



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação Em Oncologia

ANNA BEATRIZ RIBEIRO ELIAS

Avaliação funcional de variantes de *BRCA1* localizados no domínio
coiled-coil.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação Em Oncologia

ANNA BEATRIZ RIBEIRO ELIAS

Avaliação funcional de variantes de *BRCA1* localizados no domínio
coiled-coil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho.

**RIO DE JANEIRO
2018**

E42c Elias, Anna Beatriz Ribeiro

Avaliação funcional de variantes de BRCA1 localizados no domínio coiled-coil./
Anna Beatriz Ribeiro Elias. – Rio de Janeiro, 2018.
109f. il. col.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar
Gomes da Silva, 2018.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho

1. Gene BRCA1. 2. Protína do Grupo de Complementação N da Anemia de
Fanconi. 3. Neoplasias da mama. I. Carvalho, Marcelo Alex.
(Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. III.
Título.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação Em Oncologia

ANNA BEATRIZ RIBEIRO ELIAS

Avaliação funcional de variantes de *BRCA1* localizados no domínio
coiled-coil.

ORIENTADOR: Marcelo Alex de Carvalho

Aprovada em: ____/____/____

:

EXAMINADORES

**Prof. Dr. Martin Bonamino
Prof. Dr. Rafael Dias de Mesquita
Dra. Patrícia Possik
Prof. Dr. Francisco M. Bastos de Oliveira
Prof. Dr. Julio Cesar M. de Freitas Junior**

**RIO DE JANEIRO
2018**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por cada oportunidade e desafio que tenho vivido, com os quais eu tenho crescido e amadurecido.

Agradeço aos meus pais, Solange e Mario, por todo o amor e dedicação que me proporcionaram. Por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todas as minhas escolhas e não medindo esforços para sempre estarem me ajudando de todas as maneiras possíveis. Sempre torcendo por mim da forma mais verdadeira. Obrigada, meus pais, por todo os ensinamentos que me deram. Eu amo muito vocês.

Aos meus familiares que também sempre me apoiaram e torceram muito por mim. Agradeço todos os dias pela incrível família que Deus me deu.

Ao Professor Guilherme Kurtz por todo o convívio e ensinamento ao longo de todo esse tempo.

Agradeço ao meu orientador Marcelo Alex de Carvalho por ter confiado em mim como sua aluna e por ter me ajudado no momento turbulento de transição. Por todo o ensinamento e conhecimento que me passou. Agradeço muito também por todas as conversas, conselhos e o apoio ao longo desse tempo. A sua preocupação e dedicação constantes com a gente (como alunos e como pessoas) é admirável, e todos nós somos muito gratos a isso.

Agradeço aos meus amigos do INCA. Thiago por ter se tornado esse irmão que a faculdade apresentou e o INCA fortaleceu. Já são anos de amizade, muitas conversas e risadas jogadas fora, muitas citações de Friends, muita implicância e muitos conselhos. Obrigada por me ouvir e pelo seu apoio sempre. Vanessa, por ser uma amiga tão dedicada, pelos puxões de orelha e conselhos que me ajudaram muito no meu amadurecimento profissional e pessoal, por todas as brincadeiras e por cada música cantada junto. Babi, por ser essa amiga incrível, companheira para as horas de risada, para as de tristeza, de ansiedade e de academia. Agradeço por cada desabafo que você ouviu, por todos os conselhos que você me deu, por todos os açaís, brincadeiras e muitas risadas. Thales, muito obrigada por todo o ensinamento passado nesse tempo, pela paciência e dedicação comigo e por todas as implicâncias também. Renata, obrigada também por cada conversa e conselho que você me deu. Agradeço à Giu, que apesar de longe, eu não poderia deixar de ser grata por toda a dedicação e atenção que me deu, principalmente na minha mudança de projeto. Obrigada pela paciência e todos os lanchinhos nos cafés. Estamos com saudades. Agradeço também à Bruna, à Ricceli, à Vitoria e ao Evandro por todas as brincadeiras e risadas. Vocês são uma segunda família para mim e obrigada por tornarem meu dia a dia tão maravilhoso. Por criarem um ambiente tão incrível e por compartilharem minhas alegrias e algumas lágrimas também. Vocês me ajudaram muito quando mais precisei, vocês não têm ideia. Por isso, muito obrigada!

Às amigas de faculdade, Natália e Paolla, apesar de não termos mais o convívio diário, vocês estão sempre presentes na minha vida, por todas as risadas de perder o fôlego quando estamos juntas. Adoro vocês.

Agradeço também a todos os membros da banca examinadora por terem aceitado meu convite e dedicado o seu tempo a este momento tão importante para mim.

Agradeço à Pós-Graduação do INCA tanto pela oportunidade e quanto pela contribuição para a minha formação profissional até hoje.

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.

(William Shakespeare)



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Avaliação funcional de variantes de *BRCA1* localizados no domínio *coiled-coil*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anna Beatriz Ribeiro Elias

A maioria dos casos de câncer de mama pode ser atribuída a alterações em *BRCA1*, um gene crucial para a manutenção da integridade genômica. O sequenciamento desse gene ajuda, não apenas na identificação precoce de indivíduos com alto risco de desenvolvimento de câncer, mas também na orientação de indivíduos afetados quanto à adoção de rotinas preventivas. Entretanto, muitas das mutações identificadas em estudos genéticos não podem ser classificadas pois não apresentam uma designação clara da sua associação com a doença. Nesses casos, as mutações permanecem não classificadas. Ensaio funcionais podem ajudar a contornar esse problema. Esse trabalho busca avaliar funcionalmente variantes *missense* de *BRCA1* na região *coiled-coil*, usando duas abordagens: a capacidade de ativação transcricional e a interação com *PALB2*. Um grupo inicial de variantes *missense* de *BRCA1* (grupo 1, 7 variantes) foi selecionado a partir dos dados do *Breast Cancer Information Core*, todos de ocorrência natural na população e ainda não avaliados funcionalmente. Um segundo grupo de 14 variantes *missense* (grupo 2) foi selecionado após a realização de uma predição *in silico*, considerando os variantes naturais *missense* na região. A importância da posição para a interação com *PALB2* e o risco elevado de associação com o câncer foram usados como critérios de inclusão. Os variantes foram gerados através de mutagênese sítio dirigida e os ensaios foram realizados em células HEK293FT. Os variantes do grupo 1 apresentaram níveis de ativação transcricional semelhantes aos observados para a proteína selvagem.. Entretanto, no ensaio de interação com *PALB2*, os variantes M1400V, A1416T apresentaram um perfil patogênico sugestivo. Considerando o grupo 2, o ensaio de ativação transcricional indicou um comportamento patogênico para os variantes L1407F, L1407H, L1407I, L1407R, L1407V, M1411K, M1411R, M1411V, L1418F e L1418S. No ensaio de interação com *PALB2*, apenas os variantes L1407R, L1407V, M1411R, L1418S e L1418V demonstraram o mesmo perfil sugestivo. As duas abordagens usadas contribuem para a construção de um perfil de comportamento funcional para os variantes, no entanto, análises adicionais são necessárias para uma classificação final.

Palavras chaves: *BRCA1*; Variantes; *PALB2*; Avaliação funcional, Câncer de mama.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Avaliação funcional de variantes de *BRCA1* localizados no domínio *coiled-coil*

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anna Beatriz Ribeiro Elias

The majority of hereditary cases of breast cancer can be attributed to alterations in *BRCA1*, a crucial gene for the maintenance of genome integrity. Its sequencing helps not only in the early identification of individuals in high-risk of developing cancer, but also helps affected individuals to seek guidance and to adopt preventive procedures. However, many of the mutations found in genetic studies cannot be classified because they do not have a clear designation regarding cancer association. In these cases, mutations remain as variants of unknown significance. Functional assays may work to circumvent this problem. This work goal was to functional evaluate *BRCA1* missense variants coded in the *coiled-coil* region using two approaches: the evaluation of *BRCA1* transcriptional activation ability and its competence to interact with PALB2. An initial set of *BRCA1* variants (group 1, 7 variants) was identified in the Breast Cancer Information Core database, all *missense* variants of natural occurrence in population and not functionally evaluated yet. A second set of 14 missense variants (group 2) was selected after an *in silico* prediction considering natural missense variants in the region. The position in the coiled-coil structure and the prediction for cancer association were used as inclusion criteria. Variants were generated by site-directed mutagenesis and the assays were performed in HEK293FT cells. Group 1 variants showed levels of transcriptional activation similar to the wild-type protein. However, two variants (M1400V and A1416T) presented a pathogenic profile when evaluated using the PALB2 interaction assay. Considering group 2, the TA assay indicated a pathogenic profile for variants L1407F, L1407H, L1407I, L1407R, L1407V, M1411K, M1411R, M1411V, L1418F and L1418S. In the PALB2 interaction assay, only the variants L1407R, L1407V, M1411R, L1418S and L1418V showed the same suggestive profile. Both approaches contribute to built variants functional behavioral profile, however, further analyzes are required for a final classification.

Key words: *BRCA1*; Variants; PALB2; Functional Assay, Breast cancer

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Câncer.....	15
1.1.1	Câncer de mama	16
1.1.2	Câncer de mama hereditário	18
1.2	BRCA1	20
1.2.1	Os domínios BRCT	21
1.2.2	O domínio <i>coiled-coil</i>	23
1.2.3	O reparo ao dano de DNA	25
1.3	PALB2	26
1.4	Variantes genéticos de BRCA1	27
1.5	Ensaio funcionais para classificação de variantes de <i>BRCA1</i>	35
1.5.1	Ensaio de ativação transcricional como um modelo de avaliação funcional de BRCA1.....	36
1.5.2	Ensaio de interação entre BRCA1 e PALB2.....	38
2	OBJETIVO	42
2.1	Objetivo geral	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	METODOLOGIA	43
3.1	Determinação de variantes naturais <i>missense</i> no domínio <i>coiled-coil</i> de BRCA1.....	43
3.2	Avaliação dos variantes <i>missense</i> em modelos de predição <i>in silico</i>	43
3.3	Identificação de variantes <i>missense</i> no <i>coiled-coil</i> de BRCA1 já descritos e estudados na população.	43
3.4	Critérios de escolha dos variantes a serem estudados	44
3.5	Geração das construções plasmidiais.....	44
3.5.1	Geração das construções selvagens.....	44
3.5.2	Geração dos variantes.....	48
3.6	Indução de competência bacteriana	52
3.7	Transformação bacteriana	52
3.8	Extração de plasmídeos.....	53
3.9	Sequenciamento automático.....	53
3.10	Cultura <i>in vitro</i> de células humanas	53
3.11	Transfecção de células humanas.....	53

3.12	Ensaio funcionais	54
3.12.1	Ensaio de atividade transcricional	54
3.12.2	Ensaio de interação entre BRCA1 e PALB2	58
3.13	Extração de proteínas	58
3.14	Immunoblotting.....	59
3.15	Análise estatística	60
4	RESULTADOS	60
4.1	Seleção dos variantes <i>missense</i> no <i>coiled-coil</i> de BRCA1	60
4.2	Geração dos variantes de <i>BRCA1</i>	61
4.3	Análise do perfil de síntese das proteínas quiméricas	61
4.4	Avaliação da capacidade de ativação transcricional dos variantes <i>missense</i>	66
4.5	Avaliação da capacidade de interação dos variantes <i>missense</i> com a proteína PALB2.....	69
5	DISCUSSÃO.....	78
6	CONCLUSÃO.....	87
7	BIBLIOGRAFIA.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Reação de amplificação por rotina de PCR	49
Tabela 3.2: Oligonucleotídeos iniciadores* (<i>primers</i>) utilizados para a geração dos variantes do estudo	51
Tabela 3.3: Concentração transfectadas de cada construção utilizadas nos ensaios funcionais.....	57
Tabela 4.1 - Análises <i>in silico</i> dos variantes naturais <i>missense</i> localizados no domínio <i>coiled-coil</i> de BRCA1 selecionados para o estudo.....	63
Tabela 5.1: Identificação do perfil sugestivo dos variantes do estudo.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Os tipos de câncer mais incidente no mundo.....	17
Figura 1.2 – Distribuição dos tipos mais incidentes de câncer no Brasil.....	17
Figura 1.3: Representação estrutural da proteína BRCA1 e seus parceiros de interação.....	22
Figura 1.4 – Estrutura do domínio tBRCT de BRCA1 (modelo de fitas).....	24
Figura 1.5 – Os quatro complexos formados por BRCA1.....	28
Figura 1.6 – Esquema ilustrativo das vias de reparo de DSB.....	29
Figura 1.7 - PALB2 e seus parceiros de interação.....	30
Figura 1.8 - Modelo preditivo da interação entre os domínios <i>coiled-coil</i> de PALB2 e BRCA1.....	31
Figura 1.9 – Representação de um modelo multifatorial para a classificação de um VNC.....	37
Figura 1.10 – Esquema ilustrativo do ensaio de TA para BRCA1.....	40
Figura 1.11 – Representação esquemática do ensaio de interação entre BRCA1 e PALB2 para avaliação de variantes de BRCA1 no <i>coiled-coil</i>	41
Figura 3.1. Representação esquemática da construção plasmidial codificante de BRCA1 e da proteína quimérica.....	46
Figura 3.2 – Representação esquemática da construção plasmidial de PALB2 e da proteína quimérica.....	47
Figura 3.3 – Programa da rotina de PCR.....	49
Figura 3.4. Representação esquemática da mutagênese sítio dirigida.....	50
Figura 3.5: Representação esquemática dos vetores pG5luc e pGR-TK.....	56
Figura 4.1 - Esquema representativo dos diferentes conjuntos de variantes identificados e selecionado para o estudo.....	62
Figura 4.2 – Síntese das proteínas de fusão VP16:PALB2 e GAL4DBD:BRCA1 _{11/24} do primeiro grupo.....	64
Figura 4.3 – Síntese das proteínas quiméricas GAL4DBD:BRCA1 _{11/24} do segundo grupo.....	65
Figura 4.4: Proteína quimérica GAL4DBD:BRCA1 _{11/24} e as localizações dos variantes do estudo.....	67
Figura 4.5 - Análise da capacidade de ativação transcricional dos variantes do primeiro grupo.....	68

Figura 4.6 – Análise da capacidade de ativação transcricional dos variantes do segundo grupo.....	70
Figura 4.7 – Análise da capacidade de ativação transcricional por posição dos variantes do segundo grupo.....	71
Figura 4.8 - Análise da capacidade de interação dos variantes do primeiro grupo com PALB2.....	72
Figura 4.9 - Análise da capacidade de interação dos variantes do segundo grupo com PALB2.....	74
Figura 4.10 – Análise da capacidade de interação com PALB2 por posição dos variantes do segundo grupo.....	75
Figura 4.11 - Análise comparativa da capacidade de interação com PALB2 em relação a atividade transcricional dos variantes do primeiro grupo.....	76
Figura 4.12 - Análise da capacidade de interação com PALB2 dos variantes do segundo grupo.....	77
Figura 5.1 – Representação esquemática dos éxons de <i>BRCA1</i> e os diferentes contextos analisados.....	82

LISTA DE ANEXOS

Anexo 4.1 - Tabela com todos os variantes naturais <i>missense</i> possíveis na região do <i>coiled-coil</i> de BRCA1.....	100
--	-----

LISTA DE ABREVIÇÃO

°C – graus Celsius
aa – aminoácido (s)
ATM- *Ataxia Telangiectasia Mutated*
BACH1 – *BTB and CNC homology 1*
BARD1 – *BRCA1- associated ring domain 1*
BRCA1 – *Breast cancer 1, early onset*
BRCA2 – *Breast cancer 2, early onset*
BRCT – *BRCA1 C terminus*
CHEK2 – *Chekpoin Kinase 2*
CtIP – *C-terminal Binding Protein (CtBP) Interacting Protein*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO – densidade óptica
EDTA - ácido etilenodiamina tetraacético
g – gravidade ($g = 9,8 \text{ cm/s}^2$)
Gly – Glicina
HR – Recombinação homóloga
IARC – *International Agency for Research on Cancer*
IgG – imunoglobulina G
INCA – Instituto Nacional de Câncer
kb - quilobases
kV - quilovolts xii
Lys – Lisina
M - molar
min – minuto (s)
mL - mililitro
mM - milimolar
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NHEJ – Recombinação não homóloga
nm - nanômetros
OMS – Organização Mundial de Saúde
p/v – peso por volume
PBS – tampão fosfato-salino
pH – potencial hidrogeniônico
PTEN – *Phosphatase and Tensin Homolog*
RDD – Reparo ao Dano de DNA
RING – *Real Interesting New Gene* (domínio protéico)
RNA – ácido ribonucleico
SDS – dodecil sulfato de sódio
Ser – Serina
SHCMO – Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário
tBRCT – Domínio BRCT em tandem
TP53 – *Tumor Protein p53*
v/v – volume por volume
VNC – Variantes não classificados
WHO – *World Health Organization*
 μm – micrômetros
 μmol - micromol

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o termo utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças genéticas que apresentam como característica em comum, o crescimento desordenado de células que, eventualmente, são capazes de invadir tecidos e órgãos, se espalhando para outras regiões do corpo (INCA, 2017).

As neoplasias podem ter origem esporádica ou hereditária, sendo este último responsável por 5-10% dos casos (Nagy *et al.*, 2004). Já os casos esporádicos possuem como principal causa fatores ambientais, como o tabagismo, a exposição a fatores mutagênicos, a obesidade e hábitos alimentares (NCBI, 2017).

Esta doença é um problema de saúde pública globalizado, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, 8,8 milhões de pessoas morrem em decorrência do câncer no mundo. O número de novos casos em 2012 foi superior a 14 milhões e estima-se um aumento de 70% neste número nas próximas duas décadas. Este aumento ocorre, principalmente, em razão da maior expectativa de vida global da população, do avanço e da melhoria no diagnóstico da doença e no aumento da exposição a fatores ambientais como o cigarro e o álcool (IARC, 2017; WHO, 2017).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) prevê mais de 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2018-2019 no Brasil, incluindo todas as neoplasias. Ainda segundo o INCA, os cinco tipos de tumores mais incidentes para o sexo masculino nesse mesmo período serão o câncer de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Já para o sexo feminino, destacam-se os tumores de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4%) como os cinco tipos de tumor mais incidentes (INCA, 2018).

1.1.1 Câncer de mama

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer de mama é a neoplasia mais incidente em mulheres nos países em desenvolvimento e desenvolvidos (WHO, 2017), apresentando altas taxas de mortalidade (**Figuras 1.1 e 1.2**). As estimativas da GLOBOCAN para o ano de 2012 indicam 1,67 milhões de mulheres diagnosticadas com câncer de mama e 522 mil casos de óbito no mundo, um aumento na incidência e na mortalidade de 18% desde 2008 (GLOBOCAN, 2018).

O câncer de mama é multifatorial e está relacionado com a urbanização da sociedade, afetando principalmente mulheres de classe social mais elevada (KEY *et al*, 2001; INCA, 2017). É uma neoplasia que apresenta fatores etiológicos e patogênicos muito heterogêneos (Tao *et al*, 2015), que podem ser divididos em dois grupos: os ambientais e os individuais.

Os fatores ambientais são responsáveis por aproximadamente 60% dos casos de câncer de mama e são constituídos por agentes físicos, químicos e biológicos capazes de gerar danos ao genoma (AMENDOLA e VIEIRA, 2005; Strumylaitė *et al*, 2010). Por exemplo, a exposição à radiação ionizante, que mesmo em baixas doses, aumenta o risco do desenvolvimento da doença. Este risco é ainda mais acentuado em indivíduos expostos no período da puberdade, uma vez que os seios ainda estão em desenvolvimento (KEY *et al*, 2001).

Já os fatores individuais são bem variados. Entretanto, acredita-se que os de maior importância sejam o gênero e a idade. O desenvolvimento do câncer de mama é raro em mulheres abaixo dos 35 anos, porém, observa-se um grande aumento no risco em mulheres entre 35 e 50 anos. Após esta idade, o risco continua elevado, porém o seu aumento não é tão acentuado (PRUTHI, 2010; Strumylaitė *et al*, 2010; INCA, 2017).

Outros fatores individuais estão relacionados com o estilo de vida, como por exemplo o padrão de dieta (consumo de alimentos muito calóricos, ricos em proteínas e em gorduras animais, carne vermelha e processada, ingestão de álcool), que pode aumentar o risco do desenvolvimento do câncer de mama. A vida reprodutiva da mulher é outro fator individual, onde um maior risco de

desenvolvimento da doença está relacionado com o número de ciclos ovarianos ao longo da vida da mulher.

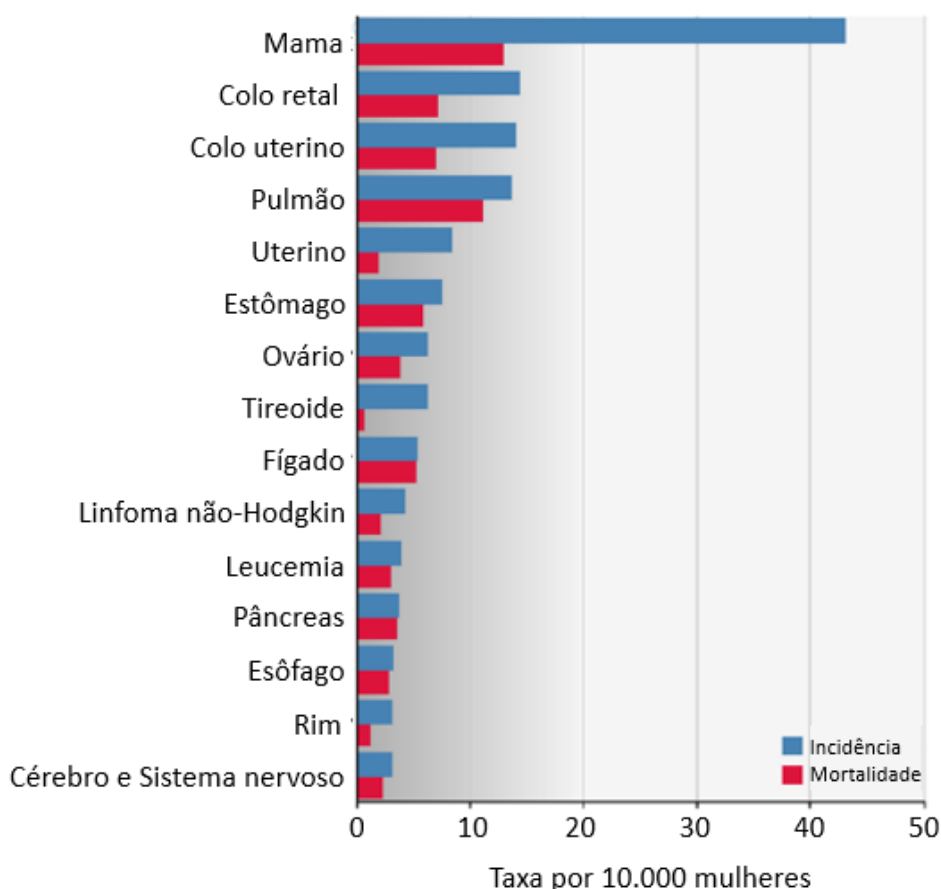


Figura 1.1 – Os tipos de câncer mais incidente no mundo. Estimativas da incidência e mortalidade globais de câncer (exceto câncer de pele não melanoma) entre mulheres para o ano de 2012. Taxas representadas a cada 10.000 mulheres. Adaptado de WHO, 2017.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Próstata	61.200	28,6%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Colo do útero	16.340	7,9%	
Colón e Reto	16.660	7,8%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
Estômago	12.920	6,0%		Estômago	7.600	3,7%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Corpo do útero	6.950	3,4%	
Esôfago	7.950	3,7%		Ovário	6.150	3,0%	
Bexiga	7.200	3,4%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
Laringe	6.360	3,0%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
Leucemias	5.540	2,6%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%					

Figura 1.2 – Distribuição dos tipos mais incidentes de câncer no Brasil. Distribuição dos 10 tipos mais incidentes de câncer para homens e mulheres no

Brasil no ano de 2016, exceto câncer de pele não melanoma, Adaptado de INCA, 2017.

A menarca precoce, primeira gestão após os 30 anos, menopausa tardia, uso de anticoncepcionais e terapias hormonais levam ao aumento do risco do desenvolvimento do câncer de mama. Em contrapartida, a amamentação e exercício físico podem ajudar na prevenção da doença, diminuindo o risco (KEY *et al*, 2001; PRUTHI *et al*, 2010; INCA, 2017; IARC, 2017).

Além disso, a hereditariedade é outro fator individual, que sozinho, é responsável por cerca de 5-10% de todos os casos de câncer de mama. Mulheres que apresentam histórico familiar da doença podem apresentar até 85% de risco de desenvolver essa neoplasia ao longo da vida. Um risco bem elevado quando comparado com o estimado para o restante da população, cerca de 13% (CARVALHO *et al.*, 2007, PRUTHI *et al*, 2010; ENGEL e FISCHER, 2015).

1.1.2 Câncer de mama hereditário

Fatores hereditários favorecem o aparecimento do câncer de mama em pacientes jovens, diferentemente dos casos de origem esporádica que possuem uma maior probabilidade de ocorrência com o avanço da idade (Ellisen and Haber, 1998). Predições epidemiológicas calculam que 36% dos casos de câncer de mama diagnosticados em mulheres abaixo de 30 anos estão relacionados a deficiências genéticas que são essenciais para o desenvolvimento da doença (Ellisen and Haber, 1998). Isso tem uma grande importância clínica, uma vez que os exames de prevenção, como a mamografia, só se tornam rotinas na vida das mulheres entre os 40 e 49 anos de idade (CALVOCORESSI *et al*, 2011).

Nos anos 1990, estudos baseados nos históricos familiares de câncer de mama, e conseqüentemente no elevado risco de desenvolvimento da doença, foram fundamentais para uma maior compreensão da relação entre a hereditariedade e a doença. Hall e colaboradores estudaram 23 famílias com histórico de câncer familiar e estabeleceram uma relação entre a neoplasia e um *locus* gênico presente no cromossomo 17 (HALL *et al*; 1990). Em 1993, Easton e colaboradores realizaram um outro estudo com 214 famílias, ratificando a

associação entre essa forma de câncer e o cromossomo 17, inferindo a existência de um gene associado a essa susceptibilidade (EASTON *et al*, 1993). No ano seguinte, Miki e colaboradores mapearam e clonaram o primeiro gene determinante para predisposição hereditária ao câncer de mama, *BRCA1* (*Breast Cancer Susceptibility Gene 1*) (MIKI *et al.*, 1994). Ainda em 1994, Wooster e colaboradores mapearam um segundo gene de susceptibilidade, o *BRCA2* (*Breast Cancer Susceptibility Gene 2*) (WOOSTER *et al*, 1994).

BRCA1 e *BRCA2* não apresentam homologia nas sequências, porém ambos são genes supressores de tumor e possuem papéis fundamentais na manutenção da integridade genômica (SHARAN *et al*; 1997; WELCSH *et al*; 2002).

Mutações nas linhagens germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* são as principais causas da síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (SHCMO), responsáveis por mais de 30% dos casos (ECONOMOPOULOU *et al*, 2015; SCALIA-WILBUR *et al*, 2016). Essa é uma síndrome autossômica dominante caracterizada pelo surgimento do câncer em pacientes jovens com histórico familiar, principalmente em primeiro e segundo graus. Mulheres com disfunções em *BRCA1* e *BRCA2* têm um risco estimado de até 85 e 60%, respectivamente, para o desenvolvimento de câncer de mama (contra 13% da população geral) (EASTON *et al*, 1993, KOBAYASHI *et al*, 2013; SHIOVITZ e KORDE, 2015).

Além de *BRCA1* e *BRCA2*, outros genes também podem contribuir para uma maior predisposição como, por exemplo, *PALB2*, *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN* e *SKT11*. Esses genes não contribuem exclusivamente para o risco em câncer de mama, mas também para o risco de outras neoplasias (KOBAYASHI *et al*, 2013; MERSCH *et al*, 2014; ECONOMOPOULOU *et al*, 2015; SCALIA-WILBUR *et al*, 2016).

A determinação do risco de câncer de mama hereditário vem se tornando essencial nas rotinas de prevenção e também de tratamento, reflexo do crescente número de ações preventivas disponíveis para indivíduos em risco e familiares. Por exemplo, a quimioterapia e a cirurgia profiláticas, e a intensificação de exames de monitoramento (SIFRI *et al.*, 2004; WOODS *et al*, 2016).

1.2 BRCA1

O gene *BRCA1* possui mais de 80 Kb e está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21). É composto por 24 éxons, dos quais 22 são codificantes. É um gene expresso na maioria dos tecidos e codifica uma proteína de mesmo nome com 1863 resíduos de aminoácidos e 220 KDa (MIKI *et al*, 1994; SMITH *et al*, 1996; ROSEN e PISHIVAIAN, 2014).

A análise estrutural da proteína BRCA1 revela a existência de vários motivos estruturais conservados entre os diferentes ortólogos (SZABO *et al*, 2004).

Na região N-terminal de BRCA1 (**Figura 1.3**), o domínio RING-finger (*Really Interesting New Gene*), também encontrado em diversas outras proteínas, possui atividade E3-ubiquitina-ligase que é potencializada com a interação com BARD1 – o principal parceiro de interação de BRCA1 (WU *et al*; 1996; BRZOVIC *et al*; 2001; BAER e LUDWIG, 2002; XIA *et al*; 2003 WU-BAER *et al*; 2003; PAUL e PAUL, 2015).

A região central da proteína (**Figura 1.3**), codificada pelos éxons 11, 12 e parte do éxon 13, corresponde a aproximadamente 65% do seguimento proteico (CLARK *et al*, 2012). Esta é uma região menos conservada e não apresenta uma estrutura bem definida. Esse tipo de conformação é característica de proteínas que funcionam como um arcabouço para a geração de complexos, onde as regiões desestruturadas permitem a flexibilização da ligação entre domínios de uma mesma molécula, favorecendo diversas interações (SAVAGE e HARKIN, 2015).

A região central de BRCA1 é conhecida por interagir com diversas proteínas presentes em vias envolvidas no reparo ao DNA, no controle do ciclo celular e no controle de transcrição, como, por exemplo, a proteína Retinoblastoma (Rb), c-Myc, RAD50 e RAD51 (CLARK *et al*, 2012; PAUL e PAUL, 2015).

Nessa mesma região são encontrados dois sinais de localização nuclear (resíduos 503 ao 509 e 606 ao 615) que direcionam a proteína para o núcleo, além de um sinal de exportação nuclear (resíduos 81 ao 99) e sítios de fosforilação (resíduos S1453, S1457, S1525) (DAPIC e MONTEIRO, 2006; YI *et al*, 2014).

Próximo a região C-terminal (**Figura 1.3**) está localizado o domínio *coiled-coil* (resíduos 1391 ao 1424), importante para a interação com PALB2 e para a manutenção da função supressora de tumor de BRCA1 (HU *et al*; 2000; YI *et al*, 2014; PRAKASH *et al*, 2015).

A região C-terminal de BRCA1 (**Figura 1.3**) encerra dois domínios BRCT (BRCA1 C-terminal) em tandem (resíduos 1650 ao 1859). Esta é uma região essencial para a manutenção da funcionalidade de BRCA1. A perda dos 11 últimos resíduos de aminoácidos é suficiente para a disfunção da proteína (MONTEIRO, *et al*, 1996; CARVALHO *et al*, 2007). Os domínios BRCT também são fundamentais na estruturação de diferentes complexos proteicos mediados por BRCA1 (JIANG e GREENBERG, 2015).

1.2.1 Os domínios BRCT

Os domínios BRCT são encontrados em diversas proteínas em diferentes organismos, de procaríotos até metazoários. Esses domínios foram primeiramente identificados em BRCA1 e, apesar de não possuírem atividade enzimática intrínseca, são fundamentais para a organização de complexo proteicos, em especial na resposta ao dano de DNA (RDD), participando na sinalização de dano e da maquinaria de reparo. (SHENG *et al*, 2011).

O domínio BRCT pode se apresentar como uma única unidade, como acontece em PARP1, ou em múltiplas repetições, como em TOPBP1 (GLOVER *et al*, 2004). Quando o BRCT se apresenta em repetições, é comum observar uma organização em pares, como ocorre em BRCA1, e são denominados BRCTs em tandem (tBRCT) (**Figura 1.3**). Este domínio, quando em tandem, funciona como uma única unidade estrutural (MESQUITA *et al*, 2010).

Os BRCTs se organizam como um domínio globular, composto por quatro folhas- β centrais paralelas flanqueadas por três hélices- α (**figura 1.4**). Quando em tandem (tBRCT), eles são conectados por uma região não estruturada denominada *linker* (MESQUITA *et al*, 2010; SHENG *et al*, 2011).

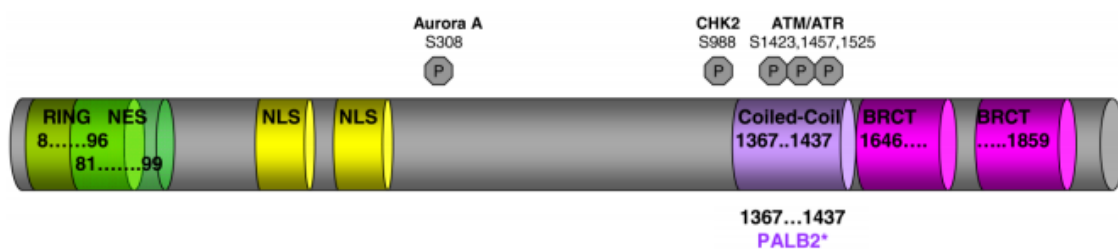


Figura 1.3: Representação estrutural da proteína BRCA1 e seus parceiros de interação. O segmento verde claro representa o domínio RING-finger; o segmento verde escuro, o sinal de exportação nuclear (NES) e em amarelo os sinais de localização nuclear (NLS). Os polígonos cinzas indicam os sítios de fosforilação (P), o segmento roxo representa o domínio *Coiled-coil* e os em rosa, os domínios BRCT. Adaptado de Christou *et al*, 2013.

Na região C-terminal de BRCA1, o tBRCT está limitado pelos resíduos de aminoácido 1650 a 1859, com um *linker* de 23 resíduos entre eles. A estrutura do domínio tBRCT de BRCA1 permite o reconhecimento de serinas fosforiladas através dos resíduos de Ser1655, Gly 1656 e Lys 1702. (WILLIAMS *et al*, 2004; PRAKASH *et al* 2015).

Alterações na estrutura do domínio tBRCT levam a uma redução nas taxas de recombinação homóloga e, conseqüentemente, a uma condição de maior susceptibilidade ao câncer (CLARK *et al*, 2012; PRAKASH *et al* 2015).

1.2.2 O domínio *coiled-coil*

O domínio *coiled-coil* apresenta uma estrutura de α -hélice e está presente na região C-terminal de BRCA1, também é conservado entre os ortólogos e encerra os resíduos 1391 a 1421 (HU *et al*; 2000). Este domínio é responsável pela interação de BRCA1 com parceiros como PALB2 (HU e LI, 2002; SY *et al*, 2009) (**Figura 1.3**).

O domínio *coiled-coil* de BRCA1 está presente dentro de uma região que alguns autores denominam de *Activation Domain 1* (AD1), compreendendo dos resíduos 1293 ao 1560, assim como o domínio tBRCT foi denominado de *Activation Domain 2* (AD2) (HU *et al*; 2000; HU & LI, 2002). O domínio *coiled-coil* foi identificado primeiramente por Hu e colaboradores em 2000 como fundamental para a atividade transcricional atuando de forma sinérgica quando junto com o domínio AD2 (HU *et al*; 2000).

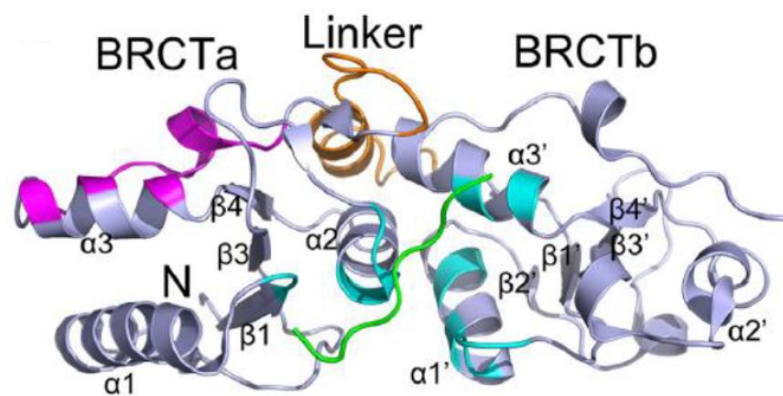


Figura 1.4 – Estrutura do domínio tBRCT de BRCA1 (modelo de fitas). Em azul observa-se a região *linker*, em rosa e laranja, regiões de interação com outras proteínas e em verde, destaque para a interação com um peptídeo fosforilado. Adaptado de Sheng *et al*, 2011.

1.2.3 O reparo ao dano de DNA

BRCA1 é uma proteína multifuncional, com diversos parceiros de interação em diferentes compartimentos celulares, quase sempre atuando como uma plataforma de coordenação de múltiplos complexos com diferentes funções. (DENG AND BRODIE, 2000). Ela exerce um papel fundamental na manutenção da integridade genômica, atuando na sinalização de dano ao DNA, no reparo do DNA, no controle do ciclo celular, no processo de ubiquitinação de proteínas, no remodelamento da cromatina, na apoptose, nos mecanismos de processamento de RNA e controle transcricional (MINAMI *et al*, 2014; SAVAGE & HARKIN, 2015; ALLI & FORD, 2015).

Quando ocorre a quebra da dupla fita (*double strand break* – DSB) do DNA, os eventos de RDD são fundamentais para que a integridade genômica seja preservada – e BRCA1 participa diretamente nesses processos. (SAVAGE & HARKIN, 2015).

A DSB pode ser reparada por duas vias distintas: por recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR) ou por recombinação não homóloga por junção de extremidades (*non-homologous end-joining* – NHEJ).

A HR utiliza a sequência da cromátide irmã não danificada como molde para reparar o dano, restaurando a sequência danificada ou perdida de maneira fidedigna, mas sua ação está limitada às fases S e G2 do ciclo celular. BRCA1 participa de ao menos 4 diferentes complexos neste processo (ZHANG e POWELL, 2005; APARACIO *et al*, 2014).

O complexo BRCA1-C é formado pelas proteínas MRE11, RAD50, NBS1 (que formam o complexo MRN) além de BRCA1 e CtIP. Esse complexo reconhece as extremidades fosforiladas do DNA lesionado (**Figura 1.5**), fazendo a ressecção dessas fitas e gerando uma simples fita com extremidade 3'OH livre (**Figura 1.6 A**) (WANG, 2012; KAKAROUGKAS e JEGGO, 2014; JIANG e GREENBER, 2015). A simples fita é revestida pela proteína RPA (*Replication protein A*) que, posteriormente, é substituída pela recombinase RAD51, que é recrutada através do complexo BRCA1-D, composto pelas proteínas BARD1, PALB2, BRCA2 e BRCA1 (**Figura 1.5**). Quando RAD51 se associa à simples fita, há a formação de nucleofilamentos que vão invadir a cromátide irmã usada como molde para síntese de uma nova fita (**Figura 1.6 A**) (KAKAROUGKAS e JEGGO, 2013; PANIER e

BOULTON, 2013; GUO *et al*, 2015; JIANG e GREENBERG, 2015; NEISC *et al*, 2017).

Outro importante complexo que participa do reparo de DSB é o BRCA1-A, composto por BRCA1, e Abraxas (**Figura 1.5**). Este complexo foi descrito por seu papel na inibição da ressecção da fita de DNA, sugerindo que BRCA1 também possa atuar limitando ou prevenindo uma ressecção excessiva (SAVAGE e HARKIN, 2015).

BRCA1 também atua no controle do ciclo celular através do complexo BRCA1-B, composto pelas proteínas BRCA1, TopBP1 e BACH1 (**Figura 1.5**). Ele favorece o arresto celular na fase S do ciclo, durante o reparo por HR. Entretanto, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado (WANG, 2012; APARACIO *et al*, 2014).

Quando a DSB ocorre ao longo da fase G1 do ciclo celular, quando não há a cromátide irmã disponível para o reparo fiel (HR), o dano é corrigido através da via de NHEJ (**Figura 1.6 B**). Resumidamente, um complexo de proteínas reconhece o dano e liga as duas extremidades independente de uma possível perda na sequência do cromossomo.

A participação de BRCA1 na NHEJ ainda é controversa. Por exemplo, a literatura mostra que fibroblastos mesenquimais embrionários de camundongos deficientes para BRCA1 apresentam defeitos na de reparo por NHEJ; outros resultados demonstram que células tronco embrionárias deficientes em BRCA1 apresentam um favorecimento para a NHEJ e uma diminuição na taxa de HR (SAVAGE & HARKIN, 2015).

1.3 PALB2

O gene *PALB2* (*Partner and localizer of BRCA2*) está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p12.2), ele codifica uma proteína de mesmo nome. PALB2 foi originalmente identificado como um novo parceiro de interação com BRCA2, em 2006. Em 2009, PALB2 foi descrito por também interagir com BRCA1, funcionando como um conector entre ambas as proteínas (ZHANG *et al.*, 2009).

PALB2 interage com BRCA2 através do seu domínio WD40, na porção C-terminal da proteína (OLIVER *et al*, 2009). Já a interação PALB2-BRCA1 ocorre

através do domínio *coiled-coil* de ambas as proteínas (ZHANG *et al*, 2009) (**Figuras 1.7 A e B**). Estudos já demonstraram que os resíduos nas posições “a” e “d” dos domínios *coiled-coil* são, provavelmente, os que mais influenciam na interação entre os domínios de PALB2 e BRCA1, como mostra a Figura 1.8 (SY *et al*, 2009 e FOO *et al*, 2017).

Além disso, a região N-terminal de PALB2 pode sofrer dimerização ou oligomerização, sugerindo uma competição entre a interação PALB2-PALB2 com a formação com complexo PALB2-BRCA1 (BUISSON *et al*, 2012).

Alterações em *PALB2* já foram associadas à condição de predisposição hereditária ao câncer de mama, respondendo por cerca de 1 a 2% dos casos. (RAHMAN *et al*; 2007; SOUTHEY *et al*, 2010). Mutações em *PALB2* também foram relacionadas com a predisposição ao câncer de pâncreas e de ovário (ANTONIOU *et al*, 2014; TOSS *et al*, 2015). Outros dados mostram a redução do perfil de expressão de *PALB2* em células cancerosas, resultado da hipermetilação de sua putativa região promotora, sugerindo que o silenciamento do gene possa favorecer o processo de tumorigênese (POTAPOVA *et al*, 2008)..

1.4 Variantes genéticos de BRCA1.

BRCA1 foi identificado na década de 1990 e, desde então, já foram descritos mais de 1800 variantes genéticas na população. A frequência de alelos mutados na população é consideravelmente alta, sendo usualmente encontrados em heterozigose com o alelo selvagem (IARC, 2017).

A descrição de um indivíduo carreador de dois alelos mutados e disfuncionais (patogênicos) de *BRCA1* é absolutamente rara. Recentemente, em 2013 e 2015, foram relatados dois casos de carreadores bialélicos. Em um deles, a paciente desenvolveu câncer de ovário precocemente, mas sobreviveu até a idade adulta, muito provavelmente porque um dos alelos apresentava um comportamento hipomórfico. Noutro caso, a paciente desenvolveu câncer de mama, apresentando outras anomalias congênitas correlacionadas ao quadro de anemia de Fanconi (MOYNAHAN, 2002; DOMCHEK *et al*, 2013; PRAKASH *et al*, 2015; SAWYER *et al*, 2015

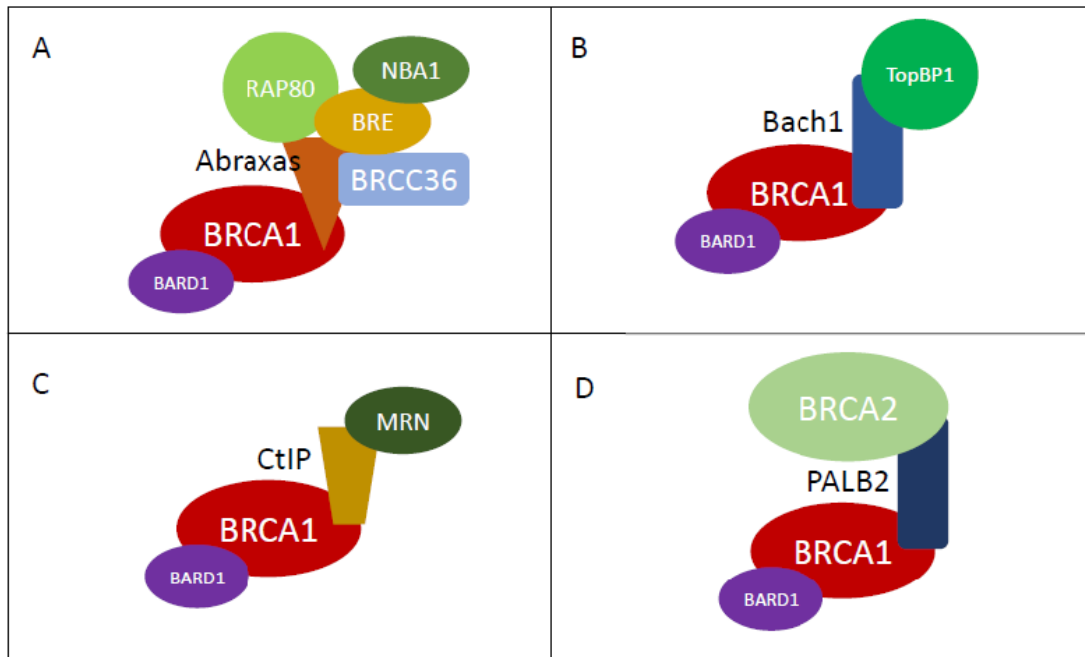


Figura 1.5 – Os quatro complexos formados por BRCA1. Os quatro complexos atuam em diferentes formas nas vias de reparo e de regulação do ciclo celular. Os complexos BRCA1-A (A), BRCA1-C (C) e BRCA1-D (D) participam da RDD por HR com papéis distintos. O complexo BRCA1-B (B) apresenta um papel no controle do ciclo celular e possui relação com a via HR. Adaptado de Wang, 2012.

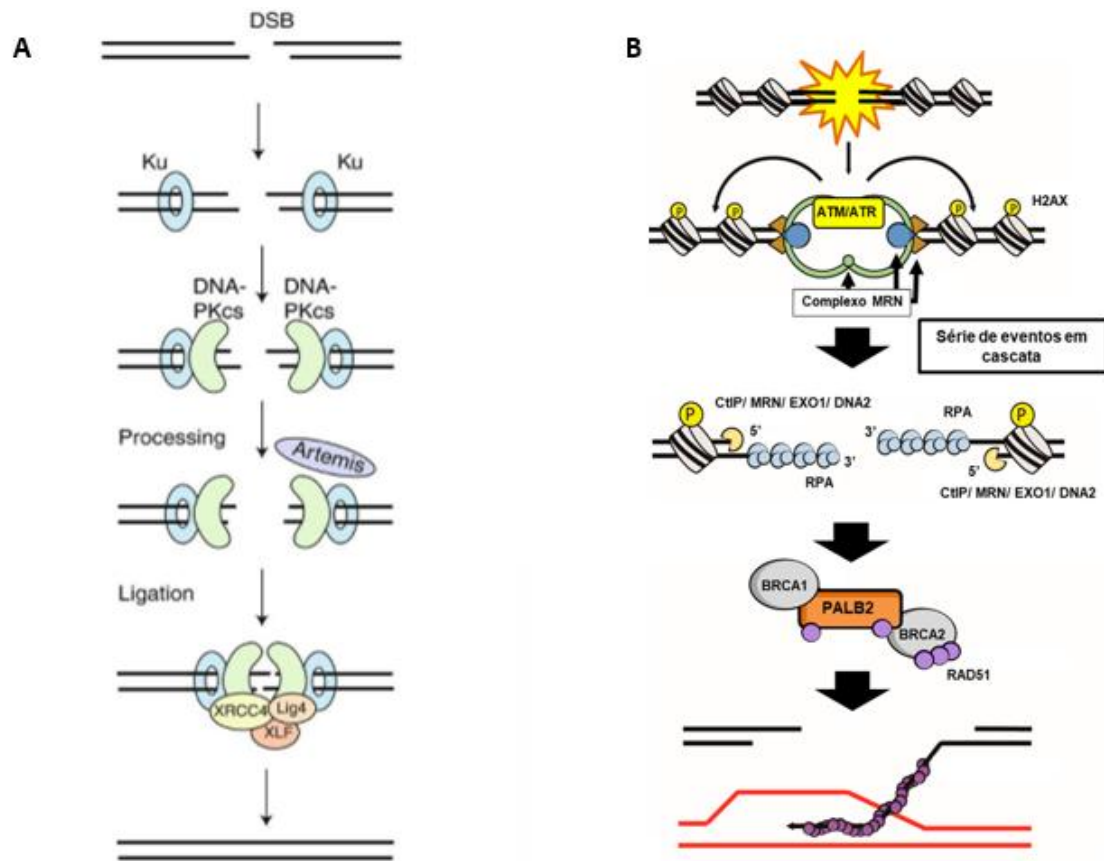
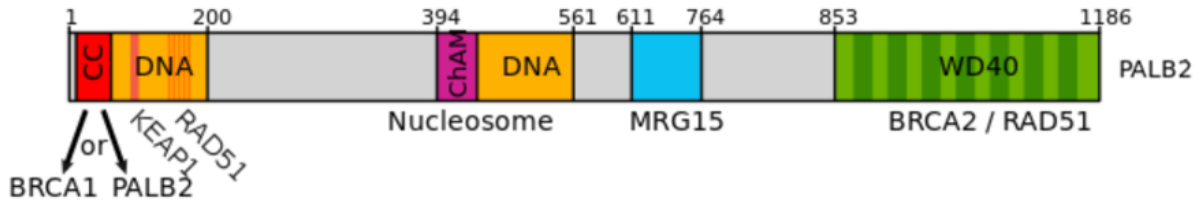


Figura 1.6 – Esquema ilustrativo das vias de reparo de DSB. (A) NHEJ. Se inicia com o heterodímero KU70-KU80 se ligando às fitas no local de dano. Então, as DNA-PKcs são recrutadas para a manutenção da proximidade das duas extremidades e para o recrutamento de outros fatores importantes para o reparo através da junção das duas extremidades das fitas de DNA. Adaptado Brandsma e Gent, 2012. **(B) Reparo por RH** se inicia com o complexo MRN reconhecendo a quebra DSB e recrutando ATM e ATR que vão fosforilas histonas H2Ax. Além disso, MRN realiza a ressecção da fita com a extremidade contendo o fosfato livre. Então, a simples fita é capeada pela proteína RPA que posteriormente é substituída pela recombinase RAD51, que é recrutada pelo complexo BRCA1-PALB2-BRCA2, formando nucleofilamentos. Estes invadem a dupla fita da cromátide irmã e uma fita complementar é sintetizada. O produto final é uma dupla fita idêntica a original. Adaptado de Nepomuceno, 2017.

A



B

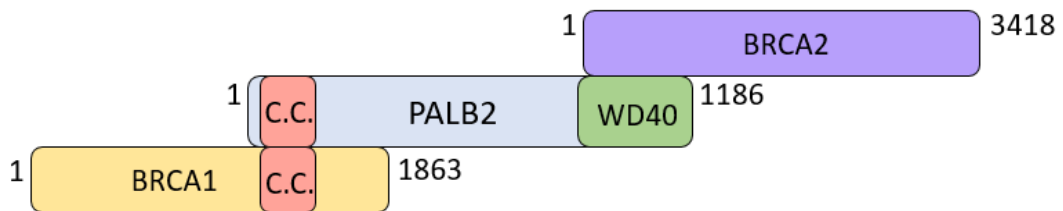


Figura 1.7 - PALB2 e seus parceiros de interação. (A) Retângulo vermelho representa o domínio *coiled-coil* de PALB2; em laranja os domínios de ligação ao DNA e em rosa o domínio ChAM. O retângulo verde representa o domínio WD40. Também estão representadas as proteínas interatoras de PALB2 dispostas de acordo com o seu local de interação. Adaptado de Buisson e Masson, 2012. (B) PALB2 (azul) e BRCA1 (amarelo) interagem através dos seus domínios *coiled-coil* (C.C.). PALB2 interage com BRCA2 através do domínio WD40, funcionando como um conector entre as proteínas BRCA1 e 2.

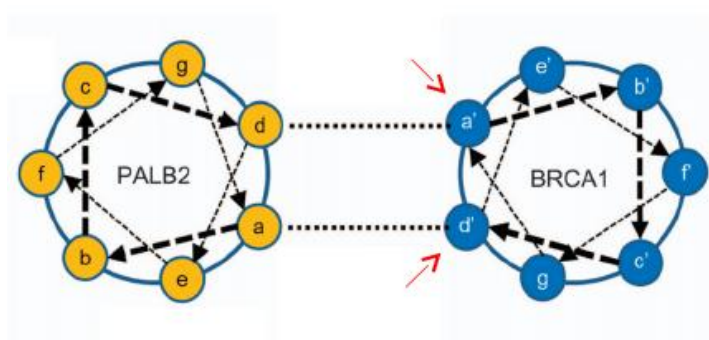


Figura 1.8 - Modelo preditivo da interação entre os domínios *coiled-coil* de PALB2 e BRCA1. Em amarelo a representação do domínio *coiled-coil* de PALB2 e em azul o de BRCA1. Os círculos representam os resíduos de cada *coiled-coil*, onde os resíduos a' e d' de BRCA1 interagem com os resíduos a e d de PALB2. Adaptado de Foo *et al*, 2017.

Dados da literatura mostram que, em modelos animais, mutações bialélicas patogênicas em *BRCA1* induzem um quadro de letalidade embrionária. Um cenário que parece estar em consonância como o papel de *BRCA1* como um gene supressor de tumor, associado a manutenção da integridade genômica (MOYNAHAN, 2002, PRAKASH *et al*, 2015; IARC, 2017).

A realização de testes genéticos para a identificação de mutações em *BRCA1* (e também *BRCA2*) é uma recomendação para indivíduos que se encaixam em pelo menos um dos seguinte critérios: (1) ter pelo menos três casos de câncer de mama e/ou ovário na família; (2) dois casos de câncer de mama em parentes próximos; (3) dois casos de câncer de mama na família diagnosticado antes dos 40 anos; (4) qualquer histórico de câncer de mama em homem que já possua um histórico familiar; (5) ancestralidade judia Ashkenazi com histórico de câncer de mama, particularmente do tipo triplo negativo (negativos para os marcadores: receptor de progesterona, receptor de estrogênio e HER2) diagnosticado antes dos 60 anos ou (6) câncer de mama ou ovário no mesmo indivíduo (SHIOVITZ & KORDE, 2014).

Os testes para a identificação de mutações em *BRCA1* são realizados a partir de rotinas de sequenciamento dos seus éxons e das regiões flangeadoras. Se o paciente apresentar mutações fora dessas regiões, estas não serão identificadas. A limitação de informações derivadas de estudos populacionais sobre sequências intrônicas de *BRCA1* torna particularmente esta identificação bastante limitada (MILLOT *et al*, 2012).

A partir dessas rotinas de sequenciamento, é possível chegar a um dos seguintes resultados:

- **Nenhuma mutação identificada**

Caso o teste não detecte alteração na sequência de *BRCA1* analisada e o indivíduo não possua histórico familiar de câncer, é sugestivo que o risco para desenvolver a doença é o mesmo observado na população geral. Entretanto, caso o indivíduo apresente um histórico familiar, existem duas questões a serem consideradas: (1) a ausência de mutação em *BRCA1* não exclui a possibilidade de mutações em outros genes de alta ou média penetrância; (2) o sequenciamento

não tem cobertura total do gene de *BRCA1*, assim, por exemplo, uma mutação patogênica pode estar presente numa região não codificante (regulatória) do gene (AGATHA *et al*, 2005, MILLOT *et al*, 2012).

- **Identificação de um variante não patogênico**

Caso o resultado do sequenciamento detecte uma alteração na sequência da região codificante já sabidamente não patogênica e o indivíduo não apresente histórico familiar, o risco de câncer é o equivalente ao da população geral. Porém, caso exista histórico de câncer, deve-se levar em consideração que a ausência de mutações patogênicas em *BRCA1* não exclui a possibilidade de mutações em outras regiões do gene fora de cobertura da técnica utilizada ou em outros genes de alta e média penetrância (MILLOT *et al*, 2012).

- **Identificação de um variante patogênico**

Uma vez que o um variante patogênico em *BRCA1* seja identificado, este indivíduo possui uma predisposição para o desenvolvimento do câncer de mama e ovário hereditários e um elevado risco para outros vários tipos de neoplasias. A identificação destes indivíduos permite que parentes sejam testados e que sejam tomadas as medidas necessárias para a prevenção da doença (CALÒ *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012).

- **Identificação de um variante de classificação indeterminada.**

Quando a mutação detectada pelo sequenciamento não apresenta dados clínicos e epidemiológicos para determinar a sua patogenicidade. A ausência de informação genética impede a classificação dessas mutações, se tornando difícil determinar a sua associação com o câncer (CALÒ *et al*, 2010). Estes variantes são chamados de “variantes não classificados” (VNC).

As limitações de testes genéticos existem e podem ser de diferentes naturezas, envolvendo questões como sensibilidade, especificidade e inabilidade na detecção das mutações, entre outras. Uma destas limitações é a ausência de associação funcional entre mutações observadas e o desenvolvimento do câncer. Com isso, há uma importante lacuna a ser preenchida na capacidade de predição do risco de doença (CARVALHO *et al*, 2007).

As mutações do tipo *nonsense* e *missense* em *BRCA1*, de uma maneira geral, são as mais comuns na população. As mutações *nonsense*, assim como as inserções e deleções geralmente tem um perfil patogênico, pois resultam numa alteração do quadro de leitura ou na geração de códons de parada prematura, o que permite uma inferência do comprometimento estrutural e funcional da proteína (CARVALHO *et al*, 2009; CALÒ *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012).

As mutações *missense*, assim como deleções e inserções que mantêm o quadro de leitura, são de difícil classificação, isto porque é complicada a identificação de um eventual comprometimento estrutural e funcional da proteína. A associação destas mutações com o risco de desenvolvimento de câncer vai depender de estudos populacionais. Esses estudos dependem da identificação de famílias acometidas pelas mesma mutação, em um número adequado para análises com poder estatístico satisfatório. Logo, é comum que variantes deste grupo permaneçam sem definição quanto a sua associação com o câncer.

Uma alternativa para a classificação dos VNC é a utilização de modelos multifatoriais que incluem: (1) modelos matemáticos baseados em análise de pedigree; (2) análises baseadas em alinhamento de ortólogos; (3) dados de ensaios funcionais; (4) análises de coocorrência com mutações patogênicas e (5) análises computacionais de algoritmos de predição, assim como outros critérios (**Figura 1.9**). Mesmo não substituindo os dados clínicos e epidemiológicos, todas essas estratégias geram informações que, juntas, são importantes para auxiliar nas decisões clínicas (CARVALHO *et al*, 2007; CALÒ *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012).

A identificação de indivíduos que carregam mutações em *BRCA1* associadas ao aumento do risco do desenvolvimento de câncer de mama e ovário é fundamental para controle da doença. Uma vez identificados, estes indivíduos podem passar por intervenções clínicas, mudanças de hábitos de vida e eventualmente procedimentos cirúrgicos que ajudem na prevenção. (DAPIC e MONTEIRO, 2006).

1.5 Ensaios funcionais para classificação de variantes de *BRCA1*

Os VNCs correspondem a mais de 35% das mutações reportadas ao BIC (disponível em - <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). A incapacidade de determinar quais destas mutações estão associadas ao câncer gera problemas na avaliação de risco, dificultando as decisões clínicas para tratamentos preventivos dos pacientes (CARVALHO *et al*, 2007; CALÒ *et al*, 2010).

Os estudos funcionais podem contribuir para classificação inicial dos VNCs, uma vez que eles se baseiam na avaliação das funções bioquímicas da proteína na presença da mutação. Esses estudos funcionam como uma referência primária de comportamento dos variante, que, combinados com outras informações disponíveis, podem auxiliar na determinação de associação com o câncer ou não (CARVALHO *et al*, 2007; COUCH *et al*, 2008).

Geralmente, os estudos funcionais utilizam apenas uma região da proteína de interesse para a avaliação. Considerando a região N-terminal de *BRCA1*, é possível avaliar a sua capacidade de interação com *BARD1*, sua capacidade de ubiquitinação de substratos através do heterodímero *BRCA1/BARD1* (MORRIS *et al*, 2006), por exemplo.

A região C-terminal de *BRCA1* pode ser avaliada de acordo com sua susceptibilidade a proteases, sua capacidade de inibição de crescimento de levedura ou sua ligação a fosfopeptídeos ou, ainda, segundo sua capacidade de ativação transcricional (MONTEIRO *et al*, 1996). (LEE *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012) (CARVALHO *et al*, 2007) (LEE *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012)

Ao avaliar uma região específica de *BRCA1*, ou mesmo outra proteína (em um ensaio funcional), deve-se considerar as evidentes limitações da abordagem antes de extrapolar os dados para o contexto clínico.

Pelo menos dois ensaios foram propostos para avaliar funcionalmente *BRCA1* no contexto completo da proteína.

Ambos, utilizam células deficientes para *BRCA1* e se baseiam na reconstituição do *status* da proteína a partir de expressão do variante do gene, avaliando (1) a capacidade de RDD por HR. ou (2) a sensibilidade à radiação ionizante (SCULLY *et al*, 1999; BOUWMAN *et al*, 2013).

1.5.1 Ensaio de ativação transcricional como um modelo de avaliação funcional de BRCA1.

Miki e colaboradores (1994) identificaram *BRCA1* e sugeriram um papel para a proteína codificada no processo de transcrição, consequência do caráter ácido observado nos domínios BRCTs. Posteriormente, Monteiro e colaboradores (1996) demonstraram que uma construção codificando apenas a porção C-terminal de BRCA1 fusionada a um domínio de ligação ao DNA era capaz de ativar a transcrição de genes repórteres tanto em modelos em células humanas como em leveduras (MONTEIRO *et al*, 1996).

BRCA1 possui um domínio de ligação ao DNA, mas ela não se liga a uma sequência específica. A sua condição de regulador transcricional parece ocorrer de forma dependente da interação com proteínas envolvidas nesse processo, como por exemplo a proteína RbAp46 (*Retinoblastoma-associated protein 46*) e histonas deacetiladas 1 e 2 (YI *et al*, 2014).

A capacidade de ativação transcricional associada à região C-terminal de BRCA1 foi usada como uma ferramenta de avaliação da integridade do domínio tBRCT, através de um ensaio específico: o ensaio de ativação transcricional (*transcriptional assay* – TA) (MONTEIRO *et al*, 1996).



Figura 1.9 – Representação de um modelo multifatorial para a classificação de um VNC. Para aumentar as informações sobre VNCs e auxiliar nas decisões clínicas, são consideradas as características encontradas de ocorrência ao variante, assim como todas as informações que podem ser coletadas de estudos populacionais e *in vitro*. Adaptado de CALÒ *et al*, 2010.

Este ensaio se baseia na capacidade de recrutamento da holoenzima RNA polimerase II pelo domínio tBRCT de BRCA1 que, quando fusionado a um domínio de ligação ao DNA, tem a capacidade de ativar a transcrição de um gene repórter (MONTEIRO *et al*, 1996). Esse ensaio permite a correlação de integridade do domínio tBRCT e a sua capacidade de ativação transcricional (LEE *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012).

O ensaio de TA consiste na geração de uma proteína quimérica, produto da fusão da região C-terminal de BRCA1 com um domínio de ligação ao DNA (DBD), como por exemplo o DBD de GAL4 de levedura (GAL4DBD:BRCA1), na presença de uma construção com um sistema repórter. Este sistema é caracterizado por um gene sob o controle de uma região promotora que apresenta a sequência de reconhecimento do DBD utilizado, levando a expressão do gene (**Figura 1.10**) (CARVALHO *et al*, 2007; CALÒ *et al*, 2010).

Em células humanas, o ensaio de TA fornece dados quantitativos. É utilizada a proteína de fusão GAL4DBD:BRCA1 e como repórter o gene da *luciferase* de *P. pyralis* (vagalume) sobre o controle de elementos responsivo ao GAL4-DBD. Para controlar variações internas do sistema, como a eficiência de transfecção e viabilidade celular é utilizada uma construção contendo um gene para a *luciferase* de *R. reniformis* (rim do mar) sob o controle de um promotor constitutivo (CARVALHO *et al*, 2007; LEE *et al*, 2010; MILLOT *et al*, 2012).

O ensaio é avaliado utilizando como controles a sequência selvagem da proteína e variantes sabidamente associados com o câncer, classificados a partir de estudos populacionais. Um elevado número de variantes na região C-terminal de BRCA1 já foram analisados através do ensaio de TA, mostrando uma estreita associação entre a integridade desta região de BRCA1 com a capacidade do gene repórter (CARVALHO *et al*, 2007; CALÒ *et al*, 2010).

1.5.2 Ensaio de interação entre BRCA1 e PALB2

O impacto na atividade transcricional de BRCA1 associado a variantes em posições fora do domínio tBRCT é limitado. Já foi observado que variantes *missense* localizados no domínio *coiled-coil* de BRCA1 apresentam atividade

bastante reduzida no ensaio de TA, dificultando bastante qualquer inferência específica sobre sua funcionalidade (WOODS *et al*, 2016).

O ensaio de interação BRCA1/PALB2 é uma abordagem que avalia a capacidade de interação entre duas proteínas utilizando um sistema repórter; classicamente, um ensaio de dois híbridos em células de mamífero (*mammalian two-hybrid, M2H*) (Luo *et al*, 1997).

Para analisar variantes *missense* no *coiled-coil* de BRCA1, o ensaio de M2H avalia a interação dos variantes com a proteína PALB2. Este ensaio consiste na produção de duas proteínas quiméricas: (1) produto da fusão da região de interesse de BRCA1 que necessariamente contenha o domínio *coiled-coil*, com um DBD, como por exemplo GAL4DBD:BRCA1; (2) produto da fusão da região de PALB2 que contenha o domínio de interação com BRCA1 com um domínio ativador transcricional, como o de VP16 (VP16:PALB2). O ensaio é realizado na presença de um sistema repórter, com um gene sob o controle de uma sequência de reconhecimento do DBD utilizado, levando a expressão do gene repórter (**Figura 1.11**) (WOODS *et al*, 2016).

O M2H é realizado em células humanas, utilizando as proteínas de fusão GAL4-DBD:BRCA1, VP16:PALB2 e como repórter o gene da *luciferase* de *P. pyralis* (vagalume) sobre o controle de elementos responsivos ao GAL4-DBD. Para controlar variações internas do sistema, como a eficiência de transfecção, é utilizada uma construção contendo um gene da *luciferase* de *R. reniformis* (rim do mar) sob o controle de um promotor constitutivo (**Figura 1.11**) (CARVALHO *et al*, 2007; WOODS *et al*, 2016).

O ensaio é avaliado utilizando uma construção com a sequência selvagem da proteína como controle positivo e variantes sabidamente associado com o câncer, classificados a partir de estudos populacionais.

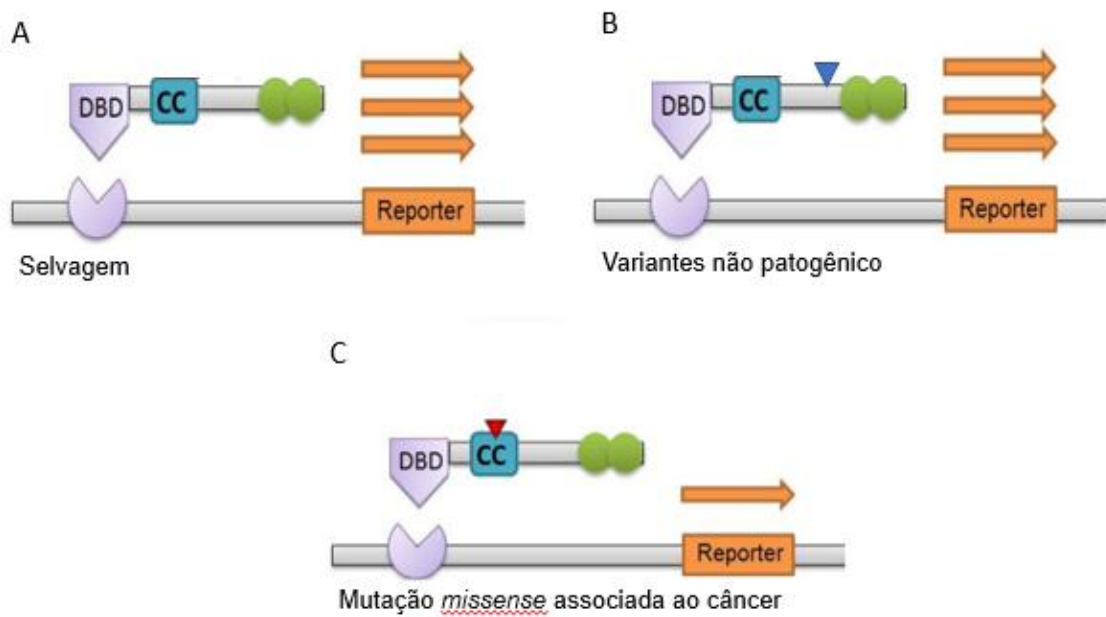


Figura 1.10 – Esquema ilustrativo do ensaio de TA para BRCA1. (A) O comportamento esperado pela proteína selvagem, em (B) o comportamento esperado para um variante *missense* não patogênico e em (C) um variante *missense* patogênico Adaptado de De Gregoris, 2014.

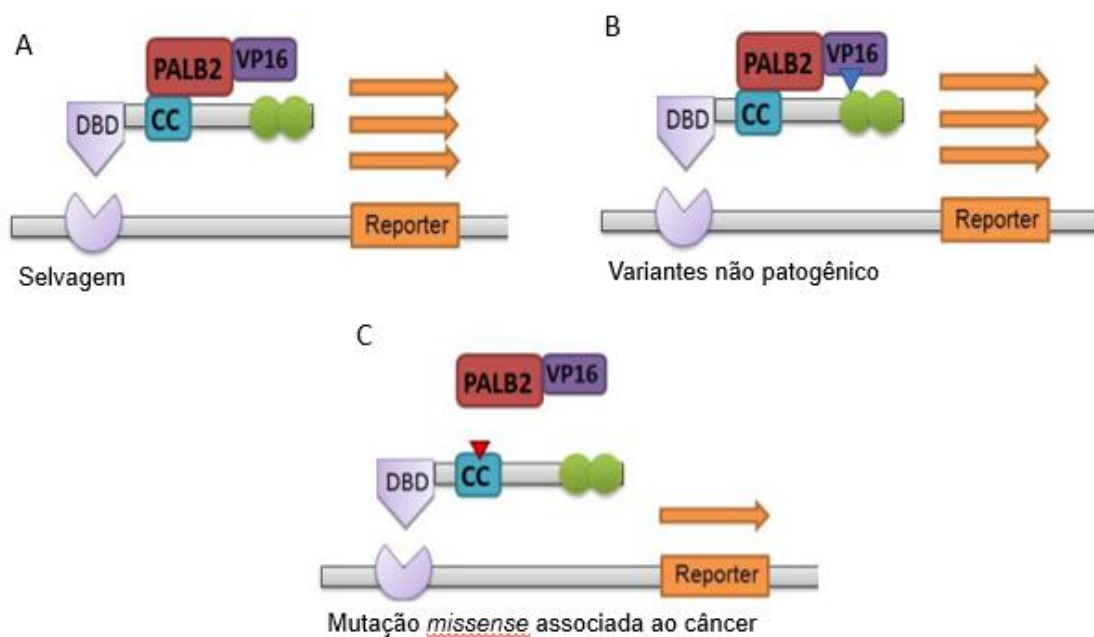


Figura 1.11 – Representação esquemática do ensaio de interação entre BRCA1 e PALB2 para avaliação de variantes de BRCA1 no *coiled-coil*. No painel A, pode-se observar o comportamento esperado tanto proteína selvagem, quanto para variantes não patogênicos onde há a interação entre as proteínas PALB2 e BRCA1 levando à transcrição do repórter. O comportamento esperado para um variante patogênico (painel B), onde não há a interação entre as proteínas, a transcrição do gene repórter. Adaptado de De Gregoris, 2014.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar funcionalmente variantes *missense* localizados no domínio *coiled-coil* de BRCA1 através da atividade transcricional intrínseca à proteína e da sua capacidade de interação com PALB2.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar todos os possíveis variantes naturais *missense* de *BRCA1* codificados no domínio *coiled-coil* (resíduos 1315-1395).
- Realizar a curadoria da literatura para identificar os variantes *missense* codificados no domínio *coiled-coil* BRCA1 já descritos na população.
- Determinar o possível impacto das variações *missense* utilizando plataformas de predição *in silico*.
- Determinar os critérios de seleção dos variantes *missense* de *BRCA1* para o estudo.
- Gerar as construções plasmidiais contendo a região codificante dos variantes selecionados para o estudo.
- Avaliar o perfil proteico dos variantes gerados utilizando um sistema de expressão ectópica em células humanas.
- Avaliar funcionalmente os variantes selecionados através da capacidade de ativação transcricional intrínseca da proteína.
- Avaliar funcionalmente os variantes selecionados através de um modelo de interação com PALB2 em células humanas.

3 METODOLOGIA

3.1 Determinação de variantes naturais *missense* no domínio *coiled-coil* de BRCA1.

Todas as possíveis substituições de um único nucleotídeo ao longo da sequência codificante do domínio *coiled-coil* (resíduos 1391-1424 - sequência de referência: GenBank U14680.1 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/U14680>) (MIKI *et al*, 1994) foram analisadas. E todas as trocas que resultaram em alteração do aminoácido original, levando a geração de variantes *missense*, foram identificadas e selecionadas para análise *in silico*.

3.2 Avaliação dos variantes *missense* em modelos de predição *in silico*.

Todos os variantes naturais *missense* identificados no *coiled-coil* de BRCA1, tiveram as suas sequências de aminoácidos submetidas a dois algoritmos de predição *in silico*: (1) Align GVGD, disponibilizado pela *International Agency for Research on Cancer - IARC (Breast Cancer Genes IARC database – TAVTIGIAN et al*, 2005 - <http://brca.iarc.fr>) e (2) PolyPhen - 2, disponibilizado pelo *Harvard Medical School, Division of Genetics (ADZHUBEI et al*, 2010 - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>).

Estes dois algoritmos se baseiam em alinhamentos múltiplos de sequências de diferentes ortólogos, porém diferem entre si nos critérios de escolha das variáveis que são analisadas e nos valores que são atribuídos a cada característica.

3.3 Identificação de variantes *missense* no *coiled-coil* de BRCA1 já descritos e estudados na população.

Uma vez identificados os variantes *missense* no *coiled-coil* de BRCA1, foi realizada uma busca pelos que já haviam sido descritos na população e previamente analisados. Esta curadoria foi realizada através do banco de dados do

BIC (*Breast Cancer Information Core* - <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). Este banco encerra a plataforma CIRCOS (Jhuraney *et al*, 2015 - <https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/circos/index.shtml>), uma compilação de dados funcionais de variantes de BRCA1 já encontrados na população.

3.4 Critérios de escolha dos variantes a serem estudados

Os variantes incluídos no estudo foram selecionados segundo diferentes critérios, e foram agrupados em dois grupos distintos.

O primeiro grupo encerra os variantes *missense* já descritos na população, porém ainda não estudados por análises funcionais segundo a plataforma CIRCOS.

No segundo grupo, foram considerados os variantes naturais dos resíduos localizados nas posições *a'* e *d'* do *coiled-coil* de BRCA1 (**Figura 1.8**). Estas posições são descritas como de maior relevância para a interação com o domínio *coiled-coil* de PALB2 (SY *et al*, 2009; FOO *et al*, 2017). A partir desse grupo, foram selecionados para o estudo todos os variantes *missense* de uma mesma posição na sequência proteica em que pelo menos um deles apresentasse uma classificação de provável patogenicidade definida pelos algoritmos de predição (como descrito no item 3.2).

3.5 Geração das construções plasmidiais

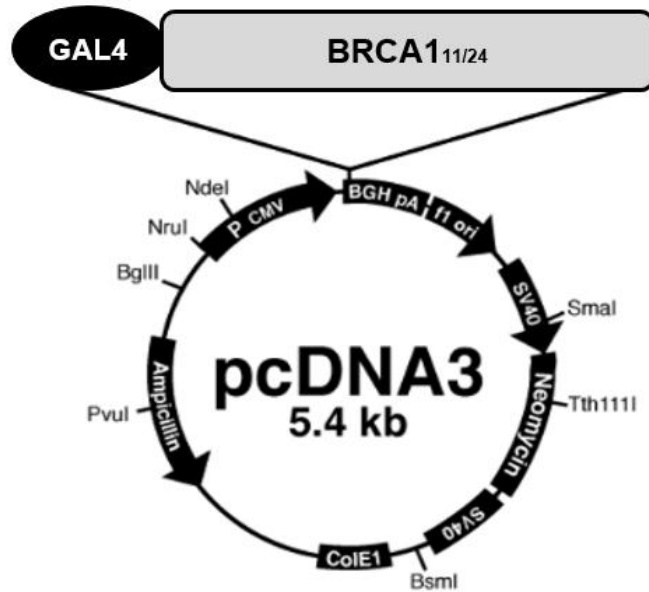
3.5.1 Geração das construções selvagens

A construção codificante de BRCA1 selvagem encerra os aminoácidos 1314 ao 1863, região correspondente à porção C-terminal da proteína (final do éxon 11 até o final do éxon 24, contexto 11/24), sequência de referência U14680.1 (GenBank). A construção foi gerada no vetor pcDNA3 e codifica uma proteína quimérica de BRCA1, uma fusão com domínio de ligação ao DNA do fator transcricional GAL4

(pcDNA3GAL4DBD:BRCA1wt - BRCA1wt). Esta construção foi previamente gerada pelo grupo (**Figura 2.1**) (WOODS *et al*, 2016).

A construção codificante de PALB2 selvagem, encerra os aminoácidos 1 ao 319, região correspondente à porção N-terminal da proteína, sequência de referência NM_024675.3 (NCBI). A construção foi gerada no vetor pVP16 e codifica uma proteína quimérica de PALB2, uma fusão com o domínio de ativação transcricional de VP16 (pVP16:PALB2). Esta construção também foi previamente gerada pelo nosso grupo (**Figura 2.2**) (WOODS *et al*, 2016).

A



B

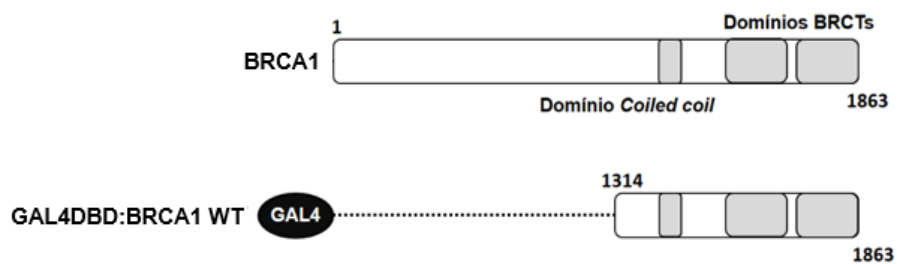
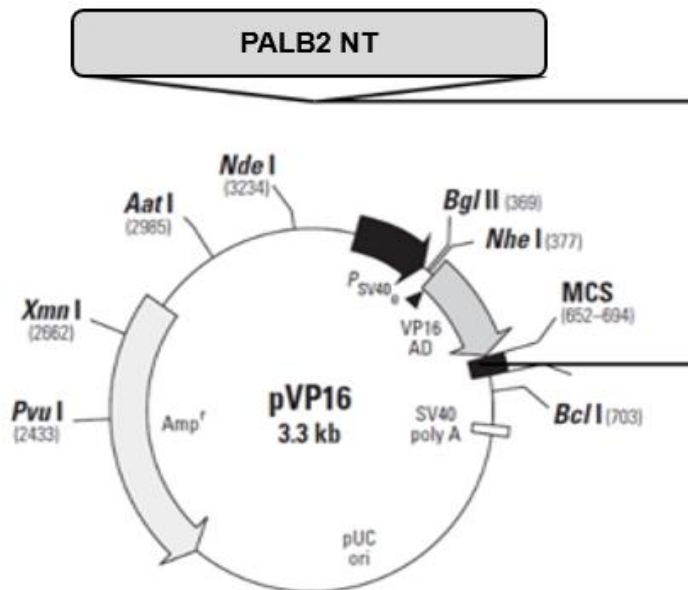


Figura 3.1. Representação esquemática da construção plasmidial codificante de BRCA1 e da proteína quimérica. (A) Representação do vetor pCDNA3 encerrando o cassete codificante de GAL4 DBD fusionado à região codificante da porção C-terminal de BRCA1. **(B)** Representação de BRCA1 e da proteína quimérica GAL4DBD:BRCA1wt (BRCA1wt) com destaque para o domínio *coiled-coil* e os domínios BRCTs. Adaptado de Torres *et al*, 2018.

A



B

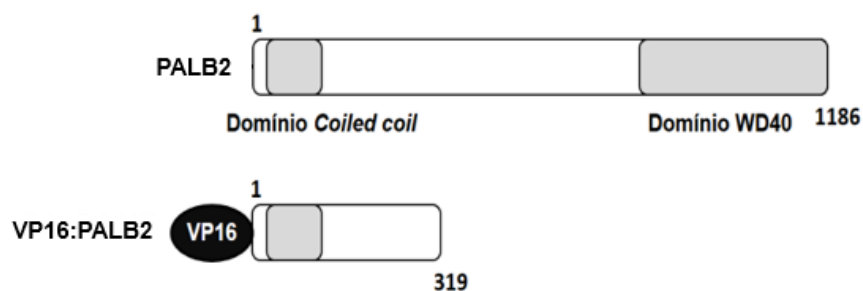


Figura 3.2 – Representação esquemática da construção plasmidial de PALB2 e da proteína quimérica. (A) Representação do vetor pVP16 encerrando a região codificante de PALB2 NT. (B) Representação de PALB2 e da proteína quimérica PALB2 NT (1-319) fusionados a VP16, com destaque para os domínios *coiled coil* e WD40. Adaptado de Torres *et al*, 2018

3.5.2 Geração dos variantes

Os variantes missense selecionados para o estudo, foram gerados a partir da estratégia de mutagênese sítio dirigida utilizando a técnica adaptada do *QuikChange II® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Genomics, California, Estados Unidos) (SMITH, 2007). Esta estratégia permite gerar mutações sítio específicas em um DNA circular dupla fita a partir de rotinas de PCR.

Através de uma única rotina de PCR (**Figura 2.3 e tabela 2.1**) é realizada a síntese completa do plasmídeo alvo contendo a mutação desejada (**Figura 2.4 A, etapa1**). Nessa rotina, são utilizados *primers* específicos (**Tabela 2.2**), parcialmente complementares, onde apenas um encerra a mutação desejada (**Figura 2.4 B**) e uma DNA polimerase de alta fidelidade e alta processividade (*PrimeSTAR® Max DNA Polymerase* - Clontech, Califórnia, Estados Unidos). Como molde para a geração dos variantes foi utilizada a construção plasmidial pcDNA3GAL4DBD:BRCA1wt.

Após as rotinas de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) em tampão TBE (45mM Tris base, 45mM ácido bórico e 1mM de EDTA – todos Merck, Dramstadt, Alemanha).

Uma vez confirmada a amplificação, os produtos foram submetidos à ação da endonuclease *DpnI* (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. Esta enzima reconhece sítios específicos de DNA metilado (5'-Gm⁶ATC-3'). O DNA usado como molde é proveniente de preparações plasmidiais susceptíveis a esse tipo de digestão, preservando a construção contendo a mutação de interesse (**Figura 2.4 A, etapa 2**).

Todos as construções geradas foram confirmadas por sequenciamento automático como descrito no item 3.9.

Tabela 3.1 – Reação de amplificação por rotina de PCR

Componente	Concentração para uso	Volume
Mix PrimeStar	2X	10 uL
<i>Primer</i> senso	10uM	0,5mL
<i>Primer</i> anti-senso	10uM	0,5mL
DNA molde	100ng/uL	1uL
Água	-	8uL
Volume final	-	20uL

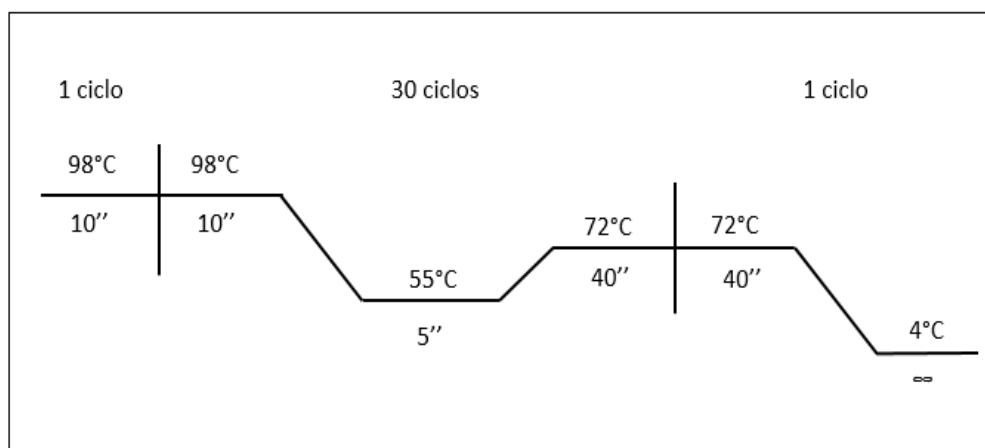


Figura 3.3 – Programa da rotina de PCR. A rotina de PCR foi realizada seguindo as etapas esquematizadas: 98°C para a separação das fitas, 55°C para o processo de anelamento dos *primers* específicos e 72°C como temperatura de extensão. Para as rotinas de PCR foi utilizado o termociclador Veriti Dx Thermal Cycler (*Applied BioSystem*, California, Estado Unidos).

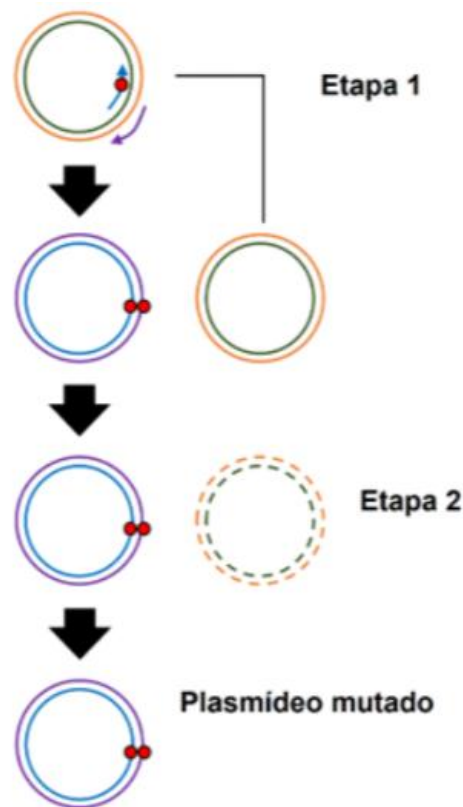
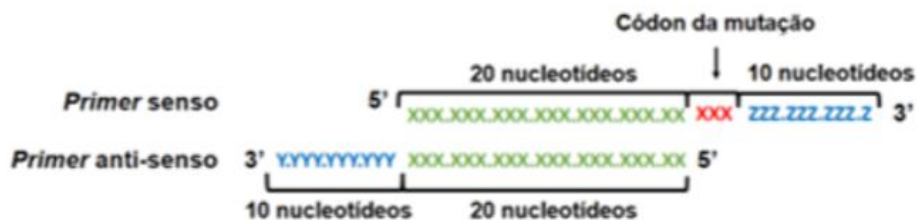
A**B**

Figura 3.4. Representação esquemática da mutagênese sítio dirigida. (A) A partir de rotinas de PCR, ocorre a síntese completa do plasmídeo alvo encerrando a mutação desejada (representados pelas linhas azuis e roxas; círculos vermelhos representam a mutação desejada e setas azul e roxa representam os oligonucleotídeos iniciadores) (etapa 1). Na etapa 2 ocorre a digestão do plasmídeo molde pela ação da enzima de restrição *DpnI*. As linhas tracejadas representam o plasmídeo molde degradado. (B) Representação do modelo de desenho dos *primers* utilizados na mutagênese (a sequência em verde representa uma região de sobreposição entre os *primers* e, em vermelho, o sítio de mutação desejada. Adaptado de Torres *et al*, 2018.

Tabela 3.2: Oligonucleotídeos iniciadores* (primers) utilizados para a geração dos variantes do estudo

1º grupo			
Mutação	Primer	Sentido	Sequência nucleotídica (5' -> 3')
M1400V	M1400V FW	senso	ccactcagcagagggataaccGtgcaacataa
	M1400V RV	anti-senso	ctgtaaaatt ggtgagtcgtctccctatgg
M1400T	M1400T FW	senso	cactcagcagagggataccaCgcaacataac
	M1400T RV	anti-senso	tgtaaaattg gtgagtcgtctccctatggt
H1402R	H1402R FW	senso	gcagagggataaccatgcaacGtaacctgata
	H1402R RV	anti-senso	attggtgagt cgtctccctatggtacggtg
H1402Y	H1402Y FW	senso	agcagagggataaccatgcaaTataacctgat
	H1402Y RV	anti-senso	aattggtgag tcgtctccctatggtacggt
Q1409L	Q1409L FW	senso	taacctgataaagctccagcTggaaatggct
	Q1409L RV	anti-senso	ggtacggtgt attggactatttcgaggtcg
A1416T	A1416T FW	senso	aggaaatggctgaactagaaActgtgttaga
	A1416T RV	anti-senso	ttcgaggtcg tcctttaccgacttgatctt
H1421R	H1421R FW	senso	agaagctgtgttagaacagcGtgggagccag
	H1421R RV	anti-senso	accgacttga tcttcgacacaatctgtcg
2º grupo			
Mutação	Primer	Sentido	Sequência nucleotídica (5' -> 3')
L1407I	L1407I FW	senso	tgcaacataacctgataaagAtccagcagga
	L1407 RV	anti-senso	ctttatcagggtatgttgcacatggtatccctc
L1407F	L1407F FW	senso	tgcaacataacctgataaagTtccagcagga
	L1407F RV	anti-senso	ctttatcagggtatgttgcacatggtatccctc
L1407V	L1407V FW	senso	tgcaacataacctgataaagGtccagcagga
	L1407V RV	anti-senso	ctttatcagggtatgttgcacatggtatccctc
L1407H	L1407H FW	senso	gcaacataacctgataaagcAccagcagga
	L1407H RV	anti-senso	gctttatcagggtatgttgcacatggtatccctc
L1407R	L1407R FW	senso	gcaacataacctgataaagcGccagcagga
	L1407R RV	anti-senso	gctttatcagggtatgttgcacatggtatccctc
M1411L	M1411L FW	senso	tgataaagctccagcaggaCtggtgaact
	M1411L RV	anti-senso	ttcctgctggagctttatcagggtatgttgcacatg
M1411V	M1411V FW	senso	tgataaagctccagcaggaGtggtgaact
	M1411V RV	anti-senso	ttcctgctggagctttatcagggtatgttgcacatg
M1411R	M1411R FW	senso	gataaagctccagcaggaGggctgaacta
	M1411R RV	anti-senso	ttcctgctggagctttatcagggtatgttgcacatg
M1411K	M1411K FW	senso	gataaagctccagcaggaAaggctgaacta
	M1411K RV	anti-senso	ttcctgctggagctttatcagggtatgttgcacatg
M1411I	M1411I FW	senso	ataaagctccagcaggaatCgctgaactag
	M1411I RV	anti-senso	atttctgctggagctttatcagggtatgttgcacatg
L1418I	L1418I FW	senso	tggtgaactagaagctgtgAtagaacagcatg
	L1418I RV	anti-senso	cacagcttctagttcagccatttctgctg
L1418V	L1418V FW	senso	tggtgaactagaagctgtgGtagaacagca
	L1418V RV	anti-senso	cacagcttctagttcagccatttctgctg
L1418S	L1418S FW	senso	ggctgaactagaagctgtgCagaacagcat
	L1418S RV	anti-senso	acacagcttctagttcagccatttctgctg
L1418F	L1418F FW	senso	gctgaactagaagctgtgtCgaacagcatg
	L1418F RV	anti-senso	aacacagcttctagttcagccatttctgctg

(*) Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos

3.6 Indução de competência bacteriana

Todos os ensaios envolvendo bactérias foram realizados utilizando bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5 α .

As bactérias eletrocompetentes foram geradas conforme previamente descrito por Ausubel e colaboradores (1987). Resumidamente, bactérias *E. coli* foram primeiramente cultivadas em meio LB (*Luria-Bertani Broth*; peptona 1% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, cloreto de sódio 0,5% p/v, todos Merck) sob constante agitação durante 16h a 37°C. Em seguida, uma alíquota dessa cultura foi inoculada em meio SOC (peptona 2% p/v, extrato de levedura 0,5 % p/v, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, glicose 20mM, todos Merck) e cultivada sob constante agitação a 37°C. O crescimento da cultura bacteriana foi acompanhado através de medições da densidade óptica (DO) e interrompido ainda na fase exponencial (DO_{600nm} de aproximadamente 0,4 – 0,5 unidade). Posteriormente a cultura foi mantida em gelo por 20 minutos e então submetida a rotinas de centrifugação (2.000 xg por 15 minutos a 4°C com desaceleração reduzida) e lavagens com glicerol 10% v/v (estéril e gelado) por 4 vezes. Ao final das lavagens as células foram ressuspensas em glicerol 10% v/v (estéril e gelado), aliqüotadas e armazenadas à -80°C.

3.7 Transformação bacteriana

A transformação de bactérias foi realizada através da adaptação do processo de eletroporação descrita por Neumann e colaboradores (1982). Resumidamente, as bactérias eletrocompetentes foram incubadas com o DNA plasmidial, transferidas para uma cubeta apropriada para transformação bacteriana (BIO-RAD Califórnia, Estados Unidos) e então foram submetidas a um pulso elétrico de 1,8 KV ($E = 18 \text{ kV/cm}$) no eletroporador MicroPulser (BIO-RAD). Imediatamente ao pulso elétrico, as bactérias foram recuperadas em meio LB por uma hora a 37°C. Posteriormente elas foram plaqueadas meio LB semi-sólido (LB + ágar 1,5% p/v) contendo antibiótico (ampicilina 50mg/mL - Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e incubadas durante 16h a 37°C.

3.8 Extração de plasmídeos

As extrações plasmidiais foram realizadas através do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hiden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9 Sequenciamento automático

As construções plasmidiais geradas foram confirmadas através de rotinas de sequenciamento automático (método automatizado de Sanger) utilizando o kit BigDye Terminator v.3.1 (Thermo Fisher Scientific), segundo as instruções do fabricante. Após a rotina de sequenciamento, a análise dos produtos foi realizada na plataforma ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific) em parceria com o Programa de Genética do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA, Rio de Janeiro, Brasil)

3.10 Cultura *in vitro* de células humanas

Células da linhagem humana HEK293FT (Thermo Fisher Scientific) foram cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) (ambos Termo Fisher Scientific) e antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100µg/mL), ambos Sigma-Aldrich, a 37°C em atmosfera com 5% v/v de CO₂. Os subcultivos foram realizados por rotinas de tripsinização (tripsina 0,125 % p/v e EDTA 0,02% p/v, ambos Sigma-Aldrich, preparadas em PBS - *Phosphate Buffered Saline*)sempre que a área cultivada atingisse de 80-90% de confluência.

3.11 Transfecção de células humanas

Todas as rotinas de transfecção foram realizadas em células humanas de linhagem HEK293FT utilizando o reagente polietilenimina (polímero linear, peso molecular 25.000; PEI 25K) (Polysciences, Inc.; Warrington, Estados Unidos).

3.12 Ensaios funcionais

3.12.1 Ensaio de atividade transcricional

Para os ensaios de atividade transcricional (TA), as células foram cotransfectadas com a construção pCDNA3-BRCA111/24 (contendo a sequência selvagem ou a dos variantes) juntamente com o plasmídeo pG5luc, que encerra o sistema repórter codificante para luciferase de *Photinus pyralis* sob o controle de operadores GAL4 (Figura 2.5 A) e o plasmídeo pGR-TK, que encerra a sequência codificante para a luciferase de *Renilla reniformis* (controle interno de transfecção), sob o controle de um promotor constitutivo HSV-TK (Fig. 2.5 B). Resumidamente, as células HEK293FT foram inoculadas em placa de 96 poços (3x10⁴ células/poço, para o ensaio de atividade) ou placas de 35mm de diâmetro (5x10⁵ células/poço; para extração de proteínas). Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com a mistura de transfecção: DNA, PEI e meio DMEM sem SFB (proporção de 3µL de PEI para cada 1µg de DNA plasmidial) previamente incubada a temperatura ambiente por 30 minutos.

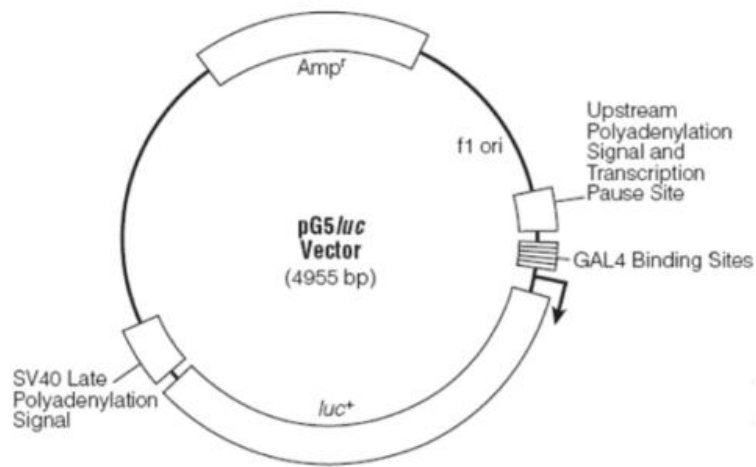
A capacidade de ativação transcricional da proteína quimérica GAL4DBD:BRCA1_{11/24} foi avaliada através da razão entre a atividade da luciferase de *P. pyralis* (expressa pelo sistema repórter – pG5luc) e a luciferase de *R. reniformis* (expressa pelo controle interno do ensaio – pGR-TK), como descrito por (VALLON-CHRISTERSSON *et al*, 2001; CARVALHO *et al*, 2007). O uso da razão entre os valores de expressão minimiza possíveis flutuações relativas à eficiência de transfecção e à viabilidade celular.

A determinação quantitativa da atividade da luciferase foi realizada usando o *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram tratadas com o tampão de lise e uma alíquota do lisado celular (20%) foi transferida para um microtubo de 1,5mL para a leitura do ensaio no luminômetro GloMax (Promega) (**Tabela 2.3**). Em cada amostra foi adicionado o reagente LARII[®], fornecido pelo fabricante, que contém, dentre outros componentes, *beetle* luciferina, o substrato da luciferase de *P.pyralis*, que é oxidado em uma reação que produz luz. A emissão de luz é, então, quantificada pelo luminômetro durante 1 segundo. Em seguida, é adicionado o

reagente Stop & Glo[®], também fornecido pelo fabricante, que interrompe a reação enzimática da luciferase de *P.pyralis* e fornece o substrato para a luciferase de *R.reniformis*. A emissão de luz é, então, quantificada novamente durante 1 segundo.

O variante utilizado como controle negativo foi o variante L1407P gerada previamente por Woods e colaboradores (2016).

A



B

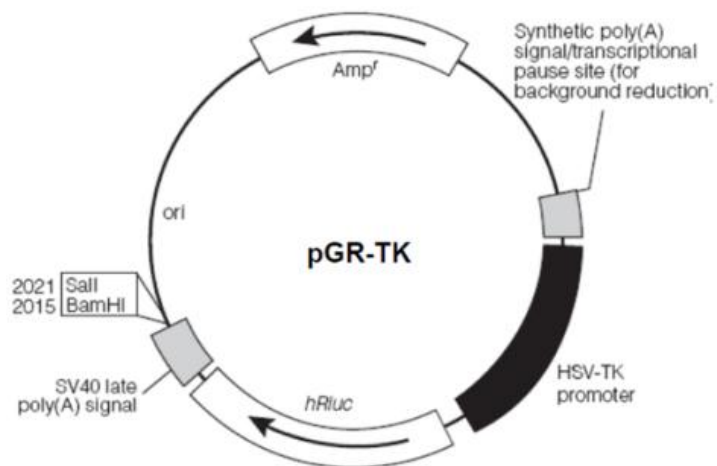


Figura 3.5: Representação esquemática dos vetores pG5luc e pGR-TK. (A) O plasmídeo pG5luc encerra a região codificante da luciferase de *P. pyralis* sob controle de elementos reguladores GAL4. **(B)** O plasmídeo pGR-TK encerra a região codificante da luciferase de *Renilla reniformis*, controlada por um promotor constitutivamente ativo reconhecido por células humanas (HSV TK).

Tabela 3.3: Concentração transfectadas de cada construção utilizadas nos ensaios funcionais.

Construções plasmidiais	Concentração transfectda
pG5Luc	50ng/poço
pGR-TK	2ng/poço
pcDN3GAL4DBD:BRCA1	100ng/poço
pVP16:PALB2	60ng/poço

3.12.2 Ensaio de interação entre BRCA1 e PALB2

Os ensaios de interação entre BRCA1 e PALB2 (M2H) foram conduzidos em células humanas cotransfectadas nas mesmas condições, e com as mesmas construções, usadas no ensaio TA (item 3.12.1), acrescida da construção pVP16:PALB2.

Nesse ensaio, foi avaliada a capacidade da proteína quimérica variante GAL4DBD:BRCA1_{11/24} de interagir com a proteína quimérica VP16:PALB2.

A capacidade de interação foi avaliada através da razão entre a atividade da luciferase de *P. pyralis* e a luciferase de *R. riniformis* utilizando o Kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega), como descrito no item 3.12.1

3.13 Extração de proteínas

O extrato proteico total das células HEK293FT foi obtido 24 horas após a transfecção com as construções de pVP16APALB2 ou pcDNA3BRCA1_{11/24} (selvagem ou dos variantes). As células transfectadas foram dissociadas por tripsinização, submetidas a rotinas de centrifugação (1000xg por 5 minutos) e lavagem com PBS. Em seguida, elas foram ressuspendidas em tampão *mild*-RIPA (NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4, EDTA 1mM e NP40 1% v/v, todos Merck), suplementado com inibidores de proteases (Merck), e incubadas por 30 minutos em banho de gelo. Por fim, os lisados foram centrifugados (16.000 xg, 10 minutos a 4°C) e os sobrenadantes foram recuperados e armazenados à – 80 °C.

A concentração de proteínas foi dosada pelo do método colorimétrico descrito por *Bradford* (1976).

3.14 Immunoblotting

A avaliação do perfil de proteínas foi conduzida por *immunoblotting* (Burnette, 1981).

Os extratos proteicos, previamente quantificados, foram diluídos em tampão de amostra (Tris-Cl pH 6,8 60% v/v, glicerol 30% v/v, SDS 10% v/v, 1-4-ditiotreitol (DTT) 9,3% p/v, azul de bromofenol 0,012% p/v, todos Merck) e desnaturados por 5 min a 95°C. Em seguida, os extratos foram resolvidos em rotinas de SDS-PAGE (*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*; géis 8% (p/v) (Laemmli *et al.*, 1970). Ao da separação, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana Hybond PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) usando o sistema TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) sob uma diferença de potencial de 20V por 2h, segundo as recomendações dos fabricantes. Após a transferência, o bloqueio foi realizado através da incubação das membranas por 1h em T-TBS (*Tris-Buffered Saline* + Tween 20; NaCl 4,0% p/v, KCl 0,1% p/v, Tris-base 1,5% p/v; pH 7,4 + Tween 20 0,1% v/v, todos Merk) suplementado com leite em pó desnatado 5% p/v. As membranas foram incubadas com os anticorpos primário anti-VP16 (1:50) (IgG de camundongo, sc-7545, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos) ou anti-GAL4DBD (1:500) (IgG de camundongo, sc-46680, Santa Cruz) diluídos em TBS-Tween suplementado com leite desnatado 0,5% por aproximadamente 16 horas a 4°C sob agitação suave. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TBS-Tween por 10 minutos. Cada lavagem em temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram, então, incubadas com o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (produzidos em cabra, sc-2005; Santa Cruz), por 1 horas à temperatura ambiente sob leve agitação. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com T-TBS. Por fim, a revelação foi conduzida utilizando o Kit Amersham ECL Western Blotting Analysis System (seguindo as recomendações do fabricante), seguida pela exposição das membranas ao filme radiográfico Amersham Hyperfilm ECL (ambos GE Healthcare).

3.15 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância de uma via (*one way* ANOVA) com pós teste de Bonferroni ou através do teste-t comparando as médias de 2 experimentos independentes utilizando o programa GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software, San Diego California USA; www.graphpad.com).

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos variantes *missense* no *coiled-coil* de BRCA1

Para a realização deste estudo, primeiramente, foram identificados todos os possíveis variantes naturais *missense* na região do *coiled-coil* de BRCA1. Ao todo, 198 variantes foram reconhecidos através da simulação de substituição de cada um dos 99 nucleotídeos que compõem a sequência codificante dessa região.

Os variantes identificados foram submetidos aos algoritmos de predição *in silico* Align GVGD e PolyPhen-2 (**Anexo 4.1**). O algoritmo de predição Align GVGD foi usado em uma rotina de análise de maior estringência, utilizando um conjunto de alinhamentos de referência que incluem desde a sequência humana (*H. sapiens*) até o ortólogo em ouriço do mar (*Strongylocentrotus purpuratus*). Já a ferramenta PolyPhen-2 foi usada seguindo os parâmetros previamente recomendados (análise padrão).

Dos 198 variantes identificados, 16 já haviam sido descritos na plataforma BRCA1 Circos (Jhuraney *et al*, 2015), dos quais 9 já haviam sido avaliados funcionalmente. Os 7 variantes restantes constituíram, então, o primeiro grupo selecionado para o estudo (**Figura 4.1 e Tabela 4.1**).

Outro critério de seleção utilizado foi o posicionamento de cada variante na estrutura do *coiled-coil*, sendo considerados apenas aqueles presentes nas posições a' e d' do domínio (**Figura 1.6**). Foram identificados 44 variantes; desse grupo, foram selecionados todos aqueles localizados em uma posição onde, ao menos um variante, tenha apresentado uma classificação C65 (perfil patogênico)

pelo algoritmo Align GVGD. Originando um segundo grupo de 14 variantes naturais *missense* (**Figura 4.1 e Tabela 4.1**).

4.2 Geração dos variantes de *BRCA1*

Todos os variantes selecionados para o estudo foram satisfatoriamente gerados utilizando a estratégia de mutagênese sítio dirigida previamente descrita. As construções geradas, pcDNA3-GAL4DBD:BRCA1_{11/24}, foram confirmadas por sequenciamento automático.

4.3 Análise do perfil de síntese das proteínas quiméricas

A análise do perfil de síntese das proteínas quiméricas GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem e variantes, e de VP16:PALB2 foi realizada por *immunoblotting*, utilizando anticorpos específicos para o domínio de ligação ao DNA de GAL4 (GAL4DBD) e para o fator transcricional VP16 (**Figuras 4.2 e 4.3**).

Os variantes do primeiro grupo (M1400V, M1400T, M1402Y, M1402R, Q1402L, A1416T e H1421R) apresentaram níveis proteicos detectáveis, apresentando perfil de migração compatível com o peso molecular previsto (aproximadamente 110 KDa); assim como o controle selvagem (GAL4DBD:BRCA1wt) e o variante controle negativo L1407P (**Figura 4.2**).

Os variantes do segundo grupo L1407V, L1407F, L1407H, L1407R, L1407I, M1411L, M1411V, M1411R, M1411K, M1411I, L1418S e L1418F também apresentaram níveis proteicos detectáveis, com a maioria apresentando perfil de migração compatível com o peso molecular previsto. Entretanto, os variantes L1418I, L1418V, apresentaram um perfil de migração distinto, sugestivo de um peso molecular acima do esperado quando comparado com os controles (**Figura 4.3**).

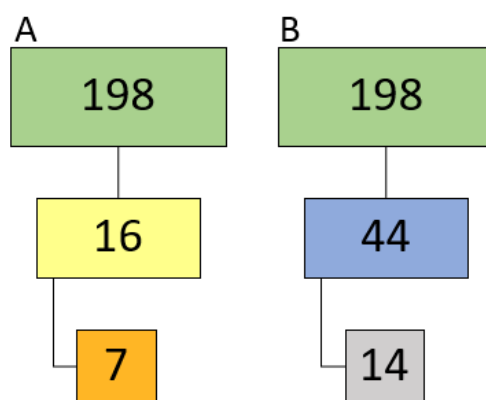


Figura 4.1 - Esquema representativo dos diferentes conjuntos de variantes identificados e selecionado para o estudo. (A) Os retângulos verdes representam o conjunto de todos os 198 possíveis variantes naturais *missense* na região do *coiled-coil* de BRCA1. O retângulo amarelo representa os 16 variantes naturais já descritos na população segundo a plataforma BRCA1 Circos. O retângulo laranja representa os 7 variantes desse conjunto que ainda não foram analisados funcionalmente. (B) O retângulo azul representa os 44 variantes localizados nas posições a' e d' do domínio *coiled-coil* de BRCA1, e o cinza representa os 14 variantes desse conjunto localizados em uma posição onde, ao menos um variante, tenha apresentado uma classificação C65 pelo algoritmo Align GVGD.

Tabela 4.1 - Análises *in silico* dos variantes naturais *missense* localizados no domínio *coiled-coil* de BRCA1 selecionados para o estudo.

1º Grupo				
Variantes	Substituição nucleotídica	Resíduos do <i>coiled-coil</i>	Predição (Aling GVGD)	Predição (Polyphen2)
M1400V	A4317G	d'	Class C0	Benign
M1400T	T4318G	d'	Class C0	Benign
H1402Y	C4323T	f'	Class C0	Benign
H1402R	A4324G	f'	Class C0	Benign
Q1409L	A4345G	f'	Class C15	Benign
A1416T	G4365A	f'	Class C0	Possibly Damaging
H1421R	A4381G	d'	Class C0	Benign
2º Grupo				
Variantes	Substituição nucleotídica	Resíduos do <i>coiled-coil</i>	Predição (Aling GVGD)	Predição (Polyphen2)
L1407I	C4338A	d'	Class C0	Benign
L1407F	C4338T	d'	Class C15	Possibly Damaging
L1407V	C4338G	d'	Class C25	Benign
L1407H	T4339A	d'	Class C65	Possibly Damaging
L1407R	T4339G	d'	Class C65	Benign
M1411L	A4350C	a'	Class C0	Benign
M1411V	A4350G	a'	Class C15	Benign
M1411R	T4351G	a'	Class C65	Benign
M1411K	T4351A	a'	Class C65	Benign
M1411I	G4352C	a'	Class C0	Possibly Damaging
L1418I	T4371A	a'	Class C0	Benign
L1418V	T4371G	a'	Class C25	Benign
L1418S	T4372C	a'	Class C65	Benign
L1418F	A4373C	a'	Class C15	Benign

Class C0, benigna; Class C15 e C 25, intermediário; Class C65, patogênico. *Benign* – benigna, *Possibly Damaging* – Possivelmente patogênica.

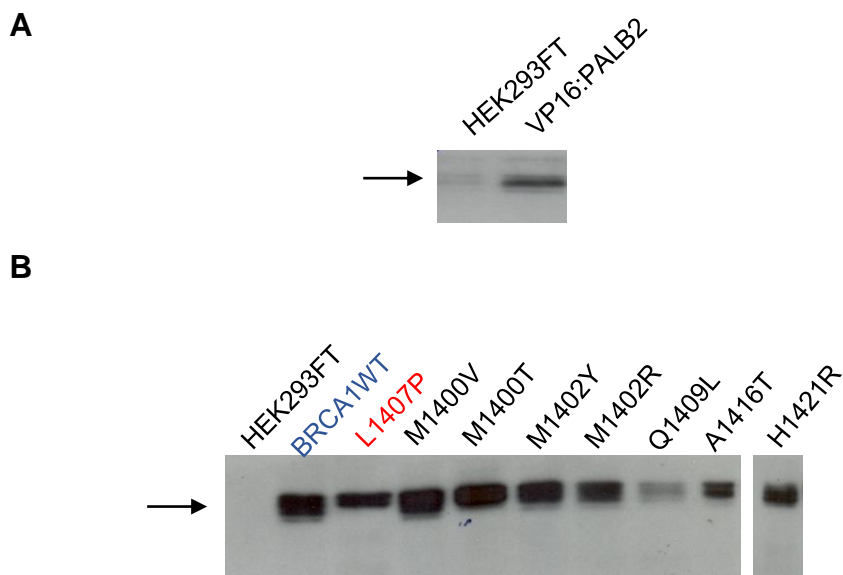


Figura 4.2 - Síntese das proteínas de fusão VP16:PALB2 e GAL4DBD:BRCA1_{11/24} do primeiro grupo. Células HEK293FT foram transfectadas com as construções codificantes das proteínas quiméricas e os extratos foram analisados após 24 horas. O *immunoblotting* foi revelado utilizando anticorpo anti-VP16 ou anti-GAL4DBD. **(A)** Síntese de PALB2 através da imunomarcção para VP16. **(B)** Síntese dos variantes *missense* do primeiro grupo. O controle positivo está destacado em azul e o negativo em vermelho. As setas indicam as bandas de interesse na altura de 110 KDa.

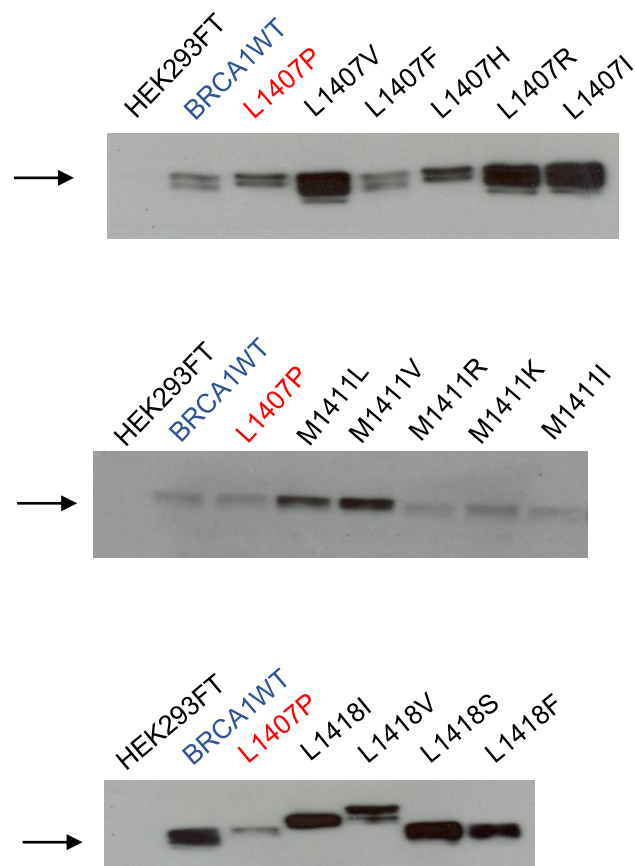


Figura 4.3 – Síntese das proteínas quiméricas GAL4DBD:BRCA1_{11/24} do segundo grupo. Células HEK293FT foram transfectadas com as construções codificantes das proteínas quiméricas e os extratos foram analisados após 24 horas. O *immunoblotting* foi revelado utilizando anticorpo anti-GAL4DBD. O controle positivo está destacado em azul e o negativo em vermelho. As setas indicam as bandas de interesse na altura de 110 KDa.

4.4 Avaliação da capacidade de ativação transcricional dos variantes *missense*.

Os variantes selecionados para o estudo tiveram a sua capacidade de ativação transcricional (TA) avaliada através da indução de expressão de um gene repórter, codificante da enzima luciferase em células humanas.

A capacidade de TA de cada variante foi determinada em pelo menos dois experimentos independentes, sempre em quadruplicata. As atividades foram avaliadas de forma comparativa, usando a sequência selvagem como controle positivo (BRCA1wt) e um variante situado no *coiled-coil*, previamente caracterizado, como controle negativo (L1407P) (CARVALHO *et al*, 2007 e WOODS *et al*, 2016).

As localizações dos variantes analisados e do variante usado como controle negativo estão representado na **Figura 4.4 A e B**.

O gráfico apresentado na **Figura 4.5** mostra o comportamento dos variantes do primeiro grupo: M1400V, M1400T, H1402Y, H1402R, Q1409L, A1416T e H1421R.

Os variantes M1400T, H1402Y, H1402R, Q1409L e H1421R apresentaram perfil semelhante ao comportamento do controle positivo (BRCA1 WT), variando de 95,13% a 130,17%, sem apresentar diferenças estatisticamente significativas.

Já os variantes M1400V e A1416T apresentaram atividade média menor, de 85,01% e 70,41%, respectivamente - uma faixa de difícil interpretação. Entretanto, também não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle selvagem.

A avaliação da capacidade de ativação transcricional dos variantes do segundo grupo está representada nas **Figuras 4.6 e 4.7**.

O variante L1418V apresentou atividade de 126,45%, relativa ao controle selvagem, porém sem diferença estatística observada (**Figura 4.6 A e 4.7**).

A

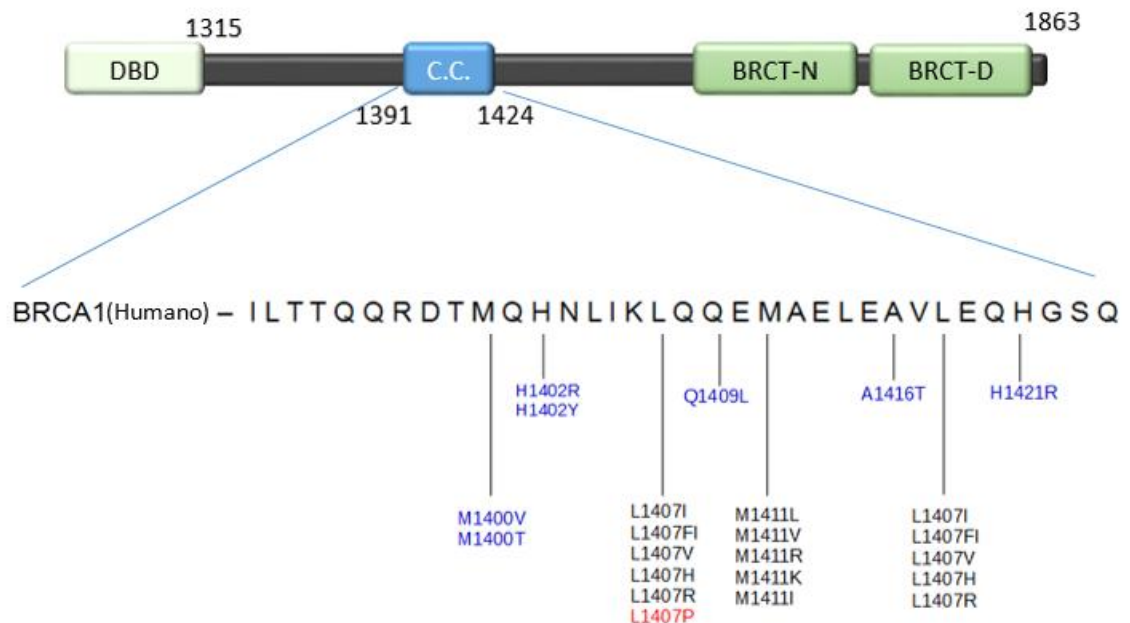


Figura 4.4: Proteína quimérica GAL4DBD:BRCA1_{11/24} e as localizações dos variantes do estudo. (A) No painel superior, a representação esquemática da proteína quimérica formada pela fusão da região codificada pelos éxons 11 a 24 de *BRCA1* e o domínio DBD de GAL4. O retângulo azul representa a localização do domínio *coiled-coil* (C.C.), os retângulos em verdes representam os domínios BRCT. No painel inferior, indicação dos 33 resíduos de aminoácidos do domínio *coiled-coil* (aa 1391-1424) e o posicionamento dos variantes analisados está indicado pelas linhas verticais. (B) Os resíduos do *coiled-coil* em que cada variante se encontra. Em azul, os variantes que compõem o primeiro grupo estudado, e em preto, o segundo. O variante controle negativo está representado em vermelho.

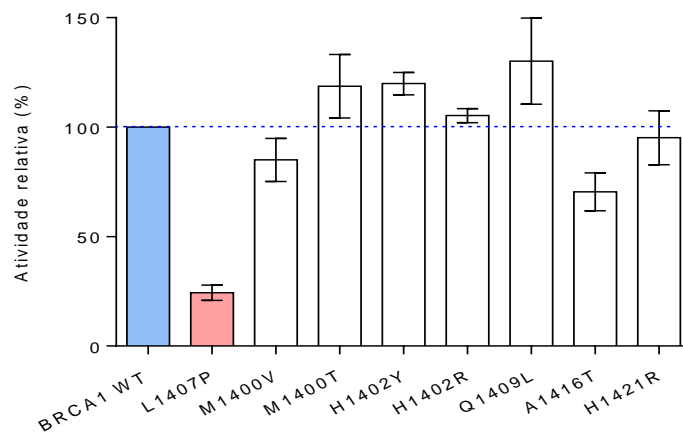


Figura 4.5 - Análise da capacidade de ativação transcricional dos variantes do primeiro grupo. As células HEK293FT foram cotransfectadas com construções codificantes da proteína quimérica GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem ou variante, além das construções codificantes do sistema repórter. A capacidade de ativação transcricional dos variantes está apresentada em relação à atividade da construção do selvagem BRCA1 WT; as barras indicam o erro padrão. As linhas pontilhadas indicam as atividades de 100% (azul). Os dados representam a média de dois experimentos independentes. Análise estatística: ANOVA *one-way*, pós teste de Bonferroni.

Curiosamente, os variantes M1411L, M1411I e L1418I demonstraram uma atividade muito mais elevada do que o controle selvagem (448,43%; 353,62% e 764,24%, respectivamente), todas estatisticamente significativas. Esses variantes foram avaliados em três experimentos independentes (**Figura 4.6 A e 4.7**).

Os demais variantes apresentaram diferenças de atividade transcricional estatisticamente significativas menores em relação ao controle positivo (**Figura 4.6 B**). Enquanto os variantes L1407F, L1407I, L1407R, L407V, M1411R, M1411V, L1418F e L1418S mostraram atividades intermediárias (entre 32.63% a 59.26%), os variantes L1407H e M1411K apresentaram reduzida capacidade de ativação transcricional (17,70% e 16,13%, respectivamente), semelhantes ao controle negativo (12,63%), como mostra **Figura 4.6 B**.

4.5 Avaliação da capacidade de interação dos variantes *missense* com a proteína PALB2

Os variantes selecionados para o estudo também tiveram sua capacidade de interação com a proteína PALB2 avaliada segundo um ensaio de dois híbridos em células humanas. As interações com PALB2 foram analisadas utilizando os mesmos variantes controle usados na avaliação da capacidade de ativação transcricional

No primeiro grupo, os variantes M1400T, H1402Y, H1402R e Q1409L apresentaram uma capacidade de interação semelhante à do controle positivo, variando de 89,32% a 125,84%. O variante H1421R apresentou uma interação relativa de 75,35% em relação ao controle positivo, em uma faixa de difícil interpretação. Já os variantes M1400V e A1416T apresentaram as menores atividades relativas (44,93% e 38,96% em relação à construção selvagem, respectivamente). (**Figura 4.8**)

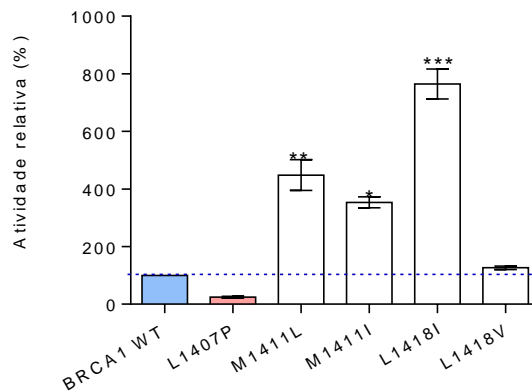
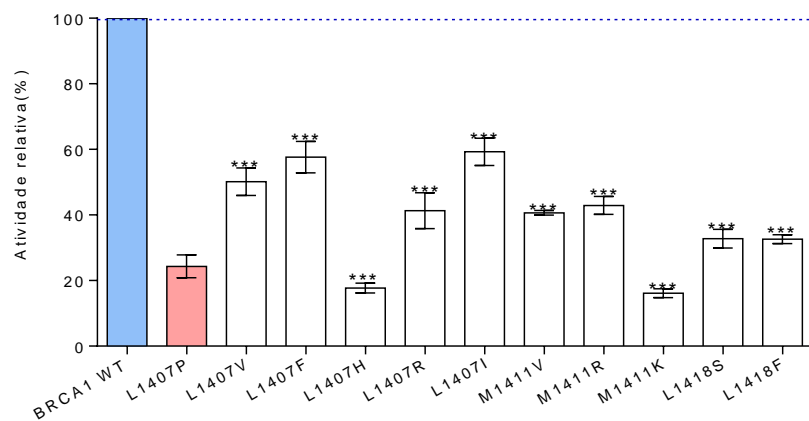
A**B**

Figura 4.6 – Análise da capacidade de ativação transcricional dos variantes do segundo grupo. As células HEK293FT foram cotransfectadas com construções codificantes da proteína quimérica GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem ou variante, além das construções codificantes do sistema repórter. A capacidade de ativação transcricional dos variantes está apresentada em relação à atividade da construção do selvagem BRCA1 WT; as barras indicam o erro padrão. As linhas pontilhadas indicam as atividades de 100% (azul) **(A)** Os variantes que apresentaram atividade igual ou maior a do controle positivo. **(B)** Os variantes que apresentaram uma atividade inferior a do controle positivo. Os dados representam a média de dois experimentos independentes, exceto para os variantes M1411L, M1411I e L1418I que apresentam uma média de 3 experimentos. Análise estatística: ANOVA *one-way*, pós teste- Bonferroni. * <0,05, ** <0,005, *** <0,0005 e **** <0,0001.

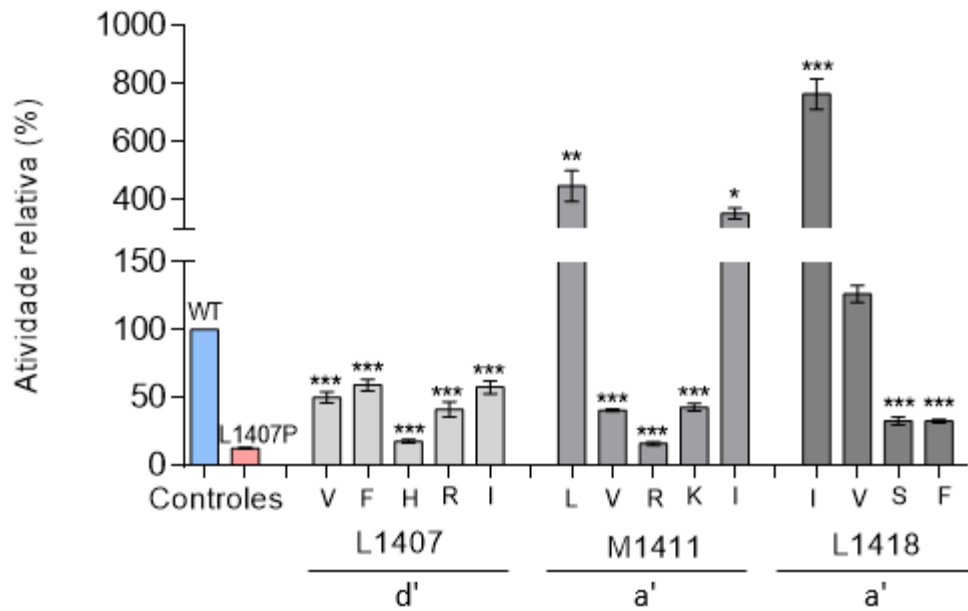


Figura 4.7 – Análise da capacidade de ativação transcricional por posição dos variantes do segundo grupo. Todos os variantes do segundo grupo agrupados por posição em que se encontram. As letras sobre as barras indicam o aminoácido substituído em cada variante.

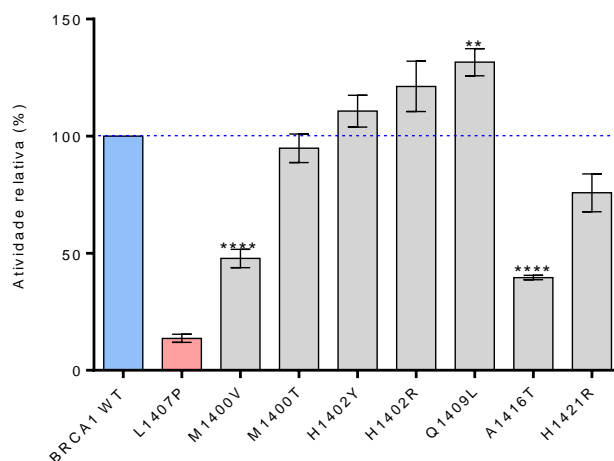


Figura 4.8 - Análise da capacidade de interação dos variantes do primeiro grupo com PALB2. As células HEK293FT foram cotransfectadas com construções codificantes das proteínas quiméricas VP16:PABL2 e GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem ou variante, além das construções codificantes do sistema repórter. A capacidade de interação dos variantes está apresentada em relação à atividade da construção do selvagem BRCA1 WT; as barras indicam o erro padrão. A linha pontilhada indica a atividade de 100%. Os dados representam a média de dois experimentos independentes Análise estatística: ANOVA *one-way*, pós teste de Bonferroni. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$ e **** $<0,0001$.

Já para o segundo grupo, os variantes L1407I, L1407F, L1407H e M1411L apresentaram perfis de interação semelhante ao do controle positivo, variando de 99,77% a 165,01% (**Figuras 4.9 A e 4.10**). Os variantes M1411K, M1411V e L1418F apresentaram atividades intermediárias, se localizando na faixa de difícil interpretação. Já os variantes M1411I e L1418I demonstraram uma alta atividade quando comparados ao controle positivo (231,21% e 368,74%, respectivamente). Para esses dois variantes, em especial, foram realizados três experimentos independentes para a confirmação dos resultados obtidos.

Os variantes L1407R, L1407V, M1411R, L1418S, L1418V e L1418V apresentaram baixa capacidade de interação com PALB2 semelhante ao controle negativo (10,00%) variando de 35,55 % a 11,73 % (**Figuras 4.9 B e 4.10**).

As **Figura 4.11 e 4.12** representam a análise de interação dos variantes do primeiro e segundo grupo, respectivamente. Para uma comparação criteriosa, os gráficos apresentam a capacidade de ativação transcricional intrínseca das construções analisadas (atividade relativa de luciferase, correspondente a um eventual vazamento de ativação do sistema repórter, GAL4DBD:BRCA1) e a atividade derivada da interação com PALB2 (GAL4DBD:BRCA1 e VP16:PALB2); os dados correspondem a dois experimentos independentes, sempre em quadruplicata.

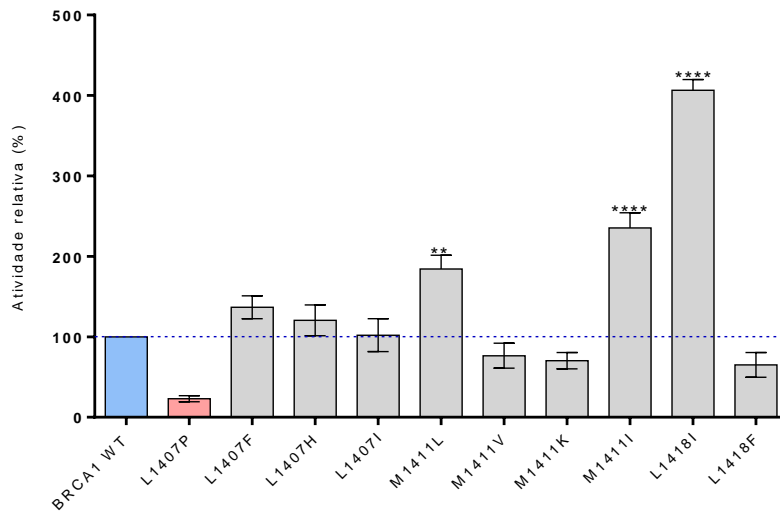
O controle selvagem, BRCA1 WT, demonstrou um aumento de 3,76 vezes na atividade de luciferase quando coexpresso com a proteína de fusão VP16:PALB2.

Todos os variantes analisados no primeiro conjunto apresentaram um aumento estatisticamente significativo na atividade de luciferase na presença da proteína de fusão VP16:PALB2 (**Figura 4.11**).

Os variantes analisados no segundo grupo, todos aqueles que apresentaram uma capacidade de interação com PALB2 semelhante ao controle positivo ou maior, apresentaram também um aumento estatisticamente significativo na atividade de luciferase na presença da proteína VP16:PALB2 (**Figura 4.12 A**). Entretanto, daqueles que apresentaram capacidade de interação inferior ao controle positivo, apenas o variante L1407V apresentou um aumento

estatisticamente significativo na sua atividade de luciferase quando na presença da proteína VP16:PALB2 (**Figura 4.12 B**).

A



B

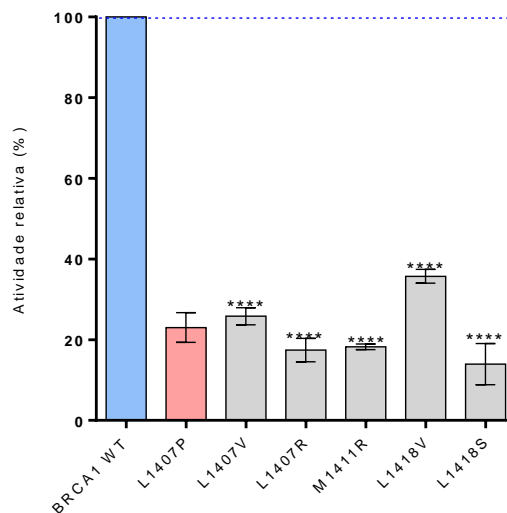


Figura 4.9 - Análise da capacidade de interação dos variantes do segundo grupo com PALB2. As células HEK293FT foram co-transfectadas com construções codificantes da proteínas quiméricas VP16:PABL2 e GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem ou variante, além das construções codificantes do sistema repórter. A capacidade de interação dos variantes está apresentada em relação à atividade da construção do selvagem BRCA1 WT; as barras indicam o erro padrão. A linha pontilhada indica a atividade de 100%. Os dados representam

a média de dois experimentos independentes Análise estatística: ANOVA *one-way*, pós teste de Bonferroni. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$ e **** $<0,0001$.

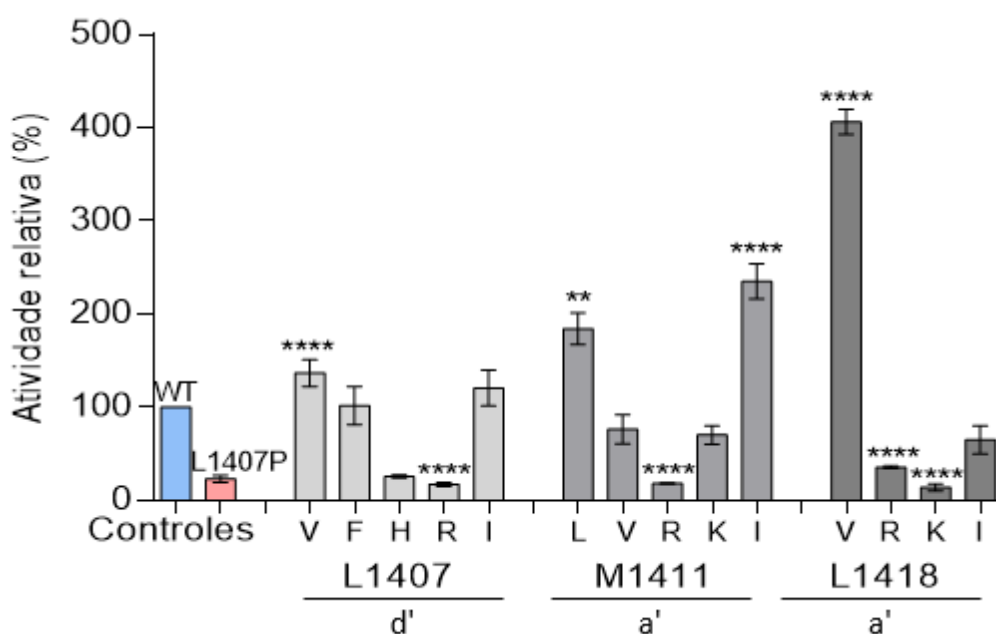


Figura 4.10 – Análise da capacidade de interação com PALB2 por posição dos variantes do segundo grupo. Todos os variantes do segundo grupo estão agrupados por posição em que se encontram.

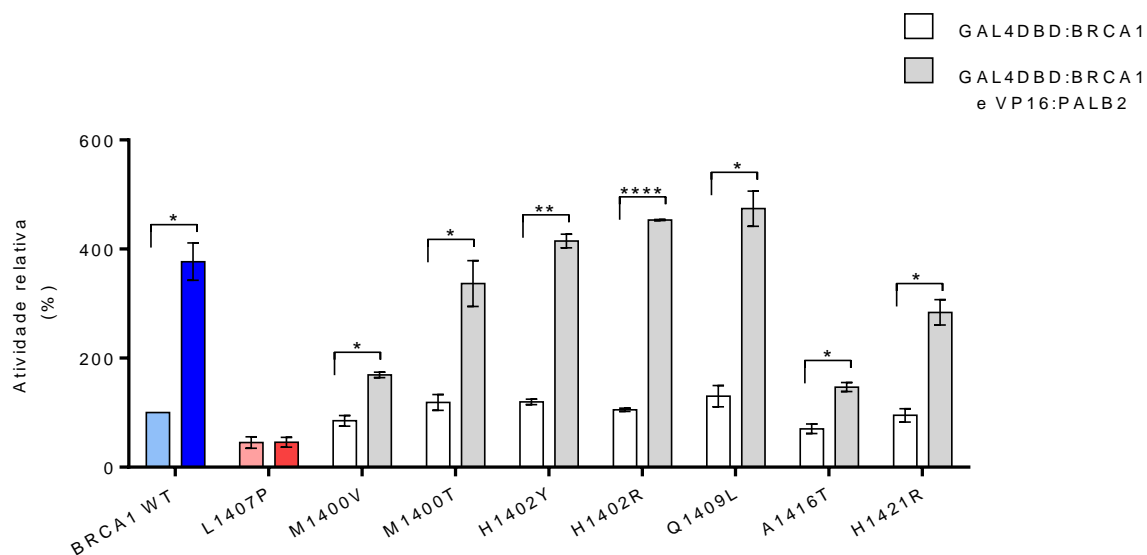


Figura 4.11 - Análise comparativa da capacidade de interação com PALB2 em relação a atividade transcricional dos variantes do primeiro grupo. O gráfico representa as médias de dois experimentos independentes. As células foram cotransfectadas com construções codificantes para as proteínas quiméricas VP16:PALB2 e GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem ou variante, além das construções codificantes do sistema repórter (luciferase). A atividade da luciferase referente ao ensaio de interação de cada variante está apresentada em relação à atividade do ensaio de atividade transcricional dos mesmos e o erro padrão dos experimentos está indicado nas barras. Foi realizado test-t para cada variante comparando a atividade de luciferase dos dois ensaios. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$, **** $<0,$

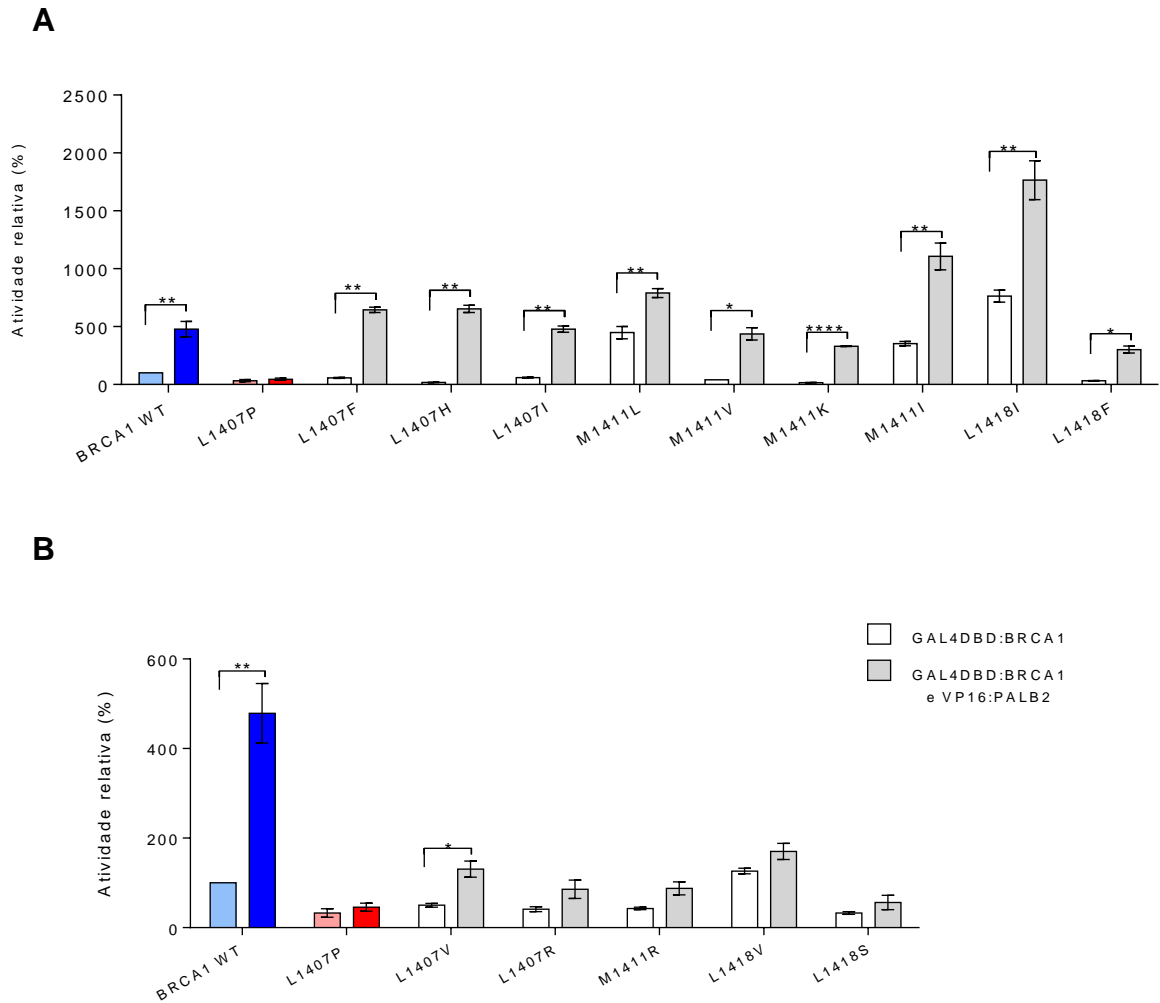


Figura 4.12 - Análise da capacidade de interação com PALB2 dos variantes do segundo grupo. O gráfico representa as médias de dois experimentos independentes, exceto para os variantes M1411I e L1418I que apresentam uma média de 3 experimentos. As células foram cotransfectadas com construções codificantes para as proteínas quiméricas VP16:PALB2 e GAL4DBD:BRCA1_{11/24} selvagem ou variante, além das construções codificantes do sistema repórter (luciferase). A atividade da luciferase referente ao ensaio de interação de cada variante está apresentada em relação à atividade do ensaio de atividade transcricional dos mesmos e o erro padrão dos experimentos está indicado nas barras. **(A)** Variantes com atividade de interação semelhante ao controle positivo ou maior e **(B)** Variantes que apresentaram atividade semelhante ao controle negativo do ensaio Foi realizado test-t para cada variante comparando a atividade de luciferase dos dois ensaios. * $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,0005$, **** $<0,0001$.

5 DISCUSSÃO

Desde a década de 1970 já havia sido estabelecida a relação entre o câncer de mama e a condição de hereditariedade. À época, já era observado que a chance de um indivíduo com histórico familiar de câncer de mama desenvolver a doença era maior que o encontrado na população em geral (KELSEY, 1979).

Na década de 1990, com a identificação do gene *BRCA1*, foi reconhecida a primeira associação direta entre o câncer de mama e de ovário com os casos hereditários. A partir de então, houve um grande empenho para que esse gene fosse sequenciado em famílias identificadas como de alto risco para o desenvolvimento dessas doenças (MIKI *et al*; 1994; LEE *et al*; 2010).

Assim, foram observadas diversas mutações fortemente associadas com o câncer, permitindo um melhor direcionamento das condutas clínicas adotadas nos pacientes portadores. Cerca de 70% dos variantes identificados resultam em proteínas truncadas ou não funcionais (consequência de mutações sem sentido (*nonsense*), inserções ou deleções), todos com estreita associação com o câncer (SMITH, 1996).

Os variantes do tipo *missense* de *BRCA1* são o segundo grupo de mutações mais reportado no BIC (*Breast Cancer Information Core* - <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>) e, em conjunto com as deleções e inserções *in-frame*, compõem majoritariamente o grupo de variantes não classificados (VNC) do gene. Essas são mutações particularmente problemáticas no que diz respeito à determinação da associação com o câncer, pois podem gerar pequenas modificações na sequência proteica, o que dificulta a inferência acerca do eventual comprometimento estrutural da proteína. Soma-se a isso, a baixa frequência em que são individualmente observadas, limitando o poder estatístico dos estudos de correlação populacional (SZABO WORLEY e MONTEIRO, 2004; EASTON *et al*, 2007, BIC, IARC, 2016). Com isso, não é surpreendente o fato de que a maioria das mutações *missense* reportadas não possuam uma designação clara quanto a sua provável patogenicidade (CARVALHO, COUCH e MONTEIRO, 2007).

Com o objetivo de melhor compreender o comportamento desses variantes e aprimorar as informações genéticas disponíveis, diversos ensaios foram desenvolvidos na tentativa de avaliar funcionalmente a proteína variante e prever a sua provável relevância clínica (BILLACK e MONTEIRO, 2004).

A crescente disponibilidade de informações sobre o papel de BRCA1 em diferentes processos celulares, contribuiu para o desenvolvimento de ensaios funcionais capazes de contemplar diferentes funções da proteína, e associá-las a sua capacidade supressora de tumor. Assim, os ensaios correlacionam propriedades bioquímicas ou funcionais de BRCA1 com a integridade estrutural proteica, avaliando o impacto funcional e a sua associação com o desenvolvimento ou não do câncer (BILLACK e MONTEIRO, 2004, COUCH *et al*, 2008; CARVALHO *et al*, 2009; MILLOT *et al*, 2012; BOWMAN *et al*, 2013).

O ensaio funcional de TA que avalia o comportamento de BRCA1 surgiu a partir da observação da capacidade de ativação da transcrição de um gene repórter mediada pela região C-terminal da proteína, mais precisamente os domínios BRCTs (resíduos 1650-1859), quando fusionada a um domínio heterólogo de ligação ao DNA (MONTEIRO, AUGUST e HANAFUSA, 1996).

Esse ensaio permite uma correlação entre a atividade transcricional e a integridade dos domínios BRCTs e sua circunvizinhança. Como esta estrutura é fundamental para a atividade supressora de tumor de BRCA1, o ensaio de TA funciona como um bom preditor de patogenicidade das mutações em *BRCA1* (CARVALHO *et al*, 2007)).

Outra abordagem funcional é o sistema de dois híbridos desenvolvido em células humanas que permite correlacionar a capacidade de interação entre BRCA1 e PALB2 e a integridade estrutural do domínio *coiled-coil* dos variantes de BRCA1 (WOODS *et al*, 2016). Como a interação de BRCA1 com PALB2 é fundamental para a via de reparo ao DNA, o ensaio também funciona como um bom preditor de patogenicidade das mutações em *BRCA1*.

Nosso estudo teve como objetivo avaliar funcionalmente variantes *missense* localizados na região do domínio *coiled-coil* de BRCA1 através destas duas abordagens: o ensaio de TA e o ensaio de interação com PALB2.

Primeiramente foram selecionados os variantes a serem estudados. Foram utilizados diferentes critérios de seleção, gerando com isso, dois grupos distintos de variantes (**Figura 4.1**). O primeiro grupo, composto por todos os variantes descritos na população identificados no banco de dados BIC (*Breast Cancer Information Core* - <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), mas que ainda não haviam sido analisados funcionalmente. O segundo grupo foi composto por todos os variantes naturais de uma mesma posição nos resíduos a' e d' do *coiled-coil* de BRCA1 onde pelo menos

uma das substituições de aminoácido foi classificada como C65 (perfil patogênico) pelo algoritmo Align GVGD (**Figura 4.4 e Tabela 4.1**).

Neste trabalho foram utilizados dois algoritmos de predição *in silico*: Align GVGD (*Breast Cancer Genes IARC database* – TAVTIGIAN *et al*, 2005 - <http://brca.iarc.fr>) e o Polyphen2 (ADZHUBEI *et al*, 2010 - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>). Como foram observadas discordâncias nas predições entre os algoritmos (**Tabela 4.1**), para a seleção dos variantes, foi considerada apenas a classificação do Align GVGD; em trabalhos anteriores do grupo, foi observado uma correlação mais satisfatória entre as predições deste algoritmo e os resultados encontrados em análises funcionais (De Gregoris, 2014 e Fernandes, 2016).

O perfil de produção das proteínas quiméricas codificadas pelas construções utilizadas nos ensaios funcionais foi avaliado por rotinas de *immunoblotting*. E, de uma maneira geral, tanto a proteína VP16:PALB2, como os controles GAL4DBD:BRCA1wt (BRCA1 WT) e L1407P, e as proteínas quiméricas variantes de BRCA1 apresentaram níveis proteicos detectáveis e com perfil de migração esperado – exceção para os variantes L1418I e L1418V (segundo grupo) (**Figura 4.2 e 4.3**).

A alteração no perfil de migração observado pode ser atribuída a modificações pós-traducionais, possivelmente fosforilações. Curiosamente, são variantes de um mesmo resíduo do domínio *colied-coil* (L1418), e também uma posição importante para a interação com PALB2 (posição d', **Figura 4.4**).

Também foram notadas variações na intensidade do perfil das proteínas quiméricas. Essas diferenças já foram observadas em outros estudos funcionais de BRCA1 (HAYES *et al*; 2000; CARVALHO *et al*; 2007), e são atribuídas a alterações na estabilidade das proteínas e/ou dos seus transcritos codificantes (NELSON e HOLT, 2010). Importante destacar que variações como essas não, necessariamente, estão associadas a um comportamento disfuncional da proteína.

O ensaio de TA foi a primeira abordagem funcional empregada para avaliação do comportamento dos variantes deste estudo.

Entretanto, alguns aspectos dessa abordagem são críticos para interpretação de resultados. Originalmente, o ensaio TA foi pensado visando a análise da região correspondente aos éxons 16 a 24, considerando essencialmente os domínios BRCTs da proteína (resíduos 1560 a 1863) (MONTEIRO *et al*, 1996; MONTEIRO *et al*, 1997; HAYES, *et al*, 2000; VALLON-CHRISTERSSON *et al*, 2001).

Posteriormente, Phelan e colaboradores, em 2005, estenderam a região de cobertura ao éxon 13 (resíduos 1396 a 1863); sendo validado por Carvalho e colaboradores em 2007 - mostrando que variantes localizados em regiões distais dos domínios BRCTs também influenciavam na capacidade de ativação transcricional, revelando uma boa correlação entre os dados de classificação funcional e os dados de epidemiologia clínica disponíveis (PHELAN *et al*, 2005; CARVALHO *et al*, 2007; CARVALHO *et al*, 2009; LEE *et al*, 2010). Mais recentemente, nosso grupo avaliou a extensão do contexto do ensaio ao final do éxon 11 (resíduos 1315-1863), englobando todo o domínio *coiled-coil* (**Figura 5.1**).

Globalmente, os dados derivados das análises nos diferentes contextos mostram que os valores absolutos de ativação transcricional diminuem à medida que o contexto analisado aumenta, diminuindo a sensibilidade do modelo (em especial para a região de análise do domínio *coiled-coil*).

Quando os variantes do primeiro grupo foram avaliados no ensaio de TA, todos apresentaram um comportamento semelhante ao da proteína selvagem. Mesmo os variantes M1400V e A1416T, que mostraram atividades relativas um pouco menores, não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle selvagem (**Figura 4.5**). Sugerindo que nenhuma das alterações de aminoácido tenham afetado estrutural e funcionalmente os domínios BRCTs.

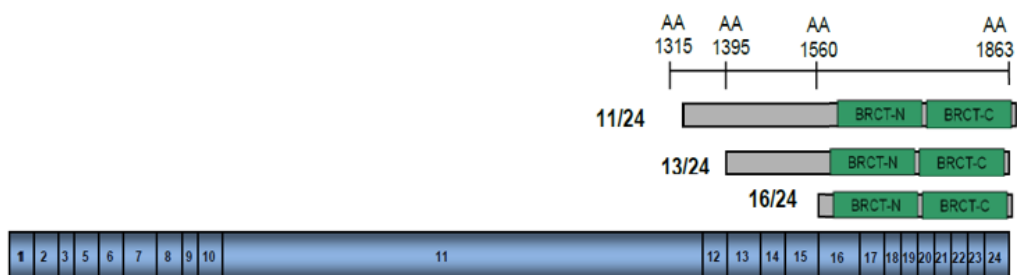


Figura 5.1 – Representação esquemática dos éxons de *BRCA1* e os diferentes contextos analisados: Representação dos éxons de *BRCA1* (em azul). E representação dos diferentes contextos de *BRCA1* (16/24, 13/24 e 11/24) analisados e avaliados quanto a sua capacidade de ativação transcricional através do ensaio de TA (retângulos cinzas). Em verde estão representados os domínios BRCTs. Adaptado de De Gregoris, 2014.

O comportamento do segundo grupo de variantes pode ser dividido em dois perfis. (1) Os variantes com atividade semelhante (L1418V) ou superior ao controle selvagem (M1411L, M1411I e L1418I), representados na **Figura 4.6 A**, sugerindo que o impacto das alterações nas proteínas não comprometem funcionalmente a capacidade de ativação transcricional dos domínios BRCTs. E (2) aqueles com atividade reduzida e estatisticamente diferente do controle positivo (L1407V, L1407F, L1407H, L1407R, L1407I, M1411V, M1411R, M1411K, L1418S e L1418F; **Figura 4.6 B**), sugestiva de um comprometimento dos BRCTs, principalmente para os variantes L1407H e M1411K, que apresentaram atividades equivalentes ao controle negativo.

A segunda abordagem proposta para avaliação dos variantes foi a análise da capacidade de interação com PALB2 através do sistema de dois híbridos em células humanas (M2H), descrito por Woods e colaboradores (2014).

Para a análise dos resultados desta abordagem é preciso ser levado em consideração a atividade transcricional intrínseca de BRCA1. As leituras da atividade de luciferase do ensaio de interação com PALB2 correspondem, na verdade, ao somatório da indução decorrente da interação propriamente dita e da indução promovida diretamente por BRCA1. Entretanto, a capacidade de recrutamento da maquinaria de transcrição pelo domínio de ativação de VP16 é superior a observada pelos domínios BRCTs de BRCA1, minimizando com isso a extensão do “vazamento”. Além disso, a análise comparativa entre a capacidade de interação com PALB2 e a atividade transcricional intrínseca de cada variante reduz ainda mais o mascaramento dos resultados, permitindo uma interpretação mais da interação dos variantes, como mostra a Figura 4.11 e 4.12.

Para o primeiro grupo, foi possível observar para o ensaio de M2H, que os variantes M1400V e A1416T apresentaram uma capacidade de interação estatisticamente inferior a apresentada pelo controle positivo (**Figura 4.8**), indicando uma redução na interação com PALB2, sugestivo de uma disfunção do domínio *coiled-coil* de BRCA1 e de um perfil patogênico.

Quando comparados os resultados dos ensaios de interação e de TA, todos os variantes do primeiro apresentaram diferenças estatísticas entre a atividade transcricional e a capacidade de interação com PALB2. O que sugere que, apesar da redução significativa na capacidade de interação dos variantes M1400V e A1416T, a interação com PALB2, ainda foi suficiente para superar a atividade basal intrínseca de cada variante (**Figura 4.11**).

O comportamento de interação do segundo grupo de variantes também pode ser dividido em dois perfis. (1) Os variantes com atividade semelhante ao controle selvagem (L1407F, L1407H, L1407I, M1411V, M1411K e L1418F) ou superior (M1411L, M1411I e L1418I) (**Figura 4.9 A**), sugerindo um impacto funcional ou estrutural reduzido nas proteínas codificadas, não comprometendo a capacidade de interação com PALB2. E (2) os variantes (L1407R, L1407V, M1411R, L1418S e L1418V) que apresentaram uma significativa redução na interação com PALB2, se assemelhando ao comportamento do controle negativo, indicando um comprometimento da região do *coiled-coil*, indicativo de um perfil patogênico (**Figura 4.9 B**).

Quando comparados os resultados dos ensaios de interação e de TA, a maioria dos variantes apresentou diferenças estatisticamente significativas (**Figura 4.12**), com exceção, novamente, dos variantes L1407R, M1411R, L1418S e L1418V nos quais esta diferença não foi observada. Isto indica que a atividade observada para esses variantes é exclusiva da capacidade transcricional intrínseca de cada um, sem uma significativa interferência da interação com PALB2.

Apesar das diferenças e similaridades entre os ensaios realizados, é importante ressaltar que eles são intrinsecamente informativos sobre regiões distintas da proteína BRCA1: o ensaio de TA reflete o comportamento dos domínios BRCTs enquanto que o ensaio de M2H reflete o domínio *coiled-coil*, onde as mutações *missense* neste estudo se encontram, sendo então, mais informativo. Com isso, comportamentos distintos entre os ensaios de avaliação funcional de um mesmo variante não são surpreendentes, pois as diferentes mutações podem impactar estrutural e funcionalmente de formas distintas.

Os variantes do primeiro grupo apresentaram não perfis distintos do selvagem em ambas as abordagens analisadas, com a exceção dos M1400V e A1416T que apresentaram uma baixa capacidade de interação com PALB2 (**Tabela 5.1**). O que permite a classificação deste dois variantes como sugestivamente patogênico.

Alguns variantes do segundo grupo (M1411L, M1411I e L1418I) também um perfil semelhante ao BRCA1 WT nos dois ensaios analisados, podendo ser classificado como provavelmente não patogênicos. Enquanto que L1407V, L1407R, M1411R e L1418S, apresentaram perfis semelhante ao controle negativo em ambas as abordagens analisadas, caracterizando-os como provavelmente patogênicos (**Figura 5.1**).

Os variantes L1407I, L1407F, L1407H, M1411V, M1411K e L1418F apresentaram uma baixa atividade apenas no ensaio de TA, o que pode ser justificado pela baixa sensibilidade do ensaio no contexto utilizado neste estudo, com isso, esses são classificados como variantes possivelmente não patogênicos.

Já o L1418V apresenta um perfil indicativo de patogenicidade apenas no ensaio de interação com PALB2, entretanto como este ensaio é mais sensível em relação a região analisada, é possível classifica-lo como um variante sugestivamente patogênico.

Ao analisar o comportamento do conjunto de variantes do segundo grupo considerando suas posições no domínio (**Figura 4.7 e 4.10**) é possível observar que a posição L1407 apresentou uma menor variabilidade em ambos os ensaios (TA e M2H), diferente das outras duas posições analisadas (M1411 e L1418). A posição L1407 é a única que se encontra no resíduo d' do *coiled-coil*, enquanto que as outras duas estão posicionadas no resíduo a'. Entretanto, para qualquer inferência sobre esse comportamento, mais informações são necessárias.

Os variantes L1418V e L1418I apresentaram uma baixa e uma elevada capacidade de interação com PALB2, respectivamente. Eles estão posicionados em um dos resíduos a' do *coiled-coil*, além de serem os dois variantes que apresentaram um perfil de migração alterado na análise do perfil proteico (**Figura 4.3**). De alguma forma, a possível alteração pós-traducional responsável por essa alteração na migração, pode ter afetado estrutural e funcionalmente o domínio *coiled-coil*, favorecendo às alterações na capacidade de interação com PALB2 observadas.

É difícil estabelecer uma linha de classificação precisa para a determinação da patogenicidade (ou não) de cada variante analisado, em especial limitando-se a apenas dois critérios de análise. São necessárias mais informações para a construção de um perfil de classificação de um variante. Mas, seguramente, as duas abordagens usadas neste estudo auxiliam na construção desse perfil, auxiliando no direcionamento de futuros estudos.

Tabela 5.1: Identificação do perfil sugestivo dos variantes do estudo.

1º GRUPO					
Variantes	Posição no <i>coiled-coil</i>	Align GVGD	IB	PERFIL SUGESTIVO	
				TA	M2H
M1400V	d'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	Patogênico
M1400T	d'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
H1402Y	f'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
H1402R	f'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
Q1409L	f'	Class C15	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
A1416T	f'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	patogênico
H1421R	d'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>

2º GRUPO					
Variantes	Posição no <i>coiled-coil</i>	Align GVGD	IB	PERFIL SUGESTIVO	
				TA	M2H
L1407I	d'	Class C0	padrão	patogênico	<i>não patogênico</i>
L1407F	d'	Class C15	padrão	patogênico	<i>não patogênico</i>
L1407V	d'	Class C25	padrão	patogênico	patogênico
L1407H	d'	Class C65	padrão	patogênico	<i>não patogênico</i>
L1407R	d'	Class C65	padrão	patogênico	patogênico
M1411L	a'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
M1411V	a'	Class C15	padrão	patogênico	<i>não patogênico</i>
M1411R	a'	Class C65	padrão	patogênico	patogênico
M1411K	a'	Class C65	padrão	patogênico	<i>não patogênico</i>
M1411I	a'	Class C0	padrão	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
L1418I	a'	Class C0	<i>alterado</i>	<i>não patogênico</i>	<i>não patogênico</i>
L1418V	a'	Class C25	<i>alterado</i>	<i>não patogênico</i>	patogênico
L1418S	a'	Class C65	padrão	patogênico	patogênico
L1418F	a'	Class C15	padrão	patogênico	<i>não patogênico</i>

IB= *immunoblotting*; TA= atividade transcricional ?; M2H = dois híbridos em mamífero

6 CONCLUSÃO

- Foram identificados 198 variantes naturais *missense* na região do *coiled-coil* de BRCA1, dos quais 16 já haviam sido reportados na base de dados do BIC, e 7 não haviam sido analisados funcionalmente. Desse conjunto, 44 variantes se encontravam posicionados nos resíduos a' e d' do domínio *coiled-coil*, e 14 estavam localizados em posições onde ao menos um variante foi classificado como C65 pelo Aling GVG
- Nenhum variante identificado na população apresentou baixa atividade no ensaio de TA. Já no ensaio de interação com PALB2, os variantes M1400V, A1416T apresentaram um comportamento, sugestivo de um perfil patogênico.
- Entre os variantes naturais estudados, o conjunto L1407F, L1407H, L1407I, L1407R, L1407V, M1411K, M1411R, M1411V, L1418F e L1418S apresentou perfil patogênico sugestivo no ensaio de TA; em especial os variantes L1407H e o M1411K. Quando considerados no ensaio de interação com PALB2, apenas os variantes L1407R, L1407V, M1411R, L1418S e L1418V apresentaram comportamento, sugestivo de um perfil patogênico.

7 BIBLIOGRAFIA

1. ADZHUBEI I.A., *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 4: 248–249. 2010
2. AGATA, S *et al.* Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. *J Med Genet*, v.42 (10). 2005.
3. ALBARAKATIA, N., *et al.* Targeting BRCA1-BER deficient breast cancer by ATM or DNA-PKcs blockade either alone or in combination with cisplatin for personalized therapy. *Molecular Oncology*, 9, 204e2 1 7, 2015.
4. Align GVGD, disponível em <http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php> acessado em: Fevereiro, 2017.
5. ALLI, E. E FORD, J. *BRCA1: Beyond double-strand break repair*. DNA Repair, 2015
6. AMENDOLA, LCB E VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51(4), p:325-330. 2005.
7. ANTONIOU, A. C.; *et al*; M. *Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2*. *N. Engl. J.Med.*, 371, 497–506, 2014
8. APARICIO, T.; BAER, R.; GAUTIER, J. *DNA double-strand break repair pathway choice and câncer*. *DNA Repair*, 19: 169–175,2014.
9. AUSUBEL, FM *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*, Nova Iorque: Ed. John Wiley & Sons. 1987.

10. BAER, R. e LUDWIG, T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. **Curr Opin Genet Dev** v.12, 86-91, 2002.
11. BILLACK, MB e MONTEIRO, ANA. *Methods to Classify BRCA1 Variants of Uncertain Clinical Significance The More the Merrier*. Cancer Biology & Therapy, v. 3 (5), p.458-459. Maio, 2004.
12. BOUWMAN, P.; *et al.* A High-Throughput Functional Complementation Assay for Classification of BRCA1 Missense Variants. **CANCER DISCOVERY**, 2013.
13. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.
14. BRCA1 CIRCOS, disponível em <https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/circos/index.shtml> acessado em: Fevereiro, 2017.
15. Breast Cancer Information Core, disponível em <http://research.nhgri.nih.gov/bic/> acessado em: Fevereiro, 2017
16. BRZOVIC, PS *et al.* Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol*, v. 8, p. 833–7. 2001.
17. BUISSON R, MASSON JY. *PALB2 self-interaction controls homologous recombination*. *Nucleic acids research*. 40:10312–10323; 2012.

18. BURNETTE, W. *Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, 112(2): 195-203, 1981.
19. CALÒ, V.; *et al.* *The Clinical Significance of Unknown Sequence Variants in BRCA Genes*. *Cancers*, 2, 1644-1660; 2010.
20. CARVALHO, MA; COUCH, FJ e MONTEIRO, ANA. *Functional assays for BRCA1 and BRCA2*. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39(2), p. 298–310. 2007.
21. CARVALHO, M.; *et al.* *Determination of Cancer Risk Associated with Germ Line BRCA1 Missense Variants by Functional Analysis*. *Cancer Res*, 15; 67(4): 1494–1501, 2007.
22. CARVALHO, M.; *et al.* *Analysis of a set of missense, frameshift, and in-frame deletion variants of BRCA1*. *Mutat Res*. 15; 660(1-2): 1–11, 2009.
23. CARVALHO, R.; *et al.* *Probing Structure-Function Relationships in Missense Variants in the Carboxy-Terminal Region of BRCA1*. *PLoS ONE*, 9(5): e97766, 2014.
24. CAVANAGH, H. & ROGERS, K. *The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers*. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 13:16, 2015.
25. CHOUDHURY A.D.; XU H., BAER R.; *Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression*. *J. Biochem*, v. 279, 33909–33918, 2004
26. CHRISTOU C.M. E KYRIACOU K., *BRCA1 and its network of interacting partners*. *Biology*. 2, 40-63, 2013.

27. CLARK, S.; *et al.* *Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1*. Computational and Structural Biotechnology Journal, volume No: 1, Issue 1, 2012.
28. COUCH, F.; *et al.* *Assessment of Functional Effects of Unclassified Genetic Variants*. Hum Mutat, 29(11): 1314–1326, 2008.
29. CROPP, C.; *et al.* *Evidence for Involvement of BRCA1 in Sporadic Breast Carcinomas*. CANCER RESEARCH, 54. 2548-2551, 1994.
30. ĐAPIC', V. E MONTEIRO, A. *Functional Implications of BRCA1 for Early Detection, Prevention, and Treatment of Breast Cancer*. Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 16(3):233–252, 2006.
31. DE GREGORIS, GIULIANA. *Avaliação Funcional De Variantes Missense De Brca1: Estudo Para O Aperfeiçoamento Do Ensaio De Transativação Transcricional*. 2012 dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em oncologia, Instituto Nacional de Câncer, RJ, 2012.
32. DE GREGORIS, G., MONTEIRO A., CARVALHO M.A., *BRCA1 VUS: an approach to assess functional impact using transcription activation and PALB2 interaction*. European Journal of Cancer, 2014.
33. DENG CHU-XIA, BRODIA S.G. *Roles of BRCA1 and its interacting proteins*. Bioessays, 22, 728-737, 2000.
34. DOWNS, B. & WANG, S. *Epigenetic changes in BRCA1-mutated familial breast cancer*. Cancer Genet, 208(5):237-40, 2015.
35. EASTON, D.; *et al.* *Genetic Linkage Analysis in Familial Breast and Ovarian Cancer: Results from 214 Families*. Am.J. Hum. Genet., 52:678-701, 1993.

36. EASTON, D.; *et al.* *A Systematic Genetic Assessment of 1,433 Sequence Variants of Unknown Clinical Significance in the BRCA1 and BRCA2 Breast Cancer–Predisposition Genes.* The American Journal of Human Genetics, Volume 81, 2007.
37. FUNDAÇÃO DO CÂNCER, disponível em <<https://www.cancer.org.br/sobre-o-cancer/estimativas/>>. Acesso em setembro, 2017
38. GLOVER, M.; WILLIAMS, S.; LEE, M. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. **TRENDS in Biochemical Sciences**, vol.29, No.11, 2004.
39. GUO, Y.; FENG, W.; SY, S. M. H.; HUEN, M. S. Y. *ATM-dependent phosphorylation of the fanconi anemia protein PALB2 promotes the DNA damage response.* J. Biol. Chem. 2015, doi:10.1074/jbc.M115.672626.
40. HALL, JM *et al.* *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.* Science, v. 250(4988), p.1684-9. 21, 1990.
41. HAYES, F.; *et al.* *Functional Assay for BRCA1: Mutagenesis of the COOH-Terminal Region Reveals Critical Residues for Transcription Activation.* CANCER RESEARCH, 60, 2411–2418, 2000.
42. HU, YF *et al.* *Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain.* J Biol Chem, v.275, p.40910–5. 2000.
43. HU, YF e LI, R. *JunB potentiates function of BRCA1 activation domain 1 (AD1) through a coiled-coil mediated interaction.* Genes Dev, v.16, p.1509–17. 2002.

44. IARC (International Agency for Cancer Research) – Breast Cancer Genes IARC Database. Disponível em <<http://brca.iarc.fr>>. Acesso em setembro, 2017.
45. INCA, disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home?orig=inca>>. Acesso em setembro, 2017.
46. JHURANEY, A.; *et al.* BRCA1 *Circos: a visualisation resource for functional analysis of missense variants.* J Med Genet, 52:224–230, 2015.
47. JIANG, Q. & GREENBERG, R. *Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network.* J Biol Chem, 290(29):17724-32, 2015.
48. KAKAROUGKAS, A. E JEGGO. *DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism.* Br J Radiol, 2014
49. KELSEY, J. *A review of the epidemiology of human breast cancer.* Epidemiol Rev., 1:74-109, 1979.
50. KEY, T.; VERKASALO, P.; BANKS, E. *Epidemiology of breast cancer.* The Lancet Oncology, Vol 2, 2001
51. KNUDSON, AG. *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, v.68, n.4, p.820-3. 1971
52. KOBAYASHI, H.; *et al.* *Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review).* Oncol Rep, (3):1019-29, 2013

53. LEE, M.; *et al.* *Comprehensive Analysis of Missense Variations in the BRCT Domain of BRCA1 by Structural and Functional Assays.* *Cancer Res*, 15; 70(12): 4880–4890, 2010.
54. LUO Y., BATALAO A., ZHOU H., ZHU L. *Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system.* *Biotechniques*, 2, 1997
55. M.C. SOUTHEY, Z.L. *et al.*, *A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer,* *Breast Cancer Res.* 12 R109, 2010.
56. MERSCH, J.; *et al.* *Cancers Associated With BRCA1 and BRCA2 Mutations Other Than Breast and Ovarian.* *Cancer*, 2014.
57. MESQUITA, R.; *et al.* *Tandem BRCT Domains: DNA's Praetorian Guard.* *Genes & Cancer*, vol 1, no 11, 2010.
58. MILLOT, G.; *et al.* *A Guide for Functional Analysis of BRCA1 Variants of Uncertain Significance (VUS).* *Hum Mutat*, 33(11): 1526–1537, 2012.
59. MIKI, Y. *et al.* *A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1.* *Science*, VOL 266, 1994.
60. MINAMI, A.; *et al.* *Connection between tumor suppressor BRCA1 and PTEN in damaged DNA repair.* **Frontiers in Oncology**, volume 4, article 318, 2014
61. MONTEIRO, A.; AUGUST, A.; HANAFUSA, H. *Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region.* *Proc. Natl. Acad. Sci*, Vol. 93, pp. 13595–13599, 1996.
62. MORRIS, J.; *et al.* *Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility.* *Hum Mol Genet*, 15(4):599-606, 2006.

63. NAGY R., SWEET K., ENG C., *Highly penetrant hereditary cancer syndromes*. *Oncogene* (2004) 23, 6445–6470
64. NATIONAL CANCER SOCIETY (NCI). Disponível em <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em Novembro de 2017.
65. NELSON, AC e JEFFREY, T. *Impact of RING and BRCT Domain Mutations on BRCA1 Protein Stability, Localization and Recruitment to DNA Damage*. *Radiation Research*, v.174(1), p.1-13. 2010.
66. NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Acesso fevereiro, 2017).
67. NEUMANN, E *et al.* *Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields*. *EMBO J*; v. 1(7), p.841–845. 1982
68. NEPOMUCENO, T.; *et al.* *The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition*. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1886, 2017.
69. NESIC, K.; *et al.* *A. Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker*. *J. Pathol.* 2017, doi:10.1002/path.5025.
70. PHELAN, C.; *et al.* *Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance*. *J Med Genet*, 42:138–146, 2005.
71. OLIVER AW, *et al.*, *Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2*. *EMBO reports*. 2009; 10:990–996
72. PANIER, S.; BOULTON, S. J. *Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus*. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 7-18, 2013.

73. PAUL, A. E PAUL, S. *The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers*. Front Biosci, 19: 605–618, 2015.
74. PolyPhen-2, disponível em <<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>> acessado em: Fevereiro, 2017.
75. POTAPOVA, A.; *et al.* *Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer*. Cancer Res, 68, 998–1002, 2008.
76. PRAKASH1, R.; *et al.* *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2 and associated proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 7(4), 2015.
77. PRUTHI, S.; GOSTOUT, B.; LINDOR, N. *Identification and Management of Women With BRCA Mutations or Hereditary Predisposition for Breast and Ovarian Cancer*. Mayo Clin Proc, 85(12):1111-1120, 2010.
78. SAWYER, S.; *et al.* *Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype*. Cancer Discov, 5(2):135-42, 2015.
79. SAVAGE, K. E HARKIN, P. *BRCA1, a ‘complex’ protein involved in the maintenance of genomic stability*. FEBS Journal, 282, 630–646, 2015.
80. SCALIA-WILBUR, J.; *et al.* *Breast Cancer Risk Assessment: Moving Beyond BRCA 1 and 2*. Semin Radiat Oncol, 26:3-8, 2016.
81. SCULLY, R. *et al.* *Genetic Analysis of BRCA1 Function in a Defined Tumor Cell Line*. Molecular Cell, Vol. 4, 1093–1099, 1999.

- 82.** SCULLY, R; Xie, A e Nagaraju, G. *Molecular functions of BRCA1 in the DNA damage response*. *Cancer Biol Ther*, v. 3, p.521–7. 2004.
- 83.** SHARAN, SK *et al.* *Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2*. *Nature*, v. 386, p. 804-810. 1997
- 84.** SHENG, Z.; ZHAO, Y.; HUANG, J. *Functional Evolution of BRCT Domains from Binding DNA to Protein*. *Evolutionary Bioinformatics*, 7, 87–97, 2011.
- 85.** SHIOVITZ, S E KORDE, L. *Genetics of breast cancer: a topic in evolution*. *Annals of Oncology* 26: 1291–1299, 2015.
- 86.** SIFRI, R; GANGADHARAPPA, S e ACHESON, L. S. *Identifying and testing for hereditary susceptibility to common cancers*. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, v.54, n.6, p.309-326. 2004.
- 87.** SMITH, TM *et al.* *Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1*. *Genome Res*, v. 6(11), p.1029-49. Novembro, 1996.
- 88.** STRUMYLAITĖ, L.; MECHONOŠINA, K.; TAMAŠAUSKAS, S. *Environmental factors and breast cancer*. *Medicina (Kaunas)*, 46(12): 867-873, 2010.
- 89.** SY, SMH; HUEN, MSY e CHEN, J. *PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106 (17), p.7155–7160. 28 de abril, 2009.
- 90.** SZABO CI, WORLEY T e MONTEIRO AN. *Understanding germ-line mutations in BRCA1*. *Cancer Biol Ther*, v.3, p.515–20. 2004

91. TAO Z., *et al.*, - *Breast cancer: Epidemiology and Etiology*. Cell Biochem Biophys. 2015 – 333-338.
92. TAVTIGIAN SV, *et al*, *Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral*. J Med Genet 42:138-146. 2005
93. TOSS, A.; *et al*. *Hereditary Ovarian Cancer: Not Only 1 and 2 Genes*. Biomed Res Int, 2015, 341723, 2015.
94. WANG, B. *BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail*. Cell & Bioscience, 2:6, 2012.
95. WANG, L. & DI, L. *BRCA1 And Estrogen/Estrogen Receptor In Breast Cancer: Where They Interact?* International Journal of Biological Sciences, 10(5): 566-575, 2014.
96. WELCSH, PL *et al*. *BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99(11), p.7560-5. 28 de maio, 2002.
97. WILLIAMS, S.; *et al*. *Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1*. NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, vol 11, number 6, 2004.
98. WOODS, N.; *et al*. *Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance*. Genomic Medicine, 2016.
99. WOOSTER, R.; *et al*. *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. Science, 265(5181):2088-90, 1994.

100. WORLD HEALTH ORGANIZATION Available at: <http://www.who.int/cancer/en/> Acesso em Novembro de 2017).
101. WU-BAER, F *et al.* *The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin.* J Biol Chem, V. 278, p. 34743–6. 2003.
102. WU, LC *et al.* Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet, v. 4, p. 430–40. 1996.
103. XIA, Y *et al.* *Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein.* J Biol Chem, v.278, p.5255–63. 2003.
104. VALLON-CHRISTERSSON, J.;*et al.* *Functional Analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families.* Human Molecular Genetics, Vol. 10, No 4, 2001.
105. YANG, ES e XIA, F. *BRCA1 16 years later: DNA damage-induced BRCA1 Shuttling.* FEBS Journal, v.277, p.3079-85. 2010.
106. YI, Y.; KANG, H.; BAE, I. *BRCA1 and Oxidative Stress.* Cancers, 6, 771-795, 2014
107. ZHANG F *et al.* *PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA damage response.* Curr Biol. 2009; 19:524–529.
108. ZHANG, J. & POWELL, S. *The Role of the BRCA1 Tumor Suppressor in DNA Double-Strand Break Repair.* Mol Cancer Res, 3(10), 2005

Anexo 4.1 - Tabela com todos os variantes naturais *missense* possíveis na região do *coiled-coil* de BRCA1.

Variantes	Substituição nucleotídica	Resíduos do <i>coiled-coil</i>	Predição (Aling GVG D)	Predição (Poliphen2)
I1391L	A4171C	b'	Class C0	Benign
I1391V	A4171G	b'	Class C0	Benign
I1391F	A4171T	b'	Class C0	Possibly Damaging
I1391T	T4172C	b'	Class C25	Benign
I1391S	T4172G	b'	Class C35	Benign
I1391N	T4172A	b'	Class C35	Benign
I1391M	T4173G	b'	Class C0	Benign
L1392I	T4174A	c'	Class C0	Benign
L1392V	T4174G	c'	Class C0	Benign
L1392S	T4175C	c'	Class C55	Possibly Damaging
L1392F	A4176C	c'	Class C0	Possibly Damaging
T1393S	A4177T	d'	Class C0	Benign
T1393P	A4177C	d'	Class C0	Possibly Damaging
T1393A	A1477G	d'	Class C0	Benign
T1393I	C1478T	d'	Class C0	Benign
T1393N	C1478A	d'	Class C0	Benign
T1394S	A1480T	e'	Class C55	Possibly Damaging
T1394P	A1480C	e'	Class C35	Probably Damaging
T1394A	A1480G	e'	Class C55	Possibly Damaging
T1394I	C1481T	e'	Class C65	Possibly Damaging
T1394N	C1481A	e'	Class C55	Benign
Q1395E	C1483G	f'	Class C25	Benign
Q1395K	C1483A	f'	Class C45	Benign
Q1395L	A1484T	f'	Class C65	Benign
Q1395P	A1484C	f'	Class C65	Possibly Damaging
Q1395R	A1484G	f'	Class C35	Benign
Q1395H	G1485C	f'	Class C15	Possibly Damaging
Q1396E	C1486G	g'	Class C25	Possibly Damaging
Q1396K	C1486A	g'	Class C45	Benign
Q1396L	A1487T	g'	Class C65	Benign
Q1396P	A1487C	g'	Class C65	Probably Damaging
Q1396R	A1487G	g'	Class C35	Benign
Q1396H	G1488C	g'	Class C15	Probably Damaging
R1397G	A1489G	a'	Class C15	Benign
R1397W	A1489T	a'	Class C25	Probably Damaging
R1397T	G1490C	a'	Class C0	Benign
R1397M	G1490T	a'	Class C15	Possibly Damaging
R1397K	G1490A	a'	Class C0	Benign
R1397S	G1491C	a'	Class C15	Benign
D1398H	G1492C	b'	Class C0	Possibly Damaging
D1398N	G1492A	b'	Class C0	Possibly Damaging

D1398Y	G1492T	b'	Class C0	Possibly Damaging
D1398V	A1493T	b'	Class C0	Benign
D1398A	A1493C	b'	Class C0	Benign
D1398G	A1493G	b'	Class C0	Possibly Damaging
D1398E	T1494G	b'	Class C0	Benign
T1399S	A1495T	c'	Class C0	Benign
T1399P	A1495C	c'	Class C0	Possibly Damaging
T1399A	A1495G	c'	Class C0	Benign
T1399I	C1496T	c'	Class C0	Possibly Damaging
T1399N	C1496A	c'	Class C0	Benign
M1400L	A1498C	d'	Class C0	Benign
M1400V	A1498G	d'	Class C0	Benign
M1400T	T1500C	d'	Class C0	Benign
M1400R	T1500G	d'	Class C0	Benign
M1400K	T1500A	d'	Class C0	Benign
M1400I	G1501C	d'	Class C0	Benign
Q1401K	C1502A	e'	Class C0	Benign
Q1401E	C1502G	e'	Class C0	Benign
Q1401L	A1503T	e'	Class C25	Benign
Q1401R	A1503G	e'	Class C0	Possibly Damaging
Q1401P	A1503C	e'	Class C15	Possibly Damaging
Q1401H	A1504T	e'	Class C0	Benign
H1402N	C1505A	f'	Class C0	Benign
H1402D	C1505G	f'	Class C0	Benign
H1402Y	C1505T	f'	Class C0	Benign
H1402L	A1506T	f'	Class C0	Benign
H1402P	A1506C	f'	Class C0	Benign
H1402R	A1506G	f'	Class C0	Benign
H1402Q	T1507A	f'	Class C0	Benign
N1403Y	A1508T	g'	Class C15	Possibly Damaging
N1403H	A1508C	g'	Class C0	Benign
N1403D	A1508G	g'	Class C0	Benign
N1403I	A1509T	g'	Class C15	Benign
N1403S	A1509G	g'	Class C0	Benign
N1403T	A1509C	g'	Class C0	Benign
N1403K	C1510G	g'	Class C0	Benign
L1404M	C1511A	a'	Class C0	Probably Damaging
L1404V	C1511G	a'	Class C0	Benign
L1404P	T1512C	a'	Class C45	Probably Damaging
L1404R	T1512G	a'	Class C45	Possibly Damaging
L1404Q	T1512A	a'	Class C55	Benign
I1405L	A1514T	b'	Class C0	Benign
I1405V	A1514G	b'	Class C0	Benign
I1405T	T1415C	b'	Class C0	Benign
I1405R	T1515G	b'	Class C0	Possibly Damaging
I1405K	T1515A	b'	Class C0	Possibly Damaging
I1405M	A1516G	b'	Class C0	Possibly Damaging

K1406Q	A1517C	c'	Class C0	Benign
K1406E	A1517G	c'	Class C0	Benign
K1406M	A1518T	c'	Class C0	Possibly Damaging
K1406T	A1518C	c'	Class C0	Benign
K1406R	A1518G	c'	Class C0	Possibly Damaging
K1406N	G1519C	c'	Class C0	Possibly Damaging
L1407I	C1520A	d'	Class C0	Benign
L1407F	C1520T	d'	Class C15	Possibly Damaging
L1407V	C1520G	d'	Class C25	Benign
L1407H	T1521A	d'	Class C65	Possibly Damaging
L1407P	T1521C	d'	Class C65	Possibly Damaging
L1407R	T1521G	d'	Class C65	Benign
Q1408E	C1523G	e'	Class C0	Benign
Q1408K	C1523A	e'	Class C15	Possibly Damaging
Q1408L	A1524T	e'	Class C35	Benign
Q1408P	A1524C	e'	Class C25	Possibly Damaging
Q1408R	A1524G	e'	Class C0	Possibly Damaging
Q1408H	G1525H	e'	Class C0	Possibly Damaging
Q1409E	C1526G	f'	Class C0	Benign
Q1409K	C1526A	f'	Class C0	Possibly Damaging
Q1409L	A1527T	f'	Class C15	Benign
Q1409P	A1527C	f'	Class C15	Possibly Damaging
Q1409R	A1527G	f'	Class C0	Possibly Damaging
Q1409H	G1528C	f'	Class C0	Possibly Damaging
E1410K	G1529A	g'	Class C0	Benign
E1410Q	G1529C	g'	Class C0	Benign
E1410V	A1530T	g'	Class C0	Benign
E1410A	A1530C	g'	Class C0	Benign
E1410G	A1530G	g'	Class C0	Benign
E1410D	A1531T	g'	Class C0	Benign
M1411L	A1532C	a'	Class C0	Benign
M1411V	A1532G	a'	Class C15	Benign
M1411T	T1533C	a'	Class C65	Benign
M1411R	T1533G	a'	Class C65	Benign
M1411K	T1533A	a'	Class C65	Benign
M1411I	G1534C	a'	Class C0	Possibly Damaging
A1412T	G1535A	b'	Class C55	Possibly Damaging
A1412P	G1535C	b'	Class C25	Possibly Damaging
A1412S	G1535T	b'	Class C65	Benign
A1412G	C1536G	b'	Class C55	Benign
A1412D	C1536A	b'	Class C65	Possibly Damaging
A1412V	C1536T	b'	Class C55	Benign
E1413Q	G1538C	c'	Class C0	Possibly Damaging
E1413K	G1538A	c'	Class C0	Possibly Damaging
E1413A	A1539C	c'	Class C0	Benign
E1413G	A1539A	c'	Class C0	Benign
E1413D	A1540C	c'	Class C0	Benign
L1414V	C1541G	d'	Class C0	Benign

L1414I	C1541A	d'	Class C0	Possibly Damaging
L1414Q	T1542A	d'	Class C35	Benign
L1414R	T1542G	d'	Class C25	Possibly Damaging
L1414P	T1542C	d'	Class C25	Possibly Damaging
E1415K	G1544A	e'	Class C0	Benign
E1415Q	G1544C	e'	Class C0	Benign
E1415V	A1545T	e'	Class C0	Benign
E1415A	A1545C	e'	Class C0	Benign
E1415G	A1545G	e'	Class C0	Benign
E1415D	A1546T	e'	Class C0	Benign
A1416T	G1447A	f'	Class C0	Possibly Damaging
A1416P	G1447C	f'	Class C0	Benign
A1416S	G1447T	f'	Class C0	Benign
A1416G	C1448G	f'	Class C0	Benign
A1416D	C1448A	f'	Class C0	Benign
A1416V	C1448T	f'	Class C0	Benign
V1417M	G1450A	g'	Class C0	Possibly Damaging
V1417L	G1450T	g'	Class C0	Benign
V1417E	T1451A	g'	Class C15	Benign
V1417A	T1451C	g'	Class C0	Benign
V1417G	T1451G	g'	Class C0	Benign
L1418I	T1453A	a'	Class C0	Benign
L1418V	T1453G	a'	Class C25	Benign
L1418S	T1454C	a'	Class C65	Benign
L1418F	A1455C	a'	Class C15	Benign
E1419K	G1456A	b'	Class C0	Benign
E1419Q	G1456C	b'	Class C0	Benign
E1419V	A1457T	b'	Class C0	Benign
E1419A	A1457C	b'	Class C0	Benign
E1419G	A1457G	b'	Class C0	Benign
E1419D	A1458T	b'	Class C0	Benign
Q1420E	C1459G	c'	Class C0	Benign
Q1420K	C1459A	c'	Class C0	Benign
Q1420L	A1460T	c'	Class C25	Benign
Q1420P	A1460C	c'	Class C15	Benign
Q1420R	A1460G	c'	Class C0	Benign
Q1420H	G1461H	c'	Class C0	Possibly Damaging
H1421N	C1462A	d'	Class C15	Benign
H1421D	C1462G	d'	Class C25	Benign
H1421Y	C1462T	d'	Class C15	Possibly Damaging
H1421L	A1463T	d'	Class C25	Benign
H1421P	A1463C	d'	Class C25	Benign
H1421R	A1463G	d'	Class C0	Benign
H1421Q	T1464A	d'	Class C0	Benign
G1422R	G1465C	e'	Class C0	Possibly Damaging
G1422W	G1465T	e'	Class C15	Possibly Damaging
G1422R	G1465A	e'	Class C0	Possibly Damaging
G1422A	G1466C	e'	Class C0	Benign

G1422V	G1466T	e'	Class C0	Possibly Damaging
G1422E	G1466A	e'	Class C0	Possibly Damaging
S1423C	A1467T	f'	Class C15	Possibly Damaging
S1423R	A1467C	f'	Class C0	Possibly Damaging
S1423G	A1467G	f'	Class C0	Benign
S1423T	G1468C	f'	Class C0	Benign
S1423I	G1468T	f'	Class C0	Possibly Damaging
S1423N	G1468A	f'	Class C0	Possibly Damaging
S1423R	C1469G	f'	Class C0	Possibly Damaging
Q1424E	C1470G	g'	Class C0	Benign
Q1424K	C1470A	g'	Class C0	Benign
Q1424L	A1471T	g'	Class C15	Benign
Q1424P	A1471C	g'	Class C0	Benign
Q1424R	A1471G	g'	Class C0	Possibly Damaging
Q1424H	G1472C	g'	Class C0	Possibly Damaging

Class C0, benigna; Class C15 e C 25, intermediário; Class C65, patogênico. *Benign* – benigna, *Possibly Damaging* – Possivelmente patogênica, *Probably Damaging* – provavelmente patogênica.