(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 646 394**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/EP2012/062708**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13004618**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12729995 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2726629**

(54) Título: **Método para determinar la función de reparación de emparejamientos incorrectos del ADN**

(30) Prioridad:

01.07.2011 FI 20115709
01.07.2011 US 201161503735 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2017

(73) Titular/es:

HELSINGIN YLIOPISTO (100.0%)
Yliopistonkatu 4
00014 Helsingin Yliopisto, FI

(72) Inventor/es:

NYSTRÖM, MINNA;
KANSIKAS, MINTTU y
PELTOMÄKI, PÄIVI

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 646 394 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la función de reparación de emparejamientos incorrectos del ADN

Campo de la invención

Esta divulgación se refiere al diagnóstico del cáncer y proporciona métodos basados en un ensayo de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN para determinar si un sujeto humano tiene una función de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN alterada; y para identificar un gen de reparación de emparejamientos incorrectos que tiene una función defectuosa y, por tanto, un riesgo aumento de desarrollar cánceres hereditarios, especialmente cáncer colorrectal. El método también proporciona un método novedoso de diagnóstico del síndrome de Lynch. El método se realiza sobre una muestra obtenida de tejido normal, tal como fibroblastos.

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal (CRC) es la segunda causa más común de muerte relacionada con cáncer en Estados Unidos y en Europa. De acuerdo con un reciente artículo de revisión de Pino, M.S. y Chung, D.D. en Expert Rev Mol Diagn, 10(5):651-665, 2010, el CRC es responsable de 52 000 muertes estimadas por año en EE. UU. y de 146 000 por año en la UE. Aproximadamente un 2-5 % de los casos recién diagnosticados de CRC pueden atribuirse a síndrome de Lynch.

El síndrome de Lynch (LS), a menudo se menciona como síndrome de cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC), se manifiesta en cáncer colorrectal y de endometrio de aparición prematura, y un riesgo aumentado de ciertos cánceres extracolónicos, incluyendo tumores en cualquier otra parte del tubo gastrointestinal (por ejemplo, estómago, intestino delgado, conducto biliar), el sistema colector urinario (pelvis renal, uréter) y el sistema reproductor femenino (ovarios).

Los estudios de familias seleccionadas con LS han estimado un riesgo de un 70-80 % a lo largo de la vida de cáncer colorrectal con una edad media de diagnóstico en la mitad de la cuarentena. La segunda el segundo cáncer más común en LS es cáncer de endometrio, y las mujeres con LS tienen un riesgo acumulado a largo de la vida de desarrollar cáncer de endometrio y ovario, con una edad media de diagnóstico aproximadamente 10 años que los casos esporádicos. El riesgo a lo largo de la vida de cáncer gástrico en pacientes con LS varía entre poblaciones, con una incidencia particularmente elevada en áreas tales como China y Corea, donde hay un riesgo endémico elevado de cáncer gástrico, con un riesgo a lo largo de la vida de aproximadamente un 30 %. En estas áreas, el riesgo de cáncer gástrico excede el de cáncer de endometrio.

El síndrome de Lynch está muy asociado a herencia latente autosómica de mutaciones en genes fundamentales para el mecanismo de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN (MMR) y está causado por mutaciones en la línea germinal en uno de los cuatro genes de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN (MMR), *MLH1, MSH2, MSH6* y *PMS2.* Además, un 25 % de los tumores de colon esporádicos, así como varios tumores de endometrio, ovario y algún otro órgano y tejido, carecen de MMR. Las proteínas MMR normalmente reconocen y reparan nucleótidos emparejados de forma incorrecta y bucles de inserción/eliminación causados por el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación de secuencias de repetición cortas conocidas como microsatélites.

Las cinco proteínas implicadas en el mecanismo de reparación de emparejamientos incorrectos (MMR) humano para mantener la función de integridad genómica como heterodímeros son MutLα (MLH1+PMS2), MutSα (MSH2+MSH6) y MutSβ (MSH2+MSH3). Las proteínas MMR corrigen los emparejamientos incorrectos de base/base y pequeños bucles de inserción/eliminación (IDL) que surgen sobre la hebra recién sintetizada durante la replicación y recombinación del ADN.

Los genes más frecuentemente afectados incluyen MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, cuyas variaciones de la línea germinal se presentan en la base de datos LOVD (http://www.insight-group.org/; http://www.lovd.nl/). Aunque la mayoría de las mutaciones que afectan a los genes MMR son truncamientos, una proporción significativa de mutaciones provoca sustitución de aminoácidos individuales o una eliminación en fase y son difíciles de distinguir de los polimorfismos inocuos. Dichas alteraciones a menudo se mencionan como variantes de importancia incierta (VUS) debido al efecto no caracterizado de la variación sobre la función del polipéptido.

Los tumores que carecen de MMR están muy asociados a inestabilidad de microsatélites (MSI). Sin embargo, el grado y tipo de MSI difieren dependiendo del gen MMR afectado (Kantelinen et al., British J Cancer, 1-6, 2010).

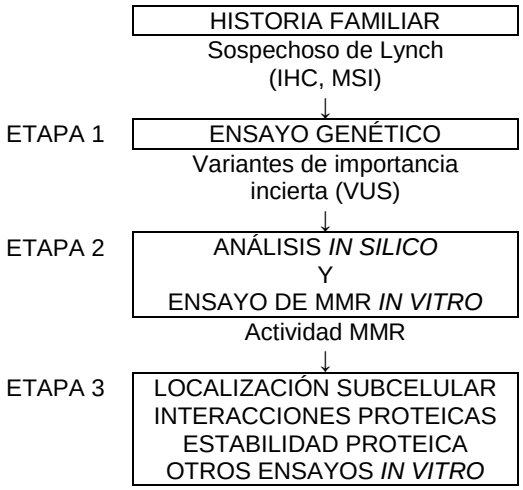
La edad media de aparición de cáncer en LS es significativamente inferior a la de un cáncer colorrectal esporádico basándose en el hecho de que en LS, un individuo ya ha heredado la susceptibilidad a través de un alelo mutado y solamente necesita un segundo acierto en una célula somática para perder la actividad MMR y empezar la tumorigénesis. Por tanto, los tumores LS se caracterizan por la ausencia o por el nivel disminuido de una proteína MMR causante, así como MSI que causa reparación alterada del ADN.

El reconocimiento oportuno de LS es esencial para identificar pacientes con alto riesgo que requerirán vigilancia intensiva del cáncer. La exploración por colonoscopia y la eliminación de lesiones precursoras, adenomas, reduce significativamente la morbilidad y la mortalidad por cáncer en portadores de mutaciones de genes MMR (Järvinen et al., Gastroenterology 118: 829-834, 2000). Los análisis de rentabilidad indican que la vigilancia de cáncer colorrectal en portadores de mutaciones de genes MMR es eficaz y considerablemente menos costosa que las consecuencias de la ausencia de vigilancia. El Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en Estados Unidos recomienda que todos los individuos con un nuevo diagnóstico de cáncer colorrectal, independientemente de la edad o de la historia familiar, deben ofrecer pruebas genéticas para el síndrome de Lynch. El informe del CDC indica adicionalmente que actualmente no hay suficientes evidencias para recomendar ninguna estrategia específica de selección frene a las estrategias alternativas.

Sin embargo, la amplia diversidad de fenotipos clínicos complica el diagnóstico de LS y se han establecido varias directrices clínicas para distinguir las familias con LS de la carga CRC general. Actualmente, el diagnóstico clínico de LS depende en gran medida de los criterios de Ámsterdam o de las directrices revisadas de Bethesda, que tienen en cuenta la edad de aparición del cáncer, la cantidad y la segregación de individuos afectados en una familia y el nivel de MSI (Pino y Chung, *Supra*). Sin embargo, muchas supuestas familias con LS no se ajustan a estos criterios y podrían reconocerse como familias con LS solamente caracterizando una mutación en el gen MMR de la línea germinal patogénica en ellos.

La secuencia de trabajo de diagnóstico tradicional para identificar portadores de mutaciones de genes MMR, es decir, sujetos afectados con el síndrome de Lynch, implica varias fases, tales como estudios de tumores, análisis de ADN, ensayos *in vitro* para patogenicidad de mutaciones y continua desde la detección de un defecto genético para evaluar si está asociado con capacidad MMR reducida. La primera etapa clínica en el diagnóstico de tumores asociados a LS incluye inmunohistoquímica (IHC) y análisis MSI seguido por exploración de mutaciones dictaminada por los resultados de IHC y MSI. Una estrategia para seleccionar mutaciones es analizar los cuatro genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2). Cuando se encuentra una mutación patogénica, puede confirmarse LS o en ausencia de una variación génica MMR, puede considerarse improbable pero no descartarse (ya que ningún método, se use en solitario o en combinación, es un 100 % sensible y específico).

Una reciente publicación de los presentes inventores (Kansikas et al., Hum Mutat 32:107-115, 2011) divulga que el ensayo de proteínas mutantes sintetizadas *in vitro* para la capacidad MMR forma la piedra angular para el ensayo de la patogenicidad. El ensayo de MMR *in vitro* publicado estudia las consecuencias fenotípicas de las mutaciones de LS en un sistema MMR humano homólogo. La construcción de la proteína mutante LS requiere que el defecto genético en cuestión se encuentre y caracterice completamente a nivel de secuencia de ADN. Por tanto, se propuso un árbol de decisiones de tres etapas (Couch et al., Hum Mutat 29:1314-1326, 2008):



Sin embargo, hay varias desventajas asociadas con los presentes ensayos usados para establecer un diagnóstico clínico:

el ensayo MSI requiere mucho tiempo y servicios patológicos moleculares específicos, y aunque es un rasgo característico de LS, no es específico del mismo. Aproximadamente un 10-25 % de los CRC esporádicos y muchos cánceres extracolónicos también muestran MSI. Además, los CRC asociados a LS y positivos a MSI esporádico tienen muchas características histopatológicas en común, pero difieren en que los CRC MSI esporádicos no están asociados con una historia familiar positiva.

Un inconveniente potencial inherente del ensayo IHC es que la técnica es algo subjetiva y depende de la calidad de la preparación tisular, de la tinción y de la interpretación de los resultados. De forma interesante, los patrones de

tinción anómalos pueden deberse a conservación del tejido y al microentorno del tumor. Por ejemplo, la hipoxia tisular o la sobrecarga oxidativa pueden disminuir la función de las proteínas MMR, incluso en tejidos genéticamente competentes en MMR, que da lugar a una pérdida focal o tinción débil. Anomalías secundarias en los genes MMR también pueden dar lugar a patrones extraños de tinción.

Sin embargo, la limitación más obvia referida a los presentes métodos de diagnóstico de LS, es que los ensayos se basan en ensayo genético y en análisis de mutación en sujetos de una familia con una historia de LS conocida o sospechosa, o en sujetos ya afectados por cáncer. Este hecho no hace a los presentes métodos de diagnóstico adecuados para selección rutinaria de sujetos sanos sospechosos de ser portadores. Además, los presentes esquemas de ensayos son muy laboriosos, que requieren laboratorios bien equipados, así como personal de laboratorio altamente cualificado. Se ha estimado que las etapas que incluyen análisis IHC, MSI y de mutaciones representan aproximadamente 3500 € por ensayo, lo que es caro para un ensayo rutinario.

Hay, por tanto, una necesidad bien establecida y reconocida de ensayos precisos, más simples, pero más baratos y clínicamente adecuados para identificar si una persona es un portador de mutaciones génicas MMR relacionadas con el síndrome de Lynch y, por tanto, sospechosas de un alto riesgo de cáncer colorrectal, así como de otros cánceres.

Kariola R et al., (Human molecular genetics, 2002, vol. 11, n.º 11, páginas 1303-1310) describe un estudio sobre la heterodimerización de cuatro variantes MSH6 con MSH2 y la funcionalidad de estos complejos MutSalfa en un ensayo de MMR *in vitro*.

Kantelinen et al., (Familiar cancer, 2011, vol. 10, n.º 3, páginas 515-520) estudia dos pacientes con cáncer colorrectal y basándose en estos resultados describe una supuesta familia de LS que porta variantes específicas tanto en *MSH2* como en *MSH6*.

Nystrom-Lahti et al., (Genes, chromosomes and cancer, 2002, vol. 33, n.º 2, páginas 160-167) realiza un ensayo funcional de mutaciones *MLH1* ligadas a HNPCC utilizando ensayo de actividad/inactividad cualitativo *in vitro*.

El documento WO2008/142521 A2 se refiere a un ensayo funcional de variantes de MMR.

Wang et al., (Journal of biological chemistry, 2002, vol. 277, n.º 29, páginas 26136-26142) describe la construcción de diferentes sustratos de MMR en alto rendimiento y pureza y, además, estudia los huecos de escisión de MMR en sustratos con emparejamientos incorrectos de bases.

Breve descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar métodos novedosos y medios para conseguir ensayos precisos, simples, baratos y clínicamente adecuados para detectar la disminución en la eficacia de MMR sin conocimiento preliminar de la historia de LS o cánceres en los sujetos y, por tanto, para resolver los problemas de los métodos actuales de diagnóstico. La presente divulgación se refiere a un método cuantitativo para determinar si un sujeto humano tiene una función de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN alterada, donde dicho método comprende a) producir un extracto nuclear de una muestra obtenida de dicho sujeto humano, b) proporcionar extractos de proteínas nucleares competentes en MMR y carentes de MMR como controles positivos y negativos, respectivamente, c) combinar en viales separados cada extracto nuclear con al menos un sustrato de ADN heterodúplex que alberga emparejamientos incorrectos, d) realizar un ensayo de reparación de emparejamientos incorrectos en dicha muestra y extractos de proteínas nucleares de control y dicho sustrato y, e) determinar si dicho extracto nuclear de muestra es capaz de reparar dicha molécula de ADN sustrato. Preferiblemente, dicha muestra comprende células normales obtenidas de un tejido constitutivo, más preferiblemente células fibroblásticas o células derivadas de sangre.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar si un sujeto humano tiene una función de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN alterada como se define en la reivindicación 1.

En una realización de la invención, dicho sustrato se obtiene de un plásmido que tiene la SEQ ID NO: 1 y, preferiblemente, dicho sustrato comprende además una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

En otra realización, el extracto nuclear carente de MMR se obtiene de una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células HCT116 y LoVo. En una realización específica, la cantidad total de extracto nuclear por vial está en el intervalo de 50-500 µg, preferiblemente 50-200 µg, más preferiblemente 75-100 µg.

La presente divulgación se refiere además a un método cuantitativo para identificar un gen de reparación de emparejamientos incorrectos que tiene una función defectuosa, donde dicho método comprende a) producir un extracto de proteínas nucleares de una muestra obtenida de un sujeto humano, b) proporcionar extractos de proteínas nucleares competentes en MMR y carentes de MMR como controles positivos y negativos,

respectivamente, c) mezclar al menos un extracto de proteínas nucleares carentes de MMR con dicho extracto de muestra, d) combinar en viales separados cada extracto nuclear proporcionado en las etapas a-c con al menos un sustrato de ADN heterodúplex que alberga emparejamientos incorrectos, e) realizar un ensayo de reparación de emparejamientos incorrectos sobre dichos extractos nucleares y dicho sustrato y f) identificar dicho gen defectuoso determinando si dicho extracto nuclear de muestra es capaz de reparar dicho sustrato y complementar dicho extracto nuclear carente de MMR. Preferiblemente, dicha muestra comprende células normales obtenidas de un tejido constitutivo, más preferiblemente células fibroblásticas o células derivadas de la sangre.

En una realización de la divulgación, dicho sustrato se obtiene de un plásmido que tiene la SEQ ID NO: 1 y preferiblemente dicho sustrato comprende además una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3.

En otra realización, el extracto nuclear carente de MMR se obtiene de una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células HCT116 y LoVo. En una realización específica, la cantidad total de extracto nuclear por vial está en el intervalo de 50-200 µg, preferiblemente 75-100 µg.

Además, la presente divulgación se refiere a un método novedoso para diagnosticar el síndrome de Lynch en un ser humano, basándose en la identificación de un gen de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN defectuoso usando un ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención, a partir de una muestra clínica obtenida de un tejido constitutivo de un sujeto humano.

La presente invención se refiere a un método para diagnosticar el síndrome de Lynch en un sujeto humano como se define en la reivindicación 6.

La presente divulgación también se refiere a un kit para el uso de los métodos de acuerdo con la presente invención, que comprende al menos un sustrato de ADN heterodúplex que alberga emparejamientos incorrectos, al menos un extracto nuclear carente de MMR y un extracto nuclear competente en MMR como control positivo. Preferiblemente, dichos extractos nucleares carentes de MMR se obtienen de una línea celular que tiene una deficiencia de MMR respecto a MLH1, MSH2 o MSH6, preferiblemente de células HCT116 o LoVo.

En una realización específica de la presente divulgación, el kit comprende al menos dos extractos nucleares carentes de MMR.

En una realización adicional, el kit también puede incluir reactivos adicionales necesarios para realizar el ensayo de MMR, tales como tampón MMR 10 X que comprende Tris-HCl 200 mM pH 7,6, KCl 400 mM, MgCl2 50 mM, glutatión 10 mM, 500 µg/ml de BSA, 1 mM de cada dNTP y ATP 15 mM; y una solución de PARADA para el ensayo de MMR que comprende EDTA 42 mM, SDS al 1,2 %, 50,4 µg/ml de proteinasa K. Opcionalmente, el kit puede comprender reactivos para aclarar la muestra, tal como tampón TE, fenol/cloroforma/alcohol isoamílico y cloroformo; para precipitar dicha muestra, tal como NaCl y etanol; y para detectar la reparación, tal como RNasa A y las enzimas de restricción *BglII* y *Eco31*I con tampón y colorante de carga.

Breve descripción de las figuras

En lo siguiente, se describirá la invención con mayor detalle mediante realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en que

La figura 1 es una visión global del método de la presente invención;
La figura 2 es un análisis de MMR de extracto nuclear de fibroblastos sanos (FB-WT, tipo silvestre) en comparación con el obtenido de una línea celular competente en MMR (HeLa) y un control de ensayos carente de MMR (SIMULADO) sin proteínas nucleares;
La figura 3 es un análisis de transferencia de Western que muestra a) el contenido de proteínas MMR (MLH1 y su equivalente PMS2) de un extracto nuclear de fibroblastos sanos (FB-WT) en comparación con la línea celular derivada de fibroblastos FB-M1 donde MLH1 se ha silenciado parcialmente y b) el contenido de proteínas MMR (MSH2 y su equivalente MSH6) de FB-WT en comparación con la línea celular derivada de fibroblastos FB-SH13 donde MSH2 se ha silenciado parcialmente.
La figura 4 es un análisis cuantitativo de MMR que muestra que la deficiencia de MLH1 en FB-M1 y de MSH2 en FB-SH13 se detecta como una disminución en la eficacia de reparación con intensidad variable. Los porcentajes relativos de reparación se muestran respecto a la eficacia de reparación de FB-WT; y
La figura 5 es un análisis cuantitativo de MMR que muestra que puede detectarse una diferente capacidad MMR de FB-WT y de FB-M1 cuando se usa en combinación con un extracto nuclear carente de MLH1 HCT116; y
La figura 6 es una presentación esquemática de la preparación de sustrato, incluyendo las presentaciones en plásmido de pGEM-IDL40, pGEM-IDLGT y pGEM-IDL39, y sus construcciones derivadas 5'IDLGT y 5'IDL1.

Descripción detallada de la invención

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que una evaluación funcional de la eficacia de reparación de

emparejamientos incorrectos de ADN (MMR) puede usarse para reconocer individuos con una deficiencia hereditaria de MMR y, por tanto, en riesgo importante de desarrollar cáncer. La presente invención proporciona un novedoso ensayo de MMR, que está dirigido a identificar la capacidad defectuosa de MMR (figura 1). El ensayo de acuerdo con la presente invención es aplicable sin ningún conocimiento previo de la secuencia génica de MMR subyacente o el cambio regulador, la historia familiar, la historia del cáncer o los resultados IHC y, por lo tanto, constituye una nueva estrategia con fines de diagnóstico. El ensayo es ideal con fines selectivos de portadores de mutaciones de MMR en grandes poblaciones y, por tanto, para hallar personas con alto riesgo de desarrollo de cáncer.

La presente divulgación se refiere a un protocolo de ensayo simple que consiste solamente en un ensayo, mientras que la secuencia de trabajo de trabajo tradicional para identificar portadores de mutaciones en genes MMR (síndrome de Lynch) implica varios ensayos y continua a partir de la detección de un defecto genético para evaluar si está asociado con capacidad MMR reducida. La presente invención proporciona un procedimiento de una etapa que evalúa si un individuo porta o no un defecto de MMR en la línea germinal, determinado por un ensayo de MMR cuantitativo. El método de acuerdo con la presente invención se basa en la detección de capacidad MMR disminuida en una muestra de tejido normal, tal como sangre, mucosa o fibroblastos, preferiblemente fibroblastos o linfoblastos obtenidos del sujeto a ensayar.

Como se usa en este documento, el término tejido "normal" pretende incluir cualquier tejido sano no neoplásico, preferiblemente un tejido constitutivo.

Como se usa en este documento, la expresión "tejido constitutivo" se refiere a tejidos de células no neoplásicas que representan sustancialmente la composición genética heredada al nacer y que puede obtenerse de cualquier parte del organismo humano accesible a la toma de muestras, por ejemplo, mucosa o fibroblastos.

El protocolo de ensayo de la presente divulgación se refiere a un método cuantitativo. Como se usa en este documento, la expresión "método cuantitativo" se refiere a un método que da resultados de eficacia de MMR con intensidad variable, es decir, no es un ensayo de actividad/inactividad. El presente ensayo de MMR detecta deficiencias de proteínas MMR como una disminución en la eficacia de reparación (véase la figura 4 para MLH1 y MSH2). Como se usa en este documento, los genes o proteínas MMR se refieren a cualquier gen o proteína que participa en el proceso MMR, por ejemplo, seleccionados del grupo que consiste en MLH1, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3, PMS1, PMS2 y EXO1. En una realización específica, las deficiencias de las proteínas MMR MLH1, MSH2 y/o MSH6 se detectan por el método o medio de la presente invención. De hecho, aún existe alguna capacidad de corregir emparejamientos incorrectos si, por ejemplo, hay solamente un alelo MMR normal presente, como es el caso en células normales de todos los portadores de la mutación del gen MMR en familias LS, o si un gen MMR está parcialmente inactivado. En comparación, los ensayos de la técnica anterior usados para células cancerosas revelan si se produce MMR (ambos alelos de tipo silvestre presentes) o está ausente (ambos alelos de tipos silvestre ausentes) lo que representa un ensayo de actividad/inactividad para MMR.

La MMR del ADN tiene lugar en el núcleo de la célula, y solamente las proteínas MMR del núcleo toman parte en el proceso de reparación. Por el método de la presente invención es posible ensayar la funcionalidad de esas proteínas MMR que se han dirigido al núcleo para la actividad de reparación *in vivo*, porque el material de partida del método es un extracto nuclear. Por el contrario, en una secuencia de trabajo tradicional, el ensayo de MMR se usa para estudiar la eficacia de MMR de los productos de proteína MMR mutada construidos *in vitro*. En estos ensayos *in vitro*, las proteínas a ensayar se añaden de forma artificial al extracto nuclear sin la posibilidad de estudiar solamente las proteínas que están presentes de forma natural en los núcleos. Por tanto, el ensayo de patogenicidad de la presente divulgación difiere de los ensayos funcionales de la técnica anterior revelando la capacidad MMR real del núcleo. Y, por lo tanto, por el método de la presente invención también es posible encontrar problemas de localización nuclear de las proteínas MMR.

Los métodos de la técnica anterior utilizan extractos celulares, es decir, extractos citoplasmáticos (CE) en lugar de extractos nucleares. Los ensayos con extractos citoplasmáticos dan información incorrecta de las cantidades y proporciones de proteínas MMR, que tienen capacidad de procesos de reparación en la práctica. Por lo tanto, los ensayos con extractos citoplasmáticos son adecuados únicamente para ensayos de actividad/inactividad y no para ensayos cuantitativos de MMR.

En los métodos de la presente invención, la capacidad MMR se detecta directamente del gel de agarosa sin usar ningún método de detección indirecta de la técnica anterior tal como ensayos de complementación en *E. coli*, donde la detección se gestiona por la expresión de lacZα.

El ensayo de una etapa de acuerdo con la presente invención opcionalmente puede estar seguido de o incluir las etapas de identificación de un gen genética o epigenéticamente defectuoso subyacente si así se desea, pero esto no es necesario para un diagnóstico clínico. Contrario a los ensayos tradicionales, el método de acuerdo con la presente invención permite el reconocimiento de individuos con susceptibilidad aumentada al cáncer debido a MMR defectuosa incluso en casos donde ningún miembro de la familia ha desarrollado aún cáncer, donde los ensayos de mutación no producen cambios detectables, y/o donde el cambio subyacente no es genético sino epigenético (regulador).

El principio básico, así como las diferentes realizaciones del ensayo propuesto, se muestra en un formato de matriz en la tabla 1, donde Y indica un extracto de proteínas nucleares ausente de MMR, X un extracto de proteínas nucleares de muestra de ensayo y Z un extracto de proteínas nucleares de control positivo competente en MMR.

Tabla 1

MMR +/-	gen MMR 1 +/-	gen MMR 2 +/-	gen MMR 3 +/-
Y	Y_1	Y_2	Y_3
X	$X + Y_1$	$X + Y_2$	$X + Y_3$
Z	Z	Z	Z

En una realización de la presente invención, se prepara un extracto de proteínas nucleares de muestra de ensayo (X) a partir de células normales cultivadas, tales como fibroblastos, obtenidos del sujeto a ensayar, y se realiza un ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención en viales que comprenden Y (extracto nuclear carente de MMR), X y Z (extracto nuclear de control positivo competente en MMR), respectivamente. la reacción de reparación convierte heterodúplex no susceptibles a escisión por la endonucleasa de restricción en homodúplex, que pueden escindirse. Si X es competente en MMR, el sustrato heterodúplex se escindirá, por tanto, y se linealizará en tres fragmentos, mientras que se producirá solamente un fragmento a causa de la linealización si X carece de MMR. Por consiguiente, Y producirá solamente un fragmento, mientras que Z producirá tres. Esta realización de la presente invención, el ensayo MMR +/- (indicando +/- que un alelo del gen MMR está funcionando y el otro es defectuoso), permitirá la determinación de si el sujeto humano ensayado tiene una función MMR alterada/defectuosa o una función MMR normal.

En otra realización de la presente invención, el extracto nuclear de muestra (X) se usa para complementar un extracto nuclear carente de MMR (Y) para formar X + Y. Las muestras de ensayo complementadas (X + Y), así como los controles positivo (Z) y negativo (Y), se usan entonces en un ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención para estudiar la capacidad de reparar emparejamientos incorrectos. La eficacia de reparación se cuantifica midiendo la eficacia de escisión usando la eficacia de reparación del extracto nuclear de fibroblastos competentes (Z) como un nivel de referencia, como se ejemplifica en el ejemplo 8 y en la figura 4.

El número de extractos nucleares carentes de MMR (Y_n) incluidos en el ensayo puede variarse dependiendo de si uno o más defectos se consideran importantes de identificar. En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, Y_1 es carente de MLH1 e Y_2 es carente de MSH2/MSH6. En una realización adicional de la presente invención, Y_3 podría ser carente de PMS2. Sin embargo, uno cualquiera de dichos extractos nucleares carentes de MMR (Y_n) podría omitirse o añadirse y usarse, en cualquier combinación. Un experto en la materia sería capaz de construir un panel de ensayo adecuado para la situación clínica en cuestión.

Se realiza un ensayo de diagnóstico típico de acuerdo con la presente invención como se describe en más detalle a continuación.

A. Muestras tisulares

La muestra tisular a ensayar puede ser cualquier tejido normal, que se obtiene y procesa fácilmente. En una realización específica de la presente invención, la muestra tisular de elección es una biopsia de piel humana o biopsia por escisión, que se puede haber obtenido por cualquier método bien conocido para los expertos en asistencia médica.

Otras muestras tisulares que pueden usarse en un método de acuerdo con la presente divulgación incluyen muestras de sangre y frotis de la mucosa.

B. Expansión de las células de muestra

Para examinar la capacidad de reparación de emparejamientos incorrectos (MMR) de las células, tiene que cultivarse una cantidad suficiente de células antes de extraer las proteínas nucleares de las mismas. Las células se cultivan en condiciones convencionales de cultivo celular, adecuadas para el tipo de células usadas y bien conocidas en la técnica y, después de ello, se recogen por suave sedimentación de las mismas.

Puede usarse cualquier tipo celular obtenido de una muestra clínica recogida de un sujeto humano, incluyendo células neoplásicas derivadas de un tumor, en un método de acuerdo con la presente divulgación. Los tipos celulares preferidos para su uso en un ensayo de acuerdo con la presente divulgación son fibroblastos humanos. Otro tipo celular preferido es células humanas derivadas de sangre, tal como células linfoides.

Muy preferiblemente, las células del ensayo de la presente divulgación son células primarias normales o células normales transformadas.

C. Extracción de proteínas nucleares de células fibroblásticas humanas

Las proteínas MMR se extraen de los núcleos de las células. Las células se centrifugan, se cuentan y se lavan con tampón de solución salina para eliminar cualquier resto de tripsina. Las células se lavan adicionalmente con tampón isotónico antes de centrifugarse y se hinchan con el efecto osmótico de un posterior lavado hipotónico. Se usa una aguja estrecha para alterar las membranas celulares hasta que se confirma que la mayoría de las células se han lisado bajo el microscopio.

Después de centrifugar las células, se retira el sobrenadante que contiene la fracción citoplasmática. Las proteínas nucleares se extraen de la fracción nuclear restante por incubación en tampón de extracción frio con sal después de lo cual se centrifuga cualquier desecho nuclear restante y se retira como el sedimento restante. La muestra de proteínas nucleares extraída después de ello se dializa en presencia de inhibidores de proteinasa, y se aclara adicionalmente por centrifugación antes de almacenarlo a -80 ºC. El contenido de proteína de las muestras se cuantifica por un fluorímetro.

D. Preparación del sustrato

Un sustrato plasmídico heterodúplex circular para su uso en el ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención se prepara re-hibridando un ADN monocatenario (ADNmc) y un ADN plasmídico coincidente desnaturalizado con un sitio no homólogo.

El ADNmc se produce a partir de un plásmido con la ayuda de células bacterianas y un fago auxiliar disponible en el mercado en fuerte selección con antibiótico. Los desechos celulares se centrifugan y se recogen las partículas fágicas por precipitación y centrifugación adicional. Las células bacterianas también se retiran por centrifugación y se retira cualquier ADN cromosómico restante originado por las bacterias con tratamientos enzimáticos. Tras limpiar la muestra, el ADNmc se libera de las proteínas de la cápsida del fago con la ayuda de una enzima proteinasa.

Se amplifica un molde plasmídico bicatenario (bc) que contiene el error de emparejamiento incorrecto y se purifica de las células bacterianas. Para tener una mella 5' anterior al sitio del error, se usa una enzima de restricción específica para linealizar la construcción después de lo cual se precipita la muestra y se disuelve en un volumen apropiado de tampón.

Para preparar el sustrato heterodúplex que alberga el emparejamiento incorrecto para el ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención, el ADNmc y el ADN plasmídico coincidente descrito anteriormente se desnaturalizan y se re-hibridan juntos. Las posteriores etapas de lavado, incluyendo la eliminación de las sales y el ADNbc lineal hibridado, así como el ADNmc no hibridado seguido por precipitación en etanol aseguran la pureza del producto final. La concentración se mide con un espectrofotómetro, así como por electroforesis en gel que también sirve para verificar la pureza de la muestra.

E. Ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención

Puede usarse un ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención para determinar si la función MMR de la muestra de ensayo es defectuosa o no, pero también puede distinguir entre la capacidad MMR de las proteínas nucleares extraídas de las células con MMR defectuosa y la de aquellas extraídas de proteínas competentes en MMR, como se describe anteriormente. Para identificar un gen MMR defectuoso, los extractos nucleares de muestra (X) se usan para complementar extractos nucleares carentes de MLH1 (Y_1) y MSH2/MSH6 (Y_2) por separado.

Se realiza un ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención combinando aproximadamente 50-500 µg, preferiblemente aproximadamente 50-200 µg, más preferiblemente aproximadamente 75-100 µg de extracto de proteínas nucleares con una cantidad excesiva de sustrato plasmídico circular (heterodúplex), mientras que en el caso de complementación de una línea celular carente de MMR bien caracterizada para determinar el gen MMR que causa la deficiencia, la cantidad total de los dos extractos usados en el ensayo no debe exceder de 200 µg. La reacción de reparación se induce en presencia de un tampón MMR que asegura una concentración salina óptima proporcionando también al mismo tiempo ATP y desoxirribonucleótidos. La reacción de reparación se termina enzimáticamente y las proteínas se retiran de la muestra por una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.

Después de la precipitación, la muestra se somete a una doble digestión, que escinde el ADN heterodúplex sustrato en dos fragmentos más pequeños si el proceso de reparación es satisfactorio. Estos dos fragmentos más pequeños se visualizan por electroforesis en gel de agarosa. Como el ADN de sustrato se añade en exceso, siempre habrá también un producto de longitud completa linealizado visible. Cuando no se ha producido la reparación, solamente el ADN plasmídico linealizado de longitud completa será evidente.

Un objetivo adicional de la presente divulgación es proporcionar un kit que comprende los reactivos necesarios para realizar un método de acuerdo con la presente invención. Un kit de acuerdo con la presente divulgación incluye reactivos convencionales, tales como un sustrato que comprende uno o más sustratos de ADN heterodúplex que alberga emparejamiento incorrecto necesarios; al menos uno, pero preferiblemente dos, extractos nucleares

carentes de MMR; y un extracto nuclear competente en MMR como control positivo. En una realización específica de la presente divulgación, dichos extractos nucleares carentes de MMR se obtienen de líneas celulares carentes de MLH1 y MSH2/MSH6, respectivamente. Más específicamente, dichos extractos nucleares carentes de MMR se obtienen de células HCT116 y LoVo.

Los reactivos incluidos en un kit de acuerdo con la presente divulgación deben elegirse de acuerdo con el principio básico divulgado en la tabla 1. En una realización, un primer extracto nuclear (Y1) está carente de MLH1, mientras que un segundo extracto nuclear (Y2) está carente de MSH2/MSH6. Si una muestra ensayada no complementa dicho primer extracto nuclear, pero complementa dicho segundo extracto nuclear, dicha muestra de ensayo revela una deficiencia de MLH1. Sin embargo, si dicha muestra ensayada complementa dicho primer extracto nuclear, pero no dicho segundo extracto nuclear, dicha muestra de ensayo revela que el sujeto ensayado tiene una deficiencia de MSH2 o de MSH6.

Opcionalmente, un kit de acuerdo con la presente divulgación puede incluir extractos nucleares carentes de MMR adicionales, que distinguen específicamente entre deficiencias en los genes *MSH2* y *MSH6*. Dichos extractos nucleares pueden obtenerse de líneas celulares, tal como HCT-15/DLD-1 carente de MSH6 (ATCC CCL-225/221).

Opcionalmente, un kit de acuerdo con la presente divulgación también puede comprender reactivos adicionales necesarios para realizar el ensayo de MMR, tal como tampones y nucleótidos necesarios.

Un ejemplo de un kit de acuerdo con la presente divulgación se da en los ejemplos a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Cultivo de fibroblastos recogidos del sujeto a ensayar

Se cultivan células fibroblásticas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen, n.º CAT 31966-021) en una incubadora de CO_2 al 5 % a 37 ºC. El medio de cultivo se complementa con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, n.º CAT 10106-169), aminoácidos no esenciales 2 X (Invitrogen, n.º CAT 10370-070) y penicilina-estreptomicina al 2 % (Invitrogen, n.º CAT 15070-063). Las células se subcultivan 1:2-1:6 cuando son aproximadamente un 80-90 % confluyentes con la ayuda de tripsina al 0,25 % en EDTA (Invitrogen, n.º CAT 25200-072). Para mantener el silenciamiento en la línea celular derivada con MLH1 eliminado FB-M1 o la línea celular derivada con MSH2 eliminado FB-SH13, se añade 150 µg/pl de higromicina B (Invitrogen, n.º CAT 10687-010) al medio de cultivo. Las células se cultivan en frascos 175 con tapón de filtro tratado con cultivo celular (NUNC, n.º CAT 145-178883) hasta que se sincronizan aproximadamente 5 x 10^8-10^9 células para la extracción de las proteínas nucleares.

Ejemplo 2. Líneas celulares y extractos nucleares

Se cultivan líneas celulares de cáncer humano adherentes HeLa, LoVo y HCT116 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las células HeLa (ATCC CCL-2) son células epiteliales competentes en MMR derivadas del cuello del útero de un individuo femenino, mientras que las células HCT116 (ATCC CCL-247) y LoVo (ATCC CCL- 229) son células epiteliales carentes de MMR derivadas del colon de un individuo masculino. Las células HCT116 carecen de MLH1 mientras que en las células LoVo, el gen *MSH2* está inactivado, lo que causa una deficiencia de las proteínas MSH2, MSH3 y MSH6. La ausencia de MSH2 se ha asociado con una degradación proteolítica de sus equivalentes MSH3 y MSH6.

Las células HeLa se cultivan en medio DMEM complementado con L-glutamina al 2 %, FBS al 10 % y PS al 5 %. Las células LoVo se cultivan en medio F12 (o F12:DMEM) (Invitrogen, n.º CAT 31765-027/31331-028) complementado con L-glutamina al 2 %, FBS al 10-20 % y PS al 5 %, mientras que las células HCT116 se cultivan en medio McCoys 5A (Invitrogen, n.º CAT 22330-021) complementado con L-glutamina al 2 %, FBS al 10 % y PS al 5 %.

La línea celular FB-M1 se produjo como se describe en McDaid et al., BJC, 101:441-451,2009. En resumen, se diseñaron oligonucleótidos solapantes que producen ARNip dirigido a MLH1 en AACTGTTCTACCAGATACTCA y se ligaron en un vector de ARNhc disponible en el mercado pSilencer™ (Ambion n.º CAT AM7209). La construcción se verificó por secuenciación antes de linealizar y electroporar 1 x 10^7 células con 1 µg de ADN. El medio enriquecido en suero se añadió inmediatamente y las células se sembraron a 5 x 10^5 antes de añadir selección con higromicina (150 µg/ml) durante 10-14 días. Asimismo, la línea celular FB- SH13 se produjo usando oligonucleótidos solapantes que producen ARNip dirigido a MSH2 en TCTGCAGAGTGTTGTGCTT en el vector de ARNhc pSilencer™.

Por consiguiente, pueden prepararse líneas celulares de fibroblastos que comprenden otras mutaciones de genes MMR, tal como MSH6 silenciado, usando el vector de ARNhc pSilencer™4.1 - CMV Hygro (n.º Cat AM5777). Los extractos nucleares de fibroblastos se prepararon de acuerdo con el siguiente protocolo (Lahue et al., Science, 245:160-164,1989):

1. Se recogen 5 x 10^8-10^9 células en fase logarítmica con tripsina.
2. Se cuentan las células.
3. Se centrifugan a 500 x g durante 10 minutos a +4 ºC.
4. Se resuspende el sedimento celular en 20-30 ml de tampón isotónico 1 x frio (Hepes 20 mM, pH 7,5, KCl 5 mM, MgCl 1,5 mM, sacarosa 250 mM, PMSF 0,2 mM, mezcla de inhibidor de proteasas sin EDTA completo 1 x (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 0,25 µg ml-1 de aprotinina, 0,7 µg ml-1 de pepstatina, 0,5 µg ml-1 de leupeptina, DTT 1 mM) y se centrifugan como anteriormente.
5. Se estima el volumen de células compactadas y se resuspende en 20-30 ml de tampón isotónico frio 1 x (tampón isotónico sin sacarosa) y se centrifuga inmediatamente como anteriormente.
6. Se retira el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en tampón hipotónico frio 1 x para obtener una densidad celular de 1-2 x 10^8 células/ml. El volumen de células compactadas se sustrae del volumen de resuspensión.
7. Se alteran las células mediante una jeringa con una aguja de calibre estrecho extrayendo las células lentamente en la jeringa y después impulsándolas con un único empuje rápido. La alteración celular tiene que realizarse hasta que un 80-90 % de las células se hallan lisado, que se verifica bajo el microscopio (50 µl de azul tripano al 0,4 % en PBS con 45 µl de PBS en 5 µl de células).
8. Se centrifugan las células alteradas a 3000 x g durante 10 minutos a +4 ºC y ser retiran el sobrenadante.
9. Se estimula el volumen de sedimento nucleico y se añade 1/3 a 1/5 de tampón de extracción frio (Hepes 25 mM, pH 7,5, sacarosa al 10 %, PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM, 1 µg ml-1 de leupeptina) al volumen del sedimento. Se resuspende el sedimento bien por pipeteo arriba y abajo.
10. Se mide el nuevo volumen y se añade NaCl hasta una concentración final de 0,155 M con agitación.
11. Se rota la mezcla durante 60 minutos a 4 ºC.
12. Se centrifuga a 14 500 x g durante 20 minutos a 2 ºC.
13. Se dializa la muestra durante 2 x 50 minutos en un casete de 3500 de punto de corte de peso molecular en 1 litro de tampón de diálisis frio (Hepes 25 mM pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM pH 8, sacarosa al 10 %, PMSF 1 mM, DTT 2 mM, 1 µg ml-1 de leupeptina). Se cambia el tampón después de los primeros 50 minutos.
14. Se aclara el extracto por centrifugación a 20 000 x g durante 15 minutos a 2 ºC.
15. Se congelan instantáneamente las proteínas nucleares en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 ºC.

Ejemplo 3. Análisis de transferencia de Western

Los niveles de expresión proteica en los extractos nucleares (NE) se estudiaron por análisis de transferencia de Western usando 50 mg de NE y 0,1-5 µl de extracto de proteínas totales de tipo silvestre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hypond™, PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que posteriormente se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-MSH2 (Calbiochem, San Diego, CA, EE. UU., MSH2-Ab1, NA-26, 0,2 mg/ml), anti-MSH3 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, EE. UU., M94120, 250 mg/ml), anti-MSH6 (BD Transduction Laboratories, clon 44, 0,02 mg/ml), anti-PMS2 (Calbiochem/Oncogene Research, San Diego, CA, EE. UU., Ab-1, 0,2 mg/ml) y anti-MLH1 (BD Biosciences/Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU., clon 168-15, 0,5 mg/ml). Se usó α-tubulina que se expresa de forma ubicua como un control de carga para estimar los niveles de proteína MMR en los extractos (anti-α-tubulina; Sigma, Louis, MO, EE. UU., DM1A, 0,2 mg/ml).

Ejemplo 4. Producción de complejos de proteína heterodimérica de tipo silvestre

Se transfectaron células de insecto de *Spodoptera frugiperda (Sf9)* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) con ADN de bácmido que porta fragmentos de ADNc de MSH2, MSH3, MSH6, PMS2 o MLH1 de tipo silvestre (WT) después de lo cual las células se volvieron a infectar para obtener un mayor rendimiento de baculovirus recombinantes (Nystrom-Lahti et al., 2002). Estos baculovirus recombinantes WT se usaron para coinfectar células Sf9 para la producción de proteínas que forman los complejos heterodiméricos ensayados: MutLa (MLH1 + PMS2), MutSa (MSH2 + MSH6) y MutSp (MSH2 + MSH3). Los complejos heterodiméricos se extrajeron como extractos de proteína total (TE) a las 50 h (MutLa) o a las 72 h (MutSa y MutSp) lisando y centrifugando las células.

Ejemplo 5. Preparación de sustrato

Preparación de moléculas heterodúplex. La molécula de ADN heterodúplex es una molécula circular de 3192 pb de longitud con una mella monocatenaria 445 pb anterior al sitio del emparejamiento incorrecto. Esto contiene un sitio de restricción de *Bgl*II completo. La molécula se prepara hibridando ADN monocatenario de un plásmido pGEM-IDL40 (figura 6) junto con un plásmido que introduce errores basado en la misma construcción (pGEM-IDL GT, para el sustrato 5'GT o pGEM-IDL-39 para el sustrato 5'IDL1).

Se preparó ADN monocatenario (ADNmc) infectando células bacterianas XL-1-blue transformadas con pGEM IDL40 con el bacteriófago M13K07 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.), que replica la hebra no codificante que, después de ello, puede extraerse de las células. La hebra inferior (-) amplificada por el fago M13 tiene la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1, donde el sitio de restricción *Bgl*II está indicado.

Se prepararon dos construcciones heterodúplex diferentes; un emparejamiento incorrecto G-T (5'GT) y un único

nucleótido 5'IDL1. Se realizó mutagénesis dirigida al sitio en un pGEM-IDL40 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Quik-Change® mutagénesis dirigida al sitio, Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) para producir los plásmidos pGEM IDLGT que contiene el error y pGEM IDL39.

El sustrato 5'GT se preparó hibridando el ADNmc con el pGEM-IDLGT que contiene el emparejamiento incorrecto. Este plásmido de 3192 pb de longitud (pGEM-IDLGT) para ADNbc lineal contiene un sitio de restricción *Bgl*II incompleto (GGATCT). La hebra superior (+) es complementaria al ADNmc producido a partir de IDL40, excepto por la G que está remplazando la A que sería complementaria en el sitio *Bgl*II. La secuencia del pGEM-IDLGT se representa en la SEQ ID NO: 2 y el sitio de restricción *Bgl*II incompleto está indicado.

El sustrato 5'IDL1 se preparó hibridando el ADNmc con el pGEM-IDL1 que contiene el error. Este plásmido de 3191 pb de longitud (pGEM-IDL39) para el ADNbc lineal contiene un sitio de restricción *Bgl*II incompleto (-GATCT). La hebra superior (+) es complementaria al ADNmc producido a partir de IDL40, excepto por dela en el sitio *Bgl*II. Para crear la mella 5', el sustrato circular se linealizó con *Bam*II o DraIII antes de la rehibridación. La secuencia de pGEM-IDL39 se representa en la SEQ ID NO: 3 y el sitio de restricción *Bgl*II incompleto está indicado.

Ejemplo 6. Ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención

La presente invención es una modificación del ensayo de MMR *in vitro* descrito previamente (Nystrom-Lahti et al., 2002), que permite el ensayo de la capacidad MMR directamente de un extracto nuclear. Además, puede usarse complementación para caracterizar el gen MMR defectuoso en la muestra complementando un extracto carente de MMR caracterizado como se describe en la tabla 1. Las reacciones de reparación se normalizan para incluir un total de 75-100 de NE. La cantidad excesiva del sustrato de ADN heterodúplex (5'GT- o 5'IDL1) se establece a 100 ng. La reacción de reparación se realiza en un volumen de 20 µl con los siguientes reactivos:

- 100 ng de sustrato heterodúplex
- 75-100 µg de extracto nuclear
- 2 µl de tampón MMR 10 X (Tris-HCl 200 mM pH 7,6, KCl 400 mM, MgCl2 50 mM, glutatión 10 mM, BSA 500 µg/ml, 1 mM de cada dNTP, ATP 15 mM)
- KCl para obtener una concentración final 110 mM
- añadir H_2O hasta 20 µl.

Como la reacción tiene que hacerse en el volumen total de 20 µl en la concentración final de KCl de 110 mM, el contenido de KCl del extracto nuclear tiene que tenerse en consideración (2 µl de tampón MMR 10 X lleva un contenido de KCl de la mezcla de reacción hasta 40 mM). El contenido de KCl del extracto nuclear se asume en 75 mM/µl.

El protocolo típico del ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención es:

1. Se pipetean los componentes de la reacción de reparación juntos en hielo y se incuban 30 minutos a 37 ºC.
2. Se detiene la reacción añadiendo 30 µl de la solución de parada reciente (EDTA 42 mM, SDS al 1,2 %, 50,4 µg/ml de proteinasa K). Se incuba a 37 ºC durante 20 minutos.
3. Se añade un volumen (50 µl) de tampón TE pH 8,0.
4. Se añade un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agita con vórtice durante 10 segundos. Se centrifuga a la velocidad máxima durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se transfiere la fase superior (aproximadamente 90 µl) a un nuevo tubo y se añade un volumen igual de cloroformo. Se agita con vórtice durante 10 segundos y se centrifuga a velocidad máxima durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Se transfieren 85 µl de la fase superior a un tubo reciente para la precipitación con etanol.
7. Se añade NaCl para obtener una concentración final de 150 mM seguido por 2,5 volúmenes de etanol absoluto frio. Se incuba a -20 ºC durante 30 minutos.
8. Se sedimenta el ADN centrifugando la muestra a velocidad máxima durante 30 minutos a +4 ºC.
9. Se lava el sedimento con 150 µl de etanol al 70 %, se centrifuga a velocidad máxima durante 10 minutos, se seca y se resuspende el sedimento en 6 µl de ddH2O.
10. Se añaden 4 µl de mezcla de digestión 10 X recién preparada (2,5 µl de FastDigest® *BglII* (Fermentas, n.º CAT FD0083), 2,5 µl de FastDigest® *Eco31I* (Fermentas, n.º CAT FD0293), 10 µl de tampón FastDigest® y 25 µl de ddH2O) y se incuba a 37 ºC durante 10 minutos.
11. Se añade RNasa hasta 40 µg/ml y se incuba a 37 ºC durante 10 minutos.
12. Se cargan las muestras en un gel de agarosa al 1,0 % preparado con TAE 1 X para observar si ha producido la reparación.

Los porcentajes de reparación se analizan usando Image-Pro® 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU.).

Se usa NE HeLa competente en MMR como control positivo, mientras que se usa NE carente de MMR sin complementar como control negativo. Los sustratos se linealizan con la enzima de restricción *Eco31*I. Según la reacción de reparación convierte un heterodúplex GT en un homodúplex AT o rellena las estructuras de bucle de 1 o

2 nt que recrean el sitio de restricción *Bgl*II, la eficacia de la reparación puede medirse por la eficacia de la digestión doble.

Ejemplo 7. Células fibroblásticas usadas en el ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención

Este ejemplo se realizó para demostrar que el ensayo de MMR puede realizarse en tejido normal, tal como células fibroblásticas. El extracto nuclear de fibroblastos de tipo silvestre (FB-WT) preparado como se describe en el ejemplo 2, el extracto nuclear de las células HeLa competentes en MMR y un control negativo (SIMULADO) que no contiene proteínas se sometieron a un ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención como se describe en el ejemplo 3.

Después de permitir que la reacción de reparación tuviera lugar, una doble digestión del ADN sustrato produjo una única banda más grande de aproximadamente 3000 pb donde se había producido reparación, y además dos fragmentos más pequeños (de aproximadamente 1800 y 1300 pb) donde se había producido la reparación. Como el ADN sustrato se añade siempre en exceso, incluso los extractos competentes en MMR tendrán el sustrato linealizado presente además de los fragmentos de doble escisión.

El resultado de este ensayo se presenta en la figura 2, que muestra que el carril 1 que contiene las células SIMULADAS tiene solamente una banda grande (= sin reparación), mientras que los carriles 2 y 3, que contienen extractos nucleares FB-WT y HeLa, respectivamente, muestran dos bandas más pequeñas adicionales, indicativa de una reacción de reparación.

Por tanto, este ejemplo muestra de forma inequívoca que los extractos nucleares de células fibroblásticas normales tienen una capacidad MMR comparable con la línea celular de control competente en MMR (HeLa), que puede confirmarse por un ensayo de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 8. Células fibroblásticas humanas con un gen MMR parcialmente silenciado muestran capacidad MMR disminuida en el ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención

Este ejemplo muestra que las líneas celulares de fibroblastos humanos FB-M1 y FB-SH13 (descritas en el ejemplo 2), donde el gen *MLH1* o el gen *MSH2*, respectivamente, está parcialmente silenciado por tecnología de ARN(hc), presentan una clara disminución en la capacidad MMR.

En primer lugar, se realizó una transferencia de Western sobre cantidades iguales de extractos nucleares de células fibroblásticas de tipo silvestre (FB-WT) y células FB-M1 o células FB-WT y FB-SH13. Como resultado (figura 3) puede observarse que la cantidad de la proteína MLH1 está claramente disminuida en células FB-M1 en comparación con FB-WT, así como el nivel de MSH2 en células FB-SH13. Se incluye α-tubulina como control de carga.

En segundo lugar, se realizó el ensayo de MMR como se describe en el ejemplo 6, usando los mismos extractos nucleares en cantidades iguales:

MOCK - Control de ensayo negativo sin extracto nuclear;
FB-WT - Extracto nuclear de células fibroblásticas humanas de tipo silvestre (control positivo); y
FB-M1 - Extracto nuclear de células fibroblásticas humanas con MLH1 parcialmente silenciado; o
FB-SH13 - Extracto nuclear de células fibroblásticas humanas con MSH2 parcialmente silenciado.

El resultado de este ensayo demuestra que una concentración disminuida de una de las proteínas MMR clave está asociada con un mecanismo MMR defectuoso. El resultado se muestra en la figura 4 y demuestra claramente que, en comparación con el extracto nuclear de fibroblastos humanos de tipo silvestre, el ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención detecta la deficiencia de MLH1 y de MSH2 como una disminución en la eficacia de reparación. Además, la capacidad MMR de un extracto nuclear carente de MMR puede restaurarse de forma diferencial cuando se ensaya junto con extracto nuclear de tipo silvestre o parcialmente carente de MMR como se presenta en la figura 5 (HCT116 con FB-WT o FB-M1 en este caso) y como se describe por el ensayo presentado en la tabla 1 y descrito en las páginas 10-11.

La eficacia de reparación en el ensayo de MMR de acuerdo con la presente invención se considera como el porcentaje de ADN reparado de todo el ADN sustrato en la reacción. La escasez de una proteína MMR clave reduce la eficacia de reparación con intensidades variables mientras que la ausencia completa de proteínas MMR clave reduce la eficacia de reparación hasta un nivel no detectable.

Ejemplo 9. Un kit para su uso en un ensayo para diagnosticar defectos en MMR

Un kit de acuerdo con la presente divulgación se presenta preferiblemente como viales precargados con todos los reactivos para realizar el ensayo de MMR. Solamente se añade el ensayo nuclear de muestra de ensayo. En una realización de la presente divulgación, se presentan viales diferentes para las diferentes deficiencias de MMR a

ensayar.

Este ejemplo describe un kit para determinar si un sujeto tiene síndrome de Lynch o no, determinando si dicho sujeto tiene un defecto en el MLH1 o en cualquiera de los genes MSH2 o MSH6, sin distinguir entre los últimos. Dicho kit tiene al menos cinco viales diferentes.

Tabla 2

Vial	Reactivo	
1	HCT116	= NE de control carente de MLH1
2	LoVo	= NE de control carente de MSH2/6
3	HCT116	= a complementarse por NE de muestra
4	LoVo	= a complementarse por NE de muestra
5	FB-WT	= NE competente en MMR, control positivo

Los reactivos incluidos en dichos viales son:

- Heterodúplex de sustrato
- Extracto nuclear (HCT116, LoVo o FB-WT)
- Tampón MMR 10 X (Tris-HCl 200 mM pH 7,6, KCl 400 mM, MgCl2 50 mM, glutatión 10 mM, BSA 500 µg/ml, 1 mM de cada dNTP, ATP 15 mM).

Además de esto, se requiere una solución de PARADA para el ensayo de MMR (EDTA 42 mM, SDS al 1,2 %, 50,4 µg/ml de proteinasa K), y podría proporcionarse, por tanto, con el kit.

Además, dicho kit puede contener, opcionalmente, reactivos necesarios para aclarar la muestra (tampón TE, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y cloroformo), para precipitarla (NaCl y etanol) y para detectar la reparación (RNasa A y enzimas de restricción *Bgl*II y *Eco31*I con tampón y colorante de carga).

Los componentes opcionales adicionales del kit son reactivos necesarios para el cultivo de las células, las proteínas nucleares de muestra que tienen que extraerse, así como los reactivos necesarios para la extracción de las proteínas nucleares de la misma (véase el ejemplo 2).

Un kit de acuerdo con la presente divulgación no está restringido a ninguna forma o tipo específico de viales. Es adecuado cualquier tipo de vial adecuados para la manipulación y las incubaciones descritas en el ejemplo 6, tales como tubos Eppendorf®.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Helsinki University

<120> Método de detección de predisposición a cánceres hereditarios

<130> 2110963PC

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 3192
<212> ADN
<213> Plásmido

<200>
<221> misc_feature
<222> (3154)..(3159)
<223> Sitio de restricción *Bgl*II

<400> 1

tatagtgagt cgtattacaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 60
cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 120
agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 180
acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 240
ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca 300
cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg ttccgattta 360
gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc 420
catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga gtccacgttc tttaatagtg 480
gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat 540
aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 600
acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttcctg atgcggtatt ttctccttac 660
gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc 720
cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg 780
tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 840
gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 900
tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg 960
aaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 1020
catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat 1080
tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 1140
tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 1200
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 1260

ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 1320
cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta 1380
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 1440
tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 1500
gaaggagcta accgcttttt tgcacaacag ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg 1560
gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca 1620
atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa 1680
caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt 1740
ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 1800
attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg 1860
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt 1920
aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 1980
catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc 2040
ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 2100
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 2160
ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 2220
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 2280
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct 2340
gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat 2400
aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 2460
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa 2520
gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 2580
gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 2640
cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 2700
aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct 2760
gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct 2820
cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca 2880
atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 2940
tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 3000
taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc 3060
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct atttaggtga 3120
cactatagaa tactcaagct tactacttga gggagatctc taggcttgca tggagcggcc 3180
gccaattcgc cc 3192

<210> 2

<211> 3192
<212> ADN
<213> Plásmido

<200>
<221> misc_feature
<222> (34)..(39)
<223> Sitio de restricción *Bgl*II incompleto

<400> 2

```
gggcgaattg gcggccgctc catgcaagcc tagggatctc cctcaagtag taagcttgag      60
tattctatag tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg     120
aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc     180
ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt     240
ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg     300
cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt     360
tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc     420
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa     480
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa     540
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc     600
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc     660
cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag     720
ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga     780
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc     840
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac     900
agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg     960
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca    1020
aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa    1080
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa    1140
ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt    1200
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag    1260
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat    1320
agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc    1380
cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa    1440
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca    1500
```

gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 1560
cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 1620
cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc ccctgttgtg caaaaaagcg 1680
gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc 1740
atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct 1800
gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc 1860
tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc 1920
atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc 1980
agttcgatgt aacccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc 2040
gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca 2100
cggaaatgtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt 2160
tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt 2220
ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca 2280
ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc tcgcgcgttt cggtgatgac 2340
ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat 2400
gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg 2460
cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 2520
ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggaaat tgtaagcgtt aatattttgt 2580
taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg 2640
gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt 2700
ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct 2760
atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatc aagtttttg gggtcgaggt 2820
gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct tgacggggaa 2880
agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc 2940
tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc 3000
tacagggcgc gtccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtgcg 3060
ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg 3120
ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata 3180
cgactcacta ta 3192

<210> 3
<211> 3191
<212> ADN
<213> Plásmido

<200>

<221> misc_feature
<222> (34)..(38)
<223> Sitio de restricción *Bgl*II incompleto

<400> 3

gggcgaattg gcggccgctc catgcaagcc taggatctcc ctcaagtagt aagcttgagt 60
attctatagt gtcacctaaa tagcttggcg taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga 120
aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc 180
tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc 240
cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc 300
ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt 360
cggctgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca 420
ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa 480
aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat 540
cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 600
cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc 660
gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 720
tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac 780
cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg 840
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca 900
gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc 960
gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa 1020
accaccgctg gtagcggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa 1080
ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac 1140
tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta 1200
aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt 1260
taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcatccata 1320
gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc 1380
agtgctgcaa tgataccgcg agacccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac 1440
cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 1500
tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac 1560
gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc 1620
agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc cctgttgtgc aaaaaagcgg 1680
ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca 1740
tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 1800

tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct 1860
cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca 1920
tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 1980
gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 2040
tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac 2100
ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 2160
attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa ataggggttc 2220
cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat 2280
taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg 2340
gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg 2400
ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc 2460
ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac 2520
cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt gtaagcgtta atattttgtt 2580
aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatttttt aaccaatagg ccgaaatcgg 2640
caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg 2700
gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa aaaccgtcta 2760
tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agttttttgg ggtcgaggtg 2820
ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagcccccga tttagagctt gacggggaaa 2880
gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcgggcg ctagggcgct 2940
ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc gccgcgctta atgcgccgct 3000
acagggcgcg tccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcggtgcgg 3060
gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg 3120
gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga attgtaatac 3180
gactcactat a 3191

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar si un sujeto humano tiene una función de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN alterada, en el que dicho método comprende

a) cultivar fibroblastos primarios derivados de una muestra de tejido constitutivo no neoplásico de dicho sujeto humano,
b) producir un extracto de proteínas nucleares a partir de dichas células fibroblásticas primarias cultivadas de dicho sujeto humano,
c) proporcionar extractos de proteínas nucleares competentes en MMR MMR+/+ y carentes de MMR MMR-/- de líneas celulares como controles positivos y negativos, respectivamente,
d) combinar cada uno de los extractos de proteínas nucleares con al menos un sustrato de ADN heterodúplex que alberga emparejamiento incorrecto en diferentes viales,
e) realizar un ensayo de reparación de emparejamientos incorrectos sobre los extractos de proteínas nucleares y
f) determinar cuantitativamente la capacidad del extracto de proteínas nucleares de células fibroblásticas primarias de reparar dicha molécula de ADN sustrato, en el que una disminución en la eficacia de reparación en comparación con el control positivo es una indicación de una función de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN alterada en el sujeto.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sustrato se obtiene de un plásmido que tiene la SEQ ID NO: 1.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho sustrato comprende además una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho extracto nuclear carente de MMR se obtiene de una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células HCT116 y LoVo.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cantidad total de extracto nuclear por vial está en el intervalo de 50-500 µg o 50-200 µg.

6. Un método *in vitro* para diagnosticar el síndrome de Lynch en un sujeto humano siguiendo el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células fibroblásticas primarias son de una muestra clínica obtenida de un tejido constitutivo no neoplásico de un sujeto humano.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el gen de reparación de emparejamientos incorrectos de ADN se selecciona del grupo que consiste en MLH1, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3, PMS1, PMS2 y EXO1.

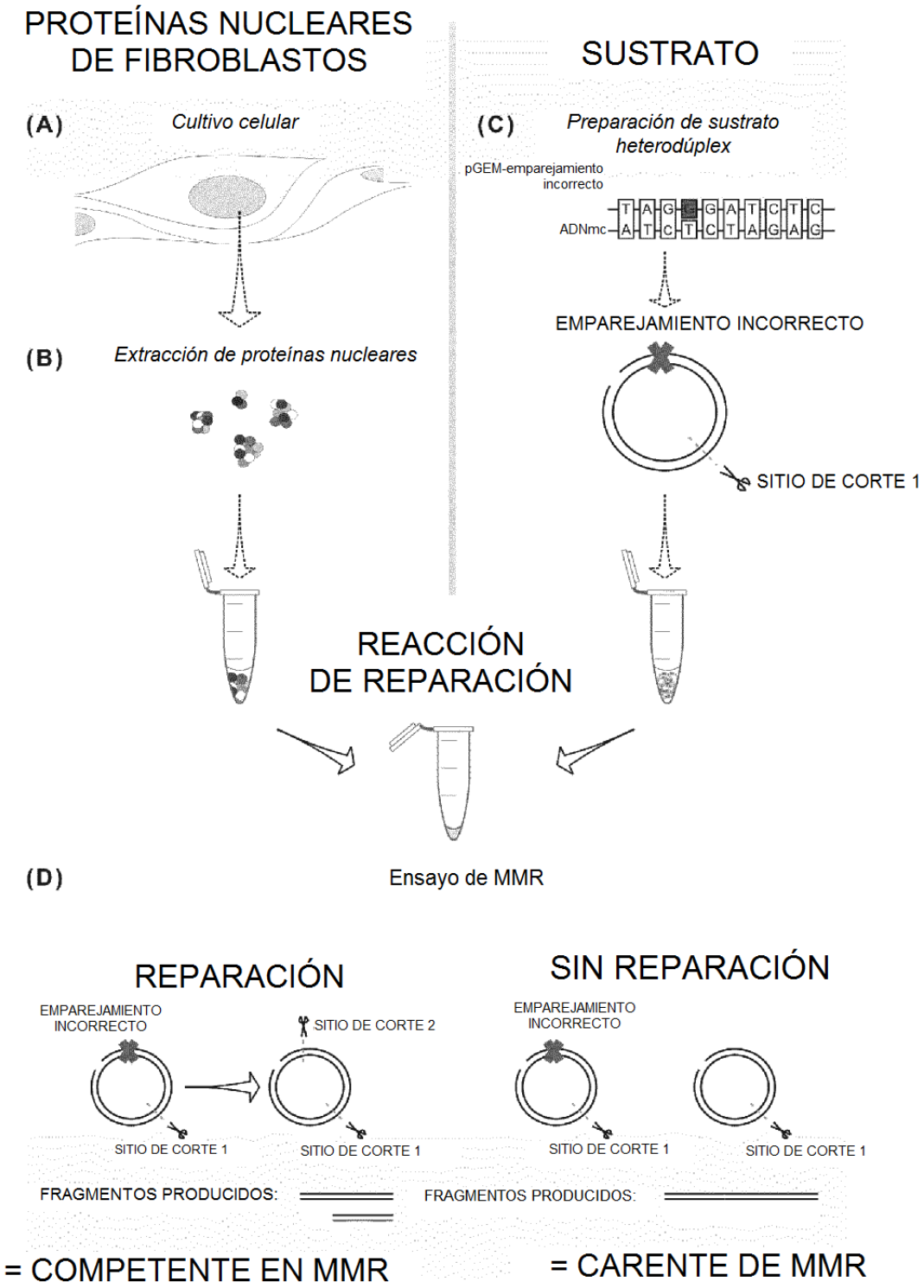

PROTEÍNAS NUCLEARES DE FIBROBLASTOS
SUSTRATO
(A)
Cultivo celular
(C)
Preparación de sustrato heterodúplex
pGEM-emparejamiento incorrecto
ADNmc
EMPAREJAMIENTO INCORRECTO
(B)
Extracción de proteínas nucleares
SITIO DE CORTE 1
REACCIÓN DE REPARACIÓN
(D)
Ensayo de MMR
REPARACIÓN
SIN REPARACIÓN
EMPAREJAMIENTO INCORRECTO
SITIO DE CORTE 2
SITIO DE CORTE 1
SITIO DE CORTE 1
EMPAREJAMIENTO INCORRECTO
SITIO DE CORTE 1
SITIO DE CORTE 1
FRAGMENTOS PRODUCIDOS:
FRAGMENTOS PRODUCIDOS:
= COMPETENTE EN MMR
= CARENTE DE MMR

Fig. 1

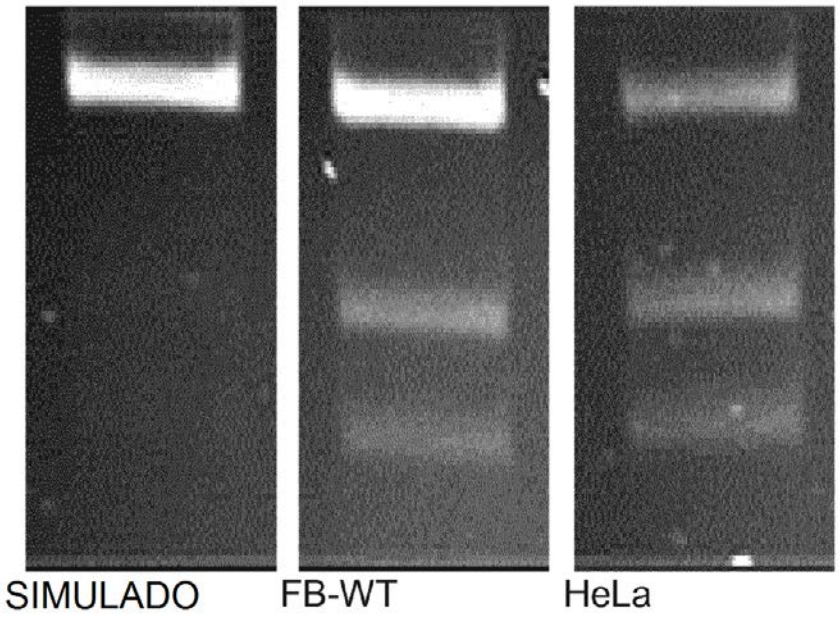


Fig. 2

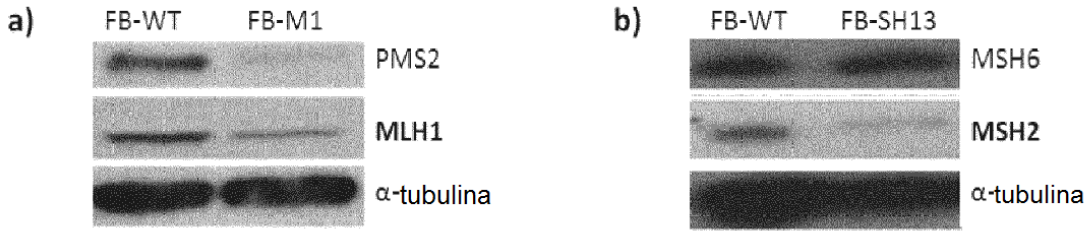


Fig 3.

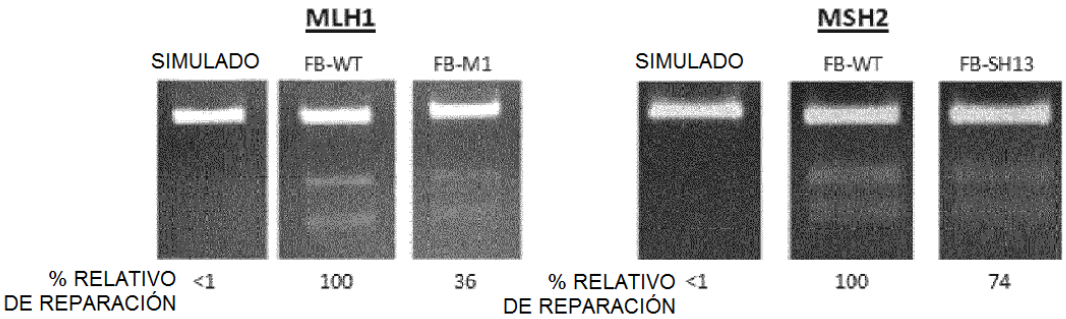


Fig 4.

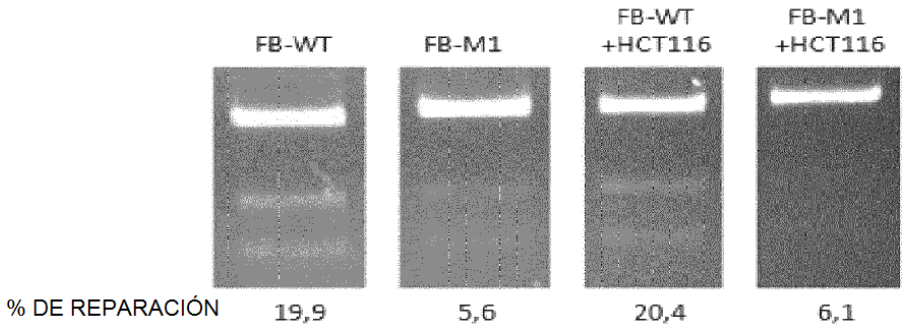
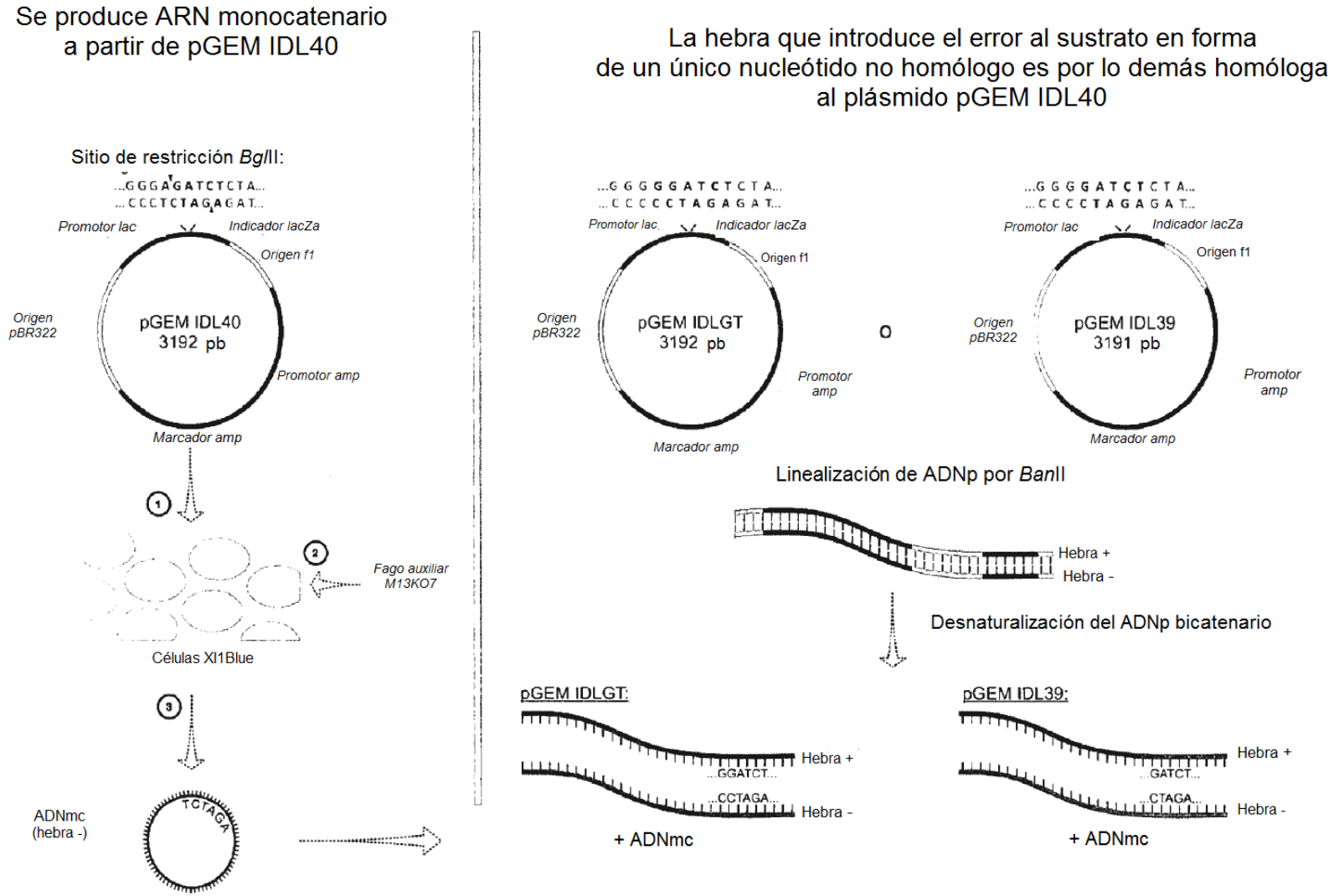


Fig 5.

Fig. 6


Se produce ARN monocatenario
a partir de pGEM IDL40
Sitio de restricción *Bgl*II:
...GGGAGATCTCTA...
...CCCTCTAGAGAT...
Promotor lac
Indicador lacZa
Origen f1
Origen pBR322
pGEM IDL40
3192 pb
Promotor amp
Marcador amp
1
2
Fago auxiliar M13KO7
Células XI1Blue
3
ADNmc
(hebra -)
TCTAGA
La hebra que introduce el error al sustrato en forma
de un único nucleótido no homólogo es por lo demás homóloga
al plásmido pGEM IDL40
...GGGGGATCTCTA...
...CCCCCTAGAGAT...
Promotor lac
Indicador lacZa
Origen f1
Origen pBR322
pGEM IDLGT
3192 pb
Promotor amp
Marcador amp
o
...GGGGATCTCTA...
...CCCCTAGAGAT...
Promotor lac
Indicador lacZa
Origen f1
Origen pBR322
pGEM IDL39
3191 pb
Promotor amp
Marcador amp
Linealización de ADNp por *Ban*II
Hebra +
Hebra -
Desnaturalización del ADNp bicatenario
pGEM IDLGT:
Hebra +
...GGATCT...
...CCTAGA...
Hebra -
+ ADNmc
pGEM IDL39:
Hebra +
...GATCT...
...CTAGA...
Hebra -
+ ADNmc

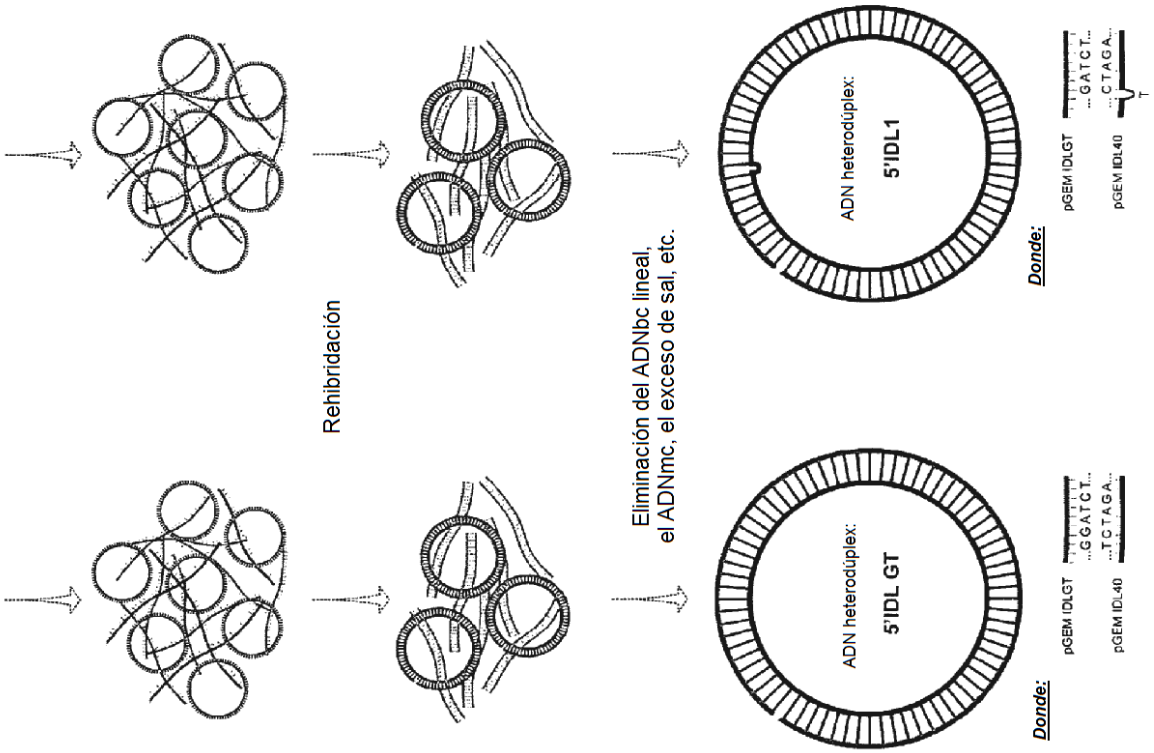

Rehibridación
Eliminación del ADNbc lineal,
el ADNmc, el exceso de sal, etc.
ADN heterodúplex:
5'IDL GT
ADN heterodúplex:
5'IDL1
Donde:
pGEM IDLGT
...GGATCT...
...TCTAGA...
pGEM IDL40
Donde:
pGEM IDLGT
...GATCT...
...CTAGA...
pGEM IDL40
T

Fig. 6 cont.