la ritardata età di insorgenza del tumore. Le famiglie HNPCC che non mostrano un fenotipo MSI-H sono dunque eccellenti candidati per mutazioni germinali nel gene MSH6.

In questo studio le mutazioni identificate nel gene MSH6 sono, dunque, in una percentuale superiore rispetto a quella descritta in letteratura, circa il 15% del totale delle famiglie analizzate, perchè sono state analizzate anche le famiglie che presentavano bassa instabilità dei microsatelliti.

Studi recenti effettuati su topi hanno indagato il possibile ruolo di MSH6 (62). I topi che mancano di MSH6 erano vitali, ma le cellule recanti mutazioni in omozigosi non erano in grado di riparare appaiamenti errati di singole basi, mentre, conservano la capacità di riparare inserzioni o delezioni e, ciò grazie al ruolo compensatorio di MSH3. Tuttavia, poiché l'assenza di MSH6 non può essere completamente compensata dall'azione di MSH3, ne deriva che mutazioni in MSH6 predispongono chiaramente allo sviluppo di tumori, sebbene ciò accada, nel corso della vita, con un certo ritardo.

Recentemente, è stato dimostrato che anche mutazioni missenso in MSH6 determinano un fenotipo HNPCC. Tali studi, effettuati su cellule di lievito, hanno individuato una serie di nuove mutazioni missenso dominanti che causano un fenotipo fortemente mutatore (63). È stato visto che sia i topi eterozigoti che quelli omozigoti per queste mutazioni missenso si sviluppano normalmente; le mutazioni non interferiscono né con la normale espressione del gene né con la stabilità della proteina mutata. Tuttavia, tumori con mutazioni missenso in omozigosi sembrano non essere in grado di riparare alcun tipo di difetto a differenza delle mutazioni nulle, probabilmente perché la proteina mutata interferisce con la capacità del complesso MSH2-MSH3 di riparare inserzioni o delezioni. Ciò suggerisce che, in tumori con mutazioni in MSH6 che esibiscono un fenotipo MSI-H, la proteina mutata MSH6 è conservata e, per assicurare il fenotipo MSI-H, non è necessaria la perdita di MSH3. Il tipo di MSI, in mutanti MSH6, è funzione della presenza della proteina mutata MSH6. Nel caso in cui MSH6 non è espressa, il fenotipo MSI-H potrebbe risultare da una mutazione secondaria in MSH3. Tutto ciò sembra essere confermato dai risultati ottenuti in questo studio. L'analisi molecolare del gene MSH6 ha consentito di identificare 4 mutazioni missenso e una nonsense in cinque famiglie che rispondono ai Criteri di Amsterdam e che all'analisi di instabilità dei microsatelliti presentavano un fenotipo MSI-H, e due mutazioni (una nonsense e una sostituzione intronica) in due famiglie non Amsterdam con fenotipo MSI-L. Si evidenzia, quindi, in questo studio che le mutazioni missenso sembrano causare un fenotipo più grave, con una maggiore instabilità, rispetto alle mutazioni nonsense. La mutazione insC 3348/3349 nell'esone 5 del gene MSH6, che determina uno stop codon precoce, è stata identificata in una famiglia con familiarità per il cancro coloretale, con età d'insorgenza molto più avanzata, intorno ai 60 anni e che all'analisi di instabilità dei microsatelliti ha presentato un fenotipo MSI-L, con instabilità in BAT25 e nelle ripetizioni mononucleotidiche quasi-monomorfiche, NR-21 e NR-24. Il tessuto tumorale del paziente 049, portatore della mutazione InsTGTTG nell'introne 2 del gene, che abbiamo definito patogenetica in quanto nella famiglia cosegregava con la malattia, ha presentato un fenotipo MSI-L con instabilità in una ripetizione dinucleotidica e nella ripetizione NR-21. Tale mutazione dovrebbe alterare l'espressione della proteina. Infine, la mutazione

3294-95delTT nell'esone 5 identificata nel probando 015 della famiglia 24 non è stata ritrovata nel paziente 0415 della stessa famiglia e con cancro del colon diagnosticato a 40 anni, inoltre l'analisi dei microsatelliti ha mostrato un fenotipo MSI-H per il paziente 015 e un fenotipo MSI-L per il soggetto 0415. Si può ipotizzare, dunque, che in questa famiglia il soggetto 015 sia portatore anche di una mutazione in MSH3, mentre il soggetto 0415 potrebbe essere portatore solo della mutazione in MSH3.

La disponibilità del tessuto tumorale del probando 0501, portatore della mutazione missenso 431 G→T nell'esone 2, ha consentito la caratterizzazione di un fenotipo MSI-H con instabilità anche nelle ripetizioni dinucleotidiche. Analogamente l'analisi condotta sul tessuto tumorale del soggetto 0210 portatore della mutazione 3028 A→G nell'esone 4, ha dimostrato che le mutazioni missenso sono più spesso correlate con un fenotipo MSI-H. Per i soggetti 0310, 978 e 0013 portatori delle altre mutazioni missenso identificate in MSH6 non è stato possibile condurre analisi MSI per mancanza del tessuto tumorale.

Infine, l'analisi del gene MSH6 ha permesso di identificare varie mutazioni silenti e sostituzioni introniche, per le quali non possiamo escludere del tutto un ruolo patogenetico. Infatti, studi recenti indicano che sostituzioni nucleotidiche silenti possono inattivare i geni interessati, inducendo l'apparato deputato allo splicing a "by-passare" l'esone recante queste alterazioni, quindi influenzando l'accuratezza e l'efficienza dello splicing e determinando una variabilità fenotipica che, in alcuni casi, può presentarsi con le stesse caratteristiche della malattia. Dunque, per queste mutazioni sarà interessante approfondire tale studio analizzando mediante real-time PCR il livello di espressione del trascritto e della proteina per comprendere l'esatta correlazione genotipo-fenotipo (68,69).

Questo studio ha indicato che la prevalenza delle mutazioni in MSH6 è del 17% in "classiche" famiglie che soddisfano i criteri di Amsterdam, contro il 52% delle mutazioni in MSH2 e MLH1. Invece, in famiglie solo "sospettate" di HNPCC, la prevalenza delle mutazioni in MLH1 ed MSH2 (4%) è inferiore a quella delle alterazioni in MSH6 (12%). In conclusione, tale studio suggerisce di effettuare l'analisi di mutazione del gene MSH6 per tutti i pazienti sospettati di avere HNPCC (58). Inoltre, l'analisi MSI ha mostrato nei

pazienti con mutazioni in MSH6 una maggiore instabilità delle sequenze mononucleotidiche NR21, 22 e 24, non mostrata in altri pazienti con mutazioni in altri geni MMR; dunque, l'instabilità di queste ripetizioni potrebbe essere d'aiuto per la ricerca di mutazioni nel gene MSH6.

In questo lavoro di tesi i risultati sono stati ottenuti mediante tecniche innovative, quali la DHPLC e la MLPA.

La tecnica dell'SSCP è stata sostituita con quella più nuova, sensibile e sofisticata della DHPLC per la ricerca di mutazioni puntiformi. Mediante SSCP, infatti, si riesce ad individuare circa il 75% delle mutazioni presenti in amplificati di lunghezza non superiore a 300 nucleotidi. La DHPLC, invece, presenta una maggiore sensibilità (circa il 95-97%), permette di effettuare l'analisi in un ampio campo di variazioni di pH (2-13) e di temperatura (40-80°C) e può essere applicata su frammenti di DNA di dimensioni tra 100 e 700 bp. Inoltre, il maggiore vantaggio della DHPLC, è quello di essere totalmente automatizzata, molto rapida (una singola analisi richiede circa 7 minuti), poco laboriosa nonché di garantire riproducibilità durante l'analisi. Grazie alla DHPLC abbiamo identificato due mutazioni, la InsC 91/92 e la Leu749Pro, non evidenziate mediante SSCP. Tuttavia, con la DHPLC non è possibile individuare ampie delezioni o duplicazioni di uno o più esoni a causa della presenza dell'allele normale. Convenzionalmente, la principale tecnica utilizzata per identificazione di ampie delezioni genomiche nei geni MMR è il Southern-Blot; tuttavia tale metodica, laboriosa e lunga, richiede una notevole quantità di DNA di partenza e non è adattabile ad indagini di routine di diagnosi molecolare. La Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), invece, presenta notevoli potenzialità d'applicazione come metodica diagnostica per la determinazione del numero di copie alleliche di specifiche sequenze geniche e, dunque, efficace per l'analisi di delezioni o duplicazioni geniche in hMLH1 ed hMSH2, i due geni principalmente coinvolti nell'HNPCC. Inoltre, possiamo dire che l'MLPA risulta altamente specifica e riproducibile. L'alta specificità della tecnica deriva dall'uso di probe con sequenza altamente specifica per le regioni target genomiche da analizzare, che consente di discriminare sequenze che differiscono anche di un solo nucleotide. Ciò ha consentito di ridurre il rischio di contaminazione di prodotti aspecifici, perché i probe-copia della sequenza esonica target sono amplificabili solo dopo

ligazione e quest'ultima avviene solo in seguito ad una perfetta interazione tra oligonucleotidi e la sequenza target complementare. Quanto alla riproducibilità, sappiamo che essa dipende dall'apparato utilizzato per l'analisi dei risultati e dall'approccio seguito per la loro interpretazione. L'utilizzo del sistema elettroforetico capillare, che presenta un grado di riproducibilità prossimo al 100%, del software Genescan per l'analisi dei picchi e di fogli Excel per la normalizzazione dei dati rispetto ai controlli interni ed esterni, ha permesso di ridurre la variabilità e di ottenere un valore di deviazione standard (D.S.) dei risultati avuti per ciascun probe tra il 4 e il 10%. L'MLPA, infine, è vantaggiosa anche per la semplicità del metodo e per la brevità del tempo richiesto per la sua realizzazione: una singola reazione di amplificazione ha consentito di analizzare fino a 42 differenti sequenze genomiche in circa 36 ore. Grazie ai vantaggi derivanti dall'uso dell'MLPA potremmo considerare, dunque, l'analisi di ampie delezioni nei geni MMR una tappa precoce nella diagnosi molecolare del cancro coloretale non-poliposico ereditario.

In conclusione possiamo dire che i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi mostrano l'elevata sensibilità dei Criteri diagnostici di Amsterdam per la diagnosi clinica delle famiglie HNPCC. Infatti, la causa della malattia, ovvero la presenza di mutazione nei geni MMR, è stata identificata in 22 delle 29 famiglie (76%) rispondenti ai Criteri di Amsterdam. Inoltre, non va sottovalutato il risultato ottenuto nella ricerca di mutazione nei geni MMR nei soggetti sottoposti in precedenza all'analisi di instabilità dei microsatelliti. In questo caso il difetto molecolare è stato identificato in 5 delle 25 famiglie (20%) definite "non Amsterdam". È da sottolineare che l'analisi di instabilità dei microsatelliti è da considerarsi importante soprattutto per la ricerca di mutazione nei geni minori: tre delle 5 famiglie con diagnosi molecolare di HNPCC hanno presentato la mutazione nel gene MSH6. L'MSI ha fornito anche un altro importante risultato: le sequenze mononucleotidiche quasi-monomorfiche sono risultate maggiormente instabili nei tessuti tumorali dei pazienti portatori di mutazioni in MSH6 (71%). Ciò rende importante l'analisi di tali ripetizioni insieme agli altri 5 microsatelliti del pannello di Bethesda. Infine, la ricerca di mutazioni potrebbe cominciare dalla ricerca di ampi riarrangiamenti genici, grazie all'utilizzo dell'MLPA che, come già detto, risulta essere molto rapida e sensibile; nella flow-chart proposta, inoltre, si

consiglia di cominciare lo screening dal gene MSH6, nel caso in cui sia presente una bassa instabilità e/o risultino particolarmente instabili le ripetizioni NR21,22,24, in modo da rendere la ricerca di mutazioni più rapida e dunque più efficace.

L'analisi genetica, grazie alle metodiche oggi a disposizione, consente di individuare i portatori di un gene mutato in fase presintomatica; ciò è di fondamentale importanza per i soggetti appartenenti alle famiglie a rischio di cancro del colon, nei quali i controlli clinici, che utilizzano tecniche invasive, iniziano solitamente intorno ai 20-25. Il test genico, effettuato prima di tale periodo, evita a coloro che non hanno ereditato la mutazione di sottoporsi a procedure invasive. I soggetti ancora asintomatici, nei quali la diagnosi molecolare indica la presenza della mutazione, vengono indirizzati ad un più stretto controllo clinico, grazie ad un insieme di indagini strumentali allo scopo di rilevare in maniera precoce la presenza di eventuali adenomi. In questo studio sono stati analizzati i DNA di 81 soggetti apparentemente sani, appartenenti a famiglie a rischio: la ricerca della mutazione causa della malattia identificata nella famiglia, ha consentito di escludere da rigorosi controlli clinici i 38 soggetti che non hanno ereditato la mutazione; i 46 soggetti che hanno ereditato la mutazione sono stati inseriti in un programma di screening al fine di individuare precocemente l'eventuale presenza di polipi e di impedire quindi la loro trasformazione in tumore.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Murray T, et al. "Cancer statistics, 2005". *CA Cancer J Clin.* 2005 Jan-Feb;55(1):10-30.
2. Weitz J, Koch M, et al. "Colorectal cancer". *Lancet.* 2005 Jan 8;365(9454):153-65.
3. Yang K., et al.(1998) "Dietary modulation of carcinoma development in a mouse model for human familial adenomatous polyposis". *Cancer Res.* 58, 5713-17
4. Lynch HT, et al. "Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). *Int J Cancer* 1996, 69, 38-43
5. Lynch HT, de la Chapelle A. "Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer". *J med genet.* 1999 nov; 39 (11:801-18)
6. Oshima H., et al (1997) Morphological and molecular processes of the polyp formation in APC knockout mice. *Cancer Res.* 57, 1644-1649
7. Kinzler K.W., et al. (1996) *Lesson from hereditary colorectal cancer.* *Cell* 87, 159-170.
8. Enric R. Fearon, Vogelstein B. "A genetic model for colorectal tumorigenesis" *Cell.* 1990 Jun 1; 61 (5): 759-67.
9. Kinzler KW, Vogelstein B. "Lesson from hereditary colorectal cancer" *Cell.* 1996 Oct 18;87(2): 159-70.
10. Chung DC. "The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis". *Gastroenterology.* 2000 Sep;119(3):854-65
11. Arakawa H. "Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis". *Nat Rev Cancer.* 2004 Dec;4(12):978-87.
12. Montgomery E, Goggins M, et al. "Nuclear localization of Dpc4 (Madh4, Smad4) in colorectal carcinomas and relation to mismatch repair/transforming growth factor-beta receptor defects". *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):537-42.
13. Kressner U, Inganas M, et al. "Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer". *J Clin Oncol.* 1999 Feb;17(2):593-9.
14. Vousden KH. "p53: death star". *Cell.* 2000 Nov 22;103(5):691-4.
15. Pannett AA, Thakker RV. "Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep; 86(9): 4371-4
16. de la Chapelle A. "Genetic predisposition to colorectal cancer". *Nat Rev Cancer.* 2004 Oct;4(10):769-80.
17. Askling J, Dickman PW, et al. "Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease". *Gastroenterology.* 2001 May;120(6):1356-62.
18. Lawes DA, SenGupta SB, et al. "Pathogenesis and clinical management of hereditary non-polyposis colorectal cancer". *Surg.* 2002 Nov;89(11):1357-69.
19. Kouraklis G, Misiakos EP. "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): criteria for identification and management". *Dig Dis Sci.* 2005 Feb;50(2):336-44.

20. Lynch HT, Lynch J. "Genetics, natural history, surveillance, management, and gene mapping in the Lynch syndrome". *Pathol Biol (Paris)*. 1995 March;43(3):151-8 review.
21. Lucci-Cordisco E, Zito I, et al. "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions". *Am J Med Genet A*. 2003 Nov 1;122(4):325-34.
22. Obmolova G, Ban C, et al. "Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA". *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):703-10.
23. Peltomaki P. "DNA mismatch repair and cancer". *Mutat Res*. 2001 Mar;488(1):77-85.
24. Papadopoulos N, Nicolaides NC, et al. "Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer". *Science*. 1994 Mar 18;263(5153):1625-9.
25. Han HJ, Maruyama M, et al. "Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)". *Hum Mol Genet*. 1995 Feb;4(2):237-42.
26. Bronner CE, Baker SM, et al. "Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer". *Nature*. 1994 Mar 17;368(6468):258-61.
27. Fishel R, Lescoe MK, et al. "The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer". *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38.
28. Kolodner RD, Hall NR, et al. "Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for MSH2 mutations". *Genomics*. 1994 Dec;24(3):516-26.
29. Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. "Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer". *Nature*. 1994 Sep 1;371(6492):75-80.
30. Nicolaides NC, Carter KC, et al. "Genomic organization of the human PMS2 gene family". *Genomics*. 1995 Nov 20;30(2):195-206.
31. Papadopoulos N, Nicolaides NC, et al. "Mutations of GTBP in genetically unstable cells". *Science*. 1995 Jun 30;268(5219):1915-7.
32. Acharya S, Wilson T, et al. "hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13629-34.
33. Chung DC, Rustgi AK. "The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications". *Ann Intern Med*. 2003 Apr 1;138(7):560-70.
34. Watanabe A, Ikejima M, et al. "Genomic organization and expression of the human MSH3 gene". *Genomics*. 1996 Feb 1;31(3):311-8.
35. Harfe BD, Jinks-Robertson S. "DNA mismatch repair and genetic instability". *Annu Rev Genet*. 2000;34:359-399.
36. Wei K, Kucherlapati R, et al. "Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defect". *Trends Mol Med*. 2002 Jul;8(7):346-53.
37. Peltomaki P. "Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer". *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):735-40.
38. Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. "Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer". *Nature*. 1994 Sep 1;371(6492):75-80.

39. Cederquist K, Emanuelsson M, et al. "Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden". *Int J Cancer*. 2004 Apr 10;109(3):370-6
40. <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/hnpcc99.htm>.
41. Lucci-Cordisco E, Rovella V, et al. "Mutations of the 'minor' mismatch repair gene MSH6 in typical and atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer". *Fam Cancer*. 2001;1(2):93-9.
42. Yang G, Scherer SJ, et al. "Dominant effects of an MSH6 missense mutation on DANN repair and cancer susceptibility". *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):139-50.
43. Calabrese P, Tsao JL, et al. "Colorectal pretumor progression before and after loss of DNA mismatch repair". *Am J Pathol*. 2004 Apr;164(4):1447-53.
44. Bocker T, Ruschoff J, et al. "Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects". *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 31;1423(2):O1-O10.
45. Pedroni M, Sala E, et al. "Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis". *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):896-9.
46. Loukola A, Eklin K, et al. "Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)". *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4545-9.
47. Christensen M, Katballe N, et al. "Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing". *Cancer*. 2002 Dec 1;95(11):2422-30.
48. Lynch, H.T, Smyrk, T. "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): An updated review". *Cancer*. 1996 Sep 15; 78(6):1149-67.
49. Wang S, Souza RF, et al. "Deficient transforming growth factor-beta1 activation and excessive insulin-like growth factor II (IGFII) expression in IGFII receptor-mutant tumors". *Cancer Res*. 1997 Jul 1;57(13):2543-6
50. Furukawa T, Konishi F, et al. "Evaluation of screening strategy for detecting hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma". *Cancer*. 2002 Feb 15;94(4):911-20.
51. Boland CR, Thibodeau SN, et al. "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 Nov 15;58(22):5248-57.
52. Bacher JW, Flanagan LA, et al. "Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors". *Dis Markers*. 2004;20(4-5):237-50.
53. Humar A, Boland CR, et al. "Revised Bethesda Guidelines for hereditary non polyposis colorectal cancer (lynce syndrome) and microsatellite instability". *Journal Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18; 96(4): 261-8.
54. Suraweera N, Duval A, et al. "Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR". *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1804-1811.
55. Herman JG, Umar A, et al. "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma".

- Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
56. Chang SC, Lin JK, et al. "Loss of heterozygosity: an independent prognostic factor of colorectal cancer". *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 14;11(6):778-84.
 57. Elke Holinski-Feder, Y. Muller-Koch et al. DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) genes hMLH1 and hMSH2. *J Biochem. Biophys. Methods* 47(2001) 21-32.
 58. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). MRC-Holland, Hudsonstraat 68, 1057sn Amstrad, The Nertherlands, Retrieved from <http://www.mrc-holland.com>.
 59. Nystrom-Lahti M, et al. "Functional analysis of MLH1 mutations linked to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Feb 33;(2):160-7.
 60. Panariello et al. « hMlh1 mutations in Hereditary nonpolyposis colon cancer kindreds. Mutations in brief n°182. Online. *Hum Mutat* 1998 12(3):216-7
 61. E. Kondo et al. "The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous aminoacid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic acids researce* 2001 29 n°8:1695-702
 62. Goodfellow PJ, Buttin BM, et al. " Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5908-13.
 63. Plaschke J, Kruger S, et al. "Eight novel MSH6 germline mutations in patients with familial and nonfamilial colorectal cancer selected by loss of protein expression in tumor tissue". *Hum Mutat.* 2004 Mar;23(3):285.
 64. Wijnen J, de Leeuw W, et al. "Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations". *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):142-4.
 65. Wu Y, Berends MJ, et al. "Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations". *Am J Hum Genet.* 1999 Nov;65(5):1291-8.
 66. Berends MJ, Wu Y, et al. "Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant". *Am J Hum Genet.* 2002 Jan;70(1):26-37.
 67. Edelmann W, Yang K, et al. "Mutation in the mismatch repair gene MSH6 causes cancer susceptibility". *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):467-77.
 68. Buratti e Baralle FE, et al. "Can a patch in skipped exon make the pre-Mrna spicing machine run better?". *Trends Mol Med* 2003 jun; 9 (6): 229-32.
 69. Cartegni L, Chew SL, et al. "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing". *Nat Rev Genet.* 2002 Apr; 3 (4):285-98.
 70. Nakagawa H, de la Chapelle A. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch Syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Hum Mutat* 2003: 22:258