

## Genómica funcional – a investigação do RNA mensageiro e da proteína dele resultante no âmbito da missão do Departamento de Genética Humana do INSA

*Functional genomics – the investigation of messenger RNA and its resulting protein within the scope of the Department of Human Genetics's mission at INSA*

Peter Jordan, Luísa Romão

*peter.jordan@insa.min-saude.pt ; luisa.romao@insa.min-saude.pt*

*Unidade de Investigação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal*

### \_Resumo

Os avanços dos últimos 50 anos na área da Genética Molecular permitiram um diagnóstico de doenças genéticas cada vez mais rápido e eficaz; no entanto, revelaram também que nem sempre pode a patogenicidade de variantes genéticas ser concluída somente pela análise da sequência do DNA. As consequências funcionais de uma variante genética são analisadas pela genómica funcional que inclui a análise do respetivo RNA mensageiro (mRNA). Neste artigo é descrito como o Departamento de Genética Humana do INSA desenvolveu linhas de investigação em genómica funcional, nomeadamente sobre o papel da degradação específica de mRNAs nas hemoglobinopatias, e sobre alterações no *splicing* do RNA pré-mensageiro associadas ao desenvolvimento do cancro.

A atividade destas linhas de investigação foi publicada em mais de 100 artigos em revistas científicas internacionais, e trouxe, ao longo destes anos, várias mais-valias para o DGH e as missões do INSA, incluindo *know-how* técnico, equipamentos inovadores, e resolução de problemas técnico-científicos no apoio à prestação de serviços diferenciados. Atualmente, a inovação tecnológica está a gerar cada vez maior capacidade de sequenciar genomas e leva a novas descobertas sobre a organização do genoma e o seu funcionamento. A genómica funcional continua a ser essencial para validar muitas destas descobertas ou as previsões computacionais do efeito de variantes genéticas.

### \_Abstract

*Advances in molecular genetics over the last 50 years have enabled increasingly rapid and effective diagnosis of genetic diseases; however, they have also revealed that the pathogenicity of genetic variants cannot always be determined by DNA sequence analysis alone. The functional consequences of a genetic variant are analyzed through functional genomics, which includes analysis of its messenger RNA (mRNA).*

*Here we describe two lines of functional genomics research developed at Department of Human Genetics (DGH) of INSA, namely the role of specific mRNA degradation in hemoglobinopathies, and alterations in pre-messenger RNA splicing associated with cancer development.*

*The results from these research lines have been published in over 100 articles in international scientific journals and, over the years, has provided added value to the DGH and INSA's missions, including technical*

*know-how, innovative equipment, and the resolution of technical and scientific problems to support the provision of differentiated services. Currently, technological innovation is generating ever-increasing genome sequencing capacity and leading to new discoveries about genome organization and function. Functional genomics remains essential for validating many of these discoveries or the computational predictions of the effect of genetic variants.*

### \_Introdução e enquadramento histórico da genómica funcional

Regressemos a 1975, o ano da fundação do Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). A nível mundial, a área da genética humana encontra-se ainda fortemente sustentada na citogenética, ou seja, num nível microscópico da análise de alterações genéticas que causam doença. A nível molecular, são analisadas apenas variações no padrão de fragmentos de DNA gerados por digestão com enzimas de restrição. No entanto, já estão em curso diversos esforços na comunidade para isolar e obter a sequência de genes individuais associados a doenças e, entre outros, são publicados a sequência do gene da beta-globina em 1980 (1), do primeiro oncogene, *HRAS*, em 1982 (2), ou dos genes supressores de tumores *APC* em 1991 (3) e *MSH2* em 1993 (4). Cresceu, assim, de forma decisiva a era da genética molecular, a qual o DGH também abraçou, reunindo investigadores e técnicos para desenvolver esta competência técnica pioneira em Portugal.

A necessidade de identificar e sequenciar genes na área biomédica culminou, em 1990, na implementação ambiciosa do projeto internacional de sequenciar todo o genoma humano. Como fruto deste esforço, incluindo muita inovação tecnológica em sequenciação genómica, grande parte da sequência do genoma humano ficou disponível em bases de dados públicas até 2004 (5). Enquanto o projeto de sequenciação do genoma ainda estava a ser concluído, as sequências, entretanto obtidas, foram sendo disponibilizadas publicamente, e o DGH também as utilizou para diagnosticar e investigar doenças genéticas; porém, no laboratório tornou-se evidente uma importante limitação: nem sempre era possível estabelecer, apenas com base na leitura da sequência de DNA, o carácter patogénico de alterações encontradas nos genes dos doentes. Nasceu, assim, a genómica funcional, ou seja, a análise dos produtos dos genes, nomeadamente o RNA mensageiro (mRNA) e a proteína por este codificado, para poder validar o impacto funcional das alterações genéticas observadas em amostras de doentes.

Com base neste quadro, o DGH investiu, já durante a década dos anos 90, em desenvolver a investigação em genómica funcional. Foram criadas linhas de investigação para estudar o papel do mRNA e da proteína na patogenicidade de doenças genéticas, incluindo por exemplo, as hemoglobinopatias e o cancro.

### \_Objetivo

Neste artigo são descritos linhas de investigação em genómica funcional que o Departamento de Genética Humana do INSA desenvolveu, nomeadamente sobre o papel da degradação específica de mRNAs nas hemoglobinopatias, e sobre alterações no *splicing* do RNA pré-mensageiro associadas ao desenvolvimento do cancro.

### \_A investigação em genómica funcional desenvolvida nas hemoglobinopatias

Ainda durante os anos 80, o DGH iniciou a progressiva transição das suas atividades da análise bioquímica e citoge

nética para a biologia molecular, transição esta fomentada pelo investigador João Lavinha. Neste contexto, começou por investigar a base molecular das hemoglobinopatias na população Portuguesa. As hemoglobinopatias estão entre as doenças genéticas mais comuns no mundo e são prevalentes na costa do Mediterrâneo, sudeste Asiático, África e sul da China. Hemoglobinopatias são doenças hereditárias causadas por mutações nos genes das globinas que resultam na síntese anormal, ou ineficiente, da hemoglobina (Hb). Esta é responsável pelo transporte de oxigénio nos glóbulos vermelhos, sendo composta por cadeias alfa- e beta-globina. Um dos primeiros estudos das hemoglobinopatias no DGH foi o de uma família açoriana com doença da Hb H, na qual há uma produção deficiente de cadeias alfa-globina, resultando num excesso de cadeias beta-globina que agregam em tetrâmeros instáveis e levam à destruição prematura dos glóbulos vermelhos. Os primeiros estudos que se realizaram no DNA da doente com Hb H sugeriram que a base molecular da doença Hb H nesta família seria diferente daquelas descritas anteriormente (6). Com o objetivo de melhor compreender a base molecular deste caso atípico de Hb H, a investigadora Luísa Romão foi, no início de 1990, para o Howard Hughes Medical Institute, School of Medicine, University of Pennsylvania (Philadelphia, USA), para o laboratório do Prof. Steve Liebhaber, onde lhe foi possível demonstrar que este caso era devido à deleção de sequências reguladoras localizadas a montante dos genes da alfa-globina, levando ao silenciamento do gene apesar de este não ter sofrido nenhuma mutação (7).

Em 1992, Luísa Romão regressou ao INSA, onde alargou esta investigação às consequências funcionais de mutações *nonsense* nos genes da beta-globina associadas à beta-talassémia. Este projeto contou com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e permitiu concluir que as mutações *nonsense* podem afetar a estabilidade do mRNA dos correspondentes genes e, deste modo, induzir a sua degradação prematura (8). Estava assim implementada, no DGH, a era dos estudos funcionais e a criação de uma nova linha de investigação dedicada ao estudo do metabolismo do mRNA e doenças associadas.

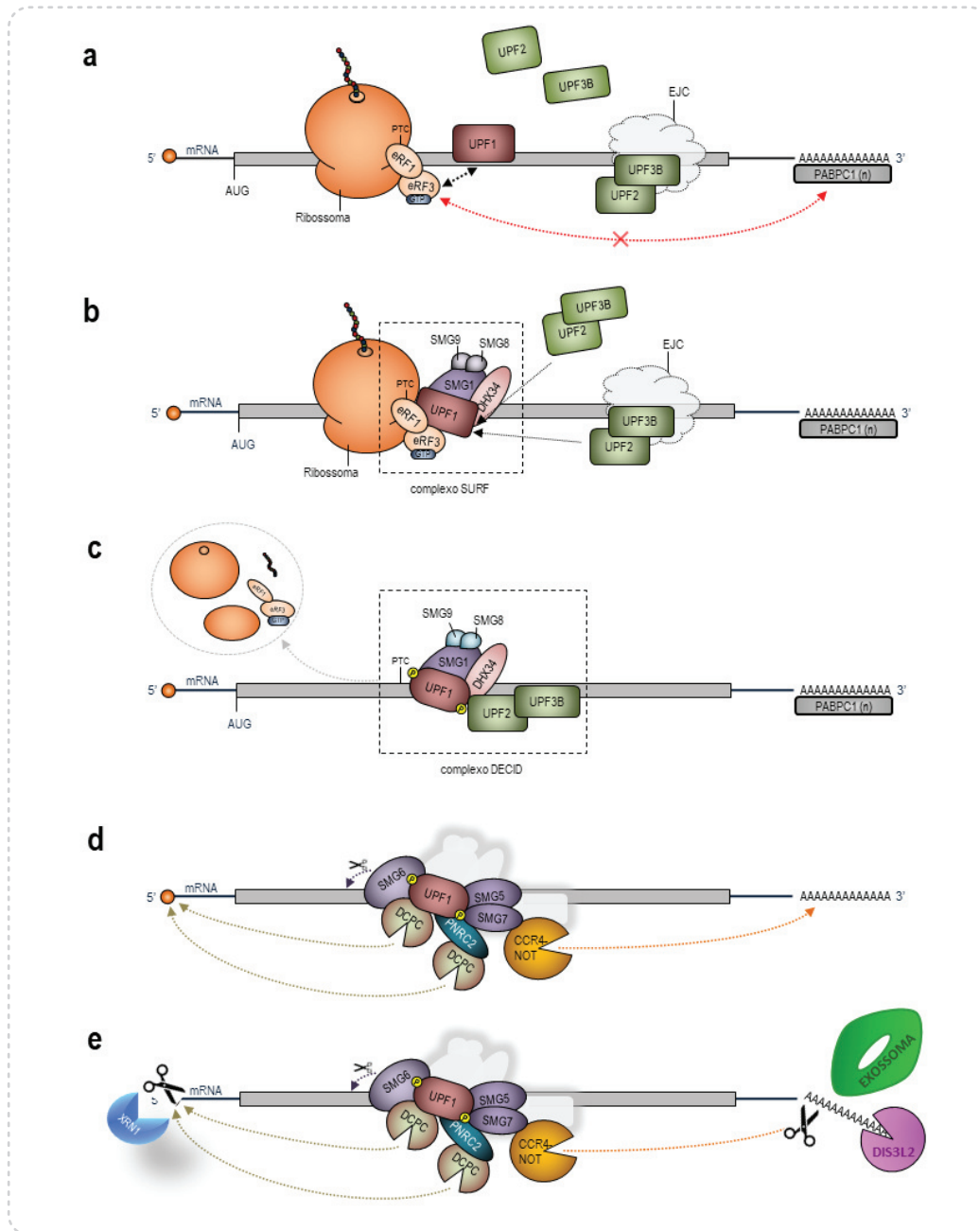
O metabolismo do mRNA engloba uma série de processos pós-transcricionais —processamento (inclui o *capping*, *splicing* e poliadenilação), transporte, tradução e degradação — que determinam o destino funcional de cada mRNA. Sabe-se hoje que os vários passos envolvidos no metabolismo do mRNA são altamente regulados na célula, o que permite maior controlo espaço-temporal da expressão génica. Para além disso, existem mecanismos de controlo de qualidade que asseguram a fidelidade da expressão génica, pois rapidamente detetam e degradam mRNAs aberrantes, incapazes de codificarem proteínas funcionais. Um dos interesses da investigadora Luísa Romão tem sido o estudo destes mecanismos de controlo de qualidade, nomeadamente o mecanismo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD; [figura 1](#)). O NMD permite à célula eliminar, seletiva e rapidamente, mRNAs derivados de genes portadores de mutações *nonsense* (que sinalizam o fim prematuro da tradução deste mRNA em proteína) e, desta forma, permite à célula prevenir a síntese e acumulação das respetivas proteínas truncadas potencialmente tóxicas.

Um dos resultados recentemente obtidos no estudo do NMD, pelo grupo da investigadora, com a colaboração do grupo do investigador Peter Jordan, mostrou que uma das enzimas envolvidas neste processo – a ribonuclease DIS3L2 ([figura 1](#)) – é também necessária para sustentar a proliferação e invasão das células de cancro colorretal ([9](#)). Este trabalho exemplifica como a identificação e caracterização dos mecanismos envolvidos no metabolismo do mRNA em associação com determinada doença genética, ou em processos de tumorigénese, permitem avançar no esclarecimento da etiopatofisiologia dessas doenças. Por outro lado, possibilitam o estabelecimento de novos biomarcadores com potencial aplicabilidade no rastreio, diagnóstico, prognóstico e/ou terapia deste tipo de doenças que, em muitos casos, são um problema de Saúde Pública.

Tal como acima referido, o metabolismo do mRNA também inclui a tradução da informação genética em proteína. Sabe-se hoje que, em condições de stress celular, como aquele que ocorre em células de cancro, este mecanismo

geral é inibido; no entanto, alguns mRNAs são traduzidos por meios alternativos, permitindo a sobrevivência das células. Estes processos ocorrem em mRNAs com características específicas, como *internal ribosome entry sites* (IRESs) ou *upstream open reading frames* (uORFs), elementos reguladores que mais de metade dos mRNAs humanos apresentam. A descoberta de alterações genéticas que criam ou interrompem estes elementos como causa de doença humana, ilustra a sua importante função na regulação da expressão génica. Neste contexto, é também objetivo da investigadora Luísa Romão estudar a função destes elementos em mecanismos de doença genética, ou em processos de tumorigénese. Um dos exemplos estudados é o do mRNA que codifica para a proteína humana oncogénica mTOR ([10](#)), que é sintetizada através dum IRES, para manter o seu nível de expressão em condições de stress celular, o que pode promover o desenvolvimento de diversas formas de cancro.

Figura 1: Representação simplificada do modelo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD).



- (a) Quando o ribossoma encontra um códon nonsense localizado a montante do último complexo proteico EJC depositado no mRNA, é estimulada a interação das proteínas UPF1 e eRF3 que induz a terminação prematura da síntese proteica.
- (b) Após essa interação, o complexo SURF é formado por várias proteínas (eRF1, eRF3, SMG1, SMG8, SMG9, DHX34 e UPF1).
- (c) Em seguida, UPF1 interage com UPF2-UPF3B, forma o complexo DECID e induz a dissociação das subunidades ribossomais.
- (d) O UPF1 desencadeia depois a degradação do mRNA, recrutando endonucleases (SMG6), desadenilases (CCR4-NOT), e o complexo de *decapping* (DCPC).
- (e) Finalmente, o mRNA é degradado pelas exoribonucleases DIS3L2 ou o complexo Exossoma para evitar que mRNAs portadores de mutações *nonsense* possam gerar proteínas disfuncionais e potencialmente tóxicas para a célula. Figura adaptada de <sup>(11)</sup>

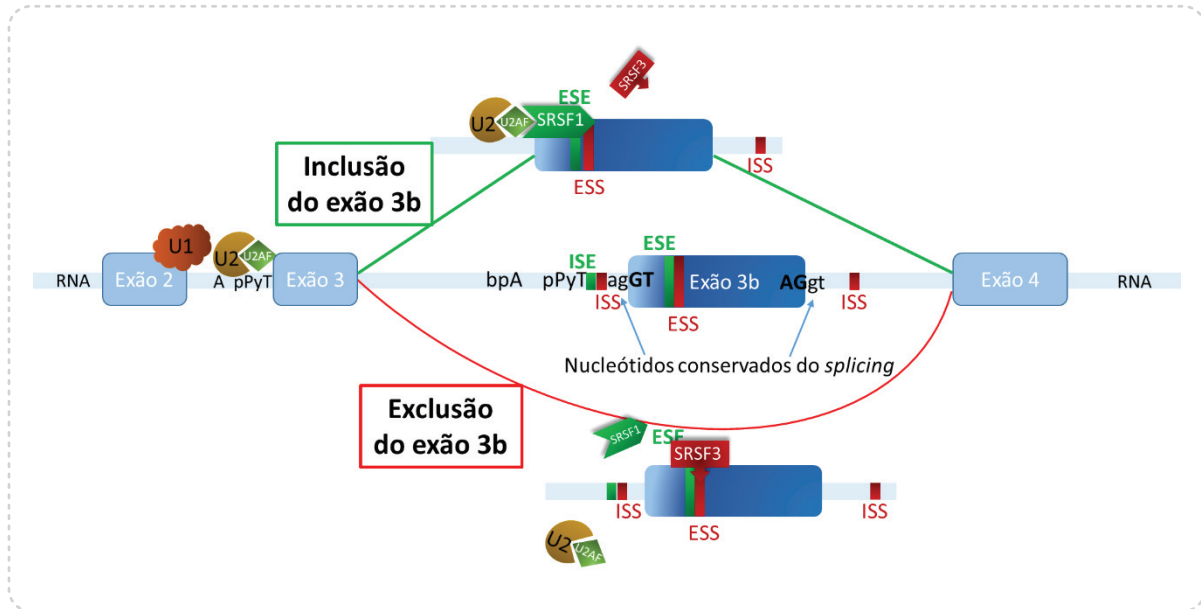
## **\_A investigação em genómica funcional desenvolvida na área do cancro**

O DGH foi pioneiro em lançar um estudo sobre a genética do cancro hereditário em Portugal, para identificar famílias afetadas pelo cancro familiar do cólon. O objetivo principal foi de poder oferecer um teste genético pré-sintomático a familiares e, assim, identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver cancro. O primeiro estudo multicêntrico, financiado em 1995 pelo programa PRAXIS XXI da JNICT/FCT, envolveu gastroenterologistas de vários hospitais nacionais que identificaram doentes com suspeita de história familiar e enviaram amostras de sangue para o estudo genético. A pesquisa de mutações focou inicialmente os genes *APC*, *MSH2* e *MLH1*, já identificados na literatura como causas de cancro hereditário. Eis que se tornou realidade no DGH a limitação metodológica referida acima: a dificuldade em determinar se algumas das alterações de sequência encontradas tinham de facto um carácter patogénico, nomeadamente quando a alteração encontrada no gene tinha o potencial para afetar o correto processamento do respetivo mRNA. Em princípio era simples: bastava verificar por análise dos respetivos mRNAs, se estes apresentavam um tamanho anormal; inesperadamente, porém, indivíduos saudáveis, que serviram de controlo experimental, também apresentavam padrões de mRNAs com diversos tamanhos (12). A análise molecular destas formas de mRNA revelou que a informação codificante de um gene poderia ser reunida de forma modular, como combinar peças individuais de *Legó*®. Este processo deve-se à estrutura dos genes humanos conterem a informação do código genético dividida em blocos (exões), interrompidos por sequências não-codificantes (intrões). Ambos são primeiro copiados do gene para formar o pré-mRNA, o qual de seguida, e ainda no núcleo da célula, sofre um processamento para juntar as regiões codificantes, designado por *splicing*. A observação experimental de que um gene poderá dar origem a diversos tamanhos de mRNA, culminou numa nova área de investigação, chamada *splicing* alternativo, ou seja, a capacidade inata dos nossos genes de gerar mais do que um mRNA em condições fisiológicas. Quais as funções, numa

célula normal, destas diversas isoformas de mRNA (designados como variantes de *splicing*)? Poderia este processo explicar porque é que os genes dos organismos multicelulares, ao contrário das bactérias, se apresentam subdivididos em regiões codificantes e não-codificantes?

A linha de investigação criada no DGH pelo investigador Peter Jordan tem revelado, ao longo dos últimos anos, duas consequências distintas devido ao *splicing* alternativo, que permitam uma maior flexibilidade de regulação do genoma de organismos multicelulares. Primeiro, há variantes de *splicing* que apresentam uma estabilidade diferente e são rapidamente degradadas, provocando rapidamente uma redução efetiva do produto funcional do gene. Trata-se de outra camada na regulação complexa dos nossos genes e os seus níveis de atividade. Segundo, há variantes que geram isoformas da proteína, codificadas pelo mesmo gene, mas estas agora diferem na sua atividade, regulação ou localização subcelular, por causa da inclusão ou omissão de uma parte da sequência codificante. O caso mais estudado no DGH, é a variante RAC1B que se encontra sobre-expressa num subtipo genético de tumores do cólon, nomeadamente os que apresentam uma mutação no oncogene BRAF (13). Este subtipo representa cerca de 15% de todos os casos de cancro do cólon esporádico. O trabalho desenvolvido no DGH identificou primeiro que a região do mRNA que determina qual é a variante produzida, está localizada diretamente na sequência destinada a ser incluída na variante RAC1B. De seguida, a equipa identificou qual a sequência de nucleótidos envolvida e pelo menos duas proteínas reguladoras de *splicing* que reconhecem estas sequências no núcleo da célula (14). A figura 2 resume os resultados desta investigação e ilustra as regras moleculares que regulam o processo do *splicing* alternativo em células humanas. Este conhecimento permitiu ainda investigar quando, e como, estas proteínas reguladoras do *splicing* são ativadas na célula cancerígena: foi concluído que a célula tumoral do cólon aumenta a expressão destas variantes pró-tumorais em resposta a estímulos inflamatórios provindos do microambiente celular que rodeia o tumor (15,16).

Figura 2: Regulação molecular do *splicing* alternativo do pre-mRNA do gene RAC1.



A regulação do *splicing* alternativo do exão 3b depende de fatores de *splicing*. Estes ligam-se a elementos curtos de sequência no RNA que intensificam (SE) ou silenciam (SS) o *splicing* e podem estar presentes no exão (ESE, ESS) ou nas regiões intrónicas adjacentes (ISE, ISS). No caso do RAC1B, um destes ESEs é reconhecido pelo fator de *splicing* SRSF1 que promove (parte superior do esquema) a junção produtiva do spliceossoma junto ao exão alternativo. Caso predomine o fator de *splicing* SRSF3 nas células, este irá ligar-se ao elemento silenciador (ESS) do exão 3b e inibir a formação do spliceossoma neste exão (parte inferior), resultando na sua exclusão do mRNA maduro e a ligação direta do exão 3 ao exão 4. A competição entre os fatores antagonistas SRSF1 ou SRSF3 depende dos seus níveis relativos de expressão na célula, ou da sua quantidade localizada no núcleo da célula, regulável por modificações transitientes e reversíveis destes fatores proteicos, como a fosforilação, em resposta a sinais exteriores que a célula recebe (p.ex., estímulos inflamatórios). Abreviaturas: U1 = partícula pequena de ribonucleoproteína nuclear (snRNP) U1, U2 = snRNP U2, U2AF = fatores auxiliares de snRNP U2, pPyT = trato de polipirimidina, bpA = adenina de conexão com a extremidade do intrão liberto, ESS/ISS = silenciador de *splicing* exónico/intrónico, ESE/IES = intensificador de *splicing* exónico/intrónico, SR = proteína da família SR.

Os resultados mais relevantes destes estudos serviram dois propósitos principais: por um lado, o aumento geral do conhecimento científico, pois os trabalhos foram internacionalmente citados como exemplos de alterações no processo do *splicing* alternativo que podem promover o desenvolvimento tumoral. Por outro lado, o *know-how* adquirido, permitiu desenhar experiências em células humanas, cultivadas em laboratório, para investigar a patogenicidade de uma dúzia de mutações de significado incerto que foram encontradas em famílias com síndrome de cancro hereditário. Com base nesta investigação, foram classificadas como patogénicas alterações encontradas nos genes *MLH1* (17) e *APC* (18). Os estudos permitiram ainda identificar e disseminar pela comunidade científica, através de publicações científicas, limitações técnicas nas metodologias utilizadas na prestação de serviços de rotina, e sugerir potenciais melhorias (12,19).

## \_Conclusões e perspectivas futuras

A atividade de investigação destes dois grupos resultou em 130 artigos publicados em revistas internacionais, e trouxe, ao longo destes anos, várias mais-valias para o DGH e as missões do INSA: (1) *know-how* de ponta em técnicas de biologia molecular e celular, (2) equipamentos inovadores, (3) pensamento crítico e capacidade de resolução de problemas técnico-científicos, (4) desenvolvimento de testes funcionais para ajudar a prestação de serviços diferenciados a determinar a patogenicidade de algumas alterações genéticas observadas em doentes.

A inovação tecnológica na análise de sequências nucleotídicas que ocorreu nos últimos 10 anos, levou à criação de uma unidade laboratorial de apoio especializado, com pessoal dedicado e capacidade de gerar grandes quantidades

de dados de sequenciação do DNA ou RNA em pouco tempo. A maior capacidade de sequenciar revelou novas descobertas sobre a organização do genoma e sobre o seu funcionamento. No entanto, será sempre necessário validar muitas das previsões computacionais através da genómica funcional e do desenvolvimento de ensaios funcionais com células em cultura ou organismos modelo. Fruto também das atividades de investigação, o DGH estará apto e preparado para enfrentar os novos desafios na área da Genética Humana.

#### Agradecimentos:

A todos os alunos e colaboradores dos referidos grupos de investigação que contribuíram para o progresso e sucesso dos trabalhos de investigação desenvolvidos. No total, foram concluídas 24 teses de Doutoramento e 35 dissertações de Mestrado desde 1990.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Lawn RM, Efstratiadis A, O'Connell C, et al. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. *Cell*. 1980 Oct;21(3):647-51. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90428-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90428-6)
- (2) Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, et al. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature*. 1982 Dec 23;300(5894):762-5. <https://doi.org/10.1038/300762a0>
- (3) Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9;66(3):589-600. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90021-0)
- (4) Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90546-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90546-3)
- (5) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- (6) Romão L, Olim G, Martins MC, et al. Unusual molecular basis of Hb H disease in the Azores Islands, Portugal. *Hemoglobin*. 1990;14(6):607-16. <https://doi.org/10.3109/03630269009046969>
- (7) Romao L, Osorio-Almeida L, Higgs DR, et al. Alpha-thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha-globin structural genes. *Blood*. 1991 Sep 15;78(6):1589-95. <https://doi.org/10.1182/blood.V78.6.1589.1589>
- (8) Romão L, Inácio A, Santos S, et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2895-901. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.8.2895>
- (9) García-Moreno JF, Lacerda R, da Costa PJ, et al. DIS3L2 knockdown impairs key oncogenic properties of colorectal cancer cells via the mTOR signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2023 Jun 20;80(7):185. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04833-5>
- (10) Marques-Ramos A, Candeias MM, Menezes J, et al. Cap-independent translation ensures mTOR expression and function upon protein synthesis inhibition. *RNA*. 2017 Nov;23(11):1712-28. Epub 2017 Aug 18. <https://doi.org/10.1261/rna.063040.117>
- (11) Nogueira G, Fernandes R, García-Moreno JF, et al. Nonsense-mediated RNA decay and its bipolar function in cancer. *Mol Cancer*. 2021 Apr 29;20(1):72. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01364-0>
- (12) Clarke LA, Jordan P, Boavida MG. Cell type specificity in alternative splicing of the human mismatch repair gene hMSH2. *Eur J Hum Genet*. 2000 May;8(5):347-52. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200472>
- (13) Matos P, Oliveira C, Velho S, et al. B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology*. 2008 Sep;135(3):899-906. Epub 2008 May 22. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.052>
- (14) Gonçalves V, Matos P, Jordan P. Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 1;18(19):3696-707. Epub 2009 Jul 13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp317>
- (15) Gonçalves V, Pereira JFS, Jordan P. Signaling Pathways Driving Aberrant Splicing in Cancer Cells. *Genes (Basel)*. 2017 Dec 29;9(1):9. <https://doi.org/10.3390/genes9010009>
- (16) Pereira JFS, Bessa C, Matos P, et al. Pro-Inflammatory Cytokines Trigger the Overexpression of Tumour-Related Splice Variant RAC1B in Polarized Colorectal Cells. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 9;14(6):1393. <https://doi.org/10.3390/cancers14061393>
- (17) Clarke LA, Veiga I, Isidro G, et al. Pathological exon skipping in an HNPCC proband with MLH1 splice acceptor site mutation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Dec;29(4):367-70. [https://doi.org/10.1002/1098-2264\(2000\)9999:9999::AID-GCC1051>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1098-2264(2000)9999:9999::AID-GCC1051>3.0.CO;2-V)
- (18) Gonçalves V, Theisen P, Antunes O, et al. A missense mutation in the APC tumor suppressor gene disrupts an ASF/SF2 splicing enhancer motif and causes pathogenic skipping of exon 14. *Mutat Res*. 2009 Mar 9;662(1-2):33-6. Epub 2008 Dec 6. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.001>
- (19) Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, et al. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol*. 2001 Oct;54(5):351-3. <https://doi.org/10.1136/mp.54.5.351>