

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**



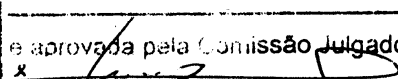
**ESTUDO DAS ENZIMAS 5 $\alpha$ -REDUTASE TIPO 2 E  
3 $\beta$ -HIDROXI-ESTERÓIDE DESIDROGENASE TIPO 2 NA  
AMBIGUIDADE GENITAL E NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**LÚCIO FÁBIO CALDAS FERRAZ**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. CHRISTINE HACKEL**

**CO-ORIENTADORES: PROF. DR. JUERGEN REICHARDT**

**PROFA. DRA. MARICILDA P. MELLO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Lúcio Fábio Caldas Ferraz</u> e aprovada pela Comissão Julgadora. 
---

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de concentração: Genética Humana e Médica.

CAMPINAS-SP  
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>F413e</b>	<p>Ferraz, Lúcio Fábio Caldas Estudo das enzimas 5<math>\alpha</math>-redutase tipo 2 e 3<math>\beta</math>-hidroxi-esteróide desidrogenase tipo 2 na ambigüidade genital e no câncer de próstata / Lúcio Fábio Caldas Ferraz. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadora: Christine Hackel. Co-orientadores: Juergen Kurt Victor Reichardt, Maricilda Palandi de Mello. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Hermafroditismo. 2. Próstata - Câncer. 3. Mutação (Biologia). 4. DNA polimerases. I. Hackel, Christine. II. Reichardt, Juergen Kurt Victor. III. Mello, Maricilda Palandi de. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Study of 5alpha-reductase 2 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 enzymes on ambiguous genital and prostate cancer.

**Palavras-chave em inglês:** Hermaphroditism; Prostate Cancer; Mutation (Biology); DNA polymerases.

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução.

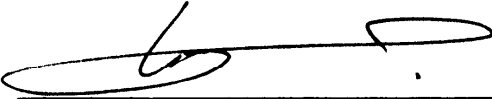
**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular.

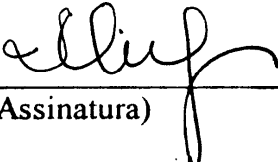
**Banca examinadora:** Christine Hackel, Hernández Faustino de Carvalho, Andréa Trevas Maciel-Guerra, Antonia Paula Marques de Faria, Janete Maria Cerutti.

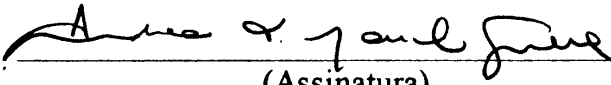
**Data da defesa:** 03/02/2006.

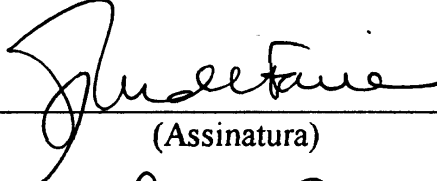
Campinas, 03 de fevereiro de 2006

**Banca Examinadora**

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Christine Hackel (Orientadora)   
(Assinatura)

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho   
(Assinatura)

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Andréa Trevas Maciel-Guerra   
(Assinatura)

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Antônia Paula Marques de Faria   
(Assinatura)

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Janete Maria Cerutti   
(Assinatura)

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Edi Lúcia Sartorato  
  
(Assinatura)

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti  
  
(Assinatura)

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Carmen Sílvia Bertuzzo  
  
(Assinatura)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Fábio e Antônia*, por fazerem da educação a maior herança que poderiam nos deixar.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus Pai, criador do Universo; a Deus Filho, nosso libertador, e a Deus Espírito Santo, fonte de sabedoria;

À minha querida família, por tudo o que significam para mim: meus pais, *Fábio* e *Antonia*, pelo imensurável amor, pelo apoio e dedicação incondicionais; aos meus irmãos *Fabio Jr.* e *Jéssica* e meu irmão *Fabrício* e família: *Adriana* e meus queridos sobrinhos *João Lucas* e *Maria Eduarda*, pelo convívio com tantas alegrias e com os quais posso sempre contar.

À minha amada companheira *Aninha*, obrigado pelo seu amor e carinho, por compartilhar comigo as alegrias e tristezas no decorrer deste trabalho; é aconchegante saber que contigo compartilharei alegrias por toda a minha vida;

À minha orientadora *Chris*, agradeço por ter acreditado na minha capacidade, pelo incentivo na realização deste trabalho e pelo apoio nos momentos difíceis;

Aos meus co-orientadores *Maricilda* e *Juergen*, agradeço os ensinamentos recebidos e por terem aceitado me co-orientar. Em especial agradeço o Prof. Dr. *Juergen* por ter me acolhido em seu laboratório no *Institute for Genetic Medicine (IGM)* da *Univertisty of Southern California (USC)*, onde pude desenvolver este trabalho;

Aos Prof(a)s Dr(a)s. *Antônia P.M. de Faria*, *Andréa T. Maciel-Guerra*, *Janete Cerutti*, *Edi L. Sartorato*, *Carmen S. Bertuzzo*, *Hernandes F. de Carvalho* e *Gilson P. Manfio*, membros das bancas de qualificação, pré-banca e banca examinadora de defesa de tese, por terem aceito participar da avaliação deste trabalho, pelas relevantes sugestões e correções que muito acrescentaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

Aos grandes amigos de Los Angeles (EUA): os amigos do laboratório do Prof. Dr. *Juergen* (*Patricia Sharpe*, *Nick*, *Troy*, *Hannh*, *Katia*, *Dolly*, *Claudia*, *Prutha*, *Abebe*, etc) e do *Institute for Genetic Medicine* da *USC* (*Torsten*, *Samira*, *Volker*, *Partha*, *Takako*, etc), por tornarem minha vida longe de casa muito menos penosa;

Aos muitos amigos do laboratório de Genética Humana;

À *Profa Dra. Laura M.M. Ottoboni*, por ter me acolhido em seu laboratório, e o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Ambiental: *Wagner*, *Tânia*, *Fábio*, *Fernanda*, *Leandro*, *Marcos*, *Rock*, *Daniela*, *Danielle*, *Susy*, *Marcela*, *Bruna* e *Camila*, sem os quais as atividades no laboratório seriam menos divertidas;

Aos funcionários do CBMEG e da Comissão de Pós-graduação do Instituto de Biologia, sobretudo à *Lourdes* e *Sílvia*, *Tânia* e *Sandra*, pela paciência e pelo trabalho sempre prestativo que tanto nos auxilia;

## EPÍGRAFE

### *Diferente*

*Se a vida esvai-se no correr dos nossos dias  
E os minutos não se repetem nunca...  
A Esperança tem que ser o nosso guia  
E ao peito o desespero não se junta.*

*Porque se hoje assim está se passando  
Exatamente diferente é o dia de amanhã...  
E isso é vida – todos nós andando –  
De risos e alegrias futuras, sempre no afã.*

***Fábio Ferraz***

*Aninha,*

*você é assim,*

*luz dos meus olhos,*

*doce sorriso em meus lábios...*

*embalo sereno, em cantiga de ninar,*

*suave perfume, que inebria minha vida...*

*Assim é você,*

*em todos os sentidos,*

*em todos os sentidos meus...*

*Assim você se fez,*

*em minha vida, **Amor.***

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xvi
<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1 – Andrógeno 5<math>\alpha</math>-di-hidrotestosterona (DHT).....</b>	<b>1</b>
1.1 – Ação da DHT na diferenciação sexual masculina.....	2
1.2 – Ação da DHT no desenvolvimento da próstata.....	3
1.3 – Metabolismo da 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona.....	5
<b>2 – Enzimas 5<math>\alpha</math>-redutases.....</b>	<b>6</b>
2.1 – Genes <i>SRD5A1</i> e <i>SRD5A2</i> .....	7
<b>3 – Enzimas 3<math>\beta</math>-hidroxi-esteróides desidrogenases (3<math>\beta</math>-HSDs).....</b>	<b>7</b>
3.1 – Genes <i>HSD3B1</i> e <i>HSD3B2</i> .....	8
<b>4 – Ambigüidade genital.....</b>	<b>9</b>
4.1 – PHM por Deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2.....	11
4.2 – HCSR por Deficiência em 3 $\beta$ -HSD tipo 2.....	12
<b>5 – Câncer de Próstata.....</b>	<b>13</b>
5.1 – Metabolismo de andrógenos na próstata.....	16
5.2 – Fenótipo mutagênico e seleção clonal na carcinogênese.....	18
5.3 – Fenótipo mutagênico no câncer de próstata.....	20
5.4 – Potencial mutagênico das DNA polimerases.....	21



<b>II – OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>III – RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo III.1 – Artigo Publicado:</b>	
“New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5a-reductase deficiency type 2. <i>Journal of Molecular Medicine</i> , 83: 569-576, 2005” .....	<b>25</b>
<b>Capítulo III.2 – Artigo a ser submetido para publicação:</b>	
“Structure-function aspects of Pro222Gln homozygous mutation in the <i>HSD3B2</i> gene in a patient with congenital adrenal hyperplasia” .....	<b>35</b>
<b>Capítulo III.3 – Artigo a ser submetido para publicação:</b>	
“Identificação e caracterização de mutações somáticas no gene <i>HSD3B2</i> em pacientes com câncer de próstata” .....	<b>53</b>
<b>Capítulo III.4 – Artigo a ser submetido para publicação:</b>	
“Genomic analysis of cancer tissue reveals that most somatic mutations occur in a novel nine nucleotide purine rich motif” .....	<b>79</b>
<b>IV – CONCLUSÕES.....</b>	<b>136</b>
<b>V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>140</b>
<b>VI – ANEXOS.....</b>	<b>150</b>
<b>Pareceres da Comissão de Ética.....</b>	<b>150</b>
<b>1 – Estudo de pacientes com PHM.....</b>	<b>150</b>
<b>2 – Estudo de pacientes com Câncer de Próstata.....</b>	<b>152</b>

## ABREVIATURAS

**3 $\beta$ -HSD** - do inglês 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase

**ACTH** - do inglês Adrenocorticotropic Hormone

**DHEA** - Di-hidroepiandrosterona

**DHT** - 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona

**gene *HPRT*** - do inglês Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase

**gene *HSD3B1*** - do inglês 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta-isomerase, type 1

**gene *HSD3B2*** - do inglês 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta-isomerase, type 2

**gene *SRD5A1*** - do inglês Steroid 5-alpha-reductase 1

**gene *SRD5A2*** - do inglês Steroid 5-alpha reductase 2

**HCSR** - Hiperplasia Congênita das Supra-Renal

**LOH** - do inglês Loss of Heterozygosis

**MSI** - do inglês Microsatellite Instability

**NAD<sup>+</sup>** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

**NADH** - forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

**NADP** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

**NADPH** - forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

**PCR** - do inglês Polymerase Chain Reaction

**PHM** - Pseudo-Hermafroditismo Masculino

**SNaPshot** - técnica de extensão em apenas um nucleotídeo de primers específicos

**SSCP** - do inglês Single Strand Conformation Polymorphism

**T** - Testosterona

**UTR** - do inglês Untranslated Region

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Esquema parcial das vias anabólica e catabólica da DHT – **página 5.**

## RESUMO

O hormônio androgênico di-hidrotestosterona (DHT) possui fundamental importância na diferenciação sexual masculina e no desenvolvimento e manutenção da próstata. Duas enzimas atuam diretamente na concentração deste andrógeno nas células: **1)** com uma função anabólica, a enzima  $5\alpha$ -redutase tipo 2 (gene *SRD5A2*) é responsável pela síntese de DHT ao converter testosterona (T) em  $5\alpha$ -di-hidrotestosterona e **2)** com uma função catabólica, a enzima  $3\beta$ -hidroxi desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase de esteróides tipo 2 (gene *HSD3B2*) é responsável pela degradação do DHT, além de contribuir para síntese indireta de testosterona por uma via anabólica. Isto exposto, cenários distintos se apresentam considerando as atividades deficientes dessas enzimas: *i)* a deficiência congênita da enzima  $5\alpha$ -redutase tipo 2 conduz a uma forma específica de pseudo-hermafroditismo masculino (PHM) no qual a conversão de T em DHT está nula ou defeituosa, inviabilizando a virilização normal da genitália externa em indivíduos com cariótipo 46,XY e *ii)* em razão das propriedades bifuncionais da enzima  $3\beta$ -HSD2, tanto na via de síntese quanto de degradação de andrógenos, sua deficiência congênita pode conduzir a quadros clínicos distintos de ambigüidade genital. No adulto, mutações somáticas que afetem sua atividade enzimática podem contribuir para a manifestação do câncer de próstata, pelo acúmulo do DHT.

O presente trabalho aborda as duas enzimas esteroidogênicas envolvidas com o metabolismo da DHT, buscando caracterizar mutações germinativas e/ou somáticas que conduzem a deficiências enzimáticas relacionadas a diferentes condições clínicas. Com

relação à deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, investigou-se a presença de mutações germinativas no gene *SRD5A2* em amostras de DNA 20 pacientes de sexo genético masculino com suspeita de deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, pertencentes a 18 famílias brasileiras, por meio de sequenciamento direto dos produtos de PCR dos cinco exons do gene e de suas regiões flanqueadoras. Foram identificadas alterações moleculares em 18 desses pacientes, compreendendo tanto mutações não anteriormente referidas na literatura (G158R, del642T, 217\_218insC e IVS3+1G>A), como mutações recorrentes já descritas em outros grupos étnicos ou em indivíduos de outras regiões geográficas. Os resultados detalhados, bem como a discussão, acham-se apresentados no Capítulo III.1, sob a forma de artigo publicado.

Com relação ao gene *HSD3B2*, foram estudados 9 pacientes de sexo genético feminino e 3 pacientes de sexo genético masculino com hiperplasia congênita das supra-renais (HCSR) e diagnóstico sugestivo de deficiência em 3 $\beta$ -HSD2. A partir do DNA genômico desses pacientes os exons do gene *HSD3B2* foram amplificados por PCR e submetidos ao sequenciamento direto. Apenas uma mutação germinativa (P222Q) foi detectada em homozigose em um paciente 46,XY com ambigüidade genital e forma clássica da doença. A modelagem molecular das enzimas 3 $\beta$ -HSD2 nativa e portadora da mutação P222Q permitiu um melhor entendimento das interações entre os resíduos responsáveis pela estabilidade da enzima 3 $\beta$ -HSD2. Esses resultados são apresentados no Capítulo III.2 sob a forma de artigo a ser submetido para publicação.

Nos Capítulos III.3 e III.4, também sob a forma de artigos, são apresentados e discutidos os resultados da caracterização de mutações somáticas do gene *HSD3B2* em tecidos tumorais de 26 pacientes com câncer de próstata esporádico, para se testar a hipótese de que mutações somáticas nesse gene poderiam levar à deficiência em 3 $\beta$ -HSD2 conduzindo a uma diminuição na degradação de DHT intraprostático. Para a detecção das mutações, três técnicas distintas foram empregadas: sequenciamento, SSCP e SNaPshot. Também foram pesquisadas a instabilidade de microsátélites (MSI) e a perda de heterozigose (LOH) por meio da análise da repetição polimórfica no intron 3 do gene *HSD3B2*. Em paralelo, amostras de tecidos normais adjacentes às áreas tumorais foram examinadas para se verificar a presença ou ausência dessas mutações no DNA constitucional. Trinta e oito alterações moleculares restritas ao DNA tumoral foram detectadas em 21 dos 26 pacientes estudados, compreendendo 18 mutações *missense*, 9 mutações silenciosas, 2 substituições nucleotídicas na região promotora, 4 substituições na região 5'-UTR, 2 substituições na região 3'-UTR, 2 substituições em introns e uma deleção. A instabilidade de microsátélites (MSI) foi identificada em material tumoral de 14 pacientes, dos quais 11 apresentavam instabilidade da repetição (sendo mais freqüente a redução do tamanho da repetição) enquanto que outros 3 apresentaram perda total de um dos alelos (LOH). No Capítulo III.3 é apresentado a caracterização molecular, por meio da técnica de *Gel Shift*, de 3 substituições nucleotídicas localizadas nas regiões promotora e 5'-UTR. São também apresentados no Capítulo III.3 os resultados da caracterização bioquímica de 8 novas mutações *missense* (L6P, R17K, V19I, L34S, F88S, N148S, T152A e E192A) sobre a atividade da 3 $\beta$ -HSD2. Foi possível constatar que sete dessas variantes levam à inativação enzimática total e que somente a enzima portadora da mutação T152A

promove um aumento de quase 2 vezes na atividade de degradação da DHT quando comparada à enzima nativa.

Finalmente, uma análise minuciosa das seqüências adjacentes às substituições nucleotídicas somáticas observadas nas amostras tumorais acima analisadas revelou que estas ocorrem principalmente em dímeros de purinas, sugerindo um padrão específico de substituição e transições em sua grande maioria. Essas observações, de acordo com a hipótese de progressão do câncer pelo acúmulo de mutações somáticas nos genes humanos (*fenótipo mutagênico*), conduziram a uma análise mais ampla, envolvendo outros genes relacionados (*SRD5A2*) ou não (*HPRT*) ao câncer de próstata. Esta análise compreendeu também uma revisão de literatura sobre o padrão de mutações somáticas descritas para os genes *H-ras*, *N-ras*, *Ki-ras*, *PTEN*, *p53* e *AR* em câncer de próstata e de 11 genes no câncer de mama. Esse trabalho foi ainda complementado pela investigação e análise de mutações somáticas nos genes que codificam DNA polimerases propensas a erro (*POLB*, *POLH* e *POLK*) nas mesmas amostras de câncer de próstata. Os resultados desse estudo, descritos e discutidos no Capítulo III.4 evidenciam a existência de um possível *motif* conservado de nove nucleotídeos rico em purina (NNUPURI) que poderia ser o alvo da maioria das mutações somáticas no câncer de próstata humano, decorrentes de um mecanismo de reparo de DNA propenso a erros.

## SUMMARY

The androgenic hormone dihydrotestosterone (DHT) has fundamental relevance in normal male sexual differentiation and in prostate development and maintenance. Two enzymes act directly on the regulation of DHT concentration at cellular level: **1)** with an anabolic function the steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 enzyme (*SRD5A2* gene) leads to DHT synthesis by converting testosterone (T) in 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and **2)** with a catabolic pathway the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase type 2 enzyme (*HSD3B2* gene) is responsible for DHT degradation, besides contributing to indirect synthesis of testosterone in an anabolic pathway. Thus, different scenarios can be considered regarding the deficiencies in the activities of these enzymes: *i)* congenital steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 enzyme deficiency leads to a specific form of male pseudohermaphroditism (MPH), where the conversion of T into DHT is defective or inexistent, preventing normal virilization of the external genitalia in individuals with a 46,XY karyotype; and *ii)* due to the bi-functional properties of the 3 $\beta$ -HSD2 enzyme, either at synthetic or degradation androgen pathways, its congenital deficiency can lead to distinct manifestations of genital ambiguity. Furthermore, in the adult, somatic mutations that affect 3 $\beta$ -HSD2 enzymatic activities could contribute to prostate cancer manifestation, due to DHT accumulation.

The present work approaches these two steroidogenic enzymes involved with the DHT metabolism, aiming to characterize germinal and/or somatic mutations leading to enzymatic deficiencies related to different clinical conditions. Concerning the steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency, we screened for germinal mutations on *SRD5A2* gene in DNA



samples of 20 patients from 18 Brazilian families with suspected SRD5A2 deficiency, by directly sequencing of the PCR products from the five exons and flanking regions of the gene. Molecular alterations were detected in 18 of these patients, comprising either mutations not previously reported in the literature (G158R, del642T, 217\_218insC e IVS3+1G>A) as well as recurring mutations already described in other ethnical groups or in individuals from other geographical regions. The detailed results and corresponding discussion are presented at Chapter III.1, as a published paper.

Concerning the *HSD3B2* gene, 9 female and 3 male unrelated patients suspected to be suffering of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 3 $\beta$ -HSD2 deficiency were studied. The PCR products from the 4 exons and flanking regions of the *HSD3B2* gene, obtained from DNA genomic samples, were directly sequenced. Only one germinal mutation (P222Q) was detected in homozygosis in one male patient with genital ambiguity and classical form of the disease. Molecular homologous modeling of 3 $\beta$ -HSD2 was performed to obtain a better understanding of the effect of this mutation on the enzyme activity. The proposed model emphasizes Pro<sup>222</sup> as an important residue for the folding pattern of the enzyme. This result is presented and discussed in Chapter III.2, as a paper to be submitted to publication.

At Chapters III.3 and III.4, the results of the screening for the *HSD3B2* somatic mutations in tumoral tissues of 26 sporadic cases of prostate cancer are presented and discussed, in view of the hypothesis that somatic mutations in this gene could lead to 3 $\beta$ -HSD2 enzymatic deficiency, thus reducing the rate of intraprostatic DHT

degradation. Three distinct techniques were employed for mutation detection: sequencing, SSCP and SNaPshot. Microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) were also investigated by the analysis of a polymorphic repeat located at the third intron of the *HSD3B2* gene. In parallel, samples of normal tissues (adjacent to tumoral areas) from the same patients were examined to verify the presence or absence of mutations in constitutional DNA. Thirty-eight molecular alterations restricted to tumoral DNA were detected in 21 of the 26 patients, comprising 18 missense mutations, 9 silent mutations, 2 nucleotide substitutions at the promoter region, 4 substitutions at 5'-UTR, 2 substitutions at 3'-UTR, 2 intronic nucleotide substitutions and one deletion. Microsatellite instability was identified in tumoral material from 14 patients, with eleven cases showing instability (most frequently a reduction of the repeat size), while the other three showed a complete loss of one of the alleles (LOH). Chapter III.3 describes the molecular characterization by gel shift analysis of three nucleotide substitutions located at the promoter and 5' UTR regions. Also at Chapter III.3, the results of biochemical characterization of 8 new missense somatic mutations (L6P, R17K, V19I, L34S, F88S, N148S, T152A e E192A) on the 3 $\beta$ -HSD2 activities are presented and discussed. It was possible to demonstrate that seven of these enzymatic variants lead to total inactivation of enzyme activities and that only the T152A substitution promotes an almost two-fold increase in the reductase activity of the 3 $\beta$ -HSD2 enzyme when compared to the native enzyme.

Finally, a detailed analysis of the sequences adjacent to the somatic nucleotide substitutions observed in the above reported tumoral samples revealed that these changes occurred predominantly within purine duplets, suggesting a specific pattern of substitutions, mostly composed by transitions. These observations, according with the

hypothesis of cancer progression due to accumulation of somatic mutations in human genes (mutator phenotype), led to a larger analysis, involving other genes directly related (such as *SRD5A2*) or not (such as *HPRT*) to prostate cancer, and also including a literature review of the pattern of somatic mutations described for the genes *H-ras*, *N-ras*, *Ki-ras*, *PTEN*, *p53* and *AR* in prostate cancer and for 11 genes in breast cancer. This work was further improved with the investigation and analysis of somatic mutations in error-prone DNA polymerase genes (*POLB*, *POLH* and *POLK*) in the same prostate cancer samples. The results of this study are fully described and discussed at Chapter III.4, pointing out to the existence of a putative conserved sequence that conforms to a Nine-Nucleotide Purine-Rich (NNUPURI) motif, which may be the target sequence of somatic mutations in human prostate cancer as a consequence of an error-prone DNA repair mechanism.

---

## I – INTRODUÇÃO

### 1 – Andrógeno 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona (DHT)

A 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona (DHT) é o produto da 5 $\alpha$ -redução da testosterona (T). Embora se acreditasse inicialmente que a DHT fosse um metabólito inativo da T, evidências posteriores indicaram que, na verdade, o hormônio DHT tem um papel fisiológico fundamental nos tecidos genitais (Russel e Wilson, 1994).

A ação androgênica da T e da DHT é mediada pelo receptor de andrógenos (RA). A DHT, e menos eficientemente a T, liga-se ao RA o que desencadeia a fosforilação e dimerização do complexo formado. Em seguida, inúmeros co-ativadores transcricionais se ligam ao esse complexo que é então translocado ao núcleo celular, passando a ativar a transcrição de genes por meio de sua ligação aos elementos responsivos aos andrógenos localizados dentro ou adjacentes aos genes sob seu controle (Marcelli e Cunningham, 1999; Cude *et al.*, 1999). Dessa maneira a DHT regula a transcrição de inúmeros genes envolvidos nas mais diversas funções biológicas como diferenciação e proliferação celular.

A DHT é o andrógeno mais potente nas células, com potência 50 vezes maior que a apresentada pelo seu precursor, a T. De fato, com a conversão de T em DHT há uma potencialização da ação androgênica e isto ocorre por 3 motivos principais: *i*) a DHT tem uma afinidade 4 vezes maior pelo receptor; além disso, a T dissocia-se do receptor com

velocidade 4 a 5 vezes mais rápida do que aquela observada com a DHT. *ii*) o complexo DHT-receptor é mais estável e *iii*) a DHT é mais efetiva em estabilizar o receptor de andrógenos nas conformações estruturais adequadas para a ligação aos sítios alvos de DNA.

Dois eventos biológicos dependem da ação da DHT: a diferenciação sexual masculina e o desenvolvimento dos tecidos genitais dependentes de andrógenos, como o epidídimo, as vesículas seminais e a próstata.

### **1.1 – Ação da DHT na diferenciação sexual masculina**

A DHT possui importância fundamental na diferenciação sexual masculina, sobretudo na virilização da genitália externa e no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários durante a puberdade (Moore, 1978; Beiguelman, 1982).

De maneira sucinta, a diferenciação sexual masculina tem início a partir da determinação do sexo cromossômico do zigoto. Uma vez estabelecido um embrião com o sexo heterogamético (cromossomos sexuais X e Y), tem-se a diferenciação da gônada bipotencial em testículo e a diferenciação masculina dos primórdios genitais internos e externos. O primeiro vestígio de hormônios androgênicos no testículo fetal é observado por volta das 8<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> semana após a fertilização com a produção, pelas células de Leydig, do andrógeno testosterona. Em seguida a T é convertida, pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase de esteróides, em DHT (Russel *et al.*, 1994).

Apesar de ligarem-se ao mesmo receptor no núcleo das células-alvo, a DHT e seu precursor, a T, possuem funções fisiológicas distintas. A testosterona é fundamental para a virilização dos primórdios genitais internos, o que resulta na formação do epidídimo, ducto ejaculatório, vesícula seminal e vasos deferentes. A testosterona controla também o processo de espermatogênese e regula a produção de gonadotrofinas (Russel *et al.*, 1994).

A DHT, por sua vez, promove a virilização da genitália externa (Moore, 1978; Beiguelman, 1982). Compõem os rudimentos genitais externos o tubérculo genital, as saliências lábio-escrotais e as duas pregas genitais que ladeiam o seio urogenital. Sob ação da DHT, o alongamento das pregas genitais formará o corpo do pênis, na extremidade do qual a glândula será desenvolvida a partir do tubérculo genital; a fusão das saliências lábio-escrotais dará origem ao escroto e a uretra será formada a partir do seio urogenital com a fusão das pregas genitais. A DHT atua também na formação dos caracteres sexuais secundários masculino durante a puberdade, com o desenvolvimento dos pêlos sexuais, o crescimento genital e o surgimento de acne.

A deficiência na síntese de DHT conduz a um quadro clínico de ambigüidade genital em indivíduos com cariótipo 46,XY. Isto ocorre por que a ausência de DHT acarretará virilização incompleta dos genitais externos.

## **1.2 – Ação da DHT no desenvolvimento da próstata**

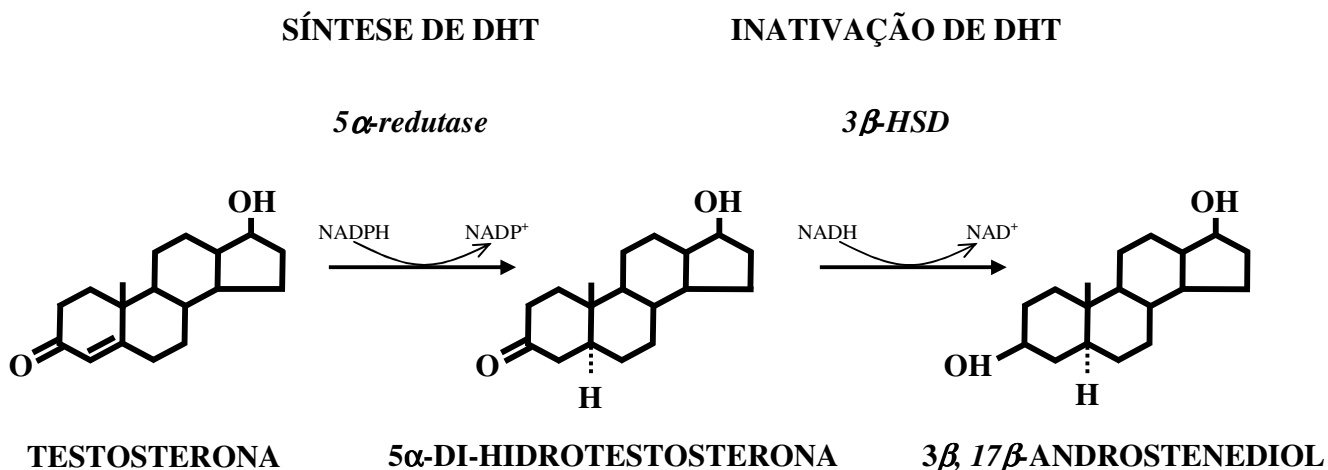
Além de ser essencial para a diferenciação sexual masculina, a DHT é imprescindível para o desenvolvimento de outros tecidos genitais como, por exemplo, a

próstata (Russel *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 1998). A T e seu metabólito mais potente, a DHT, são os principais andrógenos na próstata e possuem um papel essencial no desenvolvimento e manutenção desta glândula (Barstch, *et al.*, 1990). Durante o desenvolvimento fetal humano, a próstata diferencia-se a partir do seio urogenital por volta da décima segunda semana de vida intra-uterina. Durante este período e por intermédio dos andrógenos secretados pelo testículo fetal, tem-se a formação do epitélio glandular a partir da diferenciação das células endodérmicas, assim como a formação do estroma e fibras musculares a partir do mesênquima (Moore, 1978). O grau de diferenciação destas células mesenquimais sob a ação da DHT ditará o tamanho final da próstata. A regulação da próstata pelos andrógenos não se resume apenas ao desenvolvimento fetal, pois mesmo após atingir o tamanho adulto, a próstata necessita de uma contínua estimulação por andrógenos para sua manutenção.

Além de necessários para a diferenciação e manutenção normais da próstata, os andrógenos também estão associados ao desenvolvimento do câncer de próstata, sobretudo quando em concentrações elevadas. O aumento da síntese de DHT ou a deficiência na degradação deste andrógeno nas células prostáticas leva a um excesso de DHT, que pode resultar num crescimento celular descontrolado (Ross *et al.*, 1998; Bosland, 2000; Ruijter *et al.*, 1999; Henderson e Feigelson, 2000).

### 1.3 – Metabolismo da 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona

Duas enzimas controlam diretamente a concentração intracelular da DHT: as enzimas 5 $\alpha$ -redutases de esteróides são responsáveis pela síntese da DHT e as enzimas 3 $\beta$ -hidroxi-esteróides desidrogenases de esteróides (3 $\beta$ -HSDs) agem na inativação deste andrógeno (Figura 1) (Russel e Wilson, 1994; Labrie *et al.*, 1992).



**Figura 1.** Esquema parcial das vias anabólica e catabólica da DHT. A síntese de DHT é obtida com a conversão de T em DHT catalisada pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, ao passo que a inativação de DHT é catalisada pela enzima 3 $\beta$ -HSD.

As enzimas 5 $\alpha$ -redutases participam do metabolismo de hormônios esteróides que apresentam um grupo cetona no carbono 3 (3-ceto) e duplas ligações entre os carbonos 4 e 5 (ligação  $\Delta^{4,5}$ ). Estas enzimas utilizam o NADPH como cofator para a redução de duplas ligações (ligação  $\Delta^{4,5}$ ) com a adição de hidrogênio ao carbono 5 (5 $\alpha$ -) do anel A da



testosterona. Ao converter T em DHT as enzimas 5 $\alpha$ -redutases amplificam a ação androgênica destes hormônios. No entanto, ao mesmo tempo em que a 5 $\alpha$ -redução potencializa a ação da DHT ela também favorece a sua própria inativação.

A inativação da DHT fica a cargo das enzimas 3 $\beta$ -HSDs numa reação que tem o NADH como cofator. A 5 $\alpha$ -redução da DHT torna o grupo cetona no carbono 3 deste andrógeno mais suscetível à hidroxilação pelas 3 $\beta$ -HSDs. Esta hidroxilação irreversível reduz a afinidade de ligação da DHT ao receptor de andrógenos, o que a torna mais hidrofílica e favorecendo sua excreção. Além do seu papel na inativação de andrógenos, as enzimas 3 $\beta$ -HSDs também controlam de uma maneira indireta a produção de T por meio de uma via metabólica alternativa que será abordada adiante.

## **2 – Enzimas 5 $\alpha$ -redutases**

As enzimas 5 $\alpha$ -redutases participam do metabolismo de hormônios esteróides que apresentam a configuração 3-ceto,  $\Delta^{4,5}$  como a testosterona. Duas isoenzimas da 5 $\alpha$ -redutase catalisam a 5 $\alpha$ -redução de T em DHT: a 5 $\alpha$ -redutase tipo 1 e a 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, codificadas pelos genes *SRD5A1* e *SRD5A2*, respectivamente (Russel e Wilson, 1994).

## 2.1 – Genes *SRD5A1* e *SRD5A2*

Os genes *SRD5A1* e *SRD5A2* são compostos por 5 exons, 4 introns e sítios de *splicing* idênticos. A similaridade entre as seqüências nucleotídicas é de aproximadamente 50%. O gene *SRD5A1*, localizado no cromossomo 5p15, codifica a 5 $\alpha$ -redutase tipo 1, uma proteína de 259 aminoácidos expressa principalmente no couro cabeludo, na pele e no fígado. O gene *SRD5A2*, localizado no cromossomo 2p23, codifica a 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, uma proteína de 254 aminoácidos expressa preferencialmente nos tecidos genitais (rudimentos genitais externos e próstata).

Atribui-se à 5 $\alpha$ -redutase tipo 1, principal isoenzima do couro cabeludo, a recessão temporal dos cabelos (Wilson *et al.*, 1993). A 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, por sua vez, tem grande importância fisiológica nos tecidos genitais. Esta importância é ressaltada pela constatação de que a deficiência de 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 conduz ao pseudo-hermafroditismo masculino (PHM), um quadro clínico de virilização incompleta dos genitais externos em indivíduos com cariótipo 46,XY (Thigpen *et al.*, 1992; Russell *et al.*, 1994).

## 3 – Enzimas 3 $\beta$ -hidroxi-esteróides desidrogenases (3 $\beta$ -HSDs)

As enzimas 3 $\beta$ -hidroxi-esteróides desidrogenases (3 $\beta$ -HSD, do inglês **3 $\beta$ -Hydroxy-Steroid Dehydrogenase**) são enzimas bifuncionais que catalisam a oxidação a isomerização de substratos  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxi-esteróides em  $\Delta^4$ -keto-esteróides numa reação seqüencial

fundamental na síntese de todos os hormônios esteróides, principalmente glicocorticóides, mineralocorticóides, progesterona, estrógenos e andrógenos (Labrie *et al.*, 1992).

Com relação aos andrógenos, as 3 $\beta$ -HSDs controlam não apenas a degradação de DHT como também a produção de T por intermédio de duas vias metabólicas distintas: *i*), com a atividade de *Redutase*, iniciam o processo irreversível de inativação da DHT numa reação NADH dependente, e *ii*) com a atividade de *Desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  Isomerase*, tendo o NAD<sup>+</sup> como cofator, promovem a síntese indireta de T ao converter DHEA (dihidroepiandrosterona) em androstenediona, um precursor da testosterona. Desta forma, a enzima 3 $\beta$ -HSD regula a disponibilidade de andrógenos em muitos órgãos e tecidos humanos e, portanto, desempenha um papel crucial na diferenciação e desenvolvimento dos mesmos.

Em humanos, duas isoenzimas da 3 $\beta$ -HSD altamente similares são conhecidas: a 3 $\beta$ -HSD tipo 1 e a 3 $\beta$ -HSD tipo 2 codificadas pelos genes *HSD3B1* e *HSD3B2*, respectivamente.

### **3.1 – Genes *HSD3B1* e *HSD3B2***

Sete membros extremamente similares quanto à seqüência nucleotídica compõem o *cluster* gênico das 3 $\beta$ -HSDs localizado no cromossomo 1p13 (Labrie *et al.*, 1992; McBride *et al.*, 1999). Os genes *HSD3B1* e *HSD3B2* expressam enzimas ativas, enquanto os 5 membros restantes são pseudogenes (*HSD3B $\psi$ 1-5*). Embora tenham o códon inicial ATG

em posição equivalente àquela encontrada nos genes ativos, os pseudogenes não são processados corretamente porque possuem códons de parada prematuros e sítios alternativos de *splicing* (McBride *et al.*, 1999). Os genes *HSD3B1* e 2 possuem um padrão distinto de expressão tecido-específico. A isoenzima 3 $\beta$ -HSD tipo 1, codificada pelo gene *HSD3B1*, é expressa nos tecidos periféricos e placenta, enquanto a isoenzima 3 $\beta$ -HSD tipo 2, codificada pelo gene *HSD3B2*, está presente nas gônadas, nas adrenais e na próstata. Ambos os genes consistem em 4 exons e 3 introns com tamanhos semelhantes e um alto grau de similaridade entre as seqüências (Lachance *et al.*, 1991; McBride *et al.*, 1999).

O gene *HSD3B2* é composto de 4 exons dos quais o exon 1 e os primeiros 89 nucleotídeos do exon 2 compõem a região não traduzida na extremidade 5' do gene (região 5'-UTR). O exon 4 codifica os 270 aminoácidos finais da enzima e também contém 413 nucleotídeos da região 3'-UTR. O intron 3 do gene *HSD3B2* possui uma complexa repetição dinucleotídica [(TG)<sub>n</sub>(TA)<sub>n</sub>(CA)<sub>n</sub>] altamente polimórfica cujas variações alélicas foram associadas a grupos étnico-raciais com predisposições distintas ao câncer de próstata (Verreault *et al.*, 1994; Devgan *et al.*, 1997).

#### **4 – Ambigüidade genital**

Face à complexidade das anomalias que levam aos distúrbios da diferenciação sexual humana, Maciel-Guerra e Guerra Júnior (2002) propõem a seguinte classificação das ambigüidades genitais, baseados em aspectos clínicos e laboratoriais:

- I. Distúrbios da diferenciação gonadal – distúrbios na diferenciação das gônadas, podendo haver ambigüidade genital.
- II. Pseudo-hermafroditismo feminino – indivíduos com cariótipo 46,XX, com ovários e graus variados de virilização dos genitais externos.
- III. Pseudo-hermafroditismo masculino – indivíduos com cariótipo 46,XY, com testículos e deficiência ou ausência de virilização dos genitais externos e internos.
- IV. Outros – anomalias dos genitais internos ou externos que não são decorrentes de aberrações cromossômicas, anomalias gonadais, ou distúrbios hormonais.

Cada uma dessas categorias abriga um número variável de fatores etiológicos distintos, devidamente abordados em Maciel-Guerra e Guerra Jr (2002), cuja descrição poderia se tornar exaustiva no presente tópico. A seguir, serão abordados mais especificamente os distúrbios da diferenciação sexual decorrentes das deficiências enzimáticas da  $5\alpha$ -redutase tipo 2 (Pseudo-hermafroditismo masculino por deficiência em  $5\alpha$ -redutase tipo 2) e da  $3\beta$ -HSD tipo 2 (Hiperplasia Congênita da Supra-Renal por deficiência em  $3\beta$ -HSD tipo 2).

#### 4.1 – PHM por deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2

O pseudo-hermafroditismo masculino (PHM) consiste na deficiência ou ausência de virilização dos genitais externos e, eventualmente, internos em indivíduos do sexo masculino (cariótipo 46,XY) (Thigpen *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1994). Uma das causas de PHM é a deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, uma doença autossômica recessiva na qual a conversão de T em DHT é nula ou defeituosa. Esta deficiência resulta de mutações deletérias no gene *SRD5A2*. Os indivíduos afetados quase que invariavelmente apresentam ambigüidade genital. Há, no entanto, uma ampla heterogeneidade de manifestações fenotípicas, com afetados exibindo desde genitália externa com estruturas quase femininas (hipospadia pseudovaginal períneo-escrotal) até um fenótipo masculino sem qualquer sinal clínico grave característico deste distúrbio (Sinnecker *et al.*, 1996).

Até o presente momento foram descritas mais de 40 mutações no gene *SRD5A2*, em sua maioria mutações *missense* e *nonsense* (Human Gene Mutation Database - gene *SRD5A2*, 2005). No entanto, pequenas deleções e mutações nos sítios de *splicing* também já foram descritas. A identificação de mutações idênticas em diferentes grupos étnicos e de regiões geográficas distintas sugere a existência de possíveis regiões “*hotspots*” no gene *SRD5A2*. Por outro lado, mutações similares dentro de um mesmo grupo étnico seriam derivadas de mutações presentes em ancestrais comuns.

Um outro papel do gene *SRD5A2* foi constatado na etiologia do câncer de próstata (Reichardt *et al.*, 1995; Makridakis *et al.*, 1999). Neste caso, porém, as mutações identificadas conduzem a um ganho de atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase 2, o que leva a um aumento na síntese de DHT. Este assunto será abordado no tópico seguinte.

#### **4.2 – HCSR por deficiência em 3 $\beta$ -HSD tipo 2**

As supra-renais são responsáveis pela produção dos glicocorticóides, mineralocorticóides e andrógenos. A biossíntese desses esteróides envolve a presença de inúmeras enzimas esteroidogênicas. O controle endócrino dessas vias metabólicas dá-se por um mecanismo de *feedback* negativo. Isto é, o cortisol produzido inibe a produção do hormônio adrenocorticotrófico hipofisário (ACTH) e do hormônio hipotalâmico liberador de corticotropina. A deficiência em uma dessas enzimas esteroidogênicas leva à hiperplasia congênita das supra-renais (HCSR). Isto ocorre porque a deficiência na síntese de cortisol leva ao aumento da secreção de ACTH que, ao estimular cronicamente as supra-renais, provoca a hiperplasia destas glândulas. Como resultado desta hiperplasia, há um desvio na produção hormonal normal (Marini & Mello, 2002).

A HCSR decorrente da deficiência da enzima 3 $\beta$ -HSD tipo 2 é uma doença autossômica recessiva rara. Uma vez que a 3 $\beta$ -HSD2 é a isoenzima exclusiva de gônadas e adrenais, a deficiência nesta enzima prejudica a síntese de esteróides nesses dois tecidos. Os indivíduos afetados, tanto meninos quanto meninas, podem apresentar ambigüidade genital. Em fetos masculinos, a diminuição na síntese de andrógenos leva ao pseudo-

hermafroditismo masculino decorrente de virilização incompleta da genitália externa. Em fetos femininos, a virilização da genitália externa é branda e ocorre devido à conversão, nos tecidos periféricos, do DHEA acumulado em andrógenos mais potentes (Castro & Elias, 2004). Devido também à insuficiência na síntese de aldosterona, outra manifestação clínica da HCSR é a perda de sal que, se não tratada adequadamente, pode ser fatal. Duas formas de HCSR por deficiência em 3 $\beta$ -HSD2 são conhecidas: a forma clássica, de diagnóstico precoce e com subtipos perdedores ou não de sal, e a forma não clássica, não perdedora de sal e de diagnóstico mais tardio.

Mais de 30 mutações no gene *HSD3B2* foram descritas em pacientes com HCSR por deficiência da 3 $\beta$ -HSD2 (Human Gene Mutation Database - gene *HSD3B2*, 2005). Mutações que abolem completamente a atividade da enzima conduzem à forma clássica perdedora de sal, enquanto mutações que ainda mantêm alguma atividade enzimática conduzem à forma clássica não perdedora de sal.

## **5 – Câncer de Próstata**

O câncer de próstata é uma doença multifatorial complexa, com fatores genéticos e ambientais envolvidos em sua etiologia (Lalani, *et al.*, 1997). Atribui-se ao câncer de próstata a segunda maior causa de mortalidade por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. No Brasil, somente para o ano de 2005, estimou-se que



46.330 casos novos de câncer de próstata, o que torna este tipo de câncer um grave problema de saúde pública (INCA, 2005).

Os fatores de risco mais importantes atribuídos ao câncer de próstata incluem idade, origem étnica e fatores genéticos (Ross *et al.*, 1998; Ruijter *et al.*, 1999). Entretanto, visto que o câncer de próstata é uma doença complexa e de natureza multifatorial, fatores externos como estilo de vida, nutrição, atividade física e fatores ambientais também desempenham um papel crucial na carcinogênese da próstata.

A idade é um fator de risco extremamente importante no câncer de próstata, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após os 50 anos de idade. De fato, este tipo de câncer é extremamente raro antes dos 40 anos de idade e a incidência aumenta consideravelmente a partir dos 65 anos, mais do que em qualquer outro tipo de câncer. Como resultado, cerca de 70% dos casos são diagnosticados em homens com mais de 65 anos. Este aumento exponencial com a idade é uma característica bastante peculiar do câncer de próstata e nenhum outro tipo de câncer apresenta aumento de incidência com o avançar da idade tão expressivo quanto esse.

Ao lado da idade, outro fator de risco bastante importante no câncer de próstata é a origem étnica. Ao menos nos Estados Unidos, estudos epidemiológicos têm demonstrado que há uma variação significativa na incidência, e até mesmo na gravidade, de câncer de próstata entre os vários grupos étnico-raciais daquele país. Por exemplo, a incidência de câncer de próstata nos caucasóides é quase metade daquela observada entre os negróides, sendo que asiáticos apresentam a menor incidência (Ross *et al.*, 1998).

Considerando os fatores genéticos, há duas formas distintas de câncer de próstata: a forma hereditária e a esporádica. Embora a maioria dos casos seja esporádica, estima-se que aproximadamente de 5 a 10% de todos os casos da doença apresentam um histórico familiar positivo. O câncer de próstata hereditário caracteriza-se por apresentar um início precoce e histórico familiar de muitos indivíduos afetados. O câncer de próstata esporádico representa a grande maioria dos casos diagnosticados. Ao contrário da forma hereditária, o câncer de próstata esporádico apresenta um início tardio e sem registro prévio de câncer na família. Os estudos que abordam o câncer de próstata esporádico têm-se concentrado nos genes envolvidos com a progressão do câncer (Nwosu *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2005).

Inúmeros genes e *loci* gênicos associados aos cânceres de próstata hereditário e esporádico têm sido propostos (Hughes *et al.*, 2005). Estudos conduzidos por Chant *et al.* (2002), por exemplo, têm demonstrado uma associação dos genes *HSD3B1* e *HSD3B2* com a suscetibilidade ao câncer de próstata, quer seja hereditário ou esporádico. Em comum, os genes e *loci* gênicos associados às duas formas de câncer de próstata apresentam evidências de ligação ao fenótipo maligno bastante contraditórias, havendo estudos que confirmam tal ligação e estudos que demonstram números discordantes ou mesmo a ausência de ligação (ver Nwosu *et al.*, 2001, e Hughes *et al.*, 2005, para uma revisão). Em verdade, análises de ligação são extremamente difíceis e limitadas sobretudo para o câncer de próstata, o que em parte explica a razão de tantos resultados controversos. Estas dificuldades se devem ao caráter poligênico do câncer de próstata, com envolvimento de múltiplos genes, com penetrância variável e elevada heterogeneidade de *loci*.

## 5.1 – Metabolismo de andrógenos na próstata

Os andrógenos são fundamentais para o crescimento e a manutenção normais da próstata (Barstch *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1993), mas também desempenham papel importante no desenvolvimento da hiperplasia benigna e do câncer de próstata, sobretudo quando em concentrações elevadas (Ross *et al.*, 1998; Ruijter *et al.*, 1998; Henderson e Feigelson, 2000; Bosland, 2000). Isto ocorre por que o excesso de andrógenos na próstata, seja ele causado por aumento da síntese de testosterona (T) ou de 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona (DHT), ou por diminuição da inativação destes hormônios, tende a um crescimento celular descontrolado, o que resulta no câncer de próstata.

A concentração de andrógenos na próstata é regulada pelas enzimas esteroidogênicas. Estas enzimas atuam tanto na síntese como na inativação dos andrógenos (Barstch *et al.*, 1990). Já que o câncer de próstata é uma doença andrógeno-dependente, genes que codificam enzimas esteroidogênicas representam fortíssimos candidatos à predisposição e progressão do câncer de próstata (Ross *et al.*, 1998; Henderson e Feigelson, 2000; Makridakis e Reichardt, 2004).

A enzima 5 $\alpha$ -redutase 2, codificada pelo gene *SRD5A2*, converte a T em DHT. Muitos relatos têm mostrado a associação deste gene na predisposição ao risco de câncer de próstata, com uma forte variação étnica-racial (Reichardt *et al.*, 1995, Makridakis *et al.*, 2004). Uma possível contribuição do gene *SRD5A2* à progressão do câncer também tem

sido proposta, baseada nos achados de mutações somáticas e instabilidade de micro-satélites identificados nesse gene (Akalu *et al.*, 1999).

Além da enzima 5 $\alpha$ -redutase 2, uma outra enzima a ser considerada na carcinogênese da próstata é a *desidrogenase de 3 $\beta$ -hidroxi-esteróides*. Como mencionado anteriormente, as enzimas 3 $\beta$ -HSD atuam nas vias metabólicas dos mineralocorticóides, glicocorticóides e na biossíntese dos hormônios sexuais. Uma das causas do excesso de andrógenos na próstata pode estar no gene *HSD3B2*, visto que a enzima codificada por este gene está diretamente envolvida no metabolismo de DHT naquela glândula. Alterações na atividade desta enzima levariam a um aumento nos níveis de andrógenos, o que conduziria ao câncer. Por esta razão, o gene *HSD3B2* representa um fortíssimo candidato à progressão e à predisposição ao câncer de próstata.

De fato, nos últimos anos a enzima 3 $\beta$ -HSD2 tem merecido especial atenção na pesquisa do câncer de próstata em função de seu papel crucial tanto na síntese de T quanto na degradação de DHT. Estas duas vias metabólicas da 3 $\beta$ -HSD são fundamentais na regulação dos níveis de andrógenos na próstata. Em verdade, o fato da enzima 3 $\beta$ -HSD2 degradar DHT torna esta enzima uma candidata potencial na etiologia do câncer de próstata. Sendo assim, é de fundamental importância o estudo de mutações e/ou polimorfismos que podem interferir na atividade final da enzima 3 $\beta$ -HSD2, seja alterando as propriedades cinéticas da enzima seja alterando os níveis de expressão do gene.

## 5.2 – Fenótipo mutador e seleção clonal na carcinogênese

O desenvolvimento do câncer é um processo lento que envolve o acúmulo de alterações cromossômicas e de um grande número de mutações nas células cancerosas (Tomlinson *et al.*, 2002). Este crescente acúmulo de alterações genômicas, à medida que o tumor progride, parece constituir um pré-requisito para a transformação maligna de um tumor. A manutenção da integridade do genoma humano depende de inúmeros processos que garantam a acurácia não apenas da replicação do DNA mas também do processo de segregação dos cromossomos. Tanto a eficácia quanto a fidelidade da replicação do DNA dependem da ausência de danos no DNA ou de alterações estruturais na forca de replicação, pois estes danos podem retardar ou mesmo bloquear o processo replicativo. Entretanto, o DNA nas células é passível de danos por inúmeros agentes endógenos e exógenos. Estes danos podem desencadear um processo de carcinogênese que envolve erros substanciais na replicação do DNA, déficit no reparo do DNA e alterações na segregação cromossômica (Martin, 1991).

O cenário acima exposto tem conduzido à formulação de duas teorias distintas, porém não excludentes, da origem do câncer. Em relação ao acúmulo progressivo de alterações genéticas à medida que o tumor progride, Nowell sugere a *teoria clonal* da origem do câncer (Nowell, 2002). Segundo este autor, a evolução do câncer seria resultado da seleção sucessiva de células contendo mutações que conferem vantagens de crescimento. As células assim selecionadas atingiriam dominância clonal com a proliferação de sua progênie o que, em última análise, constituiria o tumor com acúmulo de tais mutações vantajosas (Nowell, 2002).

No tocante às células cancerosas extremamente instáveis geneticamente, Loeb propõe a teoria do *fenótipo mutador* (tradução livre do inglês "*mutator phenotype*") na carcinogênese (Loeb, 2001). Segundo esta teoria, a instabilidade do genoma das células cancerosas é resultado de mutações em genes que atuam na manutenção da integridade genômica. Tais mutações ocorreriam num período precoce da evolução do tumor e provocariam um aumento na taxa de mutações. Conseqüentemente, e numa reação em cascata, essas mutações podem, por sua vez, potencializar o surgimento de novas mutações ao incidir em outros genes que também mantêm a integridade genômica ou mesmo incidir em genes associados com as etapas do processo carcinogênico. Visto que mutações geradas por instabilidade genética seriam provavelmente eventos aleatórios, somente seriam selecionadas mutações que proporcionassem vantagem seletiva suficiente para gerar uma população clonal de células cancerosas.

O *fenótipo mutador* manifestar-se-ia por alterações moleculares diversas tais como mutações pontuais, instabilidade de microssatélites e perda de heterozigose (Loeb *et al.*, 2003). A etiologia de cada uma destas alterações moleculares no DNA seria não menos diversa. A instabilidade de microssatélites, por exemplo, resultaria de mutações ou da inativação dos genes envolvidos com o reparo de mau pareamento do DNA. Este é o caso de pacientes com câncer colorretal hereditário sem polipose nos quais mutações nos genes *MSH2* e *MLH1*, envolvidos com aquele tipo de reparo, são responsáveis pela alta incidência de mutações e de instabilidade de seqüências repetitivas (Fishel, 2001). Alterações estruturais, como a perda de heterozigose, envolveriam genes que atuam na recombinação gênica e na segregação dos cromossomos. E as mutações pontuais podem ser originadas por erros na síntese de DNA e/ou por reparo inadequado do DNA. Presume-se que estas

mutações ocorreriam indiscriminadamente, sejam em genes correlatos ou não à tumorigênese, em regiões codificantes e não-codificantes e envolvendo uma amplitude de alterações tais como transições ou transversões, conduzindo às mutações *missense*, silenciosas ou criando um codon de parada, e deleções e inserções, que podem alterar o quadro de leitura (Loeb, 2001 e Loeb *et al.*, 2003).

### **5.3 – Fenótipo mutador no câncer de próstata**

As primeiras evidências sugerindo um *fenótipo mutador* no câncer de próstata apontam para os genes que codificam DNA polimerases e para aqueles envolvidos com o mecanismo de reparo do DNA. Estes dados remontam à década passada com os resultados de Dobashi *et al.* (1994), com a detecção de mutações no gene da polimerase Beta em tecido tumoral prostático, e os de Gao *et al.* (1994), cujos resultados ilustraram o papel que o mecanismo de reparo do DNA pode desempenhar no surgimento de instabilidades de repetições nucleotídicas no câncer de próstata. Desde então, e como será brevemente descrito a seguir, novos resultados têm sido descritos evidenciando a presença de um *fenótipo mutador* na etiologia do câncer de próstata.

A polimerase Beta é codificada pelo gene *POLB* e participa do mecanismo de reparo de DNA por excisão de bases por meio de sua atividade reparadora de bases excisadas. Porém esta síntese é propensa a erros, uma peculiaridade que pode conferir à polimerase Beta um potencial *mutador*. Tem sido demonstrado que a elevada expressão do gene *POLB* pode afetar a estabilidade cromossômica e diretamente participar das mudanças associadas ao câncer (Bergolio *et al.*, 2002). A elevada expressão do gene *POLB* no tecido tumoral

prostático assim como a detecção de mutações somáticas neste gene tem sugerido que o gene *POLB* pode estar envolvido com a carcinogênese da próstata humana (Dobashi *et al.*, 1994, Srivastava *et al.*, 1999; Bhattacharyya *et al.*, 2002).

As indicações mais recentes de um *fenótipo mutador* no câncer de próstata por defeitos no reparo de DNA referem-se aos genes envolvidos com o mecanismo de reparo de pareamento inadequado do DNA (genes *PMS1*, *PMS2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH3* e *MSH6*). Tal mecanismo é responsável pela correção de nucleotídeos erroneamente incorporados durante a replicação do DNA. A deficiência desta atividade reparadora gera uma instabilidade genética marcada por elevada taxa de mutações, sobretudo nas repetições nucleotídicas denominadas microssatélites. No caso do câncer de próstata, os resultados mais proeminentes dizem respeito à redução, ou mesmo ausência, de expressão dos genes *PMS1*, *PMS2*, *MLH1* e, principalmente, *MSH2*, tanto em tecido tumoral prostático como em linhagens celulares obtidas do câncer de próstata (Yeh *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Em comum, estes trabalhos sugerem que a instabilidade de microssatélites observada no câncer de próstata é causada por deficiência do mecanismo de reparo por pareamento inadequado e concluem que a instabilidade genética assim gerada parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento tumoral.

#### **5.4 - Potencial *mutador* das DNA polimerases**

Além do gene *POLB*, novas polimerases foram recentemente identificadas e parecem desempenhar uma ação efetiva na mutagênese *in vivo* com possíveis implicações no desenvolvimento do câncer (Kunkel, 2003). Este é o caso da polimerase zeta (gene



*POLZ*) e das polimerases que compõem a família Y: polimerase Eta (gene *POLH*), Iota (gene *POLI*), Kappa (gene *POLK*) e Rev1 (gene *REVI*).

Ao contrário das polimerases Delta e Épsilon (principais polimerases do maquinário de replicação), as polimerases Eta, Iota, Kappa e Zeta não possuem atividade de exonuclease 3'-5' (função revisora de erros), replicam o DNA com baixa fidelidade e processividade e são capazes de replicar sobre lesões no DNA (Goodman, 2002). A capacidade de replicar DNA danificado confere a essas polimerases uma função essencial no processo de replicação do DNA. Conforme exposto acima, lesões no DNA ou alterações estruturais na forca de replicação podem retardar ou mesmo bloquear o processo replicativo. Nesta situação, as polimerases Eta, Iota, Kappa e Zeta substituem temporariamente as polimerases convencionais (Delta e Épsilon) que foram barradas pelas lesões no DNA. Desta forma elas impedem que a replicação do DNA seja suspensa, o que evita a morte celular. Uma vez finda a replicação do DNA danificado, as polimerases convencionais retornam à forca de replicação e dão continuidade à síntese do DNA. Finalmente, as bases lesionadas e/ou incorporadas erroneamente são corrigidas pelo mecanismo de reparo de DNA (Friedberg *et al.*, 2002; Kunkel, 2003).

No entanto, o fato das polimerases da família Y replicarem DNA com baixa fidelidade e processividade faz com que apresentem elevado potencial *mutador*, uma vez que tal replicação é propensa a erros (Tissier *et al.*, 2000; Friedberg *et al.*, 2002; Goodman, 2002; Washington *et al.*, 2002). Nessa replicação pouca acurada, nucleotídeos incorretos são introduzidos à fita recém sintetizada a partir das bases lesionadas, e sem a atividade de exonuclease 3'-5' esses erros não são corrigidos. O potencial *mutador* é ainda mais

pronunciado quando deficiências no mecanismo de reparo do DNA impedem que as bases lesionadas e/ou incorporadas erroneamente sejam corrigidas. Este efeito *mutador* das polimerases Eta, Iota, Kappa e Zeta é observado não apenas quando da replicação de DNA danificado, mas também de DNA não danificado. De fato, elas replicam DNA não danificado com uma taxa de erros de 2 a 4 vezes maior se comparado à replicação efetuada pelas polimerases Delta e Épsilon (Gearhart *et al.*, 2001).

A capacidade de replicar DNA danificado e a subsequente propensão a erros é uma propriedade que depende do tipo de lesão no DNA, das seqüências nucleotídicas adjacentes à lesão e do tipo de polimerase envolvida. Cada uma das polimerases desempenha funções específicas e com eficiência variável de acordo com o tipo de lesões no DNA com que se deparam. Portanto, na ausência ou deficiência de uma DNA polimerase específica a determinada lesão, a gênese de mutações durante a replicação de DNA danificado envolveria uma ação coordenada de enzimas não específicas para a lesão em questão (Johnson *et al.*, 2000). Esta ação coordenada envolveria DNA polimerases responsáveis por inserir um nucleotídeo oposto à lesão e outras polimerases que estenderiam a cadeia de DNA a partir deste nucleotídeo inserido.

Por fim, o potencial *mutador* destas polimerases pode ser manifestado tanto na deficiência quanto na hiperatividade das mesmas. E a gênese de mutações depende de quando, quais polimerases e em quais circunstâncias elas são recrutadas para a replicação do DNA, seja ele danificado ou não.

---

## II – OBJETIVOS

O presente trabalho aborda o estudo de duas enzimas esteroidogênicas envolvidas com o metabolismo da DHT e as conseqüências clínicas originadas por deficiências em tais enzimas, decorrentes de mutações germinativas e/ou somáticas nos genes *SRD5A2* e *HSD3B2*.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram:

1. Em relação a 5 $\alpha$ -redutase tipo 2, investigar mutações germinativas no gene *SRD5A2* que pudessem estar relacionadas à manifestação do PHM, em pacientes com sinais clínicos sugestivos de sua deficiência, e
2. Com relação a 3 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase tipo 2, buscou-se a identificação de mutações germinativas no gene *HSD3B2* em pacientes com HCSR e a caracterização bioquímica e molecular de mutações somáticas em pacientes com câncer de próstata esporádico.

---

### III – RESULTADOS

#### Capítulo III.1 – Artigo publicado

Hackel, C.; Oliveira, L.E.C.; Ferraz, L.F.C.; Tonini, M.M.O.; Silva, D.N.; Toralles, M.B.;

Stuchi-Perez, E.G. e Guerra-Júnior, G. (2005) New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency type 2. *Journal of Molecular Medicine*, 83: 569-576.

Este artigo descreve a investigação de mutações germinativas no gene *SRD5A2* em pacientes com quadro clínico sugestivo de PHM por deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2. Foram analisados 20 pacientes, de 18 famílias distintas, que apresentavam ambigüidade genital e elevada razão T/DHT. Consangüinidade entre os pais foi observada em 6 casos. A triagem de mutações no gene *SRD5A2* foi realizada a partir do sequenciamento direto dos exons e respectivas regiões flangeadoras amplificados por PCR a partir do DNA genômico dos pacientes.

Foram detectadas mutações em 18 pacientes, sendo 11 pacientes com mutação em homozigose, 4 heterozigotos compostos e 3 pacientes com mutações em apenas um dos alelos (em heterozigose). Em dois pacientes não foi detectada nenhuma mutação deletéria. A não detecção de mutações deletérias nestes pacientes e nos 3 pacientes heterozigotos

pode ser devido à localização de possíveis mutações em outras regiões além daquelas submetidas ao sequenciamento direto como, por exemplo, os introns e a região promotora.

Das 11 mutações deletérias identificadas 4 são novas e ainda não descritas na literatura: a mutação *missense* Gly158Arg, a deleção del642T, a substituição nucleotídica intrônica IVS3+1G>A e a inserção 217\_218insC. Este artigo relata o primeiro caso na literatura de uma inserção no gene *SRD5A2*. Foram observadas as seguintes mutações recorrentes: Gly183Ser (6 pacientes), Gln126Arg (4), Arg246Trp (3), Gly158Arg (2) e Gly196Ser (2 pacientes). A mutação Gly183Ser, por exemplo, foi detectada em 6 pacientes não correlacionados, todos de descendência africana, sugerindo um possível efeito fundador desta mutação na população brasileira. Por outro lado, a recorrência das mutações Gln126Arg, Gly196Ser e Ala207Asp em grupos étnicos distintos sugere prováveis *hotspots* no gene *SRD5A2*. A mutação Gly196Ser, por exemplo, já foi descrita no Brasil, Suécia, Turquia e Grécia.

Christine Hackel · Luiz Eduardo Chimello Oliveira ·  
Lucio Fabio Caldas Ferraz ·  
Maria Manuela Oliveira Tonini · Daniela Nunes Silva ·  
Maria Betania Toralles · Eliana Gabas Stuchi-Perez ·  
Gil Guerra-Junior

## New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency type 2

Received: 11 October 2004 / Accepted: 27 January 2005 / Published online: 16 March 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** Mutations of the steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 (*SRD5A2*) gene in 46,XY subjects cause masculinization defects of varying degrees, due to reduced or impaired enzymatic activity. In this study, sequence abnormalities of the *SRD5A2* gene were assessed by polymerase chain reaction with specific primers and automated sequencing analysis in DNA samples from 20 patients with suspected steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency from 18 Brazilian families. Eleven subjects presented *SRD5A2* homozygous single-base mutations (two first cousins and four unrelated patients with G183S, two with R246W, one with del642T, one with G196S, and one with 217\_218insC plus the A49T variant in heterozygosity), whereas four were compound heterozygotes (one with Q126R/IVS3+1G>A, one with Q126R/del418T, and two brothers with Q126R/G158R). Three pa-

C. Hackel · L. E. C. Oliveira · L. F. C. Ferraz ·  
M. M. O. Tonini  
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genetica,  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
Campinas, SP, Brazil

C. Hackel (✉)  
Departamento de Genetica Medica, Faculdade de Ciencias  
Medicas CP6111, Universidade Estadual de  
Campinas (UNICAMP),  
13083-970 Campinas, SP, Brazil  
e-mail: hackel@unicamp.br  
Tel.: +55-19-37881145  
Fax: +55-19-37888909

C. Hackel · E. G. Stuchi-Perez · G. Guerra-Junior  
Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinacao e  
Diferenciacao do Sexo, Faculdade de Ciencias Medicas,  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
Campinas, SP, Brazil

D. N. Silva · M. B. Toralles  
Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina,  
Universidade Federal da Bahia (UFBA),  
Salvador, BA, Brazil

G. Guerra-Junior  
Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciencias Medicas,  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
Campinas, SP, Brazil



**CHRISTINE HACKEL** received her PhD in biology from the Instituto de Biociencias of the Universidade Estadual de Sao Paulo in Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. She is presently an associate professor of human genetics in the Medical Genetics Department at the Faculdade de Ciencias Medicas of the Universidade Estadual de Campinas and an associate researcher at the Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genetica at the same Institution, in Campinas, São Paulo, Brazil. Her major scientific interests focus on the molecular aspects of sex determination and differentiation disorders.

**GIL GUERRA-JUNIOR** received his PhD in pediatrics from the Faculdade de Ciencias Medicas of the Universidade Estadual de Campinas in Campinas, Sao Paulo, Brazil. He is presently an associate professor of pediatrics in the Pediatrics Department at the Faculdade de Ciencias Medicas of the Universidade Estadual de Campinas and is one of the coordinators of the Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinacao e Diferenciacao do Sexo—GIEDDS at the same Institution. His research interests include clinical and hormonal aspects of various disorders of steroid metabolism, sex determination and differentiation, and endocrine and genetic disturbances leading to short stature.

tients were heterozygous for A207D, G196S, and R266W substitutions. The V89L polymorphism was found in heterozygosity in one of them (with A207D) and in one case with an otherwise normal gene sequence. The A49T variant was also detected in heterozygosity in the second case without other sequencing abnormalities. Four patients harbor yet non-described *SRD5A2* gene mutations: a single nu-

cleotide deletion (del642T), a G158R amino acid substitution, a splice junction mutation (IVS3+1G>A), and the insertion of a cytosine (217\_218insC) occurring at a CCCC motif. This is the first report of a single-nucleotide insertion in the coding sequence of the *SRD5A2* gene. In addition to these new mutations, this investigation reveals the prevalence of G183S substitution among a subset of African-Brazilian patients and presents evidences of the recurrence of already known mutations.

**Keywords** Male pseudohermaphroditism · Differentiation · Mutation · Splice defect

## Introduction

The steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 enzyme is encoded by the *SRD5A2* gene on chromosome 2 and is predominantly expressed in external genital tissues and prostate. Steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency, an autosomal recessive disorder (OMIM 607306), leads to the impairment of the conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT). Both hormones bind to the same androgen-receptor protein in cell nuclei, but perform different physiological roles: T plays a major role in the stimulation of Wolffian ducts during sexual differentiation and probably in the control of spermatogenesis, whereas DHT is considered the essential androgen for normal development of external genitalia in the male fetus [1]. DHT also mediates most events of male puberty, including maturation of facial and body hair, genital, and prostate growth.

The diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency can be difficult, mainly before the age of puberty. It should be suspected in all prepubertal male pseudohermaphrodites, especially those with perineal hypospadias and in those who virilize at puberty without evidence of gynecomastia. In the majority of cases, this diagnosis can be confirmed by demonstration of an abnormally high T/DHT serum ratio before and/or after hCG administration [2–4]. Early diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency is important because of its bearing on the assignment of sex in the affected infant. If the gonads are not removed, virilization occurs during puberty; as a consequence, individuals who were raised as females frequently experience a postpubertal change in gender identity and role from female to male [5]. Considering the natural history of this disease, male assignment of neonatal diagnosed patients would be the recommendation of choice [2], but differentiation of a female gender identity also occurs in a minority of patients [6].

Mutations of the *SRD5A2* gene in 46,XY subjects result in a spectrum of external genital phenotypes ranging from complete female to nearly complete male with mild symptoms of undermasculinization [5, 7, 8]. To date, over 40 different mutations scattered throughout the gene have been described. Most of them are missense or nonsense mutations, although total deletion of the gene and nucleotide deletions as well as splice-junctions alterations have also been reported [9–11]. Some of them are recurrent mutations reported among various ethnic groups, whereas others pre-

sumably reflect a founder effect. In addition, polymorphic variations at codons 49 (A49T) and 89 (V89L) have been correlated with masculinization defects and may represent genetic risk factors for the occurrence of hypospadias [11, 12].

In this paper, we report the molecular data of *SRD5A2* gene from 18 families and 20 patients with suspected steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency from three different services in Brazil, in order to provide evidence of the mutational spectrum of this disease and its relevance for correct diagnosis and genetic counseling.

## Patients and methods

Twenty patients with clinical signs of 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency from 18 unrelated families were included in this study. Informed consent was obtained from all patients or parents according to the approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences from State University of Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brazil. The clinical diagnosis was based on ambiguous genitalia in patients with 46,XY karyotype and elevated testosterone/DHT ratio. Some patients, in pubertal age, had also virilization without gynecomastia.

Eleven patients from ten families were followed in an interdisciplinary service for diagnosis and treatment of intersex cases in Campinas, Brazil (UNICAMP, patient numbers 5–9, 12, 14, 15, 18, 19, and 20 in Table 1). The other eight patients from seven families were followed in a genetics service in Salvador, BA, Brazil (State University of Bahia, patient numbers 1 to 4, 10, 11, 13, 17 in Table 1) and one patient in a pediatrics service in Sao Paulo, SP, Brazil (State University of Sao Paulo, patient number 16 in Table 1). Patients 1 and 2 are cousins, and patients 14 and 15 are brothers.

The clinical data, as age at diagnosis, sex at first consultation, definitive sex assignment, family history of sex ambiguity, consanguinity, classification of the external genitalia according to Sinnecker et al. [7] criteria and pubertal development were obtained retrospectively. Total T and DHT serum levels were also obtained retrospectively and confirmed with new evaluation at UNICAMP. The total T measurement was performed with commercial kit by electrochemiluminescence (Roche Elecsys 2010) and the DHT measurement by solid phase radioimmunoassay, with the *n*-hexane technical extraction procedure. In the prepubertal patients who were older than 4 months, the samples for total T and DHT determinations were collected following hCG stimulation (Profasi-Serono, 2000 IU, IM, for 3 consecutive days and collected at the 4th day).

Genomic DNA was isolated from blood leukocytes of the patients according to routine protocols. Polymerase chain reaction (PCR) products generated by exon flanking primers [13] were purified using the Wizard PCR Preps kit (Promega, Madison, Wis., USA) and were sequenced using the ABI377 Automated DNA Sequencer (PerkinElmer, Applied Biosystems) according to the manufacturers' procedure. All sequencing reactions were performed with PCR

**Table 1** Clinical features, ethnic background, geographical origin, and molecular data of 20 subjects with 5 $\alpha$ -reductase deficiency from 18 Brazilian families. *T* Testosterone, *DHT* dihydrotestosterone

Patient	Consanguinity/ family history	Age at diagnosis (years)	External genitalia <sup>a</sup>	Gonadal position R/L	T/ DHT ratio	Social sex	Ethnic background/ geographical origin	Molecular lesion			Other molecular variation
								Type	Location	Mutation	
Class 1: homozygotes											
1 <sup>b</sup>	+/+	5	4b	I/I	86 <sup>c</sup>	F	AE/BA	Missense	Exon 3	G→A, G183S	
2 <sup>b</sup>	+/+	2	4b	I/I	50 <sup>c</sup>	F	AE/BA	Missense	Exon 3	G→A, G183S	
3	-/-	16	3b	S/S	87 <sup>d</sup>	M	AE/BA	Missense	Exon 3	G→A, G183S	
4	-/-	27	3b	I/I	95 <sup>d</sup>	F	AE/BA	Missense	Exon 3	G→A, G183S	
5	+/-	21 days	3b	S/S	70 <sup>d</sup>	F	AE/BA	Missense	Exon 3	G→A, G183S	
6	-/-	20	3b	S/S	96 <sup>d</sup>	F→M	AE/SP	Missense	Exon 3	G→A, G183S	
7	+/+	16	3b	I/S	82 <sup>d</sup>	F <sup>e</sup>	E/MG	Missense	Exon 4	G→A, G196S	
8	+/+	3 months	3b	S/S	70 <sup>d</sup>	?→F	AE/BA	Missense	Exon 5	C→T, R246W	
9	+/-	14	3b	I/I	65 <sup>d</sup>	F→M	AE/SP	Missense	Exon 5	C→T, R246W	
10	-/-	19	3b	S/S	87 <sup>d</sup>	M	AE/BA	Frameshift	Exon 1	217_218 insC	A49T (heterozygous)
11	-/-	19	3b	I/S	30 <sup>f</sup>	F	AE/BA	Frameshift	Exon 4	del642T	
Class 2: compound heterozygotes											
12	-/-	18	3b	S/S	15 <sup>d</sup>	F→M <sup>g</sup>	E/SP	a) Missense	Exon 2	A→G, Q126R	
13	-/-	15	3b	S/S	96 <sup>f</sup>	F	AE/BA	b) Frameshift a) Missense	Exon 2 Exon 2	418delT A→G, Q126R	
14 <sup>h</sup>	-/+	2	3b	S/S	51 <sup>c</sup>	?→M	E/SP	b) Splice junction a) Missense	Exon 3/ intron3 Exon 2	IVS +1G>A A→G, Q126R	
15 <sup>h</sup>	-/+	4	3b	S/S	38 <sup>f</sup>	F→M	E/SP	b) Missense a) Missense	Exon 3 Exon 2	G→C, G158R A→G, Q126R	
16	-/-	2	3a	S/S	91 <sup>c</sup>	M	E/SP	b) Missense a) Missense	Exon 3 Exon 2	G→A, G158R A→G, Q126R	
Class 3: heterozygotes											
16	-/-	2	3a	S/S	91 <sup>c</sup>	M	E/SP	Missense	Exon 5	C→T, R246W	
17	-/-	8	3b	I/I	21 <sup>c</sup>	M	AE/BA	Missense	Exon 4	C→A A207D	V89L (heterozygous)
18	-/-	1 month	3b	S/S	25 <sup>d</sup>	M	E/SP	Missense	Exon 4	G→A, G196S	
Class 4: no abnormality identified											
19	-/+	23	3a	S/S	87 <sup>d</sup>	M	E/SP	-	-	-	V89L (heterozygous)



**Table 1** (continued)

Patient	Consanguinity/ family history	Age at diagnosis (years)	External genitalia <sup>a</sup>	Gonadal position R/L	T/ DHT ratio	Social sex	Ethnic background/ geographical origin	Molecular lesion			Other molecular variation
								Type	Location	Mutation	
20	-/-	4	3b	S/S	25 <sup>c</sup>	F→M	E/SP	-	-	-	A49T (heterozygous)

*I* Inguinal, *S* scrotal, *F* female, *M* male, *?* undefined, *AE* African-European-derived, *E* European-derived, *BA* State of Bahia, *MG* State of Minas Gerais, *SP* State of Sao Paulo, *R* right, *L* left

<sup>a</sup>According to the classification of Sinnecker et al. [7]

<sup>b</sup>First cousins

<sup>c</sup>After hCG stimulation

<sup>d</sup>Basal

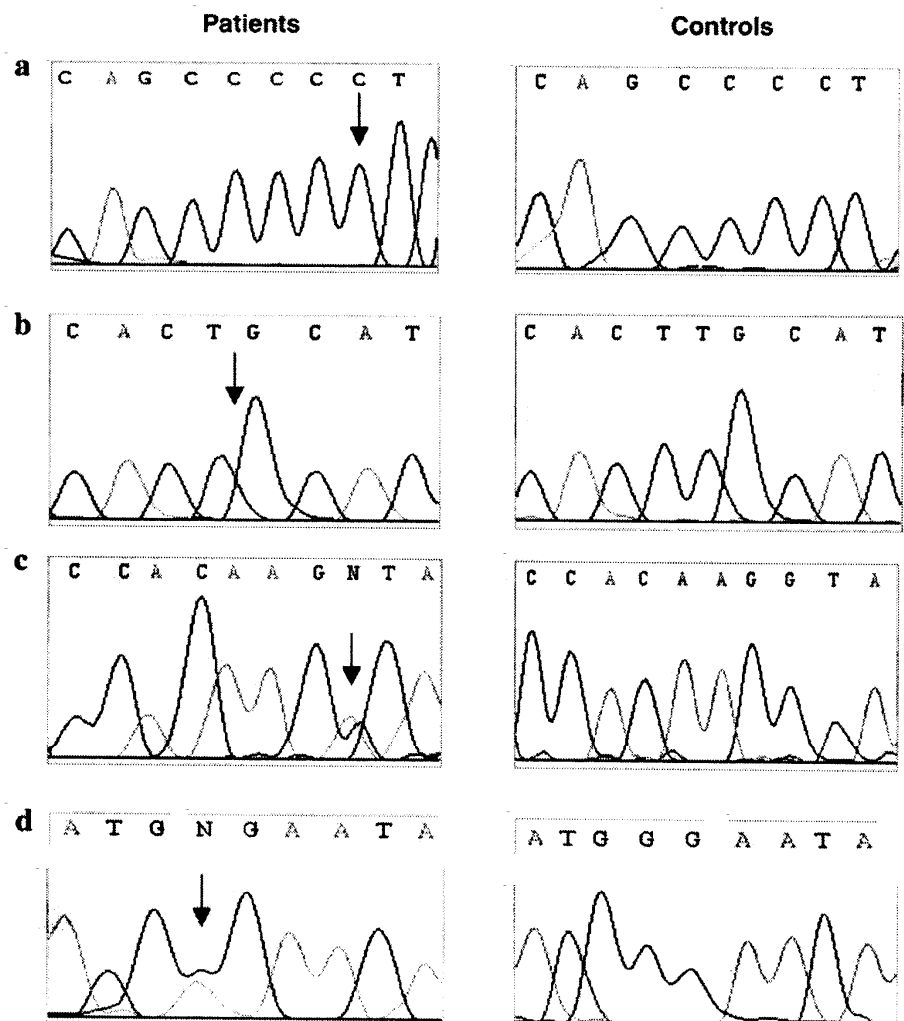
<sup>e</sup>Ferraz et al. [14]

<sup>f</sup>Data before gonadectomy

<sup>g</sup>Ferraz et al. [15]

<sup>h</sup>Brothers

**Fig. 1** Partial sequences of the *SRD5A2* gene showing the new mutations detected in the present study. **a** In patient no. 10, the insertion of a C between nucleotides 217 and 218 of the first exon leads to a premature stop at codon 135; **b** In patient no. 11, the deletion of a T in exon 4 leads to an ORF alteration. **c** In patient no. 13, a G→A mutation in the donor splice site of the third intron and **d** In patient no. 14, a G→A mutation in the third exon replaces a glycine (G) to an arginine (R) at position 158; The arrows point to the mutations. *N* = G/A



products from two separate reactions, using sense and antisense primers. The A49T and the V89L genotypes were determined for the heterozygous patients, as well as for the two without sequencing abnormalities. In one case (patient no. 11), the exon 1 PCR product was cloned in the vector pGEM<sup>+</sup>, using the Easy Vector Cloning kit (Promega), followed by sequencing analysis with the exon-specific primers.

## Results

The clinical features of the subjects are summarized in Table 1. Patients' ages varied from 21 days to 27 years; ten were more than 14 years old and only one has not already reached puberty (case 13), whereas the others were below 8 years of age and in prepubertal stage. Female was the initial sex assignment in 12 patients, male in six, and undefined in two. The definitive sex of rearing was female in seven cases and male in 13 cases. Consanguinity was registered in five families, and five others had similar cases (cases 1 and 2 are cousins, and cases 14 and 15 are brothers). The genital ambiguity according to Sinnecker et al. [7] criteria was grade 4b in two patients (cases 1 and 2), grade 3a in other two (cases 16 and 19), and grade 3b in the remainder cases, with palpable gonads in all cases. The total T levels varied from normal to elevated levels for age and pubertal stage, whereas the majority of patients had DHT values close to the lower limit of the method, varying from 0.03 ng/ml to 0.06 ng/ml. Three patients had been submitted to gonadectomy before present evaluation, and T/DHT ratio was not repeated.

The patients' ethnical and geographical origins and mutations are also summarized in Table 1. Twelve patients belonged to families with reported mixed ancestries (African- and European-derived) and, with exception of patient no. 9, were born in Bahia, a northeastern Brazilian state with a highly miscigenated population. Present-day African-Brazilians are considered the product of an original African gene pool that received European and Amerindian genes for about 12 generations [16]. The other eight patients were reported as European-derived only and were born either in Minas Gerais state (one case) or in Sao Paulo state (seven cases). Both states are located in a southeastern region, which received a greater contingent of European immigration in the last two centuries, composed mainly by Portuguese, Italian, Spanish, and German individuals.

Four new mutations were identified: the insertion of a cytosine between nucleotides 217 and 218 in the first exon (217\_218insC), the deletion of a thymine at position 642 of exon 4, a point mutation at the donor-splicing site of the third intron (IVS3+1G>A), and a C→G transition at codon 158 leading to amino acid substitution (G158R) (Fig. 1). Eleven subjects presented *SRD5A2* homozygous single-base mutations (six with G183S, two with R246W, one with del642T, one with G196S, and one with 217\_218insC), whereas other four were compound heterozygotes (one with Q126R/IVS3+1G>A, one with Q126R/del418T and two brothers with Q126R/G158R). In addition, three were het-

erozygous for A207D, G196S, and R266W substitutions, and in one case, no sequencing abnormalities were detected. Two of them were heterozygous for the V89L polymorphism: patient no. 17 with the A207D substitution, and patient no. 19 with no sequencing abnormalities. Patient no. 20 was heterozygous for the A49T variant, without other molecular alterations. The finding of both homozygous 217\_218insC and heterozygous A49T mutations in the first exon of patient no. 10 on direct sequencing of the PCR product was confirmed by the cloning procedure.

## Discussion

Because the diagnosis of steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency is sometimes difficult due its clinical variability and cannot be ruled out by a lack of an elevated T/DHT ratio, the molecular characterization of the mutations is a relevant tool for the correct ascertainment of this disease. The investigation of this series of Brazilian patients' suspected steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency leads to the findings of four new mutations, reveals the prevalence of G183S substitution, and presents evidences of the recurrence of already known mutations.

The six missense mutations detected in the present series (Q126R, G158R, G183S, G196S, A207D, and R246W) are mutations that lead to amino acid substitutions occurring in conserved regions of the type 2 enzyme of humans, rats, and monkeys [17], suggesting that these positions are important for enzymatic activity. Indeed, the causative role or the Q126R, G183S, A207D, and R246W substitutions was confirmed by site-directed mutagenesis and in vitro assays [18]. In addition, with the exception of G158R, these mutations have already been found in patients with steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency and are included in the *SRD5A2* Human Gene Mutation Database [9].

The prevalence of G183S substitution can probably be attributed to a founder gene effect, because it has been observed in five individuals from Bahia State (two were first-degree cousins) and in one patient from Sao Paulo State, all of them with mixed African-European descent. This substitution has been reported before in two Brazilian patients [19] and in four affected members of a family from the Dominican Republic [20]. Although the 183 code position might be a hot spot of the *SRD5A2* gene as suggested by Cai et al. [20], it is noteworthy to mention that, until now, this mutation was reported only among Brazilian patients from mixed African-European ancestry and in the Dominican Republic. A founder effect can be considered when we take into account that both countries have a strong component of African descent in their nowadays populations in consequence from the slave trade that occurred between the sixteenth and seventeenth centuries, in the Dominican Republic, and during the Colonial Period in Brazil [16, 21].

A second founder gene effect may be illustrated by the Q126R substitution, which was found in four compound heterozygotes of this series, one of them previously described by Ferraz et al. [15]. This mutation has been detected in subjects from Brazil, Belgium, Louisiana, and

New York, all with presumed Portuguese ancestry [22]; in a French sibship [23]; and in a German individual [7]. These observations may indicate that the Q126R mutation is relatively common among Caucasians and could have been spread through European migration in the last centuries, although the possibility of a hotspot cannot be excluded. In contrast, the R246W substitution seen in three unrelated patients of this series seems to be a good example of recurrent mutation due to a hotspot in the exon 5 of the gene. Indeed, two mutant alleles (*R246W* and *R246Q*) arise from mutation at either position of a CG dinucleotide and have been found in seven different ethnic groups: African-American, White-European, Pakistanis, Dominican Republicans, Brazilians, Egyptians, [22], and Chinese [11].

Other hotspots of the *SRD5A2* gene may be represented by the G196S and A207D substitutions. The first one has been described in Greek, Turkish, Swedish, and Brazilian patients (7, 8, 14, 24, and this series), whereas the second was initially identified in a compound heterozygous Austrian individual [24], followed by the description of two siblings of Mexican origin, with this specific alteration in homozygous state [25]. To our knowledge, this is the third report of A207D substitution, occurring in a Brazilian male of African-European descent in heterozygous state (patient no. 17). This patient is also heterozygous for the V89L polymorphism, but the methodology employed in the present work does not allow us to establish if the A207D substitution is in *trans* or in *cis* with the 89L allele and parents' DNA, which could help us to determine the inheritance of these alleles, was not available. If we presume that they are in different alleles, it would be possible to suggest that the reduction of enzymatic activity of the 89L variant by approximately 30% [26] could significantly contribute to clinical manifestation of genital ambiguity, because the 207D mutation leads to complete inactivation of the enzyme [22]. Because neither functional determination of 5 $\alpha$ -reductase activity in genital skin fibroblasts or in vitro experiments with *SRD5A2* expression vectors containing the targeted mutations have been performed, this question remains widely open.

One of the new mutations described in the present study was detected in a compound heterozygote (Q126R/IVS3+1G>A, patient no. 13). It has been demonstrated that the Q126R substitution inactivates the enzymatic function in vitro and is associated with a drastically decreased half-life of the mutant protein [18]. The second mutation takes place at the first nucleotide of the donor-splicing site of the third intron (IVS3+1G>A). Thus, it can be predicted that altered RNA messenger processing would lead to an anomalous protein, either by intron retention or by the use of an alternative splicing site. Moreover, the high T/DTH ratio (96) observed in this patient is a good indication that this new mutation also leads to an inactive enzyme. Thus, the partial virilization of external genitalia observed in this patient can hardly be attributed to the residual function of the proteins coded by these alleles. This mechanism of virilization can also not be true for patients homozygous for *SRD5A2* gene deletions or for mutations introducing premature stop codons, not allowing any translation of a

functional enzyme [27, 28]. Together, these observations are in agreement with the hypotheses proposed by Hiort et al. [28] that [1] significant levels of T or its precursors have enough androgenic potential to induce marked virilization of the external genitalia in early fetal life, and [2] variable fetal T levels could be a major determinant for the variable genotype-phenotype correlation in this disorder.

In the present series, three other patients (nos. 12, 14, and 15) were compound heterozygotes where one of the alleles carried the Q126R codon alteration. In the other allele, patient no. 12 exhibited a del418T on exon 2, which leads to a frameshift at codon 140 and introduced a premature stop codon at amino acid 159 [15]. Patient nos. 14 and 15 were brothers, and a new missense mutation was found (GGA→AGA, G158R). Although no in vitro study had been done to evaluate the effect of this mutation on 5 $\alpha$ -reductase activity, its function may be affected by the substitution of a negatively charged amino acid (glycine) by a positively charged one (arginine) in a conserved protein domain. It is interesting to note that the four compound heterozygous patients in which one of the alleles leads to the Q126R amino acid change exhibited the same external genitalia phenotype (3b, according to Sinnecker et al. [7]).

A yet non-described, one-nucleotide deletion was detected in homozygosis in patient no. 11 (del642T). This thymine deletion on exon 4 predicts a frameshift at amino acid position 215, resulting in the addition of 22 amino acids at the C-terminal of this 254-amino acid isozyme. It is likely that this alteration would compromise enzymatic activity but, in this case, the possible effect of postpubertal T production must be taken into account, because gonadectomy occurred at age of 18 years, 1 year before being evaluated by us. At age of 19 years, this patient remains at the female-rearing sex.

The finding of the insertion of a cytosine between the 217 and 218 bases of the first exon of the gene on both alleles of the *SRD5A2* gene of patient no. 10 is very intriguing, because parental consanguinity is denied, and heterozygosis for the A49T rare variant is also present. The single nucleotide insertion at codon 73 results in a disruptive alteration, because a premature stop codon is predicted to occur at amino acid position 135. This is the first report of an insertion in the *SRD5A2* gene, arising in a C-rich sequence. Insertions of less than ten nucleotides are assumed to arise by non-random mechanisms [29], and it has been suggested that even short repetitive motifs such as CCC have ~10- to 15-fold susceptibility to insertions and deletions than nonrepetitive sequences, due to slippage-mediated process [30]. In the present case, parents' DNA was not available, and we might consider either the possibility of independent origin of this rare mutation in two different alleles or a single origin in an unknown common ancestor, with the A49T substitution arising as a secondary event.

The presence of one 49T allele was the sole change detected in patient no. 20 from the present series, which exhibited a perineoscrotal hypospadias and a T/DHT ratio of 25. The 49T enzyme has been correlated with an increase of 5 $\alpha$ -reductase activity in vitro [31], but it was further

demonstrated that the 49T allele, both in homozygous or heterozygous condition, leads to lower serum androgen concentration, indicating that this rare variant may be less efficient than initially thought [32]. Interestingly, the A49T codon substitution was found in one or both alleles of the *SRD5A2* gene in five out of seven patients with isolated hypospadias [12]. Thus, Silver and Russell [12] suggested that partial deficiency of 5 $\alpha$ -reductase activity and inadequate levels of DHT in the fetal urethra may be sufficient to cause the phenotype of hypospadias without other clinical features of 5 $\alpha$ -reductase deficiency. This hypothesis is reinforced by the observations that the expression of 5 $\alpha$ -reductase type 2 is localized to the stroma surrounding the urethra, especially along the urethral seam area in the ventral portion of the remodeling urethra in male fetuses between 16 and 22 weeks of gestation [33].

We did not find a second mutation or polymorphic variants that could negatively affect the 5 $\alpha$ -reductase type 2 activity in two patients (nos. 16 and 18) and only the polymorphic V89L was found in heterozygosis in patient no. 19. It is possible that undetected mutations could map outside of the exons and the immediate flanking introns analyzed here or could be present in the promoter region of *SRD5A2*, which was not explored in our study.

In the present series, all patients had severe external genitalia defects (from frankly ambiguous to male genitalia with severe undervirilization) not allowing genotype-phenotype correlations. Moreover, as discussed above, two distinct phenomena may counteract in the degree of virilization exhibited by 5 $\alpha$ -reductase deficiency patients: the absence or partial 5 $\alpha$ -reductase type 2 enzymatic activity and the individually variable testosterone levels during the development of male external genitalia. Probably, genotype-phenotype correlation in these patients would be more reliable through the analysis of the grade of virilization at puberty (such as the penile length and the distribution of genital and facial hair), or the sexual orientation (sexual attraction and relationship). Unfortunately, this analysis has not been done, because 11 patients were still at the prepubertal stage.

In conclusion, the investigation of this series of Brazilian patients leads to the findings of four new mutations, reveals the prevalence of G183S substitution, presents evidences of the recurrence of already known mutations, and reinforces the importance of molecular analysis for the correct diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency and for genetic counseling.

**Acknowledgements** We wish to thank Drs. Leandra Steinmetz and Durval Damiani from Instituto da Criança, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, for referral of patient no. 16 and to Dr. Laurione Candido de Oliveira from Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, for re-evaluation of hormonal data. This research was supported by grants to G. G.-Jr. from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 472638/2003-3). C.H. and G.G.-Jr. were recipients of research fellowships from CNPq and L.E.C.O. was the recipient of an undergraduate fellowship from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 02/13237-4).

## References

- Wilson JD, Griffin JE, Russell DW (1993) Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14:577-593
- Odame I, Donaldson MD, Wallace AM, Cochran W, Smith PJ (1992) Early diagnosis and management of 5 alpha-reductase deficiency. *Arch Dis Child* 67:720-723
- Saenger F, Goldman AS, Levine LS, Korth-Schutz S, Muecke EC, Katsamata M, Doberne Y, New MI (1978) Prepubertal diagnosis of steroid 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 46:627-634
- Greene S, Zachmann M, Manella B, Hesse V, Hoepffner W, Willgeroet H, Prader A (1987) Comparison of two tests to recognize or exclude 5 alpha-reductase deficiency in prepubertal children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 114:113-117
- Imperato-McGinley J, Zhu YS (2002) Androgens and male physiology the syndrome of 5 alpha-reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 198:51-59
- Zucker KJ (1999) Intersexuality and gender identity differentiation. *Annu Rev Sex Res* 10:1-69
- Sinnecker GH, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, Dorr HG, Hauss H, Heinrich U, Hemminghaus M, Hoepffner W, Holder M, Schnabel D, Kruse K (1996) Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet* 63:223-230
- Nordenskiöld A, Ivarsson S-A (1998) Molecular characterization of 5 alpha-reductase type 2 deficiency and fertility in a Swedish family. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3236-3238
- Human Gene Mutation Database *SRD5A2* gene (<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/127343.html>). Accessed September 28, 2004
- Fernandez-Cancio M, Nistal M, Gracia R, Molina MA, Tovar JA, Esteban C, Carrascosa A, Audi L (2004) Compound heterozygous mutations in the *SRD5A2* gene exon 4 in a male pseudohermaphrodite patient of Chinese origin. *J Androl* 25:412-416
- Wang Y, Li Q, Xu J, Liu Q, Wang W, Lin Y, Ma F, Chen T, Li S, Shen Y (2004) Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet* 12:706-712
- Silver RI, Russell DW (1999) 5 alpha-reductase type 2 mutations are present in some boys with hypospadias. *J Urol* 162:1142-1145
- Katz ME, Cai LQ, Zhu Y, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Shackleton HL, Imperato-McGinley J (1995) The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3160-3167
- Ferraz LFC, Guerra Jr G, Baptista MTM, Maciel-Guerra AT, Hackel C (1998) Detection of Gly-196-Ser mutation in 5 alpha-reductase type II gene in a Brazilian patient with female assignment and behavior. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11:465-466
- Ferraz LFC, Baptista MTM, Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, Hackel C (1999) New frameshift mutation in the 5 alpha-reductase type 2 gene in a Brazilian patient with 5 alpha-reductase deficiency. *Am J Med Genet* 87:221-225
- Bortolini MC, Salzano FM, Zago MA, Da Silva WA Jr, Weimer TA (1997) Genetic variability in two Brazilian ethnic groups: a comparison of mitochondrial and protein data. *Am J Phys Anthropol* 103:147-156
- Levy MA, Brandt M, Sheedy KM, Holt DA, Heaslip JJ, Trill JJ, Ryan PJ, Morris RA, Garrison LM, Bergsma DJ (1995) Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid 5 alpha-reductases from *Cynomolgus* monkey: comparisons with human and rat isoenzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:307-319
- Wigley WC, Prihoda JS, Mowszowicz I, Mendonca BB, New MI, Wilson JD, Russell DW (1994) Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha-reductase 2 isozyme. *Biochemistry* 33:1265-1270

19. Mendonça BB, Inácio M, Costa EM, Arnhold IJ, Silva FA, Nicolau W, Bloise W, Russell DW, Wilson JD (1996) Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management. *Medicine (Baltimore)* 75:64–76
20. Cai LQ, Zhu YS, Katz MD, Herrera C, Baez J, DeFillo-Ricart M, Shackleton CH, Imperato-McGinley J (1996) 5 alpha-reductase-2 gene mutations in the Dominican Republic. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1730–1735
21. Weil TE, Black JK, Blutstein HI, Johnston KT, McMorris DS, Munson FP (1973) Social System. In: *Area handbook for the Dominican Republic*. US Government Printing Office, Superintendent of Documents, 2nd edn, pp 49–55
22. Russell DW, Wilson JD (1994) Steroids 5 alpha-reductases: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25–61
23. Boudon C, Lumbroso S, Lobaccaro JM, Szarras-Czapnik M, Romer TE, Garandeau P, Montoya P, Sultan C (1995) Molecular study of the 5 alpha-reductase type 2 gene in three European families with 5 $\alpha$ -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2149–2153
24. Thigpen AE, Davis DI, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW (1992) Molecular genetics of 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Invest* 90:799–809
25. Canto P, Vilchis F, Chavez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Perez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP (1997) Mutations of the 5 alpha-reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol* 46:155–160
26. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczik FZ, Kolonel LN, Shi C-Y, Yu MC, Henderson BE, Reichardt JKV (1997) A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 alpha-reductase. *Cancer Res* 57:1020–1022
27. Andersson S, Berman DH, Jenkins EP, Russell DW (1991) Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354:159–161
28. Hiort O, Schütt MS, Bals-Pratsch MT, Holterhus P-M, Marschke C, Struve D (2002) A novel homozygous disruptive mutation in the *SRD5A2* gene in a partially virilized patient with 5 alpha-reductase deficiency. *Int J Androl* 25:55–58
29. Cooper DN (1990) Structure and function in the human genome. In: Cooper DN (ed) *Human gene evolution*. BIOS Scientific, Guilford, UK, pp 3–54
30. Nishizawa M, Nishizawa K (2002) A DNA sequence evolution analysis generalized by simulation and the Markov chain Monte Carlo method implicates strand slippage in a majority of insertions and deletions. *J Mol Evol* 55:706–717
31. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, Henderson BE, Reichardt JKV (1999) A missense substitution in the *SRD5A2* gene is associated with prostate cancer in African-American and Latino men in Los Angeles. *Lancet* 354:957–958
32. Allen NE, Reichardt JKV, Nguyen H, Key TJ (2003) Association between two polymorphisms in the *SRD5A2* gene and serum androgen concentrations in British men. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 12:578–581
33. Kim KS, Liu W, Cunha GR, Russell DW, Huang H, Shapiro E, Baskin LS (2002) Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res* 307:145–153

### Capítulo III.2 – Artigo a ser submetido para publicação

**Ferraz, L.F.C.;** Soardi, F.; Lemos-Marini, S.H.V. and Mello, M.P. Structure-function aspects of Pro222Gln homozygous mutation in the *HSD3B2* gene in a patient with congenital adrenal hyperplasia.

Foram investigadas mutações germinativas no gene *HSD3B2* em 12 pacientes com hiperplasia congênita das supra-renais (HCSR) e diagnóstico sugestivo de deficiência em 3 $\beta$ -HSD2. Foram analisados nove pacientes de sexo genético feminino (46,XX) que apresentavam elevada concentração sérica de DHEA e 3 pacientes de sexo genético masculino (46,XY) que possuíam ambigüidade genital e forma clássica de HCSR com perda de sal. A partir do DNA genômico dos pacientes, os 4 exons do gene *HSD3B2* e respectivas seqüências flanqueadoras foram amplificados por PCR e submetidos ao sequenciamento direto. Em apenas um paciente masculino foi detectada mutação no gene *HSD3B2* (mutação Pro222Gln). A não detecção de mutações nos outros pacientes ressalta o caráter extremamente raro da deficiência em 3 $\beta$ -HSD2. De fato, dados na literatura demonstram que menos de 1% dos casos de HCSR são devidos à deficiência em 3 $\beta$ -HSD2.

O presente artigo relata a identificação da mutação germinativa Pro222Gln (CCA >CAA) em homozigose em um paciente masculino com ambigüidade genital e forma perdedora de sal. Este é o segundo relato brasileiro de um paciente masculino com HCSR portador de mutação no gene *HSD3B2*.

Além da mutação Pro222Gln, uma outra troca de aminoácido já descrita neste mesmo códon corresponde à mutação Pro222Thr (CCA > ACA). A importância do códon Pro<sup>222</sup> é evidenciada pelo fato de ambas as mutações abolirem completamente a atividade da enzima 3β-HSD2. De fato, além de ser um aminoácido altamente conservado nesta posição, o códon Pro<sup>222</sup> está localizado próximo ao sítio de ligação do substrato. Além disso, o códon Pro<sup>222</sup> encontra-se adjacente ao domínio hidrofóbico responsável pela ancoragem da enzima 3β-HSD2 às membranas celulares, sugerindo um possível papel daquele resíduo na estrutura terciária final da 3β-HSD2.

Sendo assim, foi realizada a modelagem molecular por homologia tanto da enzima 3β-HSD2 nativa quanto das enzimas mutantes Pro222Gln e Pro222Thr, para se obter maiores informações acerca das interações entre os resíduos mutantes e os efeitos que eles provocam na atividade e estabilidade da enzima 3β-HSD2. A análise dos modelos gerados permitiu corroborar os dados na literatura que indicam que as mutações abolem a atividade enzimática da 3β-HSD2 por motivos distintos. O efeito deletério da mutação Pro222Gln decorre provavelmente de alterações nos domínios catalíticos da enzima, sobretudo nos domínios de ligação ao substrato. Ao passo que o efeito deletério da mutação Pro222Thr decorre possivelmente de alterações no padrão da estrutura terciária da 3β-HSD2, gerando uma enzima extremamente instável.

**STRUCTURE-FUNCTION ASPECTS OF PRO222GLN HOMOZIGOUS  
MUTATION IN THE *HSD3B2* GENE IN A PATIENT WITH CONGENITAL  
ADRENAL HYPERPLASIA**

**Lúcio Fábio Caldas Ferraz<sup>1</sup>, Fernanda Soardi<sup>1</sup>, Sofia Helena Valente de Lemos-  
Marini<sup>2</sup> and Maricilda Palandi de Mello<sup>1,\*</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas – Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Pediatria, Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – Campinas, São Paulo, Brazil.

**Key Words:** Ambiguous genitalia, congenital adrenal hyperplasia, *HSD3B2* gene, mutations, molecular homology modeling.

\*Corresponding author: Maricilda Palandi de Mello

CBMEG/UNICAMP – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo. - Zip code:  
13083-970 - Campinas – São Paulo – Brazil; E-mail: mmello@unicamp.br



## ABSTRACT

Type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase (3 $\beta$ -HSD2), encoded by the *HSD3B2* gene, is a key enzyme involved in the biosynthesis of all classes of steroid hormones. Inherited deleterious mutations in the *HSD3B2* gene cause the classical deficiency of 3 $\beta$ -HSD2, which is a rare autosomal recessive disease that leads to congenital adrenal hyperplasia (CAH), the most frequent cause of ambiguous genitalia and adrenal insufficiency in newborn infants with various degrees of salt loss. Here we report the molecular analysis of *HSD3B2* gene in a male pseudohermaphrodite born from consanguineous parents and having no clinical salt loss. The patient carried a homozygous missense mutation converting Pro<sup>222</sup> to Gln in exon 4. Molecular homology modeling of mutant 3 $\beta$ -HSD2 emphasizes the codon 222 as an important residue for the folding pattern of the enzyme.

## INTRODUCTION

The steroidogenic enzyme 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase (3 $\beta$ -HSD) is a membrane-bound NAD<sup>+</sup>-dependent enzyme involved in the biosynthesis of all classes of steroid hormones, namely glucocorticoids, mineralocorticoids, progesterone, androgens, and estrogens [1]. These steroid hormones have an important function in differentiation, development, growth and physiological function in the most human tissues [2].

In humans, there are two types of 3 $\beta$ -HSD isoenzymes encoded by two genes very similar in structure and located on chromosome 1p13.1 [2,3,4]. The type I gene (*HSD3B1*) is expressed in placenta and peripheral tissues. The type II gene (*HSD3B2*) encodes the adrenal and gonadal 3 $\beta$ -HSD enzyme [4,5].

Inherited deleterious mutations in the *HSD3B2* gene cause the classical 3 $\beta$ -HSD2 deficiency, which is an autosomal recessive inherited form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) that impairs steroidogenesis in both the adrenals and gonads [6-9 and references therein]. The clinical manifestation of classical 3 $\beta$ -HSD2 deficiency ranges from the salt-wasting to the nonsalt-wasting forms in both sexes. In newborns, 3 $\beta$ -HSD2 deficiency results in ambiguity of the external genitalia in genetic males, while affected females exhibit normal sexual differentiation or partial virilization. During adolescence, 3 $\beta$ -HSD2 deficiency results in various degrees of hypogonadism in boys and hyperandrogenism (premature pubarche, and hirsutism) in girls. Nonclassical form of 3 $\beta$ -

HSD2 deficiency has been described in older females with hyperandrogenism, but no *HSD3B2* mutations were found in these patients.

In the present study we described the clinical and molecular characterization of a patient diagnosed to be suffering from a classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 3 $\beta$ -HSD2 deficiency. Molecular analysis of the *HSD3B2* gene revealed a homozygous *missense* mutation in codon 222 [CCA (Pro) > CAA (Gln)]. Molecular homologous modeling of 3 $\beta$ -HSD2 was performed to obtain a better understanding of the effect of this mutation on the enzyme activity. The proposed model emphasizes the probable critical importance of the Pro<sup>222</sup> residue on the overall enzyme integrity and activity.

## **SUBJECTS AND METHODS**

This study was approved by the appropriate Ethics Committee from State University of Campinas (São Paulo, Brazil) and informed consent was obtained from the patient and his parents.

The patient is a Caucasian male child born at term with unremarkable prenatal history. The karyotype was 46,XY and his parents were consanguineous. At 23 days of age, he was referred to the endocrinology service because of ambiguous genital and only one gonad was palpable within the scrotum. Hormonal dosage revealed highly elevated basal

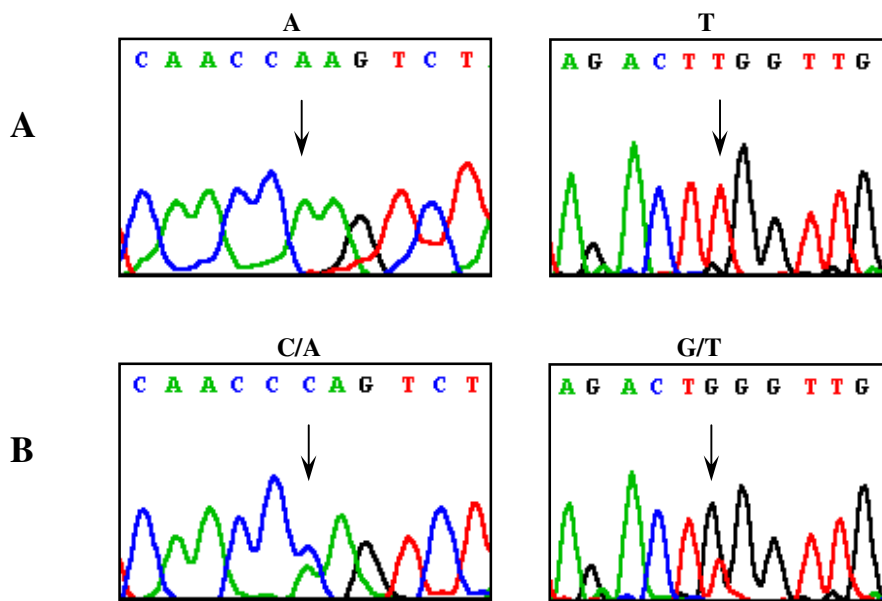
serum 17-OHP level (942ng/dL; 28,5 nmol/L; normal range: 1.7-4.2 nmol/L) and DHEA/ $\Delta^4$ -DIONE ratio of 17 (normal range: 3-10). At 2 months of age, while undergoing treatment with dexamethasone, he underwent a salt-wasting crisis with hyponatremia and hyperkalaemia. These data confirmed the diagnosis of classical form of 3B-HSD deficiency CAH in the patient. Thereafter, therapy with glucocorticoid (hydrocortisone) and mineralocorticoid (fludrocortisone) replacement was started. At age 5.8 yr, bone age was 8.5 yr and physical examination revealed height within the normal range (Z-score = 0.4) but weight highly increased (Z-score = 4.42).

Genomic DNA was isolated from blood leukocytes using standard techniques. Primers and conditions to PCR amplification of the entire coding region of *HSD3B2* gene were based on previous report [5]. Purified PCR products were sequenced in both sense and antisense orientations using ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencer according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems).

The three-dimensional structure of both mutant and native 3 $\beta$ -HSD2 were modeled using the crystal structure of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* (Protein Data Bank accession number 1A9Z and reference 10) as a template. The models were created and validated by using the default settings and parameters of the Modeller 8v0 web-served program [11]. The images were produced and analyzed by using the web-based program Diamond STING [12].

## RESULTS

Automated DNA sequencing of the patient's *HSD3B2* gene revealed the homozygous *missense* mutation Pro222Gln (CCA > CAA). Both parents and his sister were found to be heterozygous for this mutation (Figure 1).



**Figure 1.** Partial nucleotide sequence of exon IV of the *HSD3B2* gene showing the missense mutation P222Q (arrows). The patient is homozygous for the C>A transversion (A), whereas his sister and both parents are heterozygous (B). The nucleotide substitution was confirmed by at least three independent PCR-sequencing analyses.

## DISCUSSION

In the present study we describe the identification of the homozygous *missense* mutation Pro222Gln in a patient suffering from classical salt-wasting form of CAH due to 3 $\beta$ -HSD2 deficiency. Pro222Gln mutation has already been described and leads to a complete loss of 3 $\beta$ -HSD2 activity [13], which is in agreement with the severe form of CAH observed on the present patient. These findings suggest that residue position 222 is important for enzymatic activity. Indeed, Pro<sup>222</sup> residue is an amino acid highly conserved throughout the mammalian 3 $\beta$ -HSD family, as illustrated on Figure 2.

		220									
HUMAN 3 $\beta$ -HSD1	K	F	S	T	V	N	P	V	Y	V	G
<b>HUMAN 3<math>\beta</math>-HSD2</b>	K	F	S	T	V	N	<b>P<sup>222</sup></b>	V	Y	V	G
MACAQUE 3 $\beta$ -HSD	K	F	S	T	V	N	P	V	Y	V	G
BOVINE 3 $\beta$ -HSD	K	F	S	R	V	N	P	V	Y	V	G
RAT 3 $\beta$ -HSD1	K	F	S	I	A	N	P	V	Y	V	G
RAT 3 $\beta$ -HSD2	K	F	S	I	V	N	P	V	Y	V	G
RAT 3 $\beta$ -HSD3	T	F	S	I	A	N	P	V	Y	V	G
MOUSE 3 $\beta$ -HSD1	K	F	S	I	A	N	P	V	Y	V	E
MOUSE 3 $\beta$ -HSD2	K	F	N	T	A	N	P	V	Y	V	G
MOUSE 3 $\beta$ -HSD3	K	F	S	T	A	N	P	V	Y	V	G

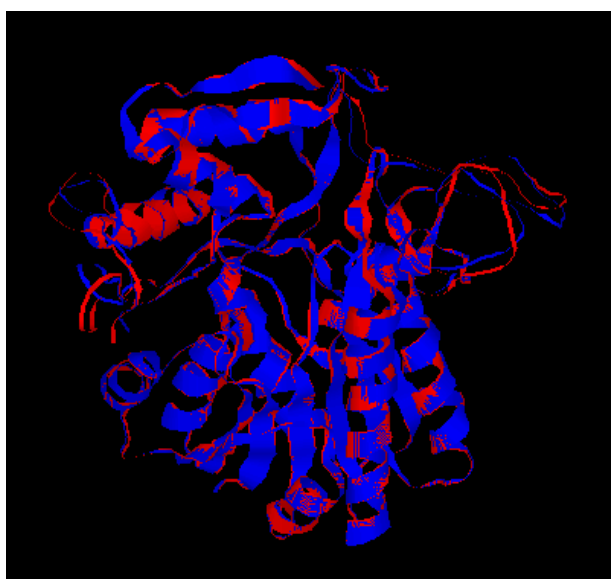
**Figure 2.** Comparison of the partial amino acid sequences of mammalian 3 $\beta$ -HSD isoenzymes. Human 3 $\beta$ -HSD2 and its residue Pro<sup>222</sup> are in bold. Amino acid residues are designated by single letter code and numbered relative to the first NH<sub>2</sub>-terminal methionine of human 3 $\beta$ -HSD2. Residues common to human 3 $\beta$ -HSD2 are boxed. Figure adapted from reference 2.

Two different *missense* mutations have been identified on codon 222, depending on the mutated base being the first or the second nucleotide of the codon [13,14,15]. The C>A transversion in the first nucleotide of codon 222 leads to the amino acid replacement from Proline (CCA) to Threonine (ACA). The *missense* mutation Pro222Thr was detected in an Eastern European female neonate with classic salt-wasting disorders. Alternatively, the C>A transversion in the second nucleotide of codon 222 converts codon CCA encoding Proline to CAA encoding a Glutamine. The *missense* mutation Pro222Gln was detected in two unrelated families: a male patient from Algeria and a female patient from Brazil. The case described here is a Brazilian male patient with typical clinical features of CAH due to 3 $\beta$ -HSD2 deficiency who also harbors the Pro222Gln mutation. This patient, however, is not related to the Brazilian female patient previously reported. To our knowledge, this is the second report of a Brazilian male patient suffering from a classical form of CAH with *HSD3B2* mutation.

Both mutations on Pro<sup>222</sup> residue abolish severely the 3 $\beta$ -HSD2 activity [14,15]. In fact, the importance of this residue is evidenced by the fact that Pro<sup>222</sup> residue was predicted to be in the membrane-spanning domains thus suggesting a putative role on the ultimate folding pattern of the enzyme [2]. In addition, besides being highly conserved in that particular position, Pro<sup>222</sup> residue is located adjacent to the substrate binding domains [16]. Although both P222Q and P222T mutations render the 3 $\beta$ -HSD2 enzyme with no detectable activity, they probably do so by different manners. The P222Q enzyme shows no evidence of protein instability (14). Thus the absence of enzymatic activity may be due to alterations on the catalytic activity of the enzyme, such as disruption of the substrate

binding domain introduced by the presence of glutamine on codon position 222. On the other hand, P222T enzyme shows no detectable level on Western blottings despite mRNA detection, thus suggesting being a totally unstable protein (15). This severe instability of the enzyme caused by the presence of threonine on codon 222 seems to be the detrimental mechanism that leads to the profoundly decreased 3 $\beta$ -HSD2 activity.

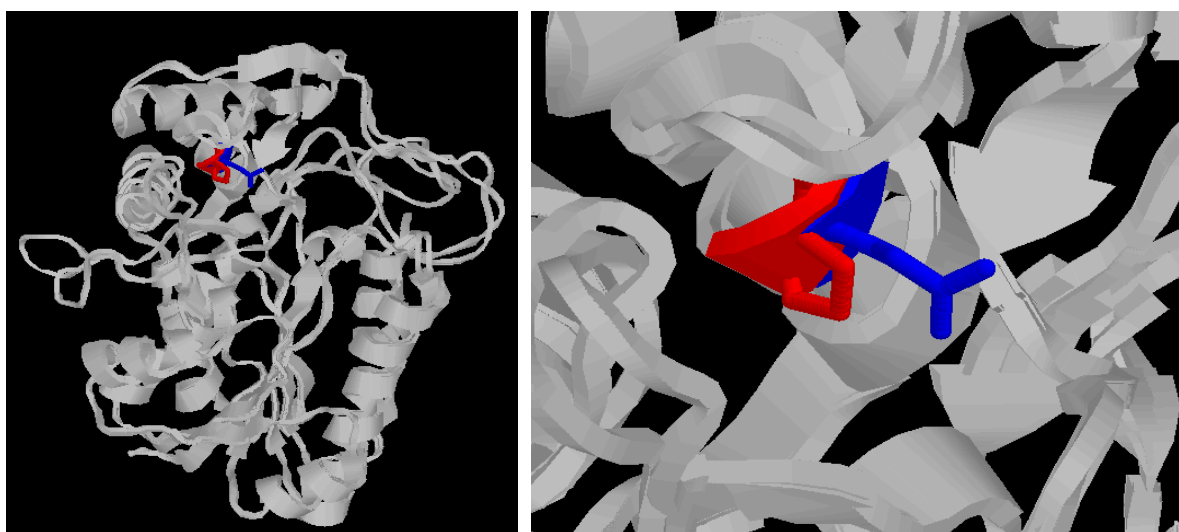
In order to obtain further information concerning structure-function relationship of the 3 $\beta$ -HSD2 mutant enzymes we attempted to further characterize the functional significance of P222Q amino acid replacement on the enzyme activity by molecular modeling the P222Q enzyme. Homology modeling of 3 $\beta$ -HSD2 has already been achieved by others [17]. Human 3 $\beta$ -HSD2 is a member of the short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily which has 30% overall sequence identity with *E. coli* UDP-galactose-4-epimerase, another SDR for which the X-ray crystal structure determination has been reported [10]. Based on this sequence identity, a three-dimensional ribbon model of human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase has been constructed (Figure 3).



**Figure 3.** Ribbon structure of both native 3 $\beta$ -HSD2 (red) and P222Q mutant enzyme (blue). The primary sequences were aligned as described on “Subjects and Methods”. This ribbon model is based on homology modeling with UDP-galactose-4-epimerase.



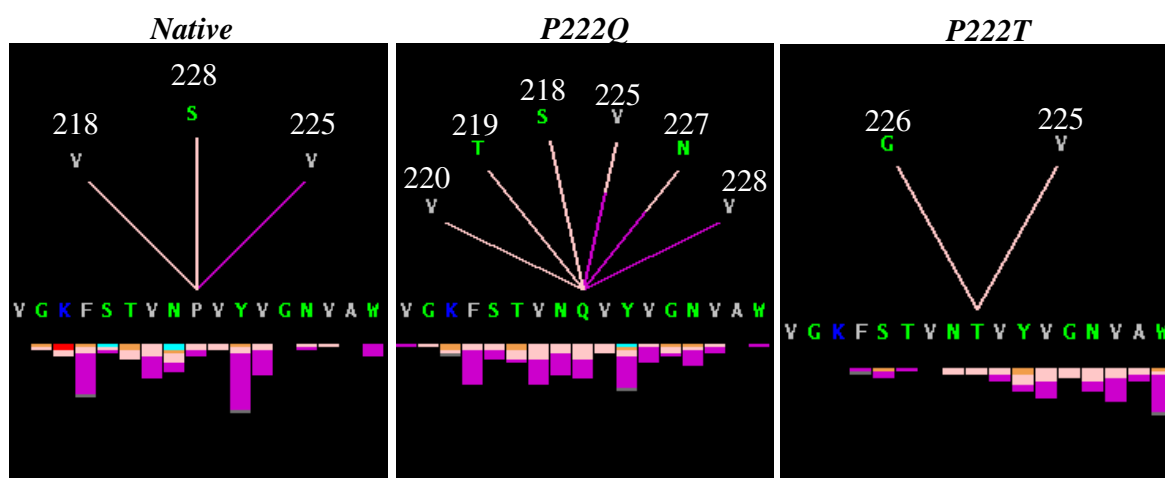
Next, the three-dimensional ribbon model of the native 3 $\beta$ -HSD2 and Gln<sup>222</sup> mutant enzyme allowed visualization in comparison of both amino acids proline (native enzyme) and glutamine (mutant enzyme) on residue position 222 (Figure 4).



**Figure 4.** Aligned ribbon structure of both native 3 $\beta$ -HSD2 and P222Q mutant enzyme showing the amino acid on residue position 222: proline on the native enzyme (red) and glutamine on the mutant enzyme (blue). Note the prominent side-chain group of the mutant glutamine as compared to the side-chain group of proline.

The consequence of amino acid replacements from Proline<sup>222</sup> to glutamine or threonine on the 3 $\beta$ -HSD2 activity can be inferred according to the biochemical properties of each amino acid. Proline has non-polar side-chain and is hydrophobic, tending to cluster with other hydrophobic residues on the inside of proteins. In addition, proline is a rigid amino acid due to the covalent binding of its side-chain with the main-chain nitrogen. As a

consequence of this unique cyclic side-chain, proline has a significant effect upon the geometry of the backbone chain and also disrupts any regular repeating structure on the three-dimensional conformation of the polypeptides. Indeed, proline can act as a structural disruptor for  $\alpha$ -helices and as a turning point in  $\beta$ -sheets. As observed on Figure 4, residue Pro<sup>222</sup> on the 3 $\beta$ -HSD2 enzyme is located on the edge between an  $\alpha$ -helix and a  $\beta$ -sheet. On the other hand, glutamine and also threonine have uncharged polar side chains and are relatively hydrophilic, clustering on the outside of proteins. The distinct biochemical properties of proline, glutamine and threonine dictate the putative interactions of these amino acids with other surrounding residues, as summarized on Figure 5 and Table 1.



**Figure 5.** STING report <sup>JAVA</sup>Protein dossier obtained from the Diamond STING program. The images show internal contacts of proline, glutamine and threonine on the respective native, P222Q and P222T enzymes. The native residue Pro<sup>222</sup> makes two hydrogen-bonds and one hydrophobic interaction with other residues. The mutated residue Gln<sup>222</sup> introduces five additional interactions when compared to the ones performed by the native Pro<sup>222</sup>, whereas the mutated residue Thr<sup>222</sup> makes only hydrogen-bonds. Note that on P222T enzyme the interaction with residue Val<sup>225</sup> is shifted from hydrophobic interaction, observed on the native enzyme, to hydrogen-bonds.

The native Pro<sup>222</sup> residue hydrogen-bonds with amino acids Val<sup>218</sup> and Ser<sup>228</sup> and makes a hydrophobic interaction with Val<sup>225</sup>. Besides interactions with the above amino acids, the mutant residue Gln<sup>222</sup> makes additional hydrophobic interactions with Asn<sup>227</sup> and Val<sup>228</sup> and additional hydrogen-bonds with Thr<sup>219</sup>, Val<sup>220</sup> and Asn<sup>227</sup>, whereas the mutant Thr<sup>222</sup> lacks hydrophobic interactions and shows hydrogen-bonds with Val<sup>225</sup> and Gly<sup>226</sup>.

**Table 1.** Residue interactions of native Pro<sup>222</sup> and the mutated residues Gln<sup>222</sup> and Thr<sup>222</sup>.

		<b>3β-HSD2</b>		
		Native (Pro <sup>222</sup> )	P222Q (Gln <sup>222</sup> )	P222T (Thr <sup>222</sup> )
<b>Residue interactions</b>	Hydrogen bonds	Ser <sup>218</sup> Val <sup>228</sup>	Ser <sup>218</sup> Val <sup>228</sup> Thr <sup>219</sup> Val <sup>220</sup> Asn <sup>227</sup>	Val <sup>225</sup> Gly <sup>226</sup>
	Hydrophobic interactions	Val <sup>225</sup>	Val <sup>225</sup> Asn <sup>227</sup> Val <sup>228</sup>	-

Note that the Gln<sup>222</sup> residue makes three additional hydrogen bonds and two additional hydrophobic interactions. The Thr<sup>222</sup> residue has no hydrophobic interactions and the interactions of Val<sup>225</sup> shifted from hydrophobic to hydrogen-bonds on the P222T enzyme. In red, residues interactions commonly found on the native and mutant enzymes.

The location of residue Pro<sup>222</sup> on both predicted membrane-spanning domains and adjacent to the substrate binding domains makes this residue a critical position for amino acid replacements. For instance, the five additional residues interactions introduced by the

mutated residue Glu<sup>222</sup> may result on a new network of residues that appears to prevent the appropriate access and/or binding of the substrate to its domain. Hence, the protein is stable but the lack of enzymatic activity may be due to the additional residue interactions that would disrupt the substrate binding domain.

Alternatively, on the Thr<sup>222</sup> mutant enzyme, the replacement of a hydrophobic (proline) to a hydrophilic (threonine) residue plus the lack of hydrophobic interactions on codon 222 may introduce conformational rearrangements on 3 $\beta$ -HSD2 that seems to compromise the folding pattern of the enzyme, which would explain the Thr<sup>222</sup> enzyme being a totally unstable protein.

Thus, the native residue Pro<sup>222</sup> appears to be essential for the hydrophobic surfaces on that particular position of the enzyme. In addition, this amino acid seems to perform specific residue interaction that would be critical for the 3 $\beta$ -HSD2 enzyme to achieve the appropriate conformation for its catalytic activity.

In summary, this study has provided further insight concerning structure-function relationship of 3 $\beta$ -HSD2 mutants. Molecular homology modeling of mutant 3 $\beta$ -HSD2 allowed us to investigate the potential role of the mutated residues. The findings emphasized the codon 222 as an important residue for the folding pattern and catalytic activity of the enzyme and allowed us to correlate experimental data previously reported.

## REFERENCES

1. Simard, J.; Durocher, F.; Mebarki, F.; Turgeon, C.; Sanchez, R.; Labrie, Y.; Couet, J.; Trudel, C.; Rheaume, E.; Morel, Y.; Luu-The, V. and Labrie, F. (1996) Molecular biology and genetics of the  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase gene family. *J. Endocrin.*, **150**: S189-S207.
2. Labrie, F.; Simard, J.; Luu-The, V.; Belanger, A. and Pelletier, G. (1992) Structure, function and tissue-specific gene expression of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **43**: 805-826.
3. McBride, M.W.; McVie, A.J.; Burrige, S.M.; Brintnell, B.; Craig, N.; Wallace, A.M.; Wilson, R.H.; Varley, J. and Sutcliffe, R.G. (1999) Cloning, expression, and physical mapping of the  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. *Genomics*, **61**: 277-284.
4. Lachance, Y.; Luu-The, V.; Verreault, H.; Dumont, M.; Rheaume, E.; Leblanc, G. and Labrie, F. (1991) Structure of the human type II  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase ( $3\beta$ -HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. *DNA and Cell Biol.*, **10**: 701-711.
5. Rheaume, E.; Lachance, Y.; Zhao, H.F.; Breton, N.; Dumont, M.; de Launoit, Y.; Trudel, C.; Luu-The, V.; Simard, J. and Labrie, F. (1991) Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase in human adrenals and gonads. *Mol. Endocrinol.*, **8**: 1147-1157.

6. Rheume, E.; Simard, J.; Morel, Y.; Mebarki, F.; Zachmann, M.; Forest, M.G.; New, M.I. and Labrie, F. (1992) Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nature Gen.*, **1**: 239-245.
7. Simard, J.; Rheume, E.; Sanchez, R.; Laflamme, N.; Launoit, Y.; Luu-The, V.; van Seters, A.P.; Gordon, R.D.; Bettendorf, M.; Heinrich, U.; Moshang, T.; New, M.I. and Labrie, F. (1993) Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol. Endocrinol.*, **7**: 716-728.
8. Pang, S. (2001) Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **1**: 81-99.
9. Simard J.; Moisan A.M. and Morel, Y. (2002) Congenital adrenal hyperplasia due to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase deficiency. *Semin Reprod Med.*, **3**: 255-276.
10. Thoden, J.B.; Frey, P.A. and Holden, H.M. (1996) Crystal structures of the oxidized and reduced forms of UDP-galactose 4-epimerase isolated from Escherichia coli. *Biochemistry*, **35**: 2557-2566.
11. Fiser, A. and Sali, A. (2003) Modeller: Generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzimol.*, **374**:461-491. (URL <http://salilab.org/modeller/modeller.html>).
12. Neshich, G.; Borro, L.C.; Higa, R.H.; Kuser, P.R.; Yamagishi, M.E.; Franco, E.H.; Krauchenco, J.N.; Fileto, R.; Ribeiro, A.A.; Bezerra, G.B.; Velludo, T.M.; Jimenez, T.S.; Furukawa, N.; Teshima, H.; Kitajima, K.; Bava, A.; Sarai, A.; Togawa, R.C. and Mancini, A.L. (2005) The Diamond STING server. *Nucleic Acids Res.*, **33** (web server issue): W29-35. (URL <http://sms.cbi.cnptia.embrapa.br>).

13. Mendonca, B.B.; Russel, A.J.; Vasconcelos-Leite, M.; Arnhold, I.J.; Bloise, W.; Wajchenberg, B.L.; Nicolau, W.; Sutcliffe, R.G. and Wallace, A.M. (1994) Mutation in 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. *J. Mol. Endocrinol.*, **12**: 119-122.
14. Moisan, A.M.; Ricketts, M.L.; Tardy, V.; Desrochers, M.; Mebarki, F.; Chaussain, J.L.; Cabrol, S.; Raux-Demay, M.C.; Forest, M.G.; Sippell, W.G.; Peter, M.; Morel, Y. and Simard, J. (1999) New insight into the molecular basis of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **12**: 4410-4425.
15. Pang, S.; Wang, W.; Rich, B.; David, R.; Chang, Y.T.; Carbutaru, G.; Myers, S.E.; Howie, A.F.; Smillie, K.J. and Mason, J.I. (2002) A novel nonstop mutation in the stop codon and a novel missense mutation in the type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) gene causing, respectively, nonclassic and classic 3beta-HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **6**: 2556-2563.
16. Thomas, J.L.; Nash, W.E.; Myers, R.P.; Crankshaw, M.W. and Strickler, R.C. (1993) Affinity radiolabeling identifies peptides and amino acids associated with substrate binding in human placental 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **268**: 18507-18512.
17. Thomas, J.L.; Duax, W.L.; Addlagatta, A.; Kacsoh, B.; Brandt, S.E. and Norris, W.B. (2004) Structure/function aspects of human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Cell Endocrinol.*, **215**: 73-82.

### Capítulo III.3 – Artigo a ser submetido para publicação (versão prévia em português)

**Ferraz, L.F.C.; Reichardt, J.K.V. e Hackel, C.** Identificação e caracterização de mutações somáticas no gene *HSD3B2* em pacientes com câncer de próstata.

A enzima 3 $\beta$ -HSD2 participa das vias de degradação de DHT intraprostático, o que torna esta enzima uma potencial candidata na etiologia do câncer de próstata. Uma atividade alterada da enzima 3 $\beta$ -HSD2 pode conduzir a um aumento nos níveis de andrógenos que levaria ao câncer de próstata. Sendo assim, é de fundamental importância o estudo de mutações e/ou polimorfismos no gene *HSD3B2* que possam interferir na atividade final da enzima 3 $\beta$ -HSD2, quer sejam mutações *missense*, levando a substituições de aminoácidos que venham a alterar as propriedades cinéticas da enzima, ou substituições nas regiões promotora e 5'-UTR, que alterem o padrão de expressão do gene *HSD3B2*.

Inicialmente identificamos um número expressivo de alterações somáticas no gene *HSD3B2* em pacientes com câncer de próstata. Dentre as alterações pontuais detectadas foram observadas 1 deleção e 37 substituições nucleotídicas que incluíam mutações *missense*, silenciosas e polimorfismos localizados nas regiões intrônica, promotora e regiões não traduzidas (extremidades 3' e 5'). Dentre as alterações pontuais detectadas despertaram particular interesse as mutações *missense* e as substituições nucleotídicas localizadas em prováveis domínios de ligação nas regiões promotora e 5'-URT.



Neste sentido, o presente artigo descreve a caracterização de algumas dessas alterações pontuais somáticas detectadas. São apresentados e discutidos:

- ✓ Caracterização molecular, por meio da técnica de *Gel Shift*, de três substituições nucleotídicas detectadas na região promotora (substituição *-g155a*) e região 5'-UTR (substituições *c234t* e *t243c*). Estas substituições estão localizadas em prováveis domínios de ligação e, portanto, investigou-se a possibilidade de fatores estarem se ligando àqueles domínios e os efeitos que as substituições poderiam acarretar nesta ligação;
  
- ✓ Caracterização bioquímica das mutações *missense* que levam às substituições Leu6Pro, Arg17Lys, Val19Ile, Leu34Ser, Phe88Ser, Asn148Ser, Thr152Ala e Glu192Lys. Foram investigados os efeitos que estas trocas de aminoácidos acarretam nas propriedades cinéticas *in vitro* da enzima 3 $\beta$ -HSD2, contribuindo para a elucidação do possível papel desta enzima no aumento dos níveis de andrógenos observado no câncer de próstata.

As substituições *c234t* e *t243c* detectadas na região 5'-UTR estão localizadas numa repetição direta composta de 9 nucleotídeos. Análises em *Gel Shift* mostraram a formação de um complexo DNA-proteína, indicando que esta repetição é um provável sítio de ligação de fatores ainda não identificados o que, portanto, requer futuras caracterizações. A presença das substituições *c234t* e *t243c* não impediu a formação do complexo DNA-proteína, ressaltando que aquelas duas posições nucleotídicas não são essenciais para a

formação do complexo observado. Apesar disso, é necessário que sejam investigados os efeitos que tais substituições podem ocasionar na expressão do gene *HSD3B2*, por intermédio da clonagem das regiões promotora e 5'-UTR em um vetor contendo um gene repórter e análise dos possíveis efeitos das substituições no padrão de expressão deste gene.

A substituição *-g155a* detectada na região promotora está localizada entre os nucleotídeos que intercalam o domínio de ligação do fator de transcrição STAT-6. O resultado obtido no *Gel Shift* mostra que esta substituição não impediu a formação do complexo STAT-6:DNA, possivelmente por que a substituição *-g155a* está localizada entre os nucleotídeos intercalantes e não no domínio de ligação propriamente dito.

Com relação à caracterização bioquímica da enzima 3 $\beta$ -HSD2, o artigo relata uma análise prévia das constantes cinéticas da enzima 3 $\beta$ -HSD2 nativa. Esta análise revelou que a enzima nativa apresenta diferenças tanto na eficiência enzimática quanto no pH ótimo de atividade, dependendo da atividade de *redutase* (pH 6.5) ou de *desidrogenase/isomerase* (pH 8.5). Estas diferenças podem ser um reflexo do papel fisiológico distinto das 3 $\beta$ -HSD2 nas vias de síntese e de degradação de andrógenos.

Das oito enzimas mutantes analisadas, apenas a enzima portadora da substituição Thr152Ala apresentou atividade enzimática detectável. Esta enzima mutante apresentou atividade de *desidrogenase/isomerase* comparável à enzima nativa. E com relação à atividade de *redutase*, a enzima mutante Thr152Ala apresentou um nítido ganho de função, por apresentar um aumento de quase 2x na atividade de degradação da DHT quando comparada à enzima nativa.

# IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS NO GENE *HSD3B2* EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA

Lúcio Fábio Caldas Ferraz<sup>1,3</sup>, Juergen K. V. Reichardt<sup>1,2,5</sup>, Christine Hackel<sup>3,4</sup>.

Departments of <sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Biology and <sup>2</sup>Preventive Medicine, Institute for Genetic Medicine, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA;

<sup>3</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil;

<sup>4</sup>Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

**Key words:** metabolismo de andrógenos, câncer de próstata, gene *HSD3B2*, mutações *missense* somáticas,

Correspondência: Lúcio Fábio Caldas Ferraz

CBMEG/UNICAMP – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo. - Zip code:

13083-970 - Campinas – São Paulo – Brazil; E-mail: lferraz@gmail.com

<sup>5</sup>Current address: Plunkett Chair of Molecular Biology (Medicine), University of Sydney, Medical Foundation Building (K25), 92 - 94 Parramatta Road, Camperdown, Sydney, NSW 2042, Australia

## RESUMO

Os andrógenos testosterona (T) e di-hidro-testosterona (DHT) possuem uma função significativa no desenvolvimento do câncer de próstata. Assim sendo, enzimas que regulam o metabolismo de andrógenos desempenham papel crucial na predisposição e progressão do câncer. A enzima  $3\beta$ -HSD2, codificada pelo gene *HSD3B2*, regula a concentração de andrógenos na próstata através de duas vias metabólicas distintas: participando da via de síntese de testosterona e catalisando as vias de degradação de DHT. Em nosso trabalho anterior investigamos o gene *HSD3B2* em pacientes com câncer de próstata e identificamos 38 substituições nucleotídicas somáticas que incluíam deleção, mutações *missense* e silenciosas e polimorfismos localizados nas regiões intrônica, promotora e regiões não traduzidas (extremidades 3' e 5'). No presente trabalho descrevemos a caracterização bioquímica de enzimas  $3\beta$ -HSD2 mutantes e a caracterização molecular de substituições nucleotídicas localizadas em prováveis domínios de ligação na região promotora e 5'-UTR.

## INTRODUÇÃO

Os andrógenos testosterona (T) e di-hidro-testosterona (DHT) são necessários para o crescimento e manutenção normais da glândula prostática<sup>1,2</sup>. A concentração de andrógenos na próstata é regulada pelas enzimas esteroidogênicas. Estas enzimas atuam tanto na síntese como na degradação dos andrógenos. O excesso de andrógenos na próstata, seja ele causado por aumento da síntese de T ou DHT ou por diminuição da inativação destes hormônios, pode induzir um crescimento celular descontrolado resultando no câncer de próstata<sup>3,4,5,6</sup>.

A enzima *3β-hidroxi-esteróides desidrogenase tipo 2* (3β-HSD2, do inglês *3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase type 2*) é uma das muitas enzimas esteroidogênicas regulatórias da próstata. Ela controla não apenas a produção de Testosterona como também a degradação de DHT em 2 vias metabólicas distintas. Com a atividade de *desidrogenase/Δ<sup>5</sup>-Δ<sup>4</sup> isomerase* promove a biossíntese de T numa reação que tem o NAD<sup>+</sup> como cofator. Dentre outros substratos, converte o Androstenediol em Testosterona e a DHEA (Dihidroepiandrosterona) em Androstenediona, que é um precursor da Testosterona. Na outra via metabólica, a enzima 3β-HSD2 inicia o processo irreversível de inativação da DHT com a atividade de *redutase*, uma reação NADH dependente. Estas duas vias metabólicas da 3β-HSD2 são fundamentais na regulação dos níveis de andrógenos na próstata, desempenhando papel crucial na diferenciação e desenvolvimento deste tecido.

A enzima 3β-HSD2, uma proteína de 371 aminoácidos e 42 KDa, é codificada pelo gene *HSD3B2* que está localizado no cromossomo 1p13.1<sup>7,8</sup>. Este gene é composto de 4 exons sendo que o intron 3 do gene *HSD3B2* possui uma complexa repetição dinucleotídica [(TG)<sub>n</sub>(TA)<sub>n</sub>(CA)<sub>n</sub>] altamente polimórfica cujas variações alélicas foram associadas a grupos étnicos- raciais com predisposição distinta ao câncer de próstata<sup>9</sup>.

Em nosso trabalho anterior identificamos um número expressivo de alterações somáticas no gene *HSD3B2* em pacientes com câncer de próstata<sup>10</sup>. As alterações detectadas incluíam tanto aquelas em níveis estruturais, sob a forma de instabilidade da repetição dinucleotídica no intron 3 do gene, quanto de alterações pontuais. Dentre as

alterações pontuais foram detectados 1 deleção e 37 substituições nucleotídicas que incluíam mutações *missense*, silenciosas e polimorfismos localizados nas regiões intrônica, promotora e regiões não traduzidas (nas extremidades 3' e 5'). O acúmulo de alterações somáticas no gene *HSD3B2* pode sugerir um papel deste gene na predisposição e/ou progressão do câncer.

No presente trabalho, investigamos os efeitos que as mutações *missense* detectadas acarretam nas propriedades bioquímicas *in vitro* da enzima 3 $\beta$ -HSD2. Para tal, foi realizada a caracterização bioquímica de oito enzimas mutantes portadoras das mutações *missense*: Leu6Pro, Arg17Lys, Val19Ile, Leu34Ser, Phe88Ser, Glu192Lys, Asn148Ser e Thr152Ala. A caracterização bioquímica destas enzimas mutantes pode contribuir para a elucidação de uma provável importância da enzima 3 $\beta$ -HSD2 no aumento dos níveis de andrógenos observado no câncer de próstata.

Em seguida procedemos à caracterização de três substituições nucleotídicas detectadas na região promotora e região 5'-UTR (região não traduzida na extremidade 5'). Estas substituições são de particular interesse por estarem localizadas em prováveis sítios de ligação: as substituições *c234t* e *t243c* estão localizadas numa repetição direta localizada na região 5'-UTR, e a substituição *-g155a* está localizada no sítio de ligação do fator de transcrição STAT-6 na região promotora. Por esta razão, a metodologia de *Gel Shift* foi empregada com o intuito de se obter maiores informações acerca dos fatores que se ligam àqueles sítios.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Pacientes e identificação das alterações somáticas***

Os pacientes analisados e as alterações somáticas identificadas foram previamente descritas<sup>10</sup>. De maneira breve, 26 pacientes caucasóides com câncer de próstata foram submetidos à prostatectomia e o tecido extraído foi fixado e corado em lâminas histológicas. A partir destas lâminas células normais e cancerosas foram micro-dissecadas com o auxílio de um microscópio e um bisturi para a extração, respectivamente, de DNA normal e

tumoral, de acordo com metodologia previamente descrita<sup>11</sup>. As alterações somáticas foram identificadas e caracterizadas por intermédio de três técnicas distintas: sequenciamento, SSCP (do inglês single strand conformational polymorphism) e SNaPshot. Foi investigada também a instabilidade da repetição dinucleotídica altamente polimórfica localizada no intron 3 do gene *HSD3B2*<sup>10</sup>.

### *Análise de Gel Shift das substituições nucleotídicas*

Para os ensaios de *Gel Shift* foram desenhados oligonucleotídeos contendo a repetição direta e o sítio de ligação do fator STAT-6. A Tabela 1 relaciona os oligonucleotídeos, fitas *sense* e *anti-sense* tanto normais quanto portadores das substituições detectadas, utilizados nos experimentos de *Gel Shift*.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos, normais e portadores das substituições detectadas, utilizados nos experimentos de *Gel Shift*. Estão representadas apenas as fitas *sense*, porém foram desenhadas também as fitas *anti-sense* (as mutações estão identificadas em itálico e sublinhadas).

Região	Mutações	Oligonucleotídeos	Seqüência (5'-3')
<b>Promotora</b>	<i>-g155a</i>	Normal	TCTTCCTGTTCTGGGAAGAATTAGA
		Mutante (g155a)	TCTTCCTGTTCTCT <u>AG</u> GAAGAATTAGA
<b>5'-UTR</b>	<i>c234t</i> e <i>t243c</i>	Normal	TCTTCTGTTTCCTGGCAAGTGTTCCTGCTACT
		Mutante 1 (c234t)	TCTTCTGTTTT <u>CT</u> GGCAAGTGTTCCTGCTACT
		Mutante 2 (t243c)	TCTTCTGTTTCCTGGCAAG <u>CG</u> TTCCTGCTACT
		Duplo mutante	TCTTCTGTTTT <u>CT</u> GGCAAG <u>CG</u> TTCCTGCTACT

Inicialmente promoveu-se o anelamento de fitas *sense* e *anti-sense* complementares para a obtenção de sondas dupla fita. Em seguida as sondas dupla fita foram marcadas com  $\gamma$ [<sup>32</sup>P] ATP por intermédio da enzima T4 Polinucleotídeo Kinase (GIBCO BRL). Sondas marcadas (20000 c.p.m.) foram então incubadas com 3µg de proteínas nucleares por 30 minutos e em temperatura ambiente na presença de 10µl de tampão de ligação (150 mM de KCl, 15% de glicerol, 40 mM de HEPES pH 7,9, 0,2% de NP-40 e 4 mM de DTT). Em

seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante (pré-corrido a 100 Volts por 1 hora) e submetidas à corrida de eletroforese por 2 horas a 200 Volts em tampão Tris-borate-EDTA. Após a corrida o gel foi seco e exposto em filme de raio-X até a revelação no dia seguinte. Nos ensaios competitivos, a sonda marcada e o extrato protéico foram incubados com concentrações crescentes de sonda não marcada.

Proteínas nucleares foram extraídas de células PC-3 (linhagem celular obtida de câncer de próstata), cultivadas em meio RPMI (GIBCO BRL) contendo 5% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, e células 293 (células embrionárias primárias de rim humano), cultivadas em meio Dulbecco's MEM (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (GIBCO BRL). Ambas as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O isolamento do núcleo celular e a extração das proteínas foram realizados de acordo com metodologia previamente descrita<sup>12</sup>.

#### ***Ensaio enzimático das enzimas 3β-HSD2 nativa e mutantes***

O cDNA contendo toda a região codificante do gene *HSD3B2* (gentilmente cedido pelo Dr. F Labrie, CHUL Research Center and Laval University, Quebec, Canada) foi previamente clonado no vetor de expressão *pCI-neo* (PROMEGA), obtendo-se assim o vetor *pHSD3B2*. As mutações *missense* Leu6Pro, Arg17Lys, Val19Ile, Leu34Ser, Phe88Ser, Glu192Lys, Asn148Ser e Thr152Ala foram construídas individualmente no vetor *pHSD3B2* por mutagênese sítio-dirigida com o auxílio do kit “*QuikChange Site-directed Mutagenesis kit*” (conforme instruções do fabricante, STRATAGENE) e com os *primers* apropriados. Em seguida os *constructs* mutantes foram submetidos ao sequenciamento automático para confirmação da presença das respectivas mutações *missense*.

A atividade das enzimas 3β-HSD2 nativa e mutantes foi caracterizada bioquimicamente por intermédio da expressão dos vetores *pHSD3B2* e *constructs* mutantes em células 293 (células embrionárias de rim humano). Estas células não apresentam atividade basal de 3β-HSD2. Os vetores de expressão foram transfectados individualmente em células 293 cultivadas em meio de cultura Dulbecco's MEM (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (GIBCO BRL) e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.



Estas células foram co-transfectadas com: 5 µg de *pHSD3B2* ou de *construct* mutante e 1 µg do vetor de expressão do gene β-galactosidase com o uso do kit LipofectAMINE PLUS™ (GIBCO BRL), conforme instruções do protocolo. De maneira sucinta, as transfecções foram realizadas conforme procedimento a seguir:

1. Um dia antes da transfecção ser iniciada células 293 foram semeadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro de maneira que, no dia seguinte, tenham atingido uma densidade de até 80% de confluência (aproximadamente de 10 a 15 x 10<sup>6</sup> células/ml). Durante o experimento de transfecção o meio DMEM utilizado não continha antibióticos, apenas soro fetal bovino.
2. No dia seguinte, as placas de Petri contendo células a 80% de confluência tiveram o meio de cultura substituído por meio DMEM fresco. As células foram então transfectadas com os vetores de expressão. Segundo instruções do protocolo, os vetores foram previamente complexados com os reagentes *Plus* (20 µl) e *Lipofectamine* (30µl) e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem adicionados à placa de Petri. Após 24hs, o meio DMEM (contendo os vetores complexados) foi substituído por meio DMEM fresco.
3. Dois dias após a transfecção, as células foram coletadas e lisadas por sonificação para a extração de proteína total. A quantidade de proteína total obtida foi determinada através do método de Bradford (BIORAD) usando albumina de soro bovino como padrão. Devido às diferenças na eficiência de transfecção, a atividade da enzima β-galactosidase foi determinada para normalização dos diferentes extratos protéicos obtidos.

Foram primeiramente definidos os parâmetros cinéticos da enzima 3β-HSD2 nativa. Avaliamos as duas vias metabólicas da enzima 3β-HSD2 com os seguintes substratos esteróides e seus respectivos cofatores: substrato DHEA com o cofator NAD<sup>+</sup>, para a

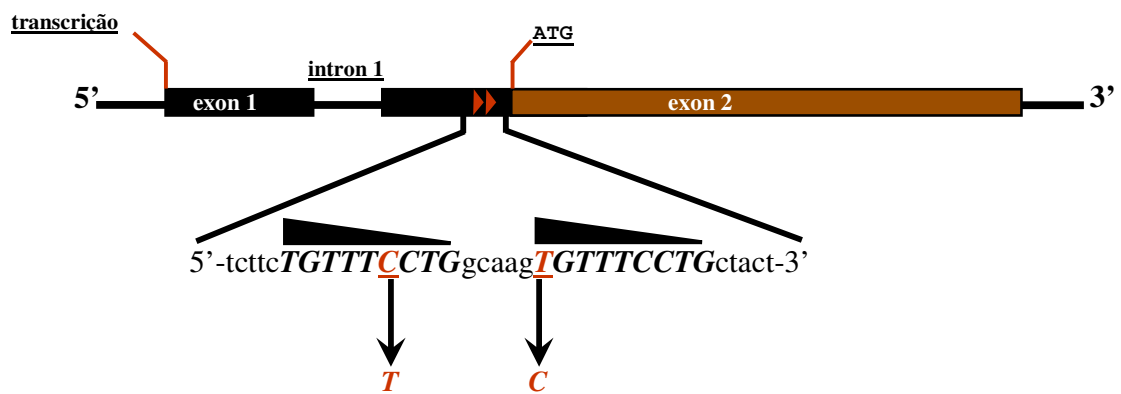
atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase*, e o substrato DHT com o cofator NADH, para a atividade de *reductase*. O pH ótimo de atividade de cada via metabólica foi determinado a partir de reações enzimáticas cujo tampão apresentava pHs de 5 a 10,5. Em seguida, as constantes cinéticas  $V_{max}$  e  $K_m$  foram determinadas em reações incubadas a 37°C contendo 3 ou 15 µg de proteína total, 50 mM de tampão Tris-citrato, 1 mM de cofator e 0,001 µCi (20 pmoles) de substrato marcado com [<sup>14</sup>C]. A quantidade de proteína total e o tempo de incubação foram previamente determinados de acordo com a via metabólica, como se segue: para a via enzimática de conversão de DHEA, foram utilizadas 15µg de proteína total e a reação foi incubada por 20 minutos. Para a via de conversão de DHT, foram utilizadas 3µg de proteína total e a reação foi incubada por 10 minutos.

As constantes cinéticas  $V_{max}$  e  $K_m$  da enzima com respeito ao substrato DHT foram determinados a partir de reações incubadas a 37°C por 10 minutos e que continham 3µg de enzima, 50mM de tampão Tris-citrato em pH 6,5, 1mM do cofator NADH, 0,2µM (0,001µCi) do substrato marcado com [<sup>14</sup>C] e concentrações crescentes de DHT não marcado (0,2 a 9,2µM). Para o cálculo da  $V_{max}$  e  $K_m$  do cofator NADH, as reações foram incubadas a 37°C por 10 minutos e continham 3µg de enzima, 50mM de tampão Tris-citrato em pH 6,5, 0,2µM de DHT marcado, 6µM de DHT não marcado e concentrações crescentes do cofator NADH (3,9 a 500µM). Com relação à atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase*, foram determinadas apenas as constantes cinéticas do substrato DHEA. Para tal, reações foram incubadas a 37°C por 20 minutos e continham 15µg de enzima, 50mM de tampão Tris-citrato em pH 8,5, 1mM do cofator NAD<sup>+</sup>, 0,2µM (0,001µCi) do substrato DHEA marcado com [<sup>14</sup>C] e concentrações crescentes de substrato não marcado (0,18 a 9,2µM). Os ensaios enzimáticos foram interrompidos com a adição de diclorometano e os esteróides separados por cromatografia de camada delgada, tendo toluene e acetona (proporção 4:1) como a fase móvel. Os resultados foram visualizados e quantificados com o auxílio do equipamento *Storm Phosphorimager* (Molecular Dynamics) e os dados analisados pelo programa *Cricket Graph 1.3* (Cricket Software). As enzimas 3β-HSD2 mutantes foram caracterizadas bioquimicamente conforme o procedimento descrito acima.

## RESULTADOS

### *Caracterização molecular das substituições nucleotídicas*

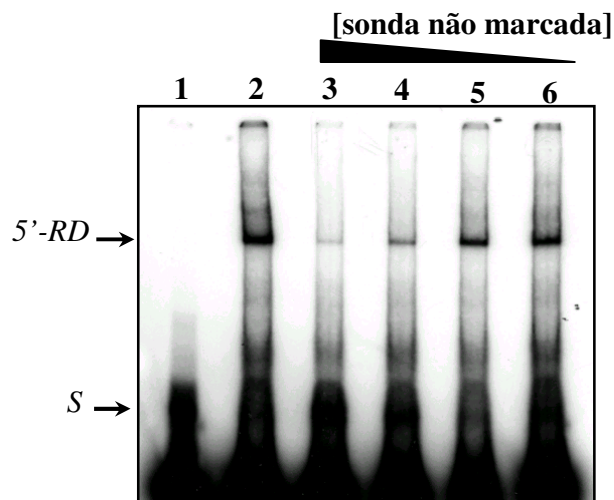
As substituições *c234t* e *t243c* estão localizadas na região não traduzida do exon 2 e encontram-se numa repetição direta composta por 9 nucleotídeos (Figura 1).



**Figura 1:** Sequência parcial da região 5'-UTR mostrando a repetição direta composta por nove nucleotídeos. Em itálico, os nucleotídeos da sequência normal e as respectivas transições detectadas (setas). Esta repetição está localizada a 36 nucleotídeos *upstream* do códon inicial de tradução, 54 nucleotídeos *downstream* do sítio acceptor de splicing do exon 2 e a 234 nucleotídeos *downstream* do início de transcrição do gene.

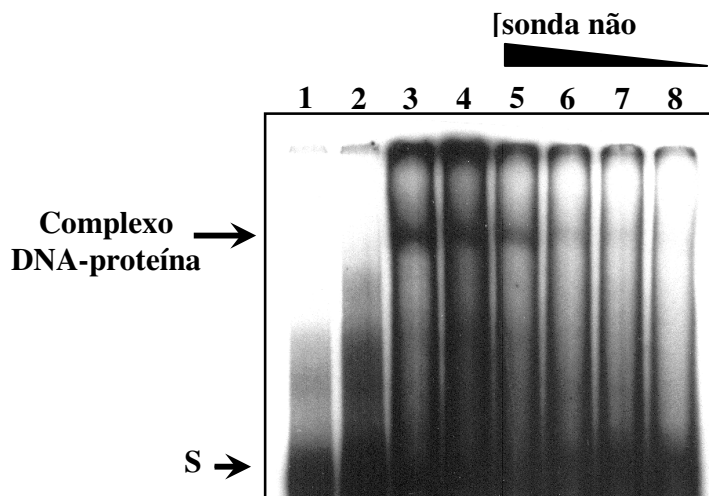
Os resultados no *Gel Shift* indicam a formação de um complexo DNA-proteína quando a repetição direta normal é incubada com proteínas nucleares de células PC-3 (Figura 2). A especificidade desta ligação pôde ser aferida em ensaios competitivos onde concentrações decrescentes de sonda não marcada foram incubadas com o extrato protéico. A formação deste complexo também é observada quando a repetição é incubada com proteínas nucleares isolados de células 293 (dados não mostrados). Com relação às substituições *c234t* e *t243c*, estas não abolem a formação deste complexo. Isto é, o complexo DNA-proteína é formado mesmo quando a repetição direta contém as substituições individualmente (dados não mostrados) ou em dose dupla (Figura 3).

**Figura 2:** Análise em *Gel Shift* da repetição direta da região 5'-UTR. Oligonucleotídeo contendo este domínio foi marcado com  $\gamma[^{32}\text{P}]$  ATP e usado como sonda. 125ng desta sonda marcada foi incubada com 3 $\mu\text{g}$  de proteínas nucleares extraídas de células PC-3 (linhagem celular do câncer de próstata). O complexo DNA-proteína formado está indicado em **5'-RD**.



Nos ensaios competitivos, o extrato protéico foi incubado com a sonda marcada e com quantidades decrescentes de sonda não marcada. **S**, banda indicando a sonda sozinha não associada às proteínas. **1**, sonda somente; **2**, extrato protéico incubado com sonda marcada; demais *lanes*, ensaio competitivo no qual a reação foi incubada na presença de concentrações decrescentes de sonda não marcada.

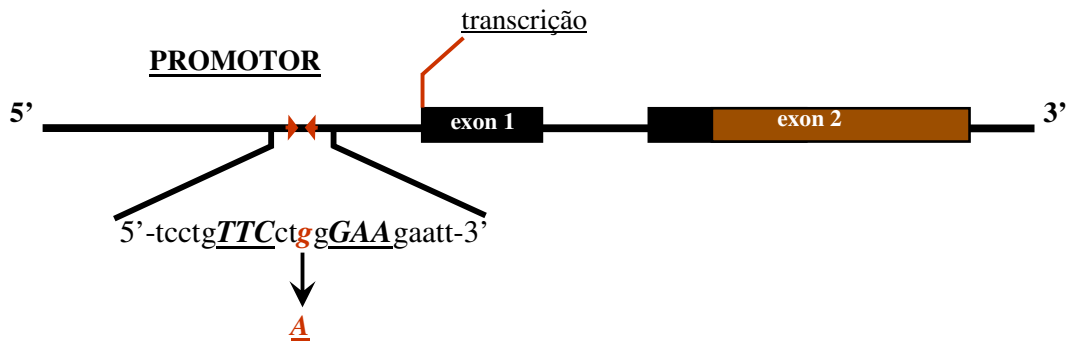
**Figura 3:** Análise em *Gel Shift* da repetição direta da região 5'-UTR contendo ambas as mutações. Foram testadas também sondas contendo as mutações *c234t* e *t243c* individualmente (dados não mostrados). O complexo DNA-proteína formado está indicado pela seta. **S**, banda indicando a sonda sozinha não



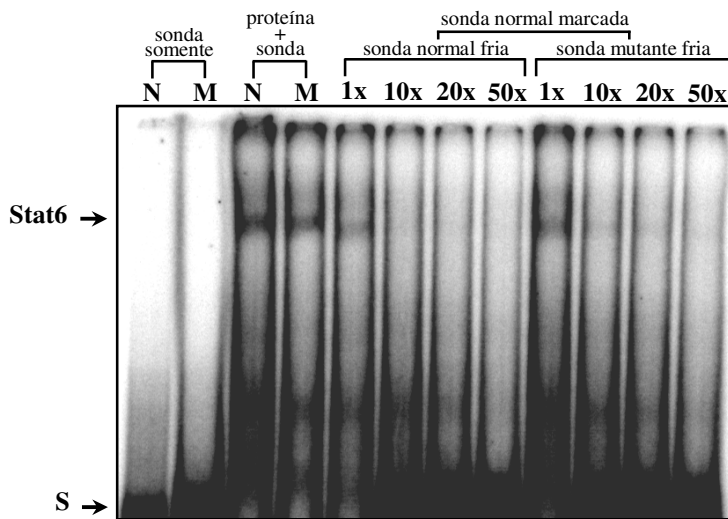
associada às proteínas. **1**, sonda normal somente e **2**, sonda mutante somente. **3 e 4**, extrato protéico incubado com sondas normal e mutante marcadas, respectivamente. **5 a 8**, ensaio competitivo no qual a reação foi incubada na presença de concentrações decrescentes de sonda mutante não marcada.

A substituição *-g155a* está localizada na região promotora, mais precisamente entre os nucleotídeos que intercalam o domínio de ligação do fator de transcrição STAT-6 (Figura 4). O método de *Gel Shift* foi empregado para verificarmos se a substituição *-g155a*

impede a ligação do STAT-6 ao seu domínio de ligação. O resultado obtido indica que a presença da substituição *-g155a* não impediu a formação do complexo proteína-DNA (Figura 5).



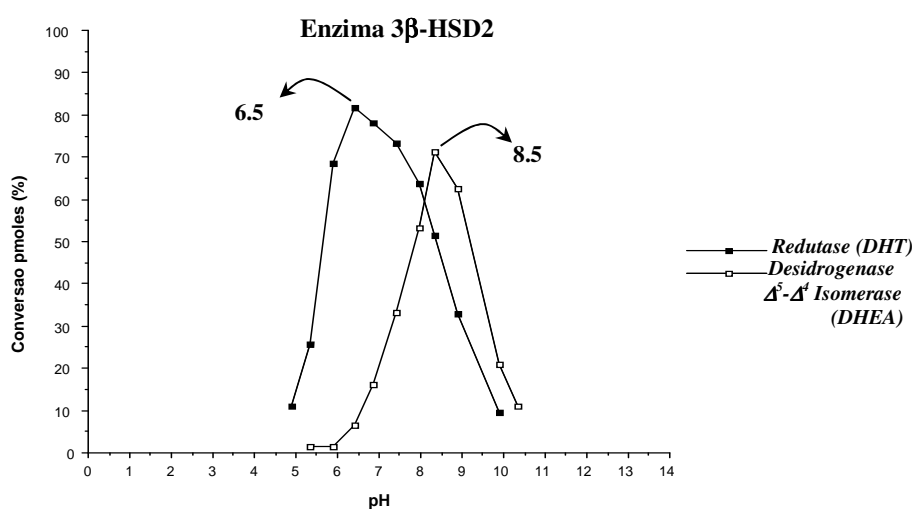
**Figura 4:** Esquema parcial da região promotora do gene *HSD3B2* mostrando o sítio de ligação do fator de transcrição STAT-6 (seqüência em itálico). A substituição *-g155a* está localizada nos nucleotídeos que intercalam o domínio de ligação. Em vermelho, a transição G>A detectada (seta). Esta transição está localizada a 155 nucleotídeos *upstream* do início de transcrição do gene.



**Figura 5:** Análise em *Gel Shift* da substituição *-g155a* localizada no domínio de ligação do STAT-6. Oligonucleotídeo contendo este domínio foi marcado com  $\gamma^{32}\text{P}$ ATP e usado como sonda. 125ng desta sonda foi incubada com 3 $\mu\text{g}$  de proteínas nucleares extraídas de células PC-3. O complexo STAT-6:DNA é formado independentemente da sonda utilizada, seja ela normal (N) ou portadora da mutação (M). Nos ensaios competitivos, o extrato protéico foi incubado com a sonda normal marcada e com quantidades crescentes (1 a 50 vezes) de sondas normal e mutante não marcadas (sondas frias). De acordo com os resultados obtidos, as sondas normal e mutante igualmente competem com a sonda marcada na formação do complexo STAT-6:DNA. S, banda indicando a sonda sozinha não associada às proteínas. Stat6, o complexo STAT-6:DNA formado.

### Caracterização bioquímica das enzimas 3 $\beta$ -HSD2 nativa e mutantes

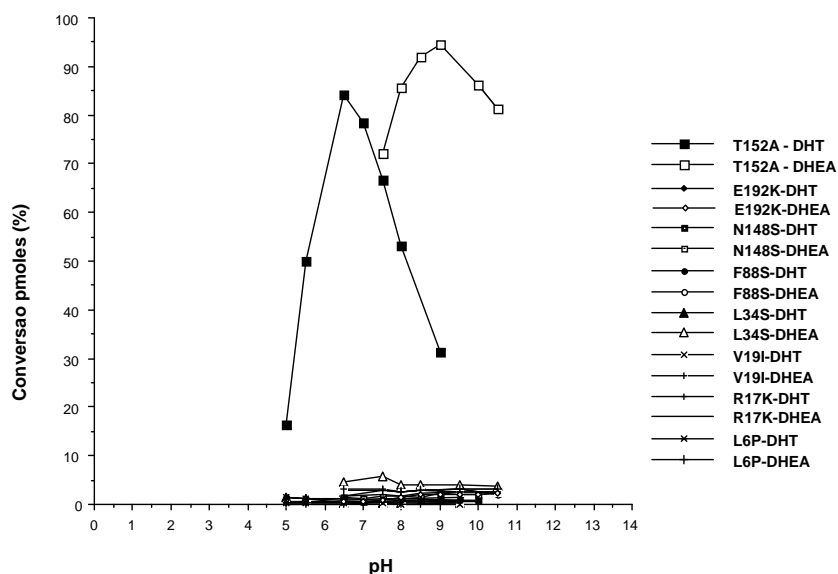
Primeiramente realizou-se a caracterização bioquímica da enzima 3 $\beta$ -HSD2 nativa. Os resultados preliminares ressaltam que a enzima 3 $\beta$ -HSD2 apresenta pH ótimo distinto de acordo com a via metabólica (Figura 6). Na via de degradação do DHT (atividade de *redutase*) o pH ótimo da reação é 6.5. Na via de conversão do DHEA (atividade de *Desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  Isomerase*) o pH ótimo da reação é de 8.5.



**Figura 6:** pH ótimo de atividade da enzima 3 $\beta$ -HSD2 para cada uma de suas duas vias metabólicas, expresso em porcentagem de substrato convertido. Cada reação foi incubada a 37°C e continha a enzima, o substrato marcado com [ $^{14}$ C], cofator correspondente e tampão Tris-citrato em pH que variou de 5 a 10,5. A reação de degradação do DHT foi incubada por 15 minutos e continha 1 $\mu$ g de enzima e 1mM do cofator NADH. A reação de conversão do DHEA foi incubada por 30 minutos e continha 5 $\mu$ g de enzima e 1mM do NAD $^+$  como cofator. A reação de degradação do DHT (atividade de *redutase*) apresenta pH ótimo de 6,5 ao passo que a reação de conversão do DHEA (atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase*) apresenta pH ótimo de 8,5.

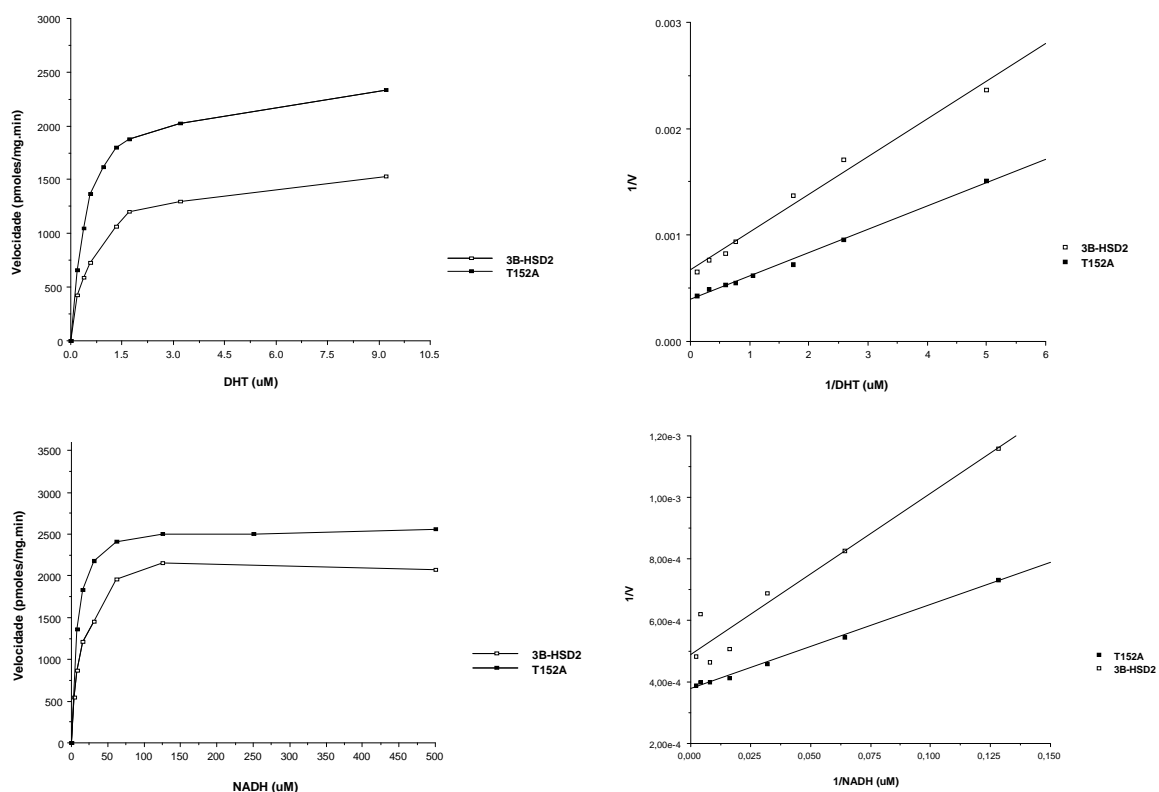
Em seguida foi determinado o pH ótimo de atividade das enzimas mutantes portadoras das mutações *missense*: Leu6Pro, Arg17Lys, Val19Ile, Leu34Ser, Phe88Ser, Glu192Lys, Asn148Ser e Thr152Ala. Os resultados revelam que a enzima portadora da mutação Thr152Ala é a única que apresenta atividade enzimática para ambas as vias

metabólicas. As demais enzimas mutantes tiveram suas atividades drasticamente reduzidas para menos de 5% de substrato convertido, conforme demonstrado na Figura 7.



**Figura 7:** Determinação do pH ótimo de atividade das enzimas mutantes para ambas as vias metabólicas: degradação do DHT (atividade de *redutase*) e conversão do DHEA (atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase*). As reações foram realizadas conforme descrito na Figura 7. Apenas a enzima portadora da mutação Thr152Ala apresenta atividade enzimática. O pH ótimo detectado para esta enzima mutante corresponde àquele observado para a enzima normal: 6,5 para a atividade de *redutase* e 8,5 para a atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase*. As demais mutações acarretam uma redução drástica na atividade da enzima.

Procedemos então à caracterização bioquímica apenas da mutação Thr152Ala uma vez que esta foi a única que rendeu atividade enzimática detectável. As constantes cinéticas  $V_{max}$  (velocidade máxima) e  $K_m$  foram calculadas a partir das equações de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burke. Com relação à atividade de *redutase* foram determinadas as constantes cinéticas para o substrato DHT e para o cofator NADH das enzimas nativa e mutante (resultados representados na Figura 8). A Tabela 2 resume os parâmetros obtidos quanto à atividade de *redutase* das enzimas nativa e mutante.



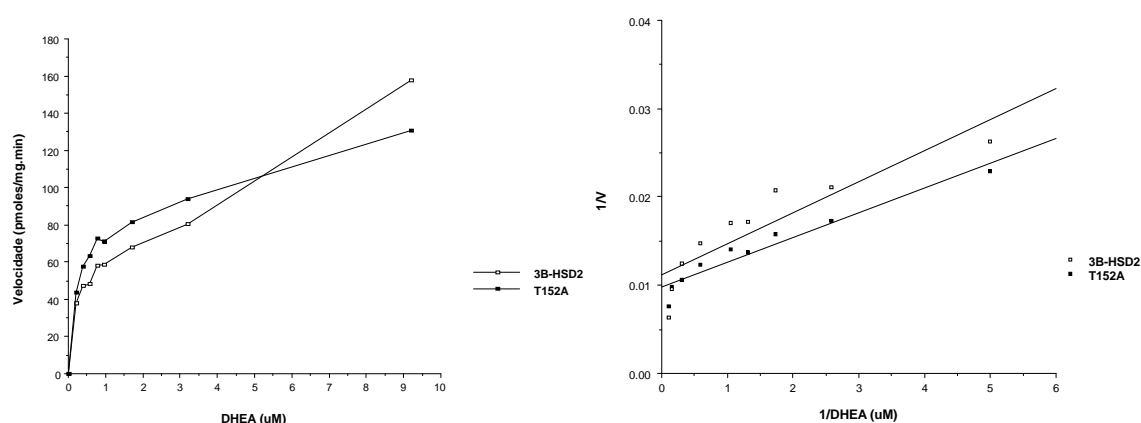
**Figura 8:** Comparação das propriedades cinéticas da reação de degradação do DHT pelas enzimas 3β-HSD2 nativa e mutante (mutação Thr152Ala). As constantes cinéticas para o substrato DHT e para o cofator NADH foram determinadas a partir da equação de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burke (duplos recíprocos) correspondente. Em **A** e **C**, os gráficos de  $V_{max}$  e  $K_m$  onde estão delineados a velocidade da reação (em pmoles/min/mg de proteína total) em função da concentração de DHT (**A**) ou de NADH (**C**) em micromolares. Em **B** e **D**, os gráficos dos duplos recíprocos, a partir dos quais foram calculadas as constantes  $V_{max}$  e  $K_m$  para o DHT (**B**) e o NADH (**D**). Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicatas.

**Tabela 2.** Parâmetros cinéticos da atividade de *redutase* das enzimas 3β-HSD2 nativa e mutante (Thr152Ala).

Enzima	DHT			NADH		
	$V_{max}$ (nmoles/mg.min)	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}/K_m$	$V_{max}$ (nmoles/mg.min)	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}/K_m$
Nativa	1.48	0.53	2.79	2.04	10.7	0.19
Thr152Ala	2.81	0.62	4.53	2.64	7.2	0.366



Quanto à atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase* foram determinadas as constantes cinéticas apenas do substrato DHEA. Os resultados obtidos estão representados na Figura 9 e descritos na Tabela 3.



**Figura 9:** Comparação das propriedades cinéticas da reação de conversão do DHEA pelas enzimas 3β-HSD2 nativa e mutante (mutação Thr152Ala). As constantes cinéticas  $V_{max}$  e  $K_m$  para o substrato DHEA foram determinadas a partir da equação de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burke (duplos recíprocos) correspondente. Em **A** o gráfico de  $V_{max}$  e  $K_m$  onde está delineado a velocidade da reação (em pmoles/mg/min) em função da concentração de DHEA. Em **B**, o gráfico dos duplos recíprocos, a partir do qual foram calculadas as constantes  $V_{max}$  e  $K_m$  para o DHEA. Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicatas.

**Tabela 3.** Parâmetros cinéticos da atividade de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase* das enzimas 3β-HSD2 nativa e da portadora da mutação Thr152Ala.

Enzima	DHEA		
	$V_{max}$ (pmoles/mg.min)	$K_m$ (μM)	$V_{max}/K_m$
Nativa	90	0.31	290
Thr152Ala	102	0.28	364

## DISCUSSÃO

Os andrógenos são necessários para o crescimento e manutenção normais da próstata. No entanto, estes hormônios têm papel fundamental no desenvolvimento do câncer de próstata, sobretudo quando em concentrações elevadas. O excesso de andrógenos na próstata, seja ele causado por aumento da síntese de T ou DHT ou por diminuição da inativação destes hormônios, pode induzir um crescimento celular descontrolado resultando no câncer de próstata. Recentemente a enzima  $3\beta$ -HSD2 tem merecido especial atenção na pesquisa do câncer de próstata em função de seu papel crucial tanto na síntese de T quanto na degradação de DHT. Em verdade, o fato da enzima  $3\beta$ -HSD2 degradar DHT torna esta enzima uma potencial candidata na etiologia do câncer de próstata. Sendo assim, é de fundamental importância o estudo de mutações e/ou polimorfismos que podem interferir na atividade final da enzima  $3\beta$ -HSD2, seja alterando as propriedades cinéticas da enzima seja alterando os níveis de expressão do gene. Por esta razão, o gene *HSD3B2* representa um fortíssimo candidato à progressão e predisposição ao câncer de próstata.

Em nosso trabalho anterior identificamos uma alta incidência de alterações somáticas no gene *HSD3B2* em pacientes com câncer de próstata. As alterações detectadas incluíam instabilidades de micro-satélite e um número expressivo de substituições nucleotídicas em tecido tumoral. Dentre as substituições detectadas despertou particular interesse aquelas que conduzem à troca de aminoácidos (mutações *missense*) e aquelas localizadas em prováveis domínios de ligação nas regiões promotora e não traduzida, uma vez que podem interferir nos níveis de expressão do gene *HSD3B2*. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi: 1), investigar os efeitos que as mutações *missense* acarretam nas propriedades bioquímicas *in vitro* da enzima  $3\beta$ -HSD2 e 2), obter maiores informações, por intermédio da metodologia de *Gel Shift*, acerca dos possíveis fatores de transcrição que possam estar se ligando àqueles domínios de ligação.

A importância da enzima  $3\beta$ -HSD2 na biosíntese de hormônios esteróides já está bem estabelecida. No entanto, os mecanismos moleculares que regulam a expressão do gene *HSD3B2* são ainda pouco compreendidos. Recentemente inúmeros trabalhos tem

abordado a regulação do gene *HSD3B2* por meio do fator SF-1, citocinas, glucocorticóides e gonadotropinas<sup>13-16</sup>. No caso do gene *HSD3B2* não há relatos na literatura de investigação, em pacientes com câncer de próstata, de substituições somáticas na região promotora e 5'-UTR que poderiam comprometer a expressão do gene *HSD3B2*.

As substituições *c234t* e *t243c* detectadas na região 5'-UTR estão localizadas numa repetição direta composta de 9 nucleotídeos. A formação de um complexo DNA-proteína no resultado de *Gel Shift* indica que esta repetição é um provável sítio de ligação de fatores ainda não identificados. Com relação às substituições *c234t* e *t243c*, estas não aboliram a formação do complexo, o que ressalta que aquelas duas posições nucleotídicas não são essenciais para a formação do complexo observado.

A substituição *-g155a* está localizada no domínio de ligação do fator de transcrição STAT-6 na região promotora, mais precisamente entre os nucleotídeos que intercalam o domínio de ligação propriamente dito. STATs (do inglês signal transducers and activators of transcription) são fatores de transcrição cuja ação é mediada por interleucinas. A regulação do gene *HSD3B2* por fatores STAT tem sido constatada<sup>16</sup>, sendo que a expressão do fator STAT6 é altamente ativada no câncer de próstata<sup>17</sup>. O resultado obtido indica que a substituição *-g155a* não impediu a formação do complexo STAT-6:DNA. Este resultado pode ser explicado pela localização da substituição entre os nucleotídeos intercalantes e não no domínio de ligação propriamente dito (5'-TTCNNNNGAA-3').

As oito mutações *missense* analisadas neste trabalho são novas e não descritas em pacientes com hiperplasia congênita da adrenal. Mutações *missense* no gene *HSD3B2* foram inicialmente descritas em pacientes com aquela anomalia. Nestes pacientes as mutações detectadas conduzem a uma deficiência de atividade de 3 $\beta$ -HSD2 que leva ao pseudohermafroditismo masculino em função de virilização incompleta dos genitais externos.

A caracterização bioquímica da 3 $\beta$ -HSD2 nativa revelou que as duas vias metabólicas desta enzima apresentam diferenças na eficiência da atividade enzimática. Esta

diferença é de certa forma presumível. Na reação de degradação da DHT, *reductase*, a enzima apenas reduz o grupo cetona no carbono 3. Ao passo que a via de conversão da DHEA, *desidrogenase/isomerase*, a reação é mais complexa pois tem-se a isomerização do substrato e a oxidação do grupo hidroxila no carbono 3. Foram constatadas também diferenças quanto ao pH ótimo da reação, dependendo da atividade enzimática (*reductase* ou *desidrogenase/isomerase*). Estas diferenças na eficiência enzimática e no pH ótimo de atividade podem estar associadas ao papel fisiológico de cada uma das vias anabólica e catabólica da 3 $\beta$ -HSD2.

Das oito enzimas mutantes analisadas, apenas a enzima portadora da mutação Thr152Ala apresentou atividade enzimática em ambas as vias metabólicas. As enzimas mutantes Leu6Pro, Arg17Lys, Val19Ile, Leu34Ser, Phe88Ser, Glu192Lys, Asn148Ser tiveram suas atividades drasticamente reduzidas para menos de 5% de substrato convertido. Esta atividade enzimática abolida deve-se em grande parte à localização dos resíduos mutados em posições cruciais na enzima. Portanto, trocas de aminoácidos nestas posições comprometeriam inevitavelmente a atividade catalítica normal da enzima 3 $\beta$ -HSD2 e de maneira decisiva. Os códons Leu<sup>6</sup>, Arg<sup>17</sup>, Val<sup>19</sup> e Leu<sup>34</sup>, por exemplo, estão localizados no domínio de ligação ao cofator NAD(H)<sup>18</sup>. O códon Phe<sup>88</sup>, por sua vez, está localizado em um domínio hidrofóbico altamente conservado responsável pela ancoragem da enzima 3 $\beta$ -HSD2 às membranas celulares. A deleção desta região de ancoragem (resíduos 72 a 89) abole completamente a atividade enzimática da 3 $\beta$ -HSD2<sup>19</sup>. Já os códons Asn<sup>148</sup> e Glu<sup>192</sup> estão localizados respectivamente numa região altamente conservada e nos domínios de ligação do substrato<sup>18</sup>.

Uma vez que apenas a mutação Thr152Ala apresentou atividade enzimática detectável, somente esta enzima mutante teve seus parâmetros cinéticos definidos para as vias metabólicas de degradação da DHT e de síntese de DHEA.

Com relação ao substrato DHT, a enzima mutante Thr152Ala apresenta afinidade pelo DHT semelhante a da enzima nativa, com valores de *K<sub>m</sub>* de 0,62 e 0,53 $\mu$ M, respectivamente. Por outro lado, a mutação *missense* Thr152Ala aumenta a atividade

enzimática em quase duas vezes quando comparada à enzima nativa, com valores de  $V_{max}$  de 1,48 e 2,81 nmoles/mg.min, respectivamente. No que se refere ao cofator NADH o cenário observado é o inverso. Isto é, não há diferença tão marcante quanto à  $V_{max}$  das enzimas mutante e nativa (2,64 e 2,04 nmoles/mg.min, respectivamente) mas a afinidade pelo NADH da enzima mutante é maior que a da enzima nativa ( $K_m$  de 7,2 e 10,7 $\mu$ M, respectivamente). Considerando a constante de 1ª ordem ( $V_{max}/K_m$ ) verifica-se que a enzima mutante apresenta um nítido ganho de função quando comparada à enzima nativa. Tanto nos experimentos que definiram as constantes cinéticas do DHT quanto do NADH, a enzima mutante possui quase o dobro da atividade catalisada pela enzima nativa.

Em contrapartida a este cenário, foi avaliado também os efeitos da mutação Thr152Ala na atividade de síntese de andrógenos, i.e., conversão de DHEA em Androstenediona (um precursor da Testosterona) pela atividade enzimática de *desidrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase*. Os resultados obtidos revelam que a enzima mutante possui propriedades cinéticas comparáveis àquela apresentada pela enzima nativa no que se refere à síntese de andrógenos (conversão de DHEA), não havendo ganho-de-função tão expressivo (apenas 25% a mais de atividade) como observado na situação anterior.

## CONCLUSÃO

Segundo a hipótese proposta neste trabalho, mutações e polimorfismos que interferem na atividade da enzima 3 $\beta$ -HSD2 podem conduzir a um aumento nos níveis de andrógenos o que levaria ao câncer de próstata. Podem interferir na atividade final de 3 $\beta$ -HSD2 mutações do tipo *missense*, que afetam as propriedades cinéticas normais da enzima, e substituições nas regiões promotora e 5'-UTR, que podem alterar o padrão de expressão do gene *HSD3B2*.

A repetição direta localizada na região 5'-UTR parece ser um provável domínio de ligação. Os fatores que poderiam se ligar a este domínio ainda precisam ser identificados e caracterizados. Os resultados obtidos com as substituições *c234t*, *t243c* e -g155a, apesar de negativos, não excluem a necessidade de que outras análises sejam realizadas. É preciso

que se investigue, por exemplo, os efeitos que tais substituições podem ocasionar na expressão do gene *HSD3B2*. Uma possível alternativa é a clonagem das regiões promotora e 5'-UTR em um vetor contendo um gene repórter. Assim, os possíveis efeitos das substituições seriam avaliados tendo por base o padrão de expressão deste gene repórter.

A caracterização bioquímica da 3 $\beta$ -HSD2 revelou que a enzima nativa apresenta diferenças tanto na eficiência enzimática quanto no pH ótimo de atividade da enzima dependendo da atividade de *redutase* (pH 6.5) ou de *desidrogenase/isomerase* (pH 8.5). Uma possível explicação para estas diferenças na eficiência enzimática e no pH ótimo de atividade pode ser o papel fisiológico da 3 $\beta$ -HSD2 tanto nas vias anabólica quanto catabólica de andrógenos.

Das oito enzimas mutantes analisadas apenas a enzima portadora da mutação Thr152Ala apresentou atividade enzimática detectável. A mutação Thr152Ala foi detectada em um paciente que apresentou instabilidade de micro-satélite sob a forma de perda de um dos alelos<sup>10</sup>. Além disso, a quantificação dos alelos normal e mutante por intermédio do sequenciamento direto revelou que o alelo mutante Thr<sup>152</sup> está presente em quase 100% das moléculas de DNA no tecido tumoral, o que permite considerar que a mutação Thr152Ala deva estar presente em homozigose ou em hemizigose na maior parte do tecido tumoral.

Os ensaios cinéticos demonstraram que com relação à atividade de *desidrogenase/isômerase* a enzima portadora da mutação Thr152Ala apresentou constantes cinéticas comparáveis à enzima nativa. Com relação à atividade de *redutase* a enzima mutante apresentou um nítido ganho de função quando comparada à enzima nativa. O códon Thr<sup>152</sup> está envolvido com as interações com o cofator NAD(H) e localiza-se adjacente ao domínio catalítico Y<sup>154</sup>-X-X-X-K<sup>158</sup> (18). A substituição de um aminoácido polar (treonina) por um aminoácido não-polar (alanine) deve de alguma maneira favorecer a atividade catalítica da enzima 3 $\beta$ -HSD2. A construção, por homologia molecular, de um modelo tridimensional da enzima mutante Thr152Ala poderia contribuir para um melhor entendimento dos resíduos envolvidos com a atividade catalítica da 3 $\beta$ -HSD2 e com a interação aos cofatores.

## REFERÊNCIAS

1. Barstch, W., Klein, H., Schiemann, U., Bauer, H.W. e Voigt, K.D. (1990) Enzymes of androgen formation and degradation in the human prostate. In: *Steroid Formation, Degradation, and Action in Peripheral Tissues* (Castagnetta, L., d'Aquino, S., Labrie, F. e Bradlow, H.L., eds), *Ann. NY Acad. Sci.*, **595**: 53-66.
2. Cheng, E., Lee, C. e Grayhack, J. (1993) Endocrinology of the prostate. In: *Prostate Diseases* (Lepor, H. e Lawson, R.K., eds) W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 57-71.
3. Ross, R.K., Pike, M.C., Coetzee, G.A., Reichardt, J.K.V., Yu, M.C., Feigelson, H., Stanczyk, F.Z., Kolonel, L.N. e Henderson, B.E. (1998) Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res.*, **58**: 4497-4504.
4. Ruijter, E., van de Kaa, C., Miller, G., Ruiters, D., Debruyne, F. e Schalken, J. (1999) Molecular genetics and epidemiology of prostate cancer. *Endocr. Rev.*, **20**: 22-45.
5. Henderson, B.E. e Feigelson, H.S. (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**: 427-433.
6. Bosland, M.C. (2000) The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **27**: 39-66.
7. Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Belanger, A. e Pelletier, G. (1992) Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/ 5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **43**: 805-826.
8. McBride, M.W., McVie, A.J., Burridge, S.M., Brintnell, B., Craig, N., Wallace, A.M., Wilson, R.H., Varley, J. e Sutcliffe, R.G. (1999) Cloning, expression, and physical mapping of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. *Genomics*, **61**: 277-284.
9. Devgan, S.A., Henderson, B.E., Yu, M.C., Shi, C.-Y., Pike, M.C., Ross, R.K. e Reichardt, J.K.V. (1997) Genetic variation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. *Prostate*, **33**: 9-12.

10. Makridakis, N., Ferraz, L.F.C. e Reichardt, J.K.V. (2006) Genomic analysis of cancer tissue reveals that most somatic mutations occur in a novel nine nucleotide purine rich motif. (artigo a ser submetido para publicação; descrito no Cap. III.4 desta tese, p.80).
11. Akalu, A. e Reichardt, J.K.V. (1999) A reliable PCR amplification method for microdissected tumors cells obtained from paraffin-embedded tissue. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **15**: 299-233.
12. Andrews, N.C. e Faller, D.V. (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **19**: 2499.
13. Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J.I. e Melner, M.H. (1997) Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **272**: 7960-7967.
14. Gingras, S., Cote, S. e Simard J. (2001) Multiple signal transduction pathways mediate interleukin-4-induced 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in normal and tumoral target tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **76**: 213-225.
15. Feltus F.A., Cote, S., Simard, J., Gingras, S., Kovacs, W.J., Nicholson, W.E., Clark, B.J. e Melner, M.H. (2002) Glucocorticoids enhance activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **82**: 55-63.
16. Feltus, F.A., Groner, B. e Melner, M.H. (1999) Stat5-mediated regulation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase gene: activation by prolactin. *Mol. Endocrinol.* **7**: 1084-1093.
17. Ni, Z., Lou, W., Lee, S.O., Dhir, R., DeMiguel, F., Grandis, J.R. e Gao, A.C. (2002) Selective activation of members of the signal transducers and activators of transcription family in prostate carcinoma. *Journal of Urology*, **167**: 1859-1862.
18. Simard, J., Ricketts, M.L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F.A. e Melner, M.H. (2005) Molecular biology of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase gene family. *Endocrine Reviews*, **26**: 525-582.
19. Thomas, J.L., Evans, B.W., Blanco, G., Mason, J.I. e Strickler, R.C. (1999) Creation of a fully active, cytosolic form of human type I 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/



isomerase by the deletion of a membrane-spanning domain. *Journal of Molecular Endocrinology*, **23**: 231–239.

### Capítulo III.4 – Artigo a ser submetido para publicação

Makridakis, N.; Ferraz, L.F.C. and Reichardt, J.K.V. Genomic analysis of cancer tissue reveals that most somatic mutations occur in a novel nine nucleotide purine rich motif.

Neste artigo abordamos a possibilidade de um *fenótipo mutador* no câncer de próstata. O conceito de um *fenótipo mutador* no câncer sugere que a instabilidade genética das células cancerosas é resultado de mutações em genes que atuam na manutenção da integridade genômica. Concomitante a isso, a evolução de um tumor envolveria expansão clonal de células cancerosas contendo mutações que conferem vantagens de crescimento (*teoria clonal* da origem do câncer). Segundo nossa hipótese, este cenário também se aplicaria ao câncer de próstata. A instabilidade genética observada neste tipo de câncer é resultado de alterações nos genes responsáveis pela replicação e pelo mecanismo de reparo do DNA. Estes genes, quando mutados, potencializariam o surgimento de novas mutações ao longo do genoma, inclusive em genes associados com as etapas do processo carcinogênico como, por exemplo, o gene *HSD3B2*, que controla o metabolismo de andrógenos na próstata. Além disso, as substituições somáticas detectadas no gene “*housekeeping*” *HPRT*, que codifica a enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, ressaltam o suposto caráter indiscriminado dos genes mutados.

As evidências que nos fazem supor um *fenótipo mutador* no câncer de próstata, e que são descritas e discutidas no presente artigo, provêm dos resultados inicialmente obtidos com os genes *HSD3B2* e *HPRT*. As alterações genéticas então observadas

condizem com aquelas sugeridas quando da manifestação de um *fenótipo mutagênico*, sendo elas:

1. Alta prevalência de instabilidades no microsatélite localizado no intron 3 do gene *HSD3B2*, o que nos faz supor uma provável deficiência do mecanismo de reparo de DNA, sobretudo aquele que versa o mau pareamento de DNA, e
2. Elevada incidência de substituições nucleotídicas no gene *HSD3B2* e no gene *HPRT*, o que pode ser um indicativo de erros substanciais nos processos de síntese e/ou reparo do DNA. Os prováveis genes envolvidos seriam não apenas aqueles que codificam DNA polimerases (genes *POLB*, *POLH*, *POLK*, *POLI*, e *POLZ*), mas também genes do mecanismo de reparo do DNA, uma vez que a deficiência nestes genes inviabilizaria a reparação dos erros introduzidos por aquelas DNA polimerases propensas a erros.

Neste artigo também é relatada uma análise minuciosa das seqüências nucleotídicas adjacentes às substituições somáticas detectadas nos genes *HSD3B2* e *HPRT*. Esta análise revelou que as substituições seguem um padrão específico de mutação, transições em sua grande maioria. A seguir procedemos a uma análise mais ampla envolvendo revisão de literatura acerca de mutações somáticas descritas nos genes associados ao câncer de próstata e de mama. O resultado dessas análises permitiu a constatação de que as substituições ocorrem em um *motif* conservado composto de nove nucleotídeos rico em purina (NNUPURI).

O presente artigo propõe a hipótese de que o *motif* NNUPURI seria alvo de um mecanismo de reparo e/ou síntese de DNA propenso a erros que, em última análise, resultaria na maioria das mutações somáticas detectadas no câncer de próstata. Embasando a hipótese proposta, o artigo relata a identificação, nas mesmas amostras de câncer de próstata, de mutações somáticas nos genes que codificam DNA polimerases propensas a erro (*POLB*, *POLH* e *POLK*). Segundo nossa hipótese, o acúmulo de mutações somáticas à medida que o câncer progride decorre de um *fenótipo mutagênico* manifestado pelas DNAs polimerases mutantes.

**GENOMIC ANALYSIS OF CANCER TISSUE REVEALS THAT MOST SOMATIC  
MUTATIONS OCCUR IN A NOVEL NINE NUCLEOTIDE PURINE RICH MOTIF**

**Nick M. Makridakis<sup>1</sup>, Lúcio Fábio Caldas Ferraz<sup>1,3</sup> and Juergen K. V. Reichardt<sup>1,2,4</sup>.**

Departments of <sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Biology and <sup>2</sup>Preventive Medicine, Institute for Genetic Medicine, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089-9075, USA

Keywords: prostate, cancer, somatic, mutation, HSD3B2, SRD5A2, HPRT, purine, consensus sequence, error prone DNA polymerase

Correspondence: NM Makridakis, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 2250 Alcazar Street, IGM 240, Los Angeles, CA, 90089-9075, USA; E-mail: [makridak@usc.edu](mailto:makridak@usc.edu)

<sup>3</sup>Current address: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, University of Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Current address: Plunkett Chair of Molecular Biology (Medicine), University of Sydney, Medical Foundation Building (K25), 92 - 94 Parramatta Road, Camperdown, Sydney, NSW 2042, Australia

## ABSTRACT

Somatic mutations are hallmarks of cancer progression. We screened 26 matched human prostate tumor and constitutional DNA samples for somatic alterations in the SRD5A2, HPRT, and HSD3B2 genes, by DNA sequencing, and identified 71 somatic substitutions. Interestingly, 79% (56/71) of these substitutions occur at a Nine-Nucleotide Purine-Rich (NNUPURI) motif, with one mismatch allowed. We also found this motif with one allowed mismatch in 89% (23/26) of the H-ras gene somatic mutations formed in the SENCAR mouse skin model, after induction of error-prone DNA repair following mutagenic treatment<sup>15,16</sup>. Literature searches identified the NNUPURI motif with one mismatch allowed in 66% of the somatic prostate cancer mutations and in 74% of the somatic breast cancer mutations found in all human genes analyzed. The high prevalence of the motif in each of the above mentioned cases cannot be explained by chance ( $p < 0.05$ ). We further identified 27 somatic mutations in the error-prone DNA polymerase genes pol  $\eta$ , pol  $\kappa$  and pol  $\beta$  in these prostate cancer patients. These data suggest that most somatic nucleotide substitutions in human cancer may occur in sites that conform to the NNUPURI motif. These mutations may be caused by “mutator” mutations in error-prone DNA polymerase genes.

## INTRODUCTION

Cancer is thought to evolve through the accumulation of somatic mutations in specific genes, depending on tumor type<sup>1</sup>. These mutations are caused by a combination of environmental and heritable factors<sup>2</sup>. To date scientists have been unable to identify a common motif at the sites of these somatic mutations suggesting that these somatic events have distinct molecular etiology, depending, among other factors, on the individual and the type of tumor. We decided to test the hypothesis that there is a common motif at the sites of somatic mutations in sporadic cancer tissue, utilizing prostate cancer, a tumor type of particular interest to us.

We and others have reported evidence supporting the involvement of androgen-metabolic candidate genes in prostate cancer risk and progression. For instance, a number of findings have associated the androgen metabolic gene SRD5A2 with prostate cancer predisposition<sup>3,4,5</sup>. The SRD5A2 gene encodes the 5 $\alpha$ -reductase type II enzyme that converts testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT), the most active androgen in the prostate<sup>6</sup>. Thus activating 5 $\alpha$ -reductase mutations are expected to contribute to prostate tumor development. A possible contribution of the SRD5A2 gene to tumor progression was also proposed based on our findings of *de novo* somatic events at the SRD5A2 locus<sup>7</sup>. More recently we reported the biochemical characterization of somatic SRD5A2 mutations in human prostate cancer tissue<sup>8</sup>, including mutations that increase enzyme activity. These data suggest that the SRD5A2 gene is a common target in prostate cancer progression.

The HSD3B2 gene also presents an attractive androgen metabolic candidate gene for prostate cancer risk and progression. DHT is inactivated through two reductive reactions catalyzed by 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase<sup>6</sup>. The two isozymes of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase reported in humans are encoded by the HSD3B1 and HSD3B2 genes. The type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme encoded by the HSD3B2 gene is mainly expressed in androgenic tissues<sup>9,10</sup>, and therefore may regulate intraprostatic DHT levels by initiating inactivation of this potent androgen. We have previously shown a putative role for the HSD3B2 gene in predisposition to prostate cancer by investigating a complex dinucleotide repeat polymorphism [(TG)<sub>n</sub> (TA)<sub>n</sub> (CA)<sub>n</sub>] located in intron 3 of this gene. In that study, we reported substantial allelic variations among racial-ethnic groups with different risks for developing prostate cancer<sup>11</sup>. In the present study we report the identification of a high number of somatic nucleotide substitutions and microsatellite instability of the HSD3B2 gene in prostate cancer tissue.

Analysis of the nucleotide sequence that surrounds each mutation revealed that most of the somatic alterations in both the HSD3B2 and SRD5A2 genes occur within a putative conserved sequence that conforms to a 9-Nucleotide Purine-Rich (NNUPURI) motif. Examination of the published literature revealed that the NNUPURI motif accounts for 66% of all somatic prostate cancer mutations found in the 8 human genes analyzed and for 74% of all somatic breast cancer mutations found in the 11 genes analyzed (with one allowed mismatch). To our knowledge this is the first time that such a consensus sequence has been identified at the site of somatic mutations in any cancer type.



If a specific molecular mechanism generates somatic mutations at specific motif sites, then it should do so even in genes expected to be unrelated to tumor progression, such as the human HPRT gene. The ubiquitously expressed HPRT gene encodes hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, an enzyme essential for the purine salvage pathway, responsible for 90 % of nucleic acid biosynthesis in normal cells<sup>12</sup>. The human HPRT gene is located on chromosome X<sup>13</sup>, and thus prostate cancer cells carrying HPRT mutations would normally be hemizygous at this locus (unless they also contain X-chromosome duplications). Sequence analysis of the HPRT gene in the same prostate cancer tissues identified many somatic mutations, 82% of which fit the NNUPURI motif, with one mismatch allowed.

In search of a potential mechanism that generates mutations at the NNUPURI motif we found that this motif is found (with one mismatch allowed) in 88% of the somatic H-ras gene mutations induced by error prone DNA repair in the SENCAR mouse skin model following mutagenic treatment<sup>15,16</sup>. Error prone (EP) DNA repair (also called translesion synthesis) is a specific pathway of DNA repair elucidated over the last decade<sup>41</sup>. This particular type of DNA repair involves DNA polymerases that are much more accurate when replicating through specific types of DNA damage than undamaged DNA<sup>42</sup> (hence the name error prone repair). EP DNA polymerases have been proposed to play a role in cancer etiology (for a review, see e.g. reference 43). The only known example of an error prone DNA polymerase causing human cancer comes from pol  $\eta$ <sup>43</sup>; constitutional DNA mutations that inactivate pol  $\eta$  are associated with a high rate of skin cancers in patients suffering from XPV (*Xeroderma Pigmentosum-Variant*)<sup>44</sup>. In the absence of pol  $\eta$ ,

ultraviolet (UV) radiation induced- pyrimidine dimers are bypassed in a manner that generates the mutations which are thought to lead to skin cancer<sup>43</sup> (perhaps by another error prone DNA polymerase<sup>42</sup>). Thus error prone polymerase mutations can result in multiple tumor-inducing mutations (mutator phenotype) given the right type (and amount) of environmental exposure. We report here 27 somatic mutations in the EP polymerase genes pol  $\eta$ , pol  $\kappa$  and pol  $\beta$  in the same prostate cancer tissues that have additional somatic mutations in some of the other analyzed genes (i.e. “target” genes: HSD3B2, HPRT and SRD5A2). We propose that the polymerase gene mutations result in multiple somatic mutations in these patients.

## RESULTS

Our samples were previously described<sup>7</sup>. **Supplementary Table 1** online summarizes patient information including age and tumor stage as well as all results concerning microsatellite instability and nucleotide substitutions in the HSD3B2 gene. These results are presented in detail in the next sections.

### **Somatic mutations in the HSD3B2 and HPRT genes in prostate cancer tissue**

Initially the tumor DNA of each patient was screened for somatic alterations, by automated DNA sequencing. Once nucleotide alterations were detected, the constitutional DNA of the same patient was also analyzed to examine if the event was somatic. From 26 patients studied, only 5 had no nucleotide HSD3B2 alterations in the tumor (**Supplementary Table 1** online). In the remaining 21 patients we detected one deletion and 37 nucleotide substitutions (**Supplementary Table 1** online). Only two HSD3B2 mutations were recurrent: the silent mutation G15G (glycine at codon 15), found in three patients, and the missense mutation F326S (phenylalanine-326 to serine), present in two patients (**Supplementary Table 1** online). We did not detect any of the tumor DNA mutations in the corresponding constitutional DNA. Thus, these mutations are somatic.

Given the potential importance of missense HSD3B2 mutations for our model of prostate cancer progression, all 18 missense mutations were confirmed independently by three distinct techniques, namely automated DNA sequencing, SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) and SNaPshot<sup>TM</sup> analysis (**Supplementary Table 2** online). This analysis included the quantitation of both the mutant and the wild-type alleles,

which demonstrated that the majority of the mutations produced similar quantitation results among all three techniques employed (**Supplementary Table 2** online). In addition, analysis of the intensity of the mutant allele indicates that in at least 7 occasions the mutant allele is present in more than 50% of the DNA molecules of the tumor tissue (**Supplementary Table 2** online).

The HPRT gene was also investigated for somatic alterations in prostate tumor tissue. Exons 7 and 8 of this gene were PCR-amplified on a single amplicon of 379 base pairs using pairs of primers described elsewhere<sup>14</sup>. Automated DNA sequencing reactions were performed as described in *Methods*. 17 nucleotide substitutions, all somatic, were identified: 10 substitutions were intronic and seven were missense (**Table 1**). These results were confirmed in independent experiments (see *Methods*). Analysis of the data shows that multiple somatic mutations in the same patient were found as well as recurrent mutations (**Table 1**). Each of the two recurrent missense mutations, P169S (proline-169 to serine) and P184S (proline-184 to serine), were found in three patients (**Table 1**). In addition, analysis of the intensity of the mutant allele indicates that in three occasions the mutant allele is present in more than 50% of the DNA molecules of the tumor tissue (**Table 1**). Finally, although only a single HPRT amplicon was screened, 9 of the 26 patients analyzed harbor somatic substitutions (**Table 1**).

### **Nucleotide sequence contexts surrounding the somatic mutations**

The high number of somatic nucleotide substitutions identified in both HSD3B2 and HPRT genes allowed us to analyze the sequence context and nature of those substitutions. This analysis revealed that the mutations occur within a putative conserved sequence that

conforms to a Nine-Nucleotide Purine-Rich (NNUPURI) motif (**Tables 1 and 2**). This motif is comprised of three nucleotide triplets interspersed by 0-2 spacer nucleotides. The middle triplet consists of purines, one of them being the mutated base. Using the IUPAC code, the NNUPURI motif can be represented by WKVnRRRnVWK [W= A/T; K= G/T; V= G/A/C; R= purine (A/G); n= any nucleotide; total number of n = 0-2 nucleotides; the underline indicates the core purine triplet].

Among all 38 nucleotide alterations detected in the HSD3B2 gene, 30 (79%) fit the NNUPURI motif with up to one mismatch: a perfect match is observed in 9 cases whereas 21 cases fit the motif with one mismatch (**Table 2**). The actual target of the motif (the RRR sequences occurring within the WKVnRRRnVWK context with one allowed mismatch) covers 60% of the total 1937 bp of the HSD3B2 sequence analyzed by PCR (see *Methods* for calculation). Thus, 22 (60%) of the HSD3B2 mutations are expected to occur in the motif (with one mismatch), compared to the 30 (79%) observed. This increased frequency of the HSD3B2 mutations that fit the motif is significant ( $p=0.026$ ). We then tested the occurrence of the motif in the HPRT and SRD5A2 mutation sites: 15 out of 17 (88%) of the somatic HPRT mutations and 11 out of 16 (69%) of the previously reported<sup>8</sup> somatic SRD5A2 mutations fit the motif with one allowed mismatch (**Tables 1 and 3**). The actual target of the motif with one allowed mismatch covers 68% of the HPRT sequence analyzed and 57% of the SRD5A2 sequence analyzed (see *Methods* for calculation). Based on the actual target of the NNUPURI motif in these two genes, 20 (out of the 33) HPRT/SRD5A2 mutations are expected to fit the motif with one allowed mismatch, compared to the 26 (15+11) observed. The increased frequency of the HPRT/ SRD5A2 mutations that fit the motif with one allowed mismatch is significant ( $p=0.05$ ). Comprehensive analysis of all the

HPRT, HSD3B2 and SRD5A2 somatic mutations indicates that 56 out of the 71 (79%) somatic mutations fit the NNUPURI motif with up to one mismatch (**Tables 1, 2 and 3**). The frequency of mutations that fit the motif with up to one mismatch in all three genes (56/71) is significantly higher ( $p=0.005$ ) than the expected frequency (43.4/71), based on the actual target of the motif in these genes.

Analysis of the nature of the somatic base substitutions detected in the three genes analyzed (**Tables 1 and 2** and reference 8) indicates that transitions are significantly more prevalent than transversions. Transitions comprise 31 A>G and 34 G>A substitutions, whereas transversions consist of two A>T, two G>T, and one C>G substitutions (all of the substitutions are listed based on the sequence of the transcribed strand).

### **The NNUPURI motif in the cancer literature**

The discovery of the NNUPURI motif motivated us to examine the published literature for other kinds of mutations that may fit this motif. These literature searches revealed that this motif is also found in all but one of the 11 H-ras gene mutations detected in the SENCAR (SENSitive to skin CARcinogenesis) mouse skin cancer model one day after benzo[ $\alpha$ ]pyrene treatment<sup>15</sup> (**Table 4**). These H-ras mutations were formed by error-prone DNA repair of abasic lesions induced after benzo[ $\alpha$ ]pyrene treatment<sup>15</sup>. Most (9 out of 11) of the H-ras gene mutations were also transitions<sup>15</sup>. More recently, Chakravarti *et al* reported that error prone DNA repair induced H-ras mutations in the mouse skin also following estradiol-3, 4-quinone (E2-Q) treatment<sup>16</sup>. All 15 of these E2-Q induced somatic mutations (figure 5 in reference 16) are transitions, and 13 out of 15 fit the NNUPURI

motif with one allowed mismatch (data not shown). Thus 88% (23 out of 26) of the somatic H-ras mutations induced in the mouse skin by error prone DNA repair fit this motif with one mismatch allowed. The actual target of the motif covers 62% of the total 500 bp of the hras1 sequence analyzed by the authors (see *Methods* for calculation). Thus, 16 (62%) of the hras1 mutations are expected to occur in the motif (with one mismatch), compared to the 23 (88%) observed. This increased frequency of the hras1 mutations that fit the motif with one mismatch is significant ( $p=0.01$ ). The frequency of the hras1 mutations that fit the exact NNUPURI motif (without mismatches) is also higher than expected (35% versus 21%), but this trend is not significant, perhaps due to the low number of mutations.

Additional literature searches identified the NNUPURI motif in 66% (37/56) of the somatic prostate cancer mutations of all the genes that we analyzed in humans: p53, H-ras, K-ras, N-ras, PTEN and the androgen receptor (AR) gene (data not shown). Examination of the somatic mutations in the AR gene database<sup>40</sup> revealed that 80% are transitions and 68% of the mutations fit the NNUPURI motif with up to one mismatch. Moreover, half of the most common somatic mutations (in prostate cancer) that activate the H-ras, K-ras, and N-ras oncogenes, at codons 12, 13 and 61, also fit the NNUPURI motif with one mismatch allowed. Regarding somatic substitutions in the p53 gene in patients with prostate cancer<sup>18</sup>, there is a prevalence of transitions over transversions and 67% (14/21) of the mutations fit the NNUPURI motif with up to one mismatch. The most common somatic PTEN mutation, found in one out of 6 prostate cancer tissues<sup>19</sup>, also fits the NNUPURI motif. To test the significance of these observations, we calculated the expected number of the AR gene mutations that fit the NNUPURI motif based on the actual target of the motif in the AR gene, the most commonly mutated gene in this dataset: 42 out of the 62 (68%) somatic AR

mutations<sup>40</sup> fit the motif with one mismatch, compared to 32 (53%) expected (see *Methods* for calculation). The higher occurrence of the motif among prostate cancer AR mutations is statistically significant ( $p=0.027$ ). The frequency of the somatic AR mutations that fit the NNUPURI motif exactly (without mismatches) is also higher than expected (16 observed versus 10 expected), but this trend does not reach statistical significance ( $p=0.08$ ), perhaps due to the low number of mutations that fit the motif exactly.

After detecting the NNUPURI motif in the most common human malignancy in males<sup>64</sup>, we decided to also examine the most common cancer in females, that of the breast<sup>64</sup>. The data, presented in **Supplementary Table 3** online, shows that 74% (90/122) of all somatic breast cancer mutations found in the literature in 11 genes analyzed fit the NNUPURI motif with up to one mismatch. The list of genes analyzed for mutations in human breast cancer includes CHEK2<sup>20,24</sup>, CSNK1E<sup>22</sup>, GATA3<sup>21</sup>, LMO4<sup>23</sup>, E-CAD (CDH-1)<sup>25,26</sup>, DLG1<sup>22</sup>, EDD/hHYD<sup>22</sup>, BRCA2<sup>27</sup>, PTEN<sup>28</sup>, p53<sup>24,28,29</sup>, and PHB<sup>30,31</sup>. To test the significance of this finding, we calculated the expected number of somatic mutations that fit the NNUPURI motif in the most commonly mutated gene in this dataset (p53), based on the actual target of the motif in the p53 gene: 29 out of the 43 (67%) somatic p53 mutations fit the motif with one mismatch allowed, compared to 23 expected (see *Methods* for calculation). This higher than expected incidence of the NNUPURI motif with one mismatch allowed does not reach statistical significance ( $p=0.089$ ). However, 10 out of the 43 (23%) somatic p53 mutations fit the motif exactly, compared to 5 (13%) expected, and this higher incidence is significant ( $p=0.046$ ). Moreover, 58% of all somatic breast cancer mutations reported in these genes are transitions.



Recently, a GA pattern (or TC in the other strand; the underline shows the mutated base) was identified at the sites of somatic mutations in the protein kinase gene family in breast cancer, but mostly in two breast cancer samples thought to display mutator phenotype<sup>17</sup>. Since this pattern is similar to the purine core of the NNUPURI motif, we decided to analyze the mutations reported by Stevens *et al* (on Supplementary Table 4<sup>17</sup>) for the presence of our motif: we found that 59 out of the 88 (67%) breast cancer mutations fit the NNUPURI motif with one allowed mismatch. In contrast, only 8 of the 71 prostate cancer mutations that we report here occur in the GA motif (8.9/71 (12.5%) expected;  $p=0.75$ ). The GA motif is overrepresented though in the breast cancer mutation dataset that we found in the literature (**Supplementary Table 3** online): 25 (of the 122) mutations fit the GA motif, compared to 15 expected ( $p= 0.01$ ). Thus both breast and prostate cancer mutations occur in the context of a purine-rich core motif, while only in breast cancer this core is often GA.

Somatic mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) have been detected in many kinds of tumors and most of these mutations are transitions at purines<sup>57</sup>. Thus we decided to investigate whether these somatic mtDNA mutations fit the NNUPURI motif. 14 out of the 34 (41%) somatic prostate cancer mutations found in the mtDNA<sup>32</sup> fit the motif with up to one mismatch (**Supplementary Table 4** online). This frequency is significantly lower ( $p=0.0001$ ) than the frequency found in the prostate cancer mutations that we report here (56/71; 79%). Moreover, the distribution of the somatic mutations by mutated nucleotide (purine versus pyrimidine; A:T versus C:G; CC or GG doublet versus TT or AA doublet) is different between the somatic mutations that fit the NNUPURI motif in the HSD3B2 gene and those that fit the motif in the mtDNA (**Supplementary Table 4** online). Taken

together, these findings suggest that most somatic mutations in prostate tumor mtDNA arise through a different mechanism than the one(s) responsible for most somatic mutations in the nuclear prostate tumor DNA.

### **Somatic mutations in the pol $\beta$ , pol $\eta$ , and pol $\kappa$ genes in prostate cancer tissue**

The significant presence of the NNUPURI motif at the sites of somatic H-ras gene mutations induced by error prone DNA repair suggests that error prone DNA polymerases may be involved in the etiology of (at least some) of the somatic mutations that fit this motif. We thus decided to sequence a few exons from each of the EP DNA polymerase genes pol  $\beta$ , pol  $\eta$  and pol  $\kappa$  for somatic mutations in our prostate cancer tissues, to test the hypothesis that prostate cancer tissue is commonly mutated in these genes. This preliminary analysis identified somatic mutations in all three genes, but the gene with most (and more prevalent) mutations was pol  $\beta$  (data not shown). We therefore decided to screen the complete coding sequence of pol  $\beta$  in these prostate cancer patients. The result of these analyses in all polymerase genes is shown on **Table 5**. We identified 27 somatic mutations in these 26 samples, 14 of which were missense substitutions, 9 were silent or intronic substitutions, two substitutions changed splice acceptor (AG) sites, one was in the promoter region and one in the 5'-UTR. The G31438A intronic substitution is recurrent on patients 5 and 30 (**Table 5**). The P242R missense substitution was also present in the constitutional DNA of patient 13, but with altered prevalence (40 % mutant peak in the tumor tissue (**Table 5**) compared to 60 % mutant peak in the constitutional DNA (data not shown). Thus an additional somatic event must have occurred in the tumor in this pol  $\beta$  site. Interestingly, the P242R mutant results in similar activity and a four-fold lower mutation rate than the

normal pol  $\beta$  when assayed *in vitro* by a Herpes Simplex Virus thymidine kinase forward mutation assay<sup>65</sup>. Thus, decreased presence of the P242R mutant in the tumor tissue may translate into higher mutagenicity compared to the adjacent normal tissue of the same patient. Overall, among 26 patients analyzed, 19 patients (73%) have somatic mutations in an EP polymerase gene and 16 patients (61%) have somatic mutations in pol  $\beta$ .

### **Somatic instability of the HSD3B2 gene in prostate cancer tissue**

Since the HSD3B2 gene was most commonly “hit” in our sequencing analysis of these prostate cancer tissues, we decided to search for other kinds of genomic instability at this locus. 20 patients were investigated for somatic alterations in the dinucleotide repeat of the HSD3B2 gene<sup>11</sup>, especially microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH). MSI and LOH were identified by the presence of altered alleles in the PCR-amplified product of the tumor DNA as compared with its matched normal DNA. The results show that 70% of the patients analyzed have LOH/ MSI in the HSD3B2 locus (**Supplementary Table 1** online). The most common findings were MSI manifested as follows: 5 cases with contraction of the alleles of the tumor DNA, 4 cases with expansion, and 3 cases with a combination of both contraction and expansion of the alleles (data not shown). Three patients had LOH in the tumor tissue and 6 patients showed no somatic alterations in this dinucleotide repeat (**Supplementary Table 1** online).

## DISCUSSION

### **Somatic mutations are commonly found in prostate cancer tissue**

We report a high number of somatic prostate cancer mutations in all three “target” genes studied, and that the sequence surrounding the mutation sites fits a nine-nucleotide purine-rich (NNUPURI) motif. From the 26 patients analyzed, 21 (80%) carry somatic nucleotide alterations in the HSD3B2 gene. Among these patients, 13 have multiple changes, including a case where a single patient harbors 4 nucleotide alterations (**Supplementary Table 1** online). In total, 38 nucleotide alterations were detected in the HSD3B2 gene: 37 base substitutions and one deletion. Similarly, analysis of the SRD5A2 gene in the same patients resulted in the identification of 16 somatic substitutions, in 60% of the patients<sup>8</sup>. Thus both androgen metabolic genes that we studied are commonly “hit” in the same prostate cancer tissues.

The house-keeping gene HPRT was also investigated for somatic mutations in these prostate tumor tissues. Although only exons 7 and 8 of this gene were amplified in a single amplicon of 379 base pairs, 17 somatic nucleotide substitutions were identified, 10 intronic and 7 missense, in 9 out of the 26 patients (**Table 1**). Collectively, we found a total of 71 somatic mutations in these three genes in prostate cancer. 8 of these mutations are recurrent and 6 of the recurrent mutations are missense (**Table 1, Supplementary Table 1** online, and reference 8). As summarized in **Table 6**, at least four patients harbor somatic substitutions in all three “target” genes examined, and most of these substitutions fit the NNUPURI motif. All four of these patients have additional somatic mutations in an EP polymerase gene (**Table 6**). In addition, four out of the 26 prostate cancer patients have

missense substitutions in both androgen metabolic genes (data not shown). Biochemical analysis of the HSD3B2 missense substitutions will help elucidating the combined effect of these somatic mutations in prostate cancer progression.

Although we selectively examined HSD3B2 gene sequences expected to be important for function (promoter, coding and UTRs) we equally found mutations that lead to amino acid change (18 missense mutations plus 1 deletion) and mutations that do not lead to amino acid change (9 silent mutations, 6 in untranslated regions, 2 in the promoter and 2 intronic; **Supplementary Table 1** online). Biochemical analysis of the somatic mutations that we found in the SRD5A2 gene<sup>8</sup> showed that 60% (6 out of 10) of the mutations had no effect on 5 $\alpha$ -reductase activity or had lower activity, suggesting that these mutations do not contribute to prostate cancer progression. The human HPRT gene is also highly mutated in these prostate cancer tissues (**Table 1**), and three of the mutations (P169S, P184S, and E197G) are known to abolish enzyme activity *in vivo* (references 33, 34 and 35 respectively), while two other mutations (D185G and D177N) are in codons that either abolish enzyme activity *in vivo*<sup>36</sup> or are associated with the Lesch-Nyhan syndrome<sup>37</sup>. Prostate tumor cells can still survive in the presence of these severe HPRT mutations, but they must do so by activating the *de novo* purine synthesis pathway, which requires higher ATP consumption<sup>38</sup>, and is thus energy-inefficient. Therefore all three genes that we studied in the same prostate cancer patients contain a high number of somatic nucleotide substitutions many of which are predicted to be unrelated to or detrimental for tumor progression (i.e “passenger mutations”). These findings taken together suggest that there may be generalized genomic instability in these patients’ tumors. We have additional

preliminary data that confirms these findings in randomly selected fragments of the prostate cancer genome (manuscript in preparation). Moreover, the fact that we found significant somatic instability (MSI/ LOH) in both the HSD3B2 (**Supplementary Table 1** online) and the SRD5A2<sup>7</sup> genes in these patients further strengthens this argument.

The similarity of the HSD3B2 genotyping results obtained by three different techniques (**Supplementary Table 2** online) indicates that these mutations are probably not PCR artifacts but rather real somatic changes in the tumor. In addition, **Supplementary Table 2** online shows that we were able to detect mutations whose prevalence was as low as 13% of the total DNA molecules in the tumor (S115C missense mutation). Moreover, in at least 7 cases the mutant allele was present in more than 50% of the DNA molecules in the tumor tissue (**Supplementary Table 2** online); such accumulation may be due to clonal proliferation of cells harboring mutations presumably advantageous. Therefore, we were able to identify both mutations present in as low as 13% of the DNA molecules in the tumor (presumably “passenger” mutations) and mutations present in the majority of the tumor cells (possibly clonal, “driver” mutations).

### **Nucleotide sequence context of the somatic substitutions**

In order to test the hypothesis that there is a common motif at the sites of somatic mutations in sporadic prostate cancer tissue we analyzed the nucleotide sequence that surrounds each mutation. We thus found that 79% (56/71) of all somatic mutation sites in the three “target” genes fit the NNUPURI motif, with up to one mismatch (**Tables 1, 2 and 3**). The difference between the expected and observed numbers of somatic mutations that fit

this motif is significant ( $p=0.005$ ) and suggests distinct molecular etiology for these somatic mutations that involves the motif.

The prevalence of the NNUPURI motif at somatic mutation sites led us to hypothesize that the motif is universal. We thus collected the sites of somatic prostate/breast cancer substitutions in the published literature and measured the prevalence of the NNUPURI motif among these sites. These literature searches identified the NNUPURI motif (with up to one mismatch) in 66% (37/56) of all somatic prostate cancer mutations and 74% (90/122) of all somatic breast cancer mutations in all the genes that we analyzed in humans. Analysis of the most commonly mutated gene in each dataset indicates that the high prevalence of the NNUPURI motif (with either one or no mismatch) is significant for both types of cancer ( $p=0.027$ ,  $p=0.046$ ). In addition, 67% (59/88) of the somatic breast cancer mutations thought to result by mutator phenotype<sup>17</sup> in the protein kinase gene family, fit the NNUPURI motif with one allowed mismatch. Our analyses suggest that most somatic mutations in the most common forms of human cancer fit the NNUPURI motif with up to one mismatch.

In all 6 genes that we compared the observed and expected frequency of the exact NNUPURI motif at somatic mutation sites we detected higher than expected occurrence of the motif (*Results* section and data not shown). This trend was not always statistically significant, perhaps due to the low number of mutations. Allowing for one mismatch with the NNUPURI motif in those cases increased the number of both observed and expected “hits” and resulted in statistically significant differences. This observation suggests that the important consensus is the exact motif without mismatches.

94% of all 54 somatic substitutions that we found in the SRD5A2 and HSD3B2 genes are transitions (**Table 2** and reference 8). In contrast, only 52% of the 63 constitutional DNA mutations and polymorphisms found in these genes in the normal population and in patients with 3B-HSD2 deficiency (reference 8, 39 and data not shown) are transitions. This difference is significant ( $p=0.000003$ ). Moreover, 88% of the 17 HPRT somatic substitutions that we found are transitions (**Table 1**). In contrast, only 51% of the 59 HPRT listed SNPs (<http://snpper.chip.org/bio/export-sequence/20797>) are transitions. This difference is also significant ( $p=0.019$ ). Analysis of all the other somatic prostate cancer mutations that we found in the published literature shows that 68% of these mutations are also transitions: for example, 80% of the somatic prostate cancer mutations in the AR gene<sup>40</sup> are transitions. In contrast, only 57 % (114/201) of the AR SNPs (<http://snpper.chip.org/bio/export-sequence/20479>) are transitions. The difference between somatic and constitutional AR nucleotide substitutions is significant ( $p=0.0054$ ). Analysis of the breast cancer mutations that we obtained from the literature shows that 58% of the 119 breast cancer mutations are transitions (**Supplementary Table 3** online). The most commonly mutated gene that we found in the breast cancer literature was p53 (**Supplementary Table 3** online). 55% of the 137 p53 SNPs (<http://snpper.chip.org/bio/export-sequence/7966>) are transitions. The difference between somatic (breast cancer) and constitutional p53 nucleotide substitutions is not significant. Thus, although both prostate cancer and breast cancer mutations fit the NNUPURI motif, only in prostate cancer there are more transitions than expected by chance. Moreover, the GA motif is overrepresented only among breast cancer mutation sites, not prostate cancer. These data suggest that similar yet distinct molecular etiologies exist between the generation of somatic mutations in the prostate and breast. For example, both prostate and



breast cancer mutations may be caused by error-prone DNA repair, but the polymerase or the carcinogen involved may be different.

### **Error-prone DNA polymerases: a role in the etiology of somatic mutations?**

The existence of a frequently found motif around the somatic mutation sites suggests that the majority of somatic mutations in the most common forms of human cancer may have similar molecular etiology. We thus screened the published literature in search of such a potential etiologic mechanism. This analysis revealed that the NNUPURI motif is found with one mismatch allowed in 88% (23/26) of the somatic H-ras gene mutations induced by error prone DNA repair in the SENCAR mouse skin model following either benzo[ $\alpha$ ]pyrene<sup>15</sup> or estradiol-3,4-quinone (E2-Q)<sup>16</sup> treatment (**Table 4** and data not shown). 92% (24/26) of these H-ras mutations in the mouse cancer skin are also transitions<sup>15,16</sup>. The association between the H-ras mutations and the presence of the NNUPURI motif cannot be explained by chance ( $p=0.01$ ). These data parallel our findings in both prostate and breast cancer tissue. Thus, we propose that most somatic mutations in the most common forms of human cancer are caused by error prone DNA repair following specific carcinogenic exposure. This model for cancer etiology and progression satisfies a well-accepted criterion for cancer development, the collaboration of genetic (such as polymerase and subsequent gene mutations) and environmental (such as mutagenic exposure) contributors.

To test this model we decided to first screen the error prone DNA polymerase genes pol  $\beta$ , pol  $\eta$  and pol  $\kappa$  that may have in turn caused the high number of mutations that fit

the NNUPURI motif in our prostate cancer samples. While we thus far completed the analysis of only the pol  $\beta$  gene, we report a total of 27 somatic mutations in the three EP polymerase genes in our 26 samples (**Table 5**). Four somatic pol  $\beta$  mutations have been previously reported in prostate cancer, but that study was done in a smaller sample (12 cases) of different racial background (Japanese)<sup>66</sup>. Most (52%) of the somatic mutations reported here are missense, while two change invariable AG splice junctions and another one changes an invariable lariat-adenine to guanine (**Table 5**). The two splice junction mutations are predicted to result in deletions of two to three amino acids, at the minimum. Most (59%) of the 27 somatic mutations are prevalent in the tumor, suggesting that they may be “drivers”.

X-ray crystallography studies of human pol  $\beta$  can shed light on the potential role of the mutated residues: proline-261 forms a hydrogen bond with glutamine-264<sup>67</sup>, while threonine-292 and methionine-236 are both involved in DNA template binding<sup>68,69</sup>. Interestingly, slight disruption of the hydrogen bond between residues 261 and 264 has been proposed to result in the mutator phenotype displayed by the previously found, prostate cancer-associated I260M pol  $\beta$  variant<sup>70</sup>. Thus the P261L mutation may also disrupt this hydrogen bond and result in prostate tumorigenesis. Moreover, both T292A and M236L substitutions are predicted to destroy the hydrogen bond between the respective residues and the DNA template and thus may affect fidelity of DNA synthesis. In addition, both methionine-236 and proline-242 are in the “flexible loop”, a part of pol  $\beta$  that functions to position the primer and has been shown to contain several residues that cause a mutator phenotype when mutated<sup>71</sup>. Finally, the P242R mutation has been previously

shown to significantly alter the fidelity of DNA synthesis when assayed *in vitro*<sup>65</sup>. Therefore, many of the somatic pol  $\beta$  mutations that we found in prostate cancer may result in a mutator phenotype. Future functional studies will examine this prediction.

Both missense substitutions that we identified in pol  $\kappa$  are in threonine-205 (**Table 5**). The homologous residue in pol  $\eta$  of threonine-205 of pol  $\kappa$  is threonine-122<sup>72</sup>. Germline missense mutation of threonine-122 of human pol  $\eta$  has been reported in an XPV patient<sup>73</sup>. In addition, one of the three missense pol  $\eta$  mutations that we identified is in glycine-263 (**Table 5**). Mutation of pol  $\eta$  glycine-263 (to valine) has been reported in another XPV patient<sup>73</sup>. Both threonine-122 and glycine-263 residues of human pol  $\eta$  have been proposed to be structurally important<sup>72</sup>. Thus three of the somatic missense mutations that we identified in the Y-family polymerase genes pol  $\kappa$  and pol  $\eta$  are in (or are in residues homologous to) residues of pol  $\eta$  previously associated with XPV. This finding suggests that these mutations may play a role in carcinogenesis. This explanation however generates an interesting question. If some XPV patients are born with a mutation of the same pol  $\eta$  codon that is associated with prostate cancer etiology, then why do these patients get only skin and not prostate cancer? The most likely explanation is different environmental exposure: XPV patients are inevitably exposed to sunlight, but not necessarily to prostate cancer inducing environmental mutagens (the prostate gland is too deep inside the body to be affected by sunlight, and pol  $\eta$  may be important for repairing other types of damage relevant to the prostate; **Table 7**). Alternatively, the tumor type specificity may result from the exact nature of the mutation.

Multiple factors determine the mutagenic potential of DNA damage sites; among them, the choice of the DNA repair machinery evoked to repair the lesions<sup>42</sup> and the nucleotide sequence context wherein a lesion takes place<sup>45,46</sup>. We identified a nine-nucleotide motif around the sites of human prostate/ breast cancer mutations and mouse skin cancer mutations induced by error prone DNA repair. A potential mechanistic model for the generation of these mutations (**Table 7**) may involve the action of specific environmental mutagens acting in conjunction with distinct error-prone polymerase (mutant) genotypes to cause specific kinds of mutations and/ or at specific sites. A mutant DNA polymerase may result in mutations directly, through decreased fidelity, or indirectly, through the use of a “non-optimal” polymerase for each DNA lesion (as in the XPV paradigm<sup>42</sup>). The presence of a motif around the mutation sites can result in this model from either the mutagenic tendencies of specific polymerases or the binding requirements of specific mutagens. The type of human error-prone DNA polymerase(s) involved in the etiology of these mutations may be inferred from the known specificities of these enzymes (**Table 7**), if the type of carcinogenic exposure is known for each patient. We plan to investigate the validity of these models in these patients.

Other mechanisms leading to the generation of the somatic cancer mutations that fit the NNUPURI motif are also possible, such as aberrant mismatch repair or base excision repair (BER). In fact, one of the human polymerases that we propose to be involved in this process, pol  $\beta$  (**Table 7**), is essential for short-patch BER<sup>56</sup>. Interestingly, Pol  $\beta$ - mouse fibroblasts do not show the high amounts of A:T to G:C transitions seen in Pol  $\beta$ + cells, following benzo[ $\alpha$ ]pyrene treatment<sup>48</sup>, suggesting that pol  $\beta$  is responsible for most of these

transitions. Moreover, the fact that the NNUPURI motif is degenerate may indicate the presence of more than one mechanism (e.g. more than one polymerase or type of damage) with distinct DNA sequence requirements. Alignment of more than one specific sequence motifs may result in a degenerate motif. However, not all kinds of DNA damage create mutations that fit the motif. Indeed, most mtDNA mutations in prostate cancer tissue do not fit the NNUPURI motif even with a mismatch allowed (**Supplementary Table 4** online). Moreover, **Supplementary Table 4** online shows that the distribution of the somatic mutations by mutated nucleotide (purine versus pyrimidine; A:T versus C:G; CC or GG doublet versus TT or AA doublet) is different between the mutations that fit the NNUPURI motif in the HSD3B2 gene and those that fit the motif in the mtDNA. These observations suggest that *a*) most somatic mutations in prostate tumor mtDNA arise through a different mechanism than the one responsible for most somatic mutations in the nuclear prostate tumor DNA, and *b*) even if there is a mechanism that creates the minority of the mtDNA mutations that fit the NNUPURI motif, this mechanism is different than the mechanism that generates the mutations that fit the motif in the nucleus. mtDNA mutations are thought to result mostly through the DNA damage caused by reactive oxygen species<sup>57</sup>, and may even be generated by error prone DNA repair<sup>58</sup>, but only through the action of the sole mtDNA polymerase, pol  $\gamma$ . Thus the type of polymerase(s) and mutagen(s) involved in error prone DNA repair may determine the type and location of the resulting mutations.

In summary, we report here the identification of 71 somatic nucleotide substitutions in three “target” genes in sporadic prostate cancer. Significantly, 79% of these somatic mutations occur in a nine-nucleotide purine-rich (NNUPURI) motif, when one mismatch is

allowed. Additionally, by analyzing the published literature for 19 genes found mutated in breast or prostate cancer tissue, we report that more than 66% of the human somatic mutations found fit the NNUPURI motif with up to one mismatch. These findings suggest that most of these mutations are caused by a specific mechanism. We also found this motif with one allowed mismatch in 88% of the somatic mutations that were previously shown to be induced by error prone DNA repair in the SENCAR mouse skin model<sup>15,16</sup>. All of the associations between the mutations and the presence of the motif are significant. Based on these data we propose that most somatic mutations in human prostate and breast cancer may be the result of error prone DNA repair. In support of this hypothesis, we report many prevalent somatic mutations in the error prone polymerases pol  $\beta$ , pol  $\eta$  and pol  $\kappa$  in these patients. Some of these polymerase mutations are known (or expected) to be functionally important while others change pol  $\eta$  residues associated with XPV (and thus may be involved in carcinogenesis). The existence of a common motif and mutations caused by error prone DNA repair in different kinds of tumors may be of high significance for understanding human cancer etiology and progression.

## METHODS

### **Tumor specimens**

We analyzed 26 patients with prostatic adenocarcinoma. Patients were all of Caucasian background and ranged from 48 to 74 years of age (for further description of the samples see reference 7). These patients underwent radical prostatectomy at the USC/Norris Comprehensive Cancer Center. The prostate tissue samples and peripheral blood were collected from each patient. Tumors were staged according to the TNM (Tumor, Nodes, Metastases) staging system<sup>59</sup>. Local IRB approval was obtained before study initiation.

### **Microdissection and DNA Extraction**

Specimens were formalin fixed, embedded in paraffin, sectioned, and transferred on microscopic slides where they were deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin. Selected populations of carcinoma cells were microdissected and tumor DNA was then extracted from the microdissected cells using a method reported by us earlier<sup>60</sup>. As control, normal (constitutional) DNA was extracted either from microdissected normal cells adjacent to the tumor or from peripheral blood leukocytes (or both).

### **Molecular analysis**

#### **PCR**

The entire coding region of the HSD3B2 gene together with the exon-intron splicing junction boundaries, the putative promoter region and the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) were amplified by PCR reactions using sets of primers as previously described<sup>61,62</sup>.

Purified (desalted) oligonucleotides were obtained from IDT (Coralville, IA). Reactions were performed with the polymerases AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) or HotStart Taq (Qiagen, Valencia, CA) with their corresponding PCR buffer. Reactions carried out with HotStart Taq had an additional reagent (5X Q-solution) provided by the manufacturer. The reaction mixture consisted of 10-20ng of DNA, 1X PCR buffer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM dNTPs, 0.1-0.2μM of each forward and reverse primer, 1X Q-solution (when necessary), 2.5 units of polymerase and sterile water, in a final volume of 50μl. The reaction was then covered with mineral oil and subjected to thermal cycling in a RoboCycler Gradient 40 (Stratagene, La Jolla, CA) under the following conditions: an initial pre-PCR heat step of 95°C for 2 min (AmpliTaq Gold) or 15 min (HotStart Taq), 50 cycles of denaturation at 95°C for 1.5 min, annealing at 58-70°C for 1.5 min, and elongation at 72°C for 1.5 min. This was followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) and then sequenced.

Exons 7-8 of the HPRT gene were PCR amplified as a single 379 bp fragment as described above, except that we used primers described elsewhere<sup>14</sup>. Sequencing analysis of the HPRT gene was performed as follows.

Analysis of the SRD5A2 gene is described in reference 8.



The error prone polymerase genes pol  $\beta$ , pol  $\eta$  and pol  $\kappa$  were PCR amplified as described above, except that we used the primers shown on **Supplementary Table 5** online. Sequencing analysis was performed as follows.

### **Sequencing**

Sequencing reactions consisted of 20–60 ng of the purified PCR product, 3.2 pmol of each PCR primer, 4  $\mu$ l of 5X sequencing reaction buffer (ABI), 4  $\mu$ l of ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), and sterile water in a total volume of 20  $\mu$ l. Reactions were submitted to the following thermal cycle: 96°C for 30 s, 50°C for 15 s, and 60°C for 4 min for a total of 30 cycles. The resulted sequences were purified according to the manufacturer's recommendations prior to loading on a polyacrylamide gel and then submitted to electrophoresis. Nucleotide sequences were collected on either an ABI PRISM 377 or a 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Results were processed with the ABI PRISM Sequence Navigator software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide substitutions were identified and quantitated by ABI PRISM Factura Feature Identification software with “identify heterozygote limit” set at 10% (Applied Biosystems, Foster City, CA). This level of detection approximates the sensitivity of the DNA sequencing reaction and allowed us to detect substitutions present in at least 10% of the total tumor DNA targets.

### **Mutation confirmation (SNaPshot/ SSCP)**

Each nucleotide substitution was confirmed by at least three independent PCR-sequencing analyses. All nucleotide substitutions that led to an amino acid change were further confirmed by two independent techniques, namely SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) and SNaPshot<sup>TM</sup> analysis (a single-base primer extension genotyping method). For SSCP analysis, each amplicon harboring a nucleotide substitution was reamplified from tumor DNA by PCR reactions as above except that one primer was radiolabeled with  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP by T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA). Electrophoresis was carried out at room temperature with 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer; others parameters, including current and duration of electrophoresis, were varied to allow the detection of all missense mutations. Therefore, five distinct gel conditions were used, as following: (i) 10% acrylamide gel with 10% glycerol, at 45W for 3 h; (ii) 10% acrylamide with 10% glycerol, at 15W for 20 h; (iii) 10% acrylamide with 5% glycerol, at 12W for 15 h; (iv) 10% acrylamide without glycerol, 1X TBE buffer with 5% glycerol, at 8W for 17 h; and (v) MDE gel (BMA, Rockland, ME) without glycerol, 1X TBE buffer with 5% glycerol, at 7W for 16 h. After electrophoresis, gels were dried and exposed to X-ray films overnight at room temperature. Signal intensities of SSCP bands were measured in a STORM 840 phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) using ImageQuant software.

For SNaPshot<sup>TM</sup> reactions, the primer used to analyze each mutation was designed according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reactions consisted of 5  $\mu$ l of SNaPshot<sup>TM</sup> ddNTP Primer Extension Mix (Applied

Biosystems, Foster City, CA), 0.15 pmol of primer, 20-50 ng of purified PCR template, and sterile water in a total volume of 10  $\mu$ l. Reactions were submitted to 25 thermal cycles of 96°C for 10 s, 50°C for 5 s and 60°C for 30 s. The samples were treated with alkaline phosphatase according to the manufacturer's recommendations prior to run on either ABI PRISM 377 or 3100 Automated DNA Sequencer. Genotyping analyzes and quantifications were performed using the Genescan software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### **Microsatellite analysis**

The dinucleotide repeat in intron 3 of the HSD3B2 gene was amplified by PCR using a fluorescent primer. Tumor DNA and its matched normal DNA were amplified by PCR using the set of primers previously described<sup>63</sup>. The forward primer was labeled on the 5' end with the fluorescent dye TET<sup>TM</sup>. In some cases, given the difficulty to amplify this complex repeat from tumor DNA, the alternative reverse primer 5'-TGGACCTATGTTTGTGTGTGG-3' was employed to ensure the PCR amplification of the fragment. PCR reactions performed with this alternative primer yielded fragments 96 bp shorter than those initially described by Verreault *et al*<sup>63</sup>. PCR reactions were performed with HotStart Taq as above described and submitted to the following procedure: initial denaturation step for 15 min at 95°C, 50 cycles with a denaturation step at 95°C for 1 min, annealing at 62°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were loaded on an ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencer together with an internal size standard (Genescan-500<sup>TM</sup> TAMRA; Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's recommendations.

Genotyping analyzes were performed using the Genescan software. Experiments were performed in triplicate.

### **Statistics**

All p-values were calculated using the chi-square test, with the Yates correction when appropriate (for one degree of freedom).

### **Calculation of the actual target of the NNUPURI motif**

For each gene we analyzed the sequence that contained the somatic mutations (usually the sequence that was PCR amplified, except for AR and p53, where we used the cDNA sequence with the addition of short patches of intronic sequence, for the mutations that were in intron- exon boundaries). The analysis was performed using a software program that finds known motifs in DNA sequence imported by the user, called “dna-pattern (strings)” (available at: <http://www.flychip.org.uk/rna-tools/>). We run this program online using both 0 and 1 allowed substitutions from the motif, and analyzed the results.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Myron Goodman for his helpful comments. This work was supported in part by grants from the NCI R01 68581 and P01 CA108964 (project 1) and the DoD 992018 (project A) and 001280 to JKVR.

## REFERENCES

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**:789-799, (2004).
2. Lichtenstein P, *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer - analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343**:78-85, (2000).
3. Reichardt JKV, Makridakis NM, Henderson BE, Yu MC, Pike MC, Ross RK. Genetic variability of the human *SRD5A2* gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res.* **55**:3973-3975, (1995).
4. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Shi C-Y, Yu M, Henderson BE, Reichardt JKV. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase. *Cancer Res.* **57**:1020-1022, (1997).
5. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Henderson BE, Reichardt JKV. A missense substitution in the *SRD5A2* gene is associated with prostate cancer in African-American and Latino men in Los Angeles. *Lancet* **354**:975-978, (1999).
6. Cheng E, Lee C, Aaronson SA, Grayhack J. Endocrinology of the prostate. In: Lepor H, Lawson RE, editors. *Prostate Diseases*. Philadelphia: W.B. Saunders Co. p 57-71, (1993).
7. Akalu A, Elmajian DE, Highshaw RA, Nichols PW, Reichardt JKV. Somatic mutations at the *SRD5A2* locus encoding prostatic steroid 5alpha-reductase during prostate cancer progression. *J. Urol.* **161**:1355-1358, (1999).

8. Makridakis NM, Akalu A, and Reichardt JKV. Identification and Characterization of Somatic Steroid 5 $\alpha$ -Reductase (SRD5A2) Mutations in Human Prostate Cancer Tissue. *Oncogene* **23**:7399-7405, (2004).
9. Labrie F, Simard J, Luu-The V, Belanger A, Pelletier G. Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**:805-826, (1992).
10. Lachance Y, Luu-The V, Verreault H, Dumont M, Rheaume E, Leblanc G, Labrie F. Structure of the human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. *DNA Cell Biol* **10**:701-711, (1991).
11. Devgan SA, Henderson BE, Yu MC, Shi C-Y, Pike MC, Ross RK, Reichardt JKV. Genetic variation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. *Prostate* **33**:9-12, (1997).
12. Zoref, E.; Sperling, O. Increased *de novo* purine synthesis in cultured skin fibroblasts from heterozygotes for the Lesch-Nyhan syndrome: a sensitive marker for carrier detection. *Hum. Hered.* **29**: 64-68, (1979).
13. Pai, G. S.; Sprenkle, J. A.; Do, T. T.; Mareni, C. E.; Migeon, B. R. Localization of loci for hypoxanthine phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **77**: 2810-2813, (1980).
14. Liu SX, Cao J, An H. Molecular analysis of Tripterygium hypoglaucum (level) Hutch-induced mutations at the HPRT locus in human promyelocytic leukemia cells by multiplex polymerase chain reaction. *Mutagenesis* **18**:77-80, (2003).

15. Chakravarti D, Mailander PC, Cavalieri EL, Rogan EG. Evidence that error-prone DNA repair converts dibenzo[*a,l*]pyrene-induced depurinating lesions into mutations: formation, clonal proliferation and regression of initiated cells carrying H-*ras* oncogene mutations in early preneoplasia. *Mutat. Res.* **456**:17-32, (2000).
16. Chakravarti D, Mailander PC, Li KM, Higginbotham S, Zhang HL, Gross ML, Meza JL, Cavalieri EL, Rogan EG. Evidence that a burst of DNA depurination in SENCAR mouse skin induces error-prone repair and forms mutations in the H-*ras* gene. *Oncogene* **20**:7945-7953, (2001).
17. Stevens P, *et al.* A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat. Genet.* **37**:590-2, (2005).
18. Chi SG, deVere White RW, Meyers FJ, Siders DB, Lee F, Gumerlock PH. p53 in prostate cancer: frequent expressed transition mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**:926-933, (1994).
19. Pesche S, Latil A, Muzeau F, Cussenot O, Fournier G, Longy M, Eng C, Lidereau R. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* **16**:2879-2883, (1998).
20. Staalesen V, Falck J, Geisler S, Bartkova J, Borresen-Dale AL, Lukas J, Lillehaug JR, Bartek J, Lonning PE. Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer. *Oncogene* **23**:8535-8544, (2004).
21. Usary, J *et al.* Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene.* **23**:7669-7678, (2004).

22. Fuja TJ, Lin F, Osann KE, Bryant PJ. Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. *Cancer Res.* **64**:942-51, (2004).
23. Sutherland KD, Visvader JE, Choong DY, Sum EY, Lindeman GJ, Campbell IG. Mutational analysis of the LMO4 gene, encoding a BRCA1-interacting protein, in breast carcinomas. *Int. J. Cancer.* **107**:155-158, (2003).
24. Sullivan, A *et al.* Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* **21**: 1316-1324, (2002).
25. Becker KF, Reich U, Schott C, Becker I, Berx G, van Roy F, Hofler H. Identification of eleven novel tumor-associated E-cadherin mutations. Mutations in brief no. 215. Online. *Hum. Mutat.* **13**:171, (1999).
26. Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* **13**:1919-1925, (1996).
27. Lancaster, JM *et al.* BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat. Genet.* **13**: 238-240, (1996).
28. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat. Genet.* **32**:355-357, (2002).
29. Thorlacius S, Borresen AL, Eyfjord JE. Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: a prognostic factor. *Cancer Res.* **53**:1637-1641, (1993).
30. Sato T, Sakamoto T, Takita K, Saito H, Okui K, Nakamura Y. The human prohibitin



- (PHB) gene family and its somatic mutations in human tumors. *Genomics* **17**:762-764, (1993).
31. Sato T, Saito H, Swensen J, Olifant A, Wood C, Danner D, Sakamoto T, Takita K, Kasumi F, Miki Y. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* **52**:1643-1646, (1992).
  32. Chen JZ, Gokden N, Greene GF, Mukunyadzi P, Kadlubar FF. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res.* **62**:6470-6474, 2002.
  33. McGregor WG, Chen RH, Lukash L, Maher VM, McCormick JJ. Cell cycle-dependent strand bias for UV-induced mutations in the transcribed strand of excision repair-proficient human fibroblasts but not in repair-deficient cells. *Mol. Cell Biol.* **11**:1927-1934, (1991).
  34. Lukash LL, Boldt J, Pegg AE, Dolan ME, Maher VM, McCormick JJ. Effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Mutat. Res.* **250**: 397-409, (1991).
  35. Yang JL, Hu MC, Wu CW. Novel mutational spectrum induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the coding region of the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase gene in diploid human fibroblasts. *J. Mol. Biol.* **221**:421-430, (1991).
  36. Bronstein SM, Cochrane JE, Craft TR, Swenberg JA, Skopek TR. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. *Cancer Res.* **51**:5188-5197, (1991).
  37. Gibbs, R. A.; Nguyen, P.-N.; Edwards, A.; Civitello, A. B.; Caskey, C. T. : Multiplex

- DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics* **7**:235-244, (1990).
38. Kornberg A and Baker TA. *DNA Replication*, 2<sup>nd</sup> ed. San Francisco: Freeman. 1992.
  39. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **30**:81-99, (2001).
  40. Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum. Mutat.* **23**:527-533, (2004).
  41. Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:17-50, (2002).
  42. Pages V, Fuchs RP. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* **21**: 8957-8966, (2002).
  43. Kunkel TA. Considering the cancer consequences of altered DNA polymerase function. *Cancer Cell.* **3**:105-110, (2003).
  44. Johnson RE, Kondratik CM, Prakash S, Prakash L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* **285**:263-265, (1999).
  45. Beard WA, Shock DD, Yang XP, DeLauder SF, Wilson SH. Loss of DNA polymerase beta stacking interactions with templating purines, but not pyrimidines, alters catalytic efficiency and fidelity. *J. Biol. Chem.* **277**:8235-8242, (2002).
  46. Wei D, Maher VM, McCormick JJ. Site-specific rates of excision repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene of human fibroblasts: correlation with mutation spectra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**:2204-2208, (1995).
  47. Meehan T, Straub K, Calvin M. Benzo[alpha]pyrene diol epoxide covalently binds to deoxyguanosine and deoxyadenosine in DNA. *Nature* **269**:725-727, (1977).

48. Venugopal V, Mailander PC, Chakravarti D. The role of DNA polymerase  $\eta$  in inducing cytotoxicity and mutations in dibenzo[*a,l*]pyrene-treated mouse fibroblasts. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **46**:3059, (2005).
49. Ogi T, Shinkai Y, Tanaka K, Ohmori H. Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[*a*]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**:15548-15553, (2002).
50. Akiyama N, Alexander D, Aoki Y, Noda M. Characterization of mutations induced by 300 and 320 nm UV radiation in a rat fibroblast cell line. *Mutat. Res.* **372**:119-131, (1996).
51. Yu SL, Johnson RE, Prakash S, Prakash L. Requirement of DNA polymerase eta for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts. *Mol. Cell Biol.* **21**:185-188, (2001).
52. Prakash L, Sherman F. Mutagenic specificity: reversion of iso-1-cytochrome c mutants of yeast. *J. Mol. Biol.* **79**:65-82, (1973).
53. Sobol RW, Wilson SH. Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**:57-74, (2001).
54. Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *EMBO J.* **19**:3100-3109, (2000).
55. Haracska L, Yu SL, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta. *Nat. Genet.* **25**:458-461, (2000).
56. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:39-85, (2004).

57. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol. Cancer* **1**:9, (2002).
58. Copeland WC, Ponamarev MV, Nguyen D, Kunkel TA, Longley MJ. Mutations in DNA polymerase gamma cause error prone DNA synthesis in human mitochondrial disorders. *Acta Biochim. Pol.* **50**:155-167, (2003).
59. Schroder FH, Hermanek P, Denis L, Fair DR, Gospodarowicz MK, Pavone-Maculaso M. The TNM classification of prostate cancer. *Prostate* **4**:129-138, (1992).
60. Akalu A, Reichardt JKV. A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue. *Genet. Anal.: Biomolec. Engin.* **15**:299-233, (1999).
61. Rheume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, New MI, Labrie F. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat. Genet.* **1**:239-245, (1992).
62. Simard J, *et al.* Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol. Endocrinol.* **7**:716-728, (1993).
63. Verreault H, Dufort I, Simard J, Labrie F, Luu-The V. Dinucleotide repeat polymorphisms in the *HSD3B2* gene. *Hum. Mol. Genet.* **3**:384, (1994).
64. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics - 2005. *CA Cancer J. Clin.* **55**:10-30, (2005).
65. Hamid S and Eckert KA. Chemotherapeutic nucleoside analogues and DNA polymerase  $\beta$ . *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **46**:1369, (2005).
66. Dobashi Y, Shuin T, Tsuruga H, Uemura H, Torigoe S, Kubota Y. DNA polymerase beta gene mutation in human prostate cancer. *Cancer Res.* **54**: 2827-2829, (1994).
67. Pelletier H, Sawaya MR, Wolfle W, Wilson SH, and Kraut J. Crystal structures of

- human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry* **35**: 12742-12761, (1996).
68. Sawaya MR, Prasad R, Wilson SH, Kraut J, and Pelletier H. Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry* **36**: 11205-11215, (1997).
69. Bose-Basu B, DeRose EF, Kirby TW, Mueller GA, Beard WA, Wilson SH, London RE. Dynamic characterization of a DNA repair enzyme: NMR studies of [methyl-13C] methionine-labeled DNA polymerase  $\beta$ . *Biochemistry* **43**:8911-8922, (2004).
70. Dalal S, Hile S, Eckert KA, Sun KW, Starcevic D, Sweasy JB. Prostate-cancer-associated I260M variant of DNA polymerase beta is a sequence-specific mutator. *Biochemistry* **44**:15664-15673, (2005).
71. Dalal S, Kosa JL, and Sweasy JB. The D246V mutant of DNA polymerase beta misincorporates nucleotides: evidence for a role for the flexible loop in DNA positioning within the active site. *J. Biol. Chem.* **279**:577-84, (2004).
72. Boudsocq F, Ling H, Yang W, and Woodgate R. Structure-based interpretation of missense mutations in Y-family DNA polymerases and their implications for polymerase function and lesion bypass. *DNA Repair (Amst)* **1**:343-58, (2002).
73. Broughton BC, *et al.* Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**:815-820, (2002).

**Table 1.** Somatic nucleotide substitutions in the HPRT gene.

Patient	DNA change	Type of change/ location	Mutant nucleotide (%)		<i>Sequence context</i>			
			Forward	Reverse				
<b>1</b>	39835C>T*	P169S	15	25	gTG	<b>GGG</b>	<u>TC</u>	CTT
	39897C>T	Intronic	22	15	AGA <u>T</u>	<b>GGt</b>	<u>TA</u>	AAT
	39985T>C	Intronic	34	25	AGA <u>TT</u>	<b>tAA</b>		AAG
	40051C>T*	P184S	19	34	TGt <u>CT</u>	<b>GGA</b>		ATT
<b>4</b>	39835C>T*	P169S	19	29	gTG	<b>GGG</b>	<u>TC</u>	CTT
	40051C>T*	P184S	23	34	TGt <u>CT</u>	<b>GGA</b>		ATT
<b>6</b>	39835C>T*	P169S	14	24	gTG	<b>GGG</b>	<u>TC</u>	CTT
	40051C>T*	P184S	21	32	TGt <u>CT</u>	<b>GGA</b>		ATT
<b>11</b>	40055A>G	D185G	28	35	TTC <u>C</u>	<b>AGA</b>	<u>C</u>	AAG
	40073A>G	Y191C	28	20	gGA <u>I</u>	<b>AtG</b>	<u>CC</u>	CTT
	40091A>G	E197G	29	22	ATG	<b>AAt</b>	<u>A</u>	CTT
<b>12</b>	39959A>G	Intronic	32	38	TTG <u>T</u>	<b>AGA</b>		GAG
<b>16</b>	39890A>G*	Intronic	33	32	TTA <u>A</u>	<b>AtG</b>		ATT
	40086T>C	Y195Y	44	41	TGA <u>CT</u>	<b>AtA</b>		ATG
<b>20</b>	39929G>A	Intronic	18	19	TGA <u>AA</u>	<b>tGG</b>		CTT
	40000C>T*	Intronic	38	42	ATA	<b>AAG</b>		AAa
<b>21</b>	39859G>A	D177N	81	69	AGC <u>C</u>	<b>AGA</b>		CTG
	39939G>T	Intronic	50	66	ATA <u>A</u>	<b>tGG</b>		CTT
	40011T>C	Intronic	37	30	ATC <u>TA</u>	<b>AAt</b>		GAT
<b>27</b>	39907C>T*	Intronic	65	89	TTA	<b>GGt</b>	<u>TA</u>	AAG
	39971G>T*	Intronic	23	33	TGG	<b>cAA</b>		ATG

The HPRT nucleotide changes are numbered according to the genomic reference sequence (Genbank: M26434). In the *Sequence context* column, the nucleotide sequence is displayed using the DNA strand that rendered the best fit to the NNUPURI motif. Asterisks indicate mutations that fit the motif only in the non-transcribed strand (the rest of the mutations fit the motif in the transcribed strand). The mutated base is indicated in bold. Lower-case letters indicates mismatches within the consensus motif. The spacer nucleotides (up to 2) are underlined. Sequence contexts that conform to the motif are shaded. The mutant peak intensity is reported as percentage of total peak intensity.

**Table 2.** Sequence context of the 30 somatic substitutions in the HSD3B2 gene that conform to the NNUPURI motif.

Exact match with motif				One mismatch with motif							
Mutation ID	Sequence			Mutation ID	Sequence						
1153G>A	TTC	<u>T</u>	<b>GGA</b>	<u>G</u>	GAG	1443G>A	TTC	<u>T</u>	<b>GGG</b>	<u>T</u>	CAC
1097G>A	TTC	<u>CT</u>	<b>GGG</b>		AAG	1454A>G	cTA	<b>GAA</b>	<u>T</u>	CAG	
7996C>G*	TTG	<u>T</u>	<b>AGG</b>	<u>A</u>	GTT	1485C>T*	TGC	<u>CA</u>	<b>GGA</b>		AAc
8006A>G	AGG		<b>AAA</b>	<u>T</u>	CAT	1494T>C*	AGG	<u>AA</u>	<b>AcA</b>		CTT
8089G>A	AGA		<b>AGG</b>		CTG	1538T>C*	TcA	<u>C</u>	<b>AAG</b>	<u>G</u>	CAG
8174G>A	TGG		<b>GGA</b>	<u>AG</u>	GAG	1551A>G	AGC		<b>AGG</b>		AgG
8209G>A	ATG		<b>AGG</b>	<u>CC</u>	CTG	1566T>C	TTC	<u>TG</u>	<b>GGt</b>		CAG
8595A>G	AGA		<b>AGG</b>	<u>CT</u>	CAG	1571G>A	TcA		<b>GAG</b>		GAT
8774C>T*	TGG	<u>GT</u>	<b>GGA</b>		GTT	1576G>A*	AGG	<u>CG</u>	<b>GAc</b>		GAT
<b>MOTIF:</b>	WKV	<u>n</u>	<b>RRR</b>	<u>n</u>	VWK	1660delT*	TaG		<b>AAA</b>		ATT
						1671A>G	AGt		<b>AAA</b>		CTT
						5635T>C*	AcC		<b>AAA</b>	<u>GA</u>	CAT
						7939A>G	TcC		<b>AAG</b>	<u>C</u>	CAG
						7973A>G	AGC		<b>AtA</b>		GAG
						8016A>G	ATC	<u>CA</u>	<b>GAA</b>		CgG
						8043A>G	TGG	<u>A</u>	<b>AAA</b>		CAC
						7943A>T	AGC		<b>cAG</b>	<u>T</u>	GTG
						8391A>G*	ATC		<b>AtA</b>	<u>G</u>	CTT
						8443C>T*	ATC	<u>T</u>	<b>GGA</b>		ATc
						8577T>C*	AGG	<u>T</u>	<b>GAA</b>		CAC
						8738G>A	AGA	<u>T</u>	<b>GtG</b>		CAT
						<b>MOTIF:</b>	WKV	<u>n</u>	<b>RRR</b>	<u>n</u>	VWK

The nucleotide sequence is displayed using the DNA strand that rendered the best fit to the motif. Asterisks indicate mutations that fit the motif only in the non-transcribed strand (the rest of the mutations fit the motif in the transcribed strand). The mutated base is indicated in bold. Lower-case letters indicates mismatches within the consensus motif. The spacer nucleotides (up to 2 total) are underlined. HSD3B2 DNA changes are numbered according to the genomic reference sequence (Genbank M77144.1).

**Table 3.** Sequence context of the 11 somatic substitutions in the SRD5A2 gene that conform to the NNUPURI motif.

Mutation ID	Sequence context
G750A	TGC AGG TT CAG
G929A	TTC GcG GTG
T1294C*	AGA <b>AGG</b> CAG
T1908C*	TcC <u>AG</u> <b>AAA</b> CAT
G1914A	cTG <b>GAG</b> <u>CC</u> AAT
C1927T*	AcC <b>GAG</b> <u>GA</u> AAT
T1996C*	AGA <b>AAA</b> ATG
T2004C*	Aça <b>AAG</b> <u>T</u> GAG
G2059A	ATA <u>A</u> <b>AAG</b> CGG
C2247T*	TTG <b>AGG</b> tAG
C2285T*	ATA <u>A</u> <b>GGG</b> CTT
<b>MOTIF:</b>	WKV <u>n</u> <b>RRR</b> <u>n</u> VWK

The somatic SRD5A2 mutations shown here were first reported in reference 8. SRD5A2 nucleotide changes are numbered according to the genomic reference sequence (Genbank: L03843.1). Refer to the legend of Table 2 for further explanations.

**Table 4.** Sites of *H-ras* mutations induced after benzo[ $\alpha$ ]pyrene treatment in the SENCAR mouse skin model conform to the NNUPURI motif.

Sequence	Mutation (nucleotide number)
TGG <b>AGG</b> <u>C</u> GTG	C (37)
TGt <b>GGA</b> <u>C</u> GAG	G (89)
TGA <u>CC</u> <b>AAA</b> CAG	G (169)
TGG <b>GGt</b> <u>AT</u> GAT	C (200)
TGC <b>AAG</b> <u>G</u> GTG	G (228)
TGC <u>A</u> <b>AAA</b> CAa	G* (314)
TGC <b>AGG</b> AcT	C (320)
gGG <b>GAG</b> <u>A</u> CAT	G (355)
AGt <b>AAG</b> CAT	C* (364)
AGA Gt <b>A</b> <u>TA</u> GTG	G (400)
ATC <b>AAc</b> AAc	G (463)
WKV <u>n</u> <b>RRR</b> <u>n</u> VWK	<b>MOTIF</b>

Data were obtained from Figure 8 of reference 15. Refer to the legend of Table 2 for further explanations.



**Table 5.** Somatic mutations detected in polymerase genes in prostate cancer patients.

Gene (accession #)	Patient	DNA change	Type of Change/ location	Mutant peak (%)	Predicted/ known effect
<b>Pol β</b> (AF491812.1)	1	23912G>A	AG-splice junction	59 %	Deletion of amino acids 184-185
	2	25254G>A	E216K	52 %	-
	4	960C>T	5'-UTR	52 %	-
		18145T>C	N128N	54%	-
	5	32481C>T	P261L	100 %	Altered fidelity
		32573A>G	T292A	100 %	Altered fidelity
		32592T>C	I298T	100 %	-
		32439G>A*	Intron 12	79 %	-
	8	11628T>C	Intron 3	27 %	-
	10	25314A>T	M236L	38 %	Altered fidelity
	11	15180G>A	E123K	100%	-
	12	1444G>C	K27N	60 %	-
	13	25236C>T	L210L	42 %	-
		31911C>G**	P242R	40 %	Altered fidelity
	15	921C>T	Promoter	100 %	-
	20	25302G>A	E232K	100 %	-
	23	12622A>G	AG-splice junction	25 %	Deletion of amino acids 88-90
	24	11630T>C	Intron 3	30 %	-
	29	32521G>T	G274G	35 %	-
	30	32467T>C	Intron 12	51 %	-
32439G>A*		Intron 12	100 %	-	
<b>Pol η</b> (AY388614.1)	1	28891G>A	G259R	23 %	-
	6	29021A>T	Intron 7	46 %	-
	20	28901G>C	G263A	60 %	XPV
		28967C>T	S284F	66 %	-
<b>Pol κ</b> (AY273797.1)	12	67088C>A	T205K	28 %	-
	21	66992A>G	Intron 5	68 %	Changes Lariat-A
	27	67088C>T	T205I	30 %	-

\* Creates a new branch (Lariat-A) site

\*\* Also in constitutional DNA (rs3136797)

Notes: For both mutations that change the invariant splice junction (AG), an in-frame AG exists shortly downstream. Utilization of the alternative AG is predicted to result in the deletions shown in the last column. XPV denotes a pol η residue mutated in an XPV patient. For further details, see text.

**Table 6.** Patients with somatic nucleotide substitutions in all “target” genes analyzed (HSD3B2, SRD5A2 and HPRT genes).

Patient	Gene	DNA change	Sequence context
1	HPRT	39835C>T*	gTG <b>G</b> GG <u>TC</u> CTT
		39897C>T	AGA <u>T</u> <b>G</b> Gt <u>TA</u> AAT
		39985T>C	AGA <u>TT</u> <b>t</b> AA AAG
		40051C>T*	TGt <u>CT</u> <b>G</b> GA ATT
	SRD5A2	888G>A	TGC <u>C</u> <b>AG</b> c CcG
		1890G>A	AcA <b>AGG</b> TGG CTT
	HSD3B2	8774C>T*	TGG <u>GT</u> <b>G</b> GA GTT
	Pol β	23912G>A	ATC <u>A</u> <b>c</b> AG GTG
	Pol η	28891G>A	GTC <u>TT</u> <b>G</b> GA <u>G</u> GAA
6	HPRT	39835C>T*	gTG <b>G</b> GG <u>TC</u> CTT
		40051C>T*	TGt <u>CT</u> <b>G</b> GA ATT
	SRD5A2	888G>A	TGC <u>C</u> <b>AG</b> c CcG
		1294T>C*	AGA <b>AGG</b> CAG
	HSD3B2	1551A>G	AGC <b>AGG</b> AgG
		1571G>A	TcA <b>GAG</b> GAT
		1622T>C	TcC <b>AAG</b> <u>GCC</u> CTG
		1671A>G	AGt <b>AAA</b> CTT
	Pol η	29021A>T	TTT <u>TT</u> <b>AAA</b> ATC
11	HPRT	40055A>G	TTC <u>C</u> <b>AGA</b> <u>C</u> AAG
		40073A>G	gGA <u>T</u> <b>At</b> G <u>CC</u> CTT
		40091A>G	ATG <b>AAt</b> <u>A</u> CTT
	SRD5A2	2019T>C	cGC <b>AG</b> c <u>CC</u> AAG
	HSD3B2	8089G>A	AGA <b>AGG</b> CTG
		8174G>A	TGG <b>GGA</b> AG GAG
Pol β	15180G>A	cTA <b>GAA</b> <u>G</u> GTG	
21	HPRT	39859G>A	AGC <u>C</u> <b>AGA</b> CTG
		39939T>G	AGC <b>AAt</b> <u>TAT</u> AAG
		40011T>C	ATC <u>TA</u> <b>AA</b> t GAT
	SRD5A2	888G>A	TGC <u>C</u> <b>AG</b> c CcG
		1914G>A	cTG <b>GAG</b> <u>CC</u> AAT
		1927C>T*	AcC <b>GAG</b> <u>GA</u> AAT
	HSD3B2	8006A>G	AGG <b>AAA</b> <u>T</u> CAT
		8577T>C*	AGG <u>T</u> <b>GAA</b> CAc
	Pol κ	66992A>G	ATT <u>T</u> <b>AAA</b> CTT

Refer to Tables 1, 2 and 3 for legends. Polymerase mutations are shown in different font. Sequence contexts that conform to the NNUPURI motif are shaded.

**Table 7:** Models for the potential etiology of the observed somatic mutation motifs.

DNA sequence motif/ Type of mutation		Potential mutagen involved in DNA damage	Potential polymerase involved in DNA damage repair and/or mutation generation
WKV <u>n</u> RRR <u>n</u> VWK	<b>RR</b> on the strand that fits the motif	PAH <sup>47</sup> Cisplatin <sup>54</sup> AAF-dG 8-oxo-dG	*pol $\beta$ <sup>48</sup> / pol $\kappa$ <sup>49</sup> pol $\eta$ <sup>54</sup> pol $\eta$ <sup>54</sup> pol $\eta$ <sup>□5</sup>
	<b>YY</b> on the other strand	UV radiation <sup>50</sup>	pol $\eta$ <sup>51</sup>
Transition		Alkylating agent <sup>52</sup>	EP polymerase (e.g. pol $\beta$ <sup>53</sup> )

\*The choice of the polymerase involved may depend on the type of the PAH adduct that is present (depurinating or stable).

Notes: These models involve the action of a specific environmental mutagen acting in conjunction with an error prone polymerase to cause specific kinds of mutations (or at specific sites). Pol  $\beta$  is not a “classic” error prone polymerase, yet it causes 67-times more substitution errors than mammalian pol  $\delta$ <sup>43</sup>. The models presented in this table are not mutually exclusive (e.g. a transition may also occur in the WKVnRRRnVWK motif). Bold letters indicate the potential sites of the altered nucleotide. For further details see text. Key: PAH= polyaromatic hydrocarbons (e.g. benzo[ $\alpha$ ]pyrene), AAF-dG= acetylaminofluorene-deoxyguanosine, 8-oxo-dG= 8-oxo- deoxyguanosine, EP= error prone, UV= ultraviolet.

**Supplementary Table 1.** Patient information and somatic alterations in the HSD3B2 gene.

<b>Patient ID</b>	<b>Age</b>	<b>Tumor stage</b>	<b>MSI/LOH</b>	<b>DNA change</b>	<b>Type of change / location</b>
<b>1</b>	58	pT3a	MSI	8774C>T	3'-UTR
<b>2</b>	58	pT3c	N	5635T>C 8043A>G	F88S N148S
<b>3</b>	71	pT2c	n/a	-	-
<b>4</b>	48	pT4	n/a	-	-
<b>5</b>	51	pT3a	N	1566T>C	G15G
<b>6</b>	59	pT2c	MSI	1551A>G 1571G>A 1622T>C 1671A>G	A10A R17K L34S Intronic
<b>7</b>	65	pT3a	n/a	1566T>C	G15G
<b>8</b>	-	-	MSI	7973A>G 8016A>G	I125V N139S
<b>10</b>	57	pT3c	MSI	1576G>A 8443C>T	V19I S281S
<b>11</b>	68	pT3a	N	8089G>A 8174G>A	K163K E192K
<b>12</b>	69	pT3a	N	7924G>A 8209G>A	L108L E203E
<b>13</b>	72	pT3c	LOH	8054A>G	T152A
<b>14</b>	49	pT2c	MSI	1454A>G 1494T>C	5'-UTR 5'-UTR
<b>15</b>	59	pT3a	MSI	8096C>G 8656C>T	S132S T352T
<b>16</b>	63	pT2c	n/a	1410A>G 1443G>A 1660delT 8595A>G	Intronic 5'-UTR S47fsX173 K332R
<b>17</b>	80	pT2c	N	1153G>A	Promoter
<b>19</b>	56	pT2a	MSI	-	-
<b>20</b>	71	pT2c	MSI	8391A>G	Y264C
<b>21</b>	67	pT3a	MSI	8006A>G 8577T>C	I136V F326S
<b>23</b>	70	pT3c	n/a	7943A>T	S115C
<b>24</b>	64	pT2c	n/a	-	-
<b>25</b>	74	pT2b	LOH	7939A>G 8670G>A 8738G>A	Q113Q G357D 3'-UTR
<b>26</b>	67	pT3c	LOH	-	-
<b>27</b>	58	pT3a	N	1485C>T 1538T>C 8675C>T	5'-UTR Leu6Pro L359F
<b>29</b>	62	pT3a	MSI	8461A>T 8577T>C 1097G>A	L287F F326S Promoter
<b>30</b>	61	pT2c	MSI	1566T>C	G15G

Tumor staging was carried out according to the TNM system. Somatic alterations in the third intron microsatellite are listed as LOH, MSI, N (normal) or n/a (not available). HSD3B2 DNA changes are numbered according to the genomic reference sequence (Genbank M77144.1).

**Supplementary Table 2.** Mutant allele quantitation of all 18 missense HSD3B2 substitutions.

Missense substitutions	Mutant nucleotide peak (%)			
	Forward sequence	Reverse sequence	SNaPshot <sup>TM</sup>	SSCP
<b>L6P</b>	21	30	18	29
<b>R17K</b>	100	100	100	CH
<b>V19I</b>	45	21	39	60
<b>L34S</b>	100	100	100	CH
<b>F88S</b>	26	34	26	53
<b>S115C</b>	38	13	18	14
<b>I125V</b>	37	31	25	36
<b>I136V</b>	50	60	50	50
<b>N139S</b>	44	56	46	58
<b>N148S</b>	31	38	38	43
<b>T152A</b>	100	100	76	50
<b>E192K</b>	16	30	26	7
<b>Y264C</b>	40	31	46	39
<b>L287F</b>	55	51	51	53
<b>F326S</b>				
patient 21	63	60	61	60
patient 29	30	40	31	37
<b>K332R</b>	27	29	42	25
<b>G357D</b>	34	24	34	33
<b>L359F</b>	23	17	30	29

The results are reported as the mutant peak intensity in % of total peak intensity. In the SSCP results, CH stands for Compound Heterozygote (quantitation was not possible in this case because the PCR fragment contained multiple mutations resulting in many band shifts, and mutation to band assignment could not be performed).

**Supplementary Table 3.** Somatic breast cancer mutations found in the literature fit the NNUPURI motif.

GENE	MUTATION ID	FIT WITH MOTIF			
<b>CHEK2</b>	S49P*	gGC	<u>T</u>	GGA	GTT
	S62S*	cTC	<u>T</u>	AAG	GAG
	E79G			No fit	
	D82A	TGA		GGA	<u>CC</u> AAG
	R132T	AaA		GAA	CAG
	P152S*	TTA		GGA	<u>CC</u> CAc
	I157T*	TGC		AA <u>t</u>	<u>GT</u> AAG
	T378S*	AGA	<u>G</u>	AGG	<u>T</u> CTc
	375insG	TTt	<u>T</u>	GGG	<u>A</u> GAG
	456insA	TcA		GAG	<u>A</u> AAG
	<b>CSNK1E</b>	I29T*	AGG	<u>C</u>	GA <u>t</u>
A36G*		ATG		G <u>c</u> G	<u>A</u> CTT
L39Q		AGC		<u>t</u> GG	<u>A</u> GTG
L49Q*		ATG	<u>T</u>	G <u>c</u> A	<u>G</u> CTG
E52K		ATC		GAG	<u>AG</u> CAa
G64A		AGt		GGG	GAT
G72A		TGC		GGA	<u>G</u> CTG
A73V				No fit	
E74X		AGC	<u>T</u>	GAG	<u>G</u> GcG
N78T				No fit	
S101R*		TTG		AGG	CTG
<b>GATA3</b>	L344F (BR00-0587)			No fit	
	R367L (UII-011)	AaC	<u>C</u>	GAA	<u>A</u> AAT
	R367X* (BR99-0348)	TTC		GG <u>t</u>	<u>TT</u> CTG
<b>LMO4</b>	79insG (LIM1 <sup>mut</sup> )	TTA		GG <u>t</u>	AAG
<b>E-CAD</b>	153delG	AGA		AGA	GAG
	263insA*	TGG		G <u>t</u> G	<u>A</u> ATT
	289delCG	cGC		GGA	<u>C</u> GAT
	Intron7-1delAG	TGC		AGA	GTT
	368insA			No fit	
	379insG*	TTA	<u>CC</u>	G <u>t</u> G	GTG
	408delG	AGC		G <u>t</u> G	<u>G</u> GAG
	522insGT	ATA		A <u>c</u> G	<u>TA</u> AGT
	615delT	ATC		AA <u>t</u>	GAT
	621delC*	TGG		GAG	<u>G</u> AAG
	631delAC			No fit	
	657delC*	cTA		AGG	<u>C</u> CAT
	677delC	AGA	<u>C</u>	cAA	GTG
	W20X*	AGC		cAA	GAG

	Q23X	TGC		<b>c</b> AG	GAG
	Intron4-1G>T	TTC		AGA <u>T</u>	CAa
	R335X	TGG	<u>AC</u>	<b>c</b> GA	GAG
	Q346X			No fit	
	Intron15-1G>A	TTA		<b>G</b> AA <u>T</u>	CTG
<b>DLG1</b>	G338R	GTG	<u>TT</u>	<b>G</b> GA	AAT
	Q340X			No fit	
	I348V			No fit	
	Y349S	TTA	<u>C</u>	<b>A</b> tA	GAT
	K352R	AcC		<b>AAA</b> <u>AT</u>	AAT
	K352E	AcC		<b>AAA</b> <u>AT</u>	AAT
	G356A	TGA	<u>A</u>	<b>G</b> GA <u>G</u>	GTG
	H360Q			No fit	
	H360N	AGC		<b>A</b> cA <u>T</u>	AAG
<b>EDD/hHYD</b>	A2411G	TTA	<u>CA</u>	<b>G</b> Gc	ATT
	M2419V			No fit	
	E2422K	TTG	<u>TT</u>	<b>G</b> GA	ATT
	Q2427E*	AGC	<u>T</u>	<b>G</b> AG	CTG
	A2433G	TTC	<u>T</u>	<b>A</b> Gc	AAG
<b>BRCA2</b>	D3095E	AGA		<b>G</b> Ac <u>G</u>	AAT
<b>PTEN</b>	800delA	AaA		<b>AAA</b> <u>G</u>	GTT
	963-968delA	Ac <b>A</b>		<b>AAA</b> <u>A</u>	<b>A</b> TG
	F341V*	TTA		<b>AAA</b> <u>T</u>	tTG
	P354R			No fit	
	Q110X			No fit	
	373-375delA	cTG	<u>T</u>	<b>AAA</b> <u>G</u>	CTG
	IVS2-9T>C			No fit	
	H61D			No fit	
	Intron1+62G>A	AGt		<b>A</b> GA <u>CG</u>	GAT
	Intron4-40delA	TTC	<u>A</u>	<b>A</b> GA	GTT
	I253N			No fit	
	L152P*	ATC	<u>T</u>	<b>A</b> GG <u>G</u>	CcT
	R130P	gGA	<u>C</u>	<b>G</b> AA	CTG
	E106X	TTG	<u>T</u>	<b>G</b> AA	GAT
<b>P53</b>	117insG	TTC	<u>T</u>	<b>G</b> GG <u>A</u>	CAG
	151-152delC*	GGG	<u>C</u>	<b>G</b> GG <u>G</u>	<b>G</b> TG
	182delT			No fit	
	251delT	TGA		<b>G</b> GA <u>T</u>	GgG
	E2Q	ATG		<b>G</b> AG	GAG
	P13S*	AGA		<b>G</b> GG <u>G</u>	GcT
	E56K			No fit	
	A63S	ATG		<b>A</b> AG	CTc
	P98L*	AaG		<b>G</b> GA	CAG
	T102I*	TGG	<u>T</u>	<b>A</b> GG	tTT
	Y126F			No fit	

Q136X	TGC		<b>cAA</b>	CTG
V143M			No fit	
Q144P	TGC		<b>AGc</b> <u>I</u>	GTG
R213S*	gTC		<b>GAA</b>	AAG
Y220H			No fit	
Y163N*	TGC	<u>TT</u>	Gt <b>A</b>	GAT
Y163C*	TGC	<u>TT</u>	G <b>t</b> A	GAT
V173L			No fit	
R175H	TGA	<u>G</u>	Gc <b>G</b>	CTG
P177S*	TGG		<b>GGG</b>	CAG
H179N			No fit	
H179Y			No fit	
S183L*	ATC	<u>I</u>	<b>GAG</b>	CAG
R196Q	ATC		<b>cGA</b>	GTG
Y220C			No fit	
P222A*	AGG	<u>C</u>	<b>GGc</b> <u>I</u>	CAT
M237I			No fit	
S241P*	TGC		<b>AGG</b> <u>AA</u>	CTG
G245D	TGG	<u>G</u>	<b>cGG</b>	CAT
R248W			No fit	
R248Q			No fit	
R249S	cGG		<b>AGG</b> <u>CC</u>	CAT
N263S			No fit	
R273P	AGG	<u>I</u>	Gc <b>G</b> <u>I</u>	GTT
R273C	AGG	<u>I</u>	Gc <b>G</b> <u>I</u>	GTT
R282P			No fit	
E286X	AGA		<b>GGA</b> <u>A</u>	GAG
P316S*	TGG		<b>GGA</b>	GAG
Q317X*	TGG	<u>CT</u>	<b>GGG</b>	GAG
Q317R*	TGG	<u>C</u>	<b>tGG</b> <u>G</u>	GAG
G361V	AGG		<b>GGG</b>	GAG
S367N	TcC		<b>AGG</b>	GTG
<b>PHB</b>	Intron4+10C>T		No fit	
	90-91delCA	ATC	<b>AcA</b>	CTG
	V88A*	TTG	<b>AcA</b> <u>TT</u>	CTG
	R105H*	ATG	<b>cGA</b> <u>GG</u>	AAG
	A214V		No fit	

Notes: Numbers in the *Mutation ID* column indicate codon numbers, except for mutations that are not in the coding sequence. Asterisks indicate mutations that fit the motif only in the non-transcribed strand (the rest of the mutations fit the motif in the transcribed strand). In the *Fit with Motif* column, the nucleotide sequence is displayed using the DNA strand that rendered the best fit to the motif. The mutated base is indicated in bold. Lower-case letters indicate mismatches within the consensus motif. The spacer nucleotides (up to 2) are underlined.



**Supplementary Table 4.** Comparison: HSD3B2 versus mitochondrial DNA somatic alterations in prostate cancer tissue.

<b>Genes</b>	<b>HSD3B2</b>	<b>mtDNA*</b>
<b>Total of somatic mutations</b>	<b>38</b>	<b>34</b>
<b>% of sequences that fit the NNUPURI motif</b>	79% (30/38)	41% (14/34)
<b>Substitutions on purine (TS)</b>	65% (19/29)	29% (4/14)
<b>Substitutions on pyrimidine (TS)</b>	35% (10/29)	71% (10/14)
<b>Substitutions on A or T</b>	55% (16/29)	29% (4/14)
<b>Substitutions on C or G</b>	45% (13/29)	71% (10/14)
<b>Substitutions on duplets</b>	72% (21/29)	57% (8/14)
<b>CC or GG doublets</b>	52% (11/21)	88% (7/8)
<b>TT or AA doublets</b>	48% (10/21)	12% (1/8)
<b>Substitutions on pyrimidine dimers</b>	83% (24/29)	71% (10/14)
<b>YY dimers located at</b>	<b>TS</b> 38% (9/24)	80% (8/10)
	<b>NTS</b> 62% (15/24)	20% (2/10)
<b>NNUPURI motif located at</b>	<b>TS</b> 62% (18/29)	36% (5/14)
	<b>NTS</b> 38% (11/29)	64% (9/14)

\*These mutations were reported in reference 32.

Notes: mtDNA: mitochondrial DNA; TS = transcribed strand; NTS = non-transcribed strand.

**Supplementary Table 5.** Primers used for PCR amplification of the error prone DNA polymerase genes.

<b>POL β</b>	
Exon 1	FORWARD : 5' - CCA GGA CGC GTG ACG TCA C - 3' REVERSE: 5' - GAA GGC AGG GGA AGA GGC TG - 3'
Exon 2	FORWARD: 5' - GCT GCC ATA TCC CCT TCC AG - 3' REVERSE: 5' - GCC ACA CTA AAC AGG GTA TCC - 3'
Exon 3	FORWARD: 5' - GTT ATC TTG GTG AAA GCA TAA GC - 3' REVERSE: 5' - GCA AGT TTG GTT TGG TGG GAA C - 3'
Exon 4	FORWARD: 5' - CTG GGG TTC AAT TTT CTG TGT C - 3' REVERSE: 5' - CTG CAA TGA CGC TAC ATA GTG G - 3'
Exon 5	FORWARD: 5' - CTT CAT GTC TTT TAG CAG ACT GG - 3' REVERSE: 5' - GGC TAA GGT ACA GAG GTG GTG - 3'
Exon 6	FORWARD: 5' - GCA GCT CTT CTT ACT ATT AAG ACA TGG - 3' REVERSE: 5' - CAA GTT GAA GTT TGT TAG AGC AC - 3'
Exon 7	FORWARD: 5' - GTA TTT GTT CCC CAG GTG GTT C - 3' REVERSE: 5' - GGT TTA GCT AAG TTT GAA GAG TC - 3'
Exon 8-9	FORWARD: 5' - CAC GGA CAA TTG TTA TAA AAG GC - 3' REVERSE: 5' - CAA ATT CTT CCC ATA TAT TAG GC - 3'
Exon 10	FORWARD: 5' - CAT CAG CTT GGT TCC ATT TGC C - 3' REVERSE: 5' - CTT ATT CTG AAA ATA CCC AAC TAT C - 3'
Exon 11	FORWARD: 5' - GCA ATA TAG CAA GAC TGT GTC TC - 3' REVERSE: 5' - GCT ACC ATG AAG TCA CAC ACT C - 3'
Exon 12	FORWARD: 5' - CAA AAA TGG CCT TGT GTT TTA C - 3' REVERSE: 5' - CTC CAA GAT ACA AAC AGG GAG - 3'
Exon 13	FORWARD: 5' - GCT AAA CTT GAA ATG CAT GG - 3' REVERSE: 5' - GAT ACT TGA GTT TTT CAG GG - 3'
Exon 14	FORWARD: 5' - GCA AGT CCC ACA CAG CTC TTA - 3' REVERSE: 5' - CAC CAA AGA CCC TTA CAT AGC - 3'
<b>POL η</b>	
Exon 7	FORWARD: 5' - GCT CTC ATT TGT CCT GAA CCT - 3' REVERSE: 5' - ATT TGA ATA TAG CAT CTC CAT AAA GG - 3'
<b>POL κ</b>	
Exon 2	FORWARD: 5' - CCT GGC CAC AGA TGG TTT TA - 3' REVERSE: 5' - TTT GAA ACA GAA AGT TAA AAG GTC ATT - 3'
Exon 6	FORWARD: 5' - TGA CAG AAG AAG TTT GCT ATC ACA G - 3' REVERSE: 5' - TTT TCA CTG CTT CTT GGT TTG A - 3'

---

## IV – CONCLUSÕES

O presente trabalho abordou o estudo das deficiências de duas enzimas envolvidas com o metabolismo da DHT, 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 e 3 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase tipo 2, decorrentes de mutações germinativas e/ou somáticas nos genes *SRD5A2* e *HSD3B2*.

Com relação à deficiência em 5 $\alpha$ -redutase tipo 2 foram investigadas mutações germinativas no gene *SRD5A2* em 20 pacientes com quadro clínico sugestivo de PHM por deficiência nesta enzima. As conclusões deste estudo são a seguir relatadas:

- ✓ A detecção, em 18 dos 20 pacientes examinados, de mutações deletérias por sequenciamento direto dos cinco éxons do gene *SRD5A2* preconiza este método como importante ferramenta diagnóstica da deficiência congênita desta enzima;
- ✓ A identificação de quatro mutações novas (Gly158Arg, del642T, 217\_218insC e IVS3+1G>A) não anteriormente referidas na literatura amplia o espectro de mutações germinativas conhecidas para esse gene;
- ✓ A identificação de mutações recorrentes em pacientes brasileiros (mutações Gln126Arg, Gly196Ser e Ala207Asp) corrobora dados de literatura que sugerem a existência de *hotspots* no gene *SRD5A2*. Por outro lado, para pelo menos uma

dessas mutações recorrentes (Gly183Ser) é possível supor que sua presença em nossa população seja decorrente de um “efeito fundador”.

Com relação à deficiência em 3 $\beta$ -HSD2 conduzindo à ambigüidade genital foram investigadas mutações germinativas no gene *HSD3B2* em 12 pacientes com diagnóstico sugestivo de HCSR por deficiência em 3 $\beta$ -HSD2. Abaixo estão sumarizadas as conclusões deste estudo:

- ✓ Este estudo descreve a mutação germinativa Pro222Gln em homozigose no gene *HSD3B2* em um paciente masculino com ambigüidade genital e forma clássica de HCSR com perda de sal. Esta mutação já foi descrita antes no Brasil em pacientes femininos. Este é o segundo relato brasileiro de um paciente masculino com HCSR portador da mutação Pro222Gln no gene *HSD3B2*;
- ✓ A modelagem molecular por homologia das enzimas 3 $\beta$ -HSD2 nativa e portadora da mutação Pro222Gln permitiu um melhor entendimento dos efeitos da mutação na estabilidade da enzima. O modelo gerado evidenciou o papel do códon Pro<sup>222</sup> na estrutura terciária final da 3 $\beta$ -HSD2.

Para se testar a hipótese de deficiência em 3 $\beta$ -HSD2 conduzindo ao câncer de próstata em razão da diminuição na degradação de DHT intraprostático foram investigadas mutações somáticas no gene *HSD3B2* em 26 pacientes com câncer de próstata esporádico. As conclusões deste estudo são a seguir sumarizadas:

- ✓ A identificação de uma alta frequência de alterações no gene *HSD3B2* restritas ao DNA tumoral aponta para um possível papel deste gene na predisposição e/ou progressão do câncer;
- ✓ A caracterização bioquímica da 3 $\beta$ -HSD2 revelou que a enzima nativa apresenta diferenças tanto na eficiência quanto no pH ótimo de atividade da enzima, dependendo das atividades de *redutase* (pH 6.5) ou de *desidrogenas/isomerase* (pH 8.5). Estas diferenças podem ser um reflexo do papel fisiológico distinto das 3 $\beta$ -HSD2 tanto nas vias de síntese quanto de degradação de andrógenos;
- ✓ Das 8 mutações *missense* bioquimicamente caracterizadas, apenas a enzima portadora da mutação Thr152Ala não apresentou atividade enzimática abolida. No caso da atividade de *redutase*, a enzima Thr152Ala apresentou um nítido ganho de função quando comparada à enzima nativa. Esta atividade de degradação da DHT aumentada na enzima mutante Thr152Ala pode significar um possível efeito protetor da mutação Thr152Ala no âmbito do crescimento celular descontrolado provocado por excesso de DHT;

- ✓ A análise por *Gel Shift* da repetição direta localizada na região 5'-UTR permitiu a identificação de um provável domínio de ligação de fatores ainda não identificados e que precisam ser caracterizados futuramente;
  
- ✓ A análise das seqüências nucleotídicas adjacentes às mutações somáticas revelou que estas seguem um padrão específico de substituição, transições em sua grande maioria e ocorrendo principalmente em dímeros de purina. Este mesmo padrão de substituição foi observado em mutações somáticas detectadas em genes associados aos cânceres de próstata e de mama e em um gene controle (gene *HPRT*). O resultado das análises permitiu constatar que as mutações ocorrem em um *motif* conservado composto de nove nucleotídeos rico em purina (NNUPURI), sugerindo a hipótese de que este *motif* seria alvo de um mecanismo de reparo e/ou síntese de DNA propenso a erros que resultaria na maioria das mutações somáticas detectadas no câncer de próstata;
  
- ✓ A identificação de 27 mutações somáticas nos genes que codificam DNA polimerases propensas a erro (*POLB*, *POLH* e *POLK*) nas mesmas amostras de câncer de próstata evidenciou a hipótese proposta neste estudo. Segundo esta hipótese, o acúmulo de mutações somáticas à medida que o câncer de próstata progride decorre de um *fenótipo mutagênico* manifestado pelas DNAs polimerases mutantes.

---

## V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALU, A.; ELMAJIAN, D.E.; HIGHSHAW, R.A.; NICHOLS, P.W.; REICHARDT, J.K.V. – Somatic mutations at the *SRD5A2* locus encoding prostatic steroid 5alpha-reductase during prostate cancer progression. **J. Urol.**, **161**: 1355-1358, 1999.

BARSTCH, W.; KLEIN, H.; SCHIEMANN, U.; BAUER, H.W.; VOIGT, K.D. – Enzymes of androgen formation and degradation in the human prostate. In: **Steroid Formation, Degradation, and Action in Peripheral Tissues** (Castagnetta, L.; d'Aquino, S.; Labrie, F.; Bradlow, H.L.), Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990. p.53-66.

BEIGUELMAN, B. – A diferenciação sexual normal e anômala e as aberrações dos cromossomos sexuais. In: **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1982. p.243-301.

BERGOLIO, V.; PILLAIRE, M-J.; LACROIX-TRIKI, M.; RAYNAUD-MESSINA, B.; CANITROT, Y.; BIETH, A.; GARES, M.; WRIGHT, M.; DELSOL, G.; LOEB, L.A.; CAZAUX, C.; HOFFMANN, J-S. – Deregulated DNA polymerase B induces chromosome instability and tumorigenesis. **Cancer Research**, **62**: 3511-3514, 2002.

BHATTACHARYYA, N.; CHEN, H.C.; WANG, L.; BANERJEE, S. – Heterogeneity in expression of DNA polymerase beta and DNA repair activity in human tumor cell lines. **Gene Expr.**, **10**: 115-23, 2002.

BOSLAND, M.C. – The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, **27**: 39-66, 2000.

CASTRO, M.; ELIAS, L.L. – Causas raras de pseudo-hermafroditismo feminino: quando suspeitar ? **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, **49**: 126-137, 2005.

CHANG, B.L.; ZHENG, S.L.; HAWKINS, G.A.; ISAACS, S.D.; WILEY, K.E.; TURNER, A.; CARPTEN, J.D.; BLEECKER, E.R.; WALSH, P.C.; TRENT, J.M.; MEYERS, D.A.; ISAACS, W.B.; XU, J. – Joint effect of *HSD3B1* and *HSD3B2* genes is associated with hereditary and sporadic prostate cancer susceptibility. **Cancer Research** **62**: 1784–1789, 2002.

CHEN, Y.; WANG, J.; FRAIG, M.M.; HENDERSON, K.; BISSADA, N.K.; WATSON, D.K.; SCHWEINFEST, C.W. – Alterations in *PMS2*, *MSH2* and *MLH1* expression in human prostate cancer. **Int. J. Oncol.**, **22**: 1033-1043, 2003.

CHENG, E.; LEE, C.; GRAYHACK, J. – Endocrinology of the Prostate. In: **Prostate Diseases** (Lepor, H.; Lawson, R.K.). Philadelphia. W.B. Saunders, 1993. p.57-71.



CUDE, K.J.; DIXON, S.C.; GUO, Y.; LISELLA, J. & FIGG, W.D. – The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. **J. Mol. Med.**, **77**: 419-426, 1999.

DEVGAN, S.A.; HENDERSON, B.E.; YU, M.C.; SHI, C.-Y.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K.; REICHARDT, J.K.V. – Genetic variation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. **Prostate**, **33**: 9-12, 1997.

DOBASHI, Y.; SHUIN, T.; TSURUGA, H.; UEMURA, H.; TORIGOE, S.; KUBOTA, Y. – DNA polymerase beta gene mutation in human prostate cancer. **Cancer Research**, **54**: 2827-2829, 1994.

ELIAS, L.L.; CASTRO, M. – Defeitos de síntese de testosterona. In: **Menino ou menina ? Os distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri. Editora Manole, 2002. p.105-108.

FISHEL, R. – The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. **Cancer Research**, **61**: 7369-7374, 2001.

FRIEDBERG, E.C.; WAGNER, R.; RADMAN, M. – Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. **Science**, **296**: 1627-1630, 2002.

- GAO, X.; WU, N.; GRIGNON, D.; ZACHAREK, A.; LIU, H.; SALKOWSKI, A.; LI, G.; SAKR, W.; SARKAR, F.; PORTER, A.T. – High frequency of mutator phenotype in human prostatic adenocarcinoma. **Oncogene**, **10**: 2999-3003, 1994.
- GEARHART, P.J. AND WOOD, R.D. – Emerging links between hypermutation of antibody genes and DNA polymerases. **Nat. Rev. Immunol.**, **1**: 187-192, 2001.
- GOODMAN, M.F. – Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.**, **71**: 17-50, 2002.
- HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. – Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, **21**: 427-433, 2000.
- HUGHES, C.; MURPHY, A.; MARTIN, C.; SHEILS, O.; O’LEARY, J. – Molecular pathology of prostate cancer. **J. Clin. Pathol.**, **58**: 673-684, 2005.
- HUMAN GENE MUTATION DATABASE – gene *HSD3B2* (<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/134044.html>). Acessado no dia 15 de dezembro de 2005.
- HUMAN GENE MUTATION DATABASE – gene *SRD5A2* (<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/127343.html>). Acessado no dia 15 de dezembro de 2005.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, Ministério da Saúde – Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2005.

- JOHNSON, R.E.; WASHINGTON, M.T.; HARACSKA, L.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. – Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. **Nature**, **406**: 1015-1019, 2000b.
- KUNKEL, T.A. – Considering the cancer consequences of altered DNA polymerase function. **Cancer Cell**, **3**: 105-110, 2003.
- LABRIE, F., SIMARD, J., LUU-THE, V., BELANGER, A. E PELLETIER, G. – Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **43**: 805-826, 1992.
- LACHANCE, Y.; LUU-THE, V.; VERREAULT, H.; DUMONT, M.; RHEAUME, E.; LEBLANC, G.; LABRIE, F. – Structure of the human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. **DNA and Cell Biol.**, **10**: 701-711, 1991.
- LOEB, L.A. – A mutator phenotype in cancer. **Cancer Research**, **61**: 3230-3239, 2001.
- LOEB, L.A.; LOEB, K.R.; ANDERSON, J.P. – Multiple mutations and cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **100**: 776-781, 2003.

MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA JÚNIOR, G. – Ambigüidade genital. In: **Menino ou menina ? Os distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri. Editora Manole, 2002. p.31-36.

MAHONY, M.C.; SWANLUND, D.J.; BILLETER, M.; ROBERTS, K.P.; PRYOR, J.L. – Regional distribution of 5 $\alpha$ -reductase type 1 and type 2 mRNA along the human epididymus. **Fertil. Steril.** **69**: 1116-1121, 1998.

MAKRIDAKIS, N.M.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CROCITTO, L.E.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E; REICHARDT, J.K.V. – A missense substitution in the *SRD5A2* gene is associated with prostate cancer in African-American and Latino men in Los Angeles. **Lancet**, **354**: 975-978, 1999.

MAKRIDAKIS, N.M.; AKALU, A.; REICHARDT, J.K.V. – Identification and characterization of somatic steroid 5 $\alpha$ -reductase (*SRD5A2*) mutations in human prostate cancer tissue. **Oncogene**, **23**: 7399-7405, 2004.

MAKRIDAKIS, N.M.; REICHARDT, J.K.V. – Molecular epidemiology of androgen-metabolic loci in prostate cancer: predisposition and progression. **Journal of Urology**, **171**: S25-S29, 2004.

- MARINI, S.H.V.L.; MELLO, M.P. – Hiperplasia congênita das supra-renais (HCSR). In: **Menino ou menina ? Os distúrbios da diferenciação do sexo**. Barueri. Editora Manole, 2002. p.61-65.
- MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G.R. – Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **84**: 3463-3468, 1999.
- MARTIN, G. M. – Genetic and environmental modulations of chromosomal stability: their roles in aging and oncogenesis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **621**: 401-417, 1991.
- MCBRIDE, M.W.; MCVIE, A.J.; BURRIDGE, S.M.; BRINTNELL, B.; CRAIG, N.; WALLACE, A.M.; WILSON, R.H.; VARLEY, J.; SUTCLIFFE, R.G. – Cloning, expression, and physical mapping of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. **Genomics**, **61**: 277-284, 1999.
- MOORE, K.L. – Sistema Urogenital. In: **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro. Interamericana, 1978. p.219-258.
- NOWELL, P.C. – Tumor progression: a brief historical perspective. **Semin. Cancer Biol.**, **12**: 261-266, 2002.

REICHARDT, J.K.V.; MAKRIDAKIS, N.M.; HENDERSON, B.E.; YU, M.C.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K. – Genetic variability of the human *SRD5A2* gene: implications for prostate cancer risk. **Cancer Res.**, **55**: 3973-3975, 1995.

RHEAUME, E.; SIMARD, J.; MOREL, Y.; MEBARKI, F.; ZACHMANN, M.; FOREST, M.G.; NEW, M.I.; LABRIE, F. – Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene. **Nature Gen.**, **1**: 239-245, 1992.

ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; COETZEE, G.A.; REICHARDT, J.K.V.; YU, M.C.; FEIGELSON, H.; STANCZYK, F.Z.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E. – Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. **Cancer Res.**, **58**: 4497-4504, 1998.

RUIJTER, E.; VAN DE KAA, C.; MILLER, G.; RUITER, D.; DEBRUYNE, F.; SCHALKEN, J. – Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. **Endocr. Rev.**, **20**: 22-45, 1999.

RUSSELL, D.W.; BERMAN, D.M.; BRYANT, J.T.; CALA, K.M.; DAVIS, D.L.; LANDRUM, C.P.; PRIHODA, J.S.; SILVER, R.I.; THIGPEN, A.E.; WIGLEY, W.C. – The molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductases. **Recent Prog. Horm. Res.**; **49**: 275-284, 1994.

RUSSELL, D.W. & WILSON, J.D. – Steroids 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes.

**Annu. Rev. Biochem., 63:** 25-61, 1994.

SINNECKER, G.H.G.; HIORT, O.; DIBBELT, L.; ALBERS, N.; DORR, H.G.; HAUSS,

H.; HEINRICH, U.; HEMMINGHAUS, M.; HOEPFFNER, W.; HOLDER, M.;

SCHNABEL, D.; KRUSE, K. – Phenotypic classification of male pseudo-

hermaphroditism due to steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Am. J. Med. Genet., 63:**

223-230, 1996.

THIGPEN, A.E.; DAVIS, D.L.; MILATOVICH, A.; MENDONÇA, B.B.; IMPERATO-

MCGINLEY, J.; GRIFFIN, J.E.; FRANCKE, U.; WILSON, J.D.; RUSSELL, D.W. –

Molecular genetics of 5 $\alpha$ -reductase deficiency. **J. Clin. Invest., 90:** 799-809, 1992.

TISSIER, A., MCDONALD, J.P., FRANK, E.G.; WOODGATE, R. – Pol iota, a

remarkably error-prone human DNA polymerase. **Genes Dev., 14:** 1642-1650, 2000.

TOMLINSON, I., SASIENI, P.; BODMER, W. – How many mutations in a cancer? **Am. J.**

**Pathol., 160:** 755-758, 2002.

SRIVASTAVA, D.K., HUSAIN, I., ARTEAGA, C.L.; WILSON, S.H. – DNA polymerase

B expression differences in selected human tumors and cell lines. **Carcinogenesis,**

**20:** 1049-1054, 1999.

VELASCO, A., HEWITT, S.M., ALBERT, P.S., HOSSEIN, M., ROSENBERG, H., MARTINEZ, C., SAGALOWSKY, A.I., MCCONNELL, J.D., MARSTON, W.; LEACH, F.S. – Differential expression of the mismatch repair gene *hMSH2* in malignant prostate tissue is associated with cancer recurrence. **Cancer**, **94**: 690-699, 2002.

NWOSU, V.; CARPTEN, J.; TRENT, J.M.; SHERIDAN, R. – Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. **Hum. Molec. Genet.**, **10**: 2313-2318, 2001.

VERREAULT, H.; DUFORT, I.; SIMARD, J.; LABRIE, F.; LUU-THE, V. – Dinucleotide repeat polymorphisms in the *HSD3B2* gene. **Hum. Mol. Genet.**, **3**: 384, 1994.

YEH, C-C., LEE, C.; DAHIYA, R. – DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **285**: 409-413, 2001.

WILSON, J.D.; GRIFFIN, J.E.; RUSSEL, D.W. – Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Endocr. Rev.**, **14**: 577-593, 1993.

WASHINGTON, M.T., JOHNSON, R.E., PRAKASH, L.; PRAKASH, S. – Human DINB1-encoded DNA polymerase kappa is a promiscuous extender of mispaired primer termini. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **99**: 1910-1914, 2002.



---

## **VI – ANEXOS**

### **Pareceres da Comissão de Ética**

#### **1 – Estudo de pacientes com PHM**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA

CONSULTA No. 385/96-C.Ética

DATA: 18.11.96

ASSUNTO: Projeto de Pesquisa: "Detecção de mutações do gene 5 $\alpha$ -redutase-2 em pacientes de sexo genético masculino com ambiguidade genital"

INTERESSADO: Profa. Dra. Christine Hackel

RELATOR: Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona


P A R E C E R

Consideramos que o projeto referido acima obedece os requisitos necessários para pesquisa.

Esta Comissão manifesta-se favorável à realização do estudo.



Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona  
MEMBRO RELATOR



Prof. Dr. Sebastião Araújo

PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA  
HC/UNICAMP

## **Pareceres da Comissão de Ética**

### **2 – Estudo de pacientes com Câncer de Próstata**

Proposal #994057  
Review Category: E

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD  
HEALTH RESEARCH ASSOCIATION  
AND  
INSTITUTIONAL REVIEW BOARD  
UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA  
SCHOOL OF MEDICINE

Date: 3/21/2003  
To: **Juergen K. V Reichardt, Ph.D.**  
Assistant Professor  
Biochemistry & Molecular Biology  
Clinical Sciences Center, #240  
Health Sciences Campus

From: **Vice Chair, IRB**  
Matthew Carabasi, M.D.  
Interns Residence Dorm, Suite 425  
2020 Zonal Avenue  
Los Angeles, CA 90033  
(323) 223-2340

*Matthew H. Carabasi, M.D.*

---

**TITLE OF PROPOSAL:**  
**GENETIC VARIATION OF THE HSD3B2 GENE AND PROSTATE CANCER**

---

Action Date: 3/19/2003      Action Taken: Approved  
Committee: Vice Chair, IRB  
Note:

Your Continuing Review form dated 2/11/03 (received on 2/12/03), and attachments, were reviewed by Dr. Matthew Carabasi on 3/19/03. The Continuing Review Qualifies for expedited review according to 63 FR 60364-60367 (November 9, 1998) as category 9. The Continuing Review was APPROVED.

The DOD Progress Report, dated 7/25/02, was APPROVED.

APPROVAL FOR YOUR STUDY IS VALID FROM 4/5/03 UNTIL 4/4/04.

As the Principal Investigator you are required to ensure that this research and the actions of all project personnel involved in conducting the study will conform with the research project and its modifications approved by the IRB; HHS regulations (45CFR46); FDA regulations (21CFR50,56); International Conference on Harmonization Good Clinical Practice Consolidated Guideline; IRB Policies and Procedures and applicable state laws. Failure to comply may result in suspension or termination of your research project, notification of appropriate governmental agencies by the IRB, and/or suspension of your freedom to present or publish results. Any proposed changes in the research project must be submitted, reviewed and approved by the IRB before the change can be implemented. The only exception is a change necessary to eliminate apparent immediate hazards to the research subjects. In such a case, the IRB should be promptly informed of the change following its implementation for IRB review. You must inform the IRB immediately if you become aware of any violations of HHS regulations (45CFR46), FDA regulations (21CFR50,56), applicable state laws or IRB Policies and Procedures for the protection of human subjects. You are required to notify the IRB office in the event of any action by the sponsor, funding agency or FDA, including warnings, suspension or termination of your participation in this trial.