

KALINCA PATRICIA MARENGO SANTOS

ANÁLISE MOLECULAR DA ATAXINA 1

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ANÁLISE MOLECULAR DA ATAXINA 1

Kalinca Patricia Marengo Santos

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob a orientação da Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes.

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Sa59a Santos, Kalinca Patricia Marengo, 1974 -
Análise molecular da Ataxina 1 / Kalinca Patricia
Marengo Santos. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína. 2. Poliglutaminas. 3. Dicroísmo
circular. 4. Raios X – espalhamento a baixo ângulo. I.
Lopes - Cendes, Iscia Teresinha. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular analysis Ataxin 1.

Palavra-chave em inglês:

Protein

Circular dichroism

X-rays of low angle

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Iscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Almir de Sousa Martins

Paulo Henrique Condeixa de França

Fabio Rossi Torres

Claudia Vianna Maurer Morelli

Data da defesa: 24-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Kalinca Patrícia Marengo Santos

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Almir de Sousa Martins

Professor (a) Doutor (a) Paulo Henrique Condeixa de França

Professor (a) Doutor (a) Claudia Vianna Maurer Morelli

Professor (a) Doutor (a) Fábio Rossi Torres

Professor (a) Doutor (a) Iscia Teresinha Lopes Cendes

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/01/2012

AGRADECIMENTOS

Agradecer é tão nobre mas ao mesmo tempo é uma tarefa difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças e por esquecimento não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para o sucesso do nosso trabalho portanto, tentarei não esquecer nenhuma pessoa, mas se esquecer me perdoe desde já...

Primeiramente agradeço ao Marcio meu marido, que apoia minhas decisões, incentiva, dá suporte, elogia e se orgulha das NOSSAS conquistas! E aos outros membros do quarteto fantástico, meus filhos Pedro Henrique e Júlio César que estiveram comigo primeiro na “barriga” viajando todos os dias em uma van, depois sentados ao meu lado junto ao computador. Mas, sempre em meus pensamentos e principalmente no meu coração apertado de mãe quando deixava o Pedro na escolinha e viajava para Campinas e em todos os outros momentos de alegrias e tristezas dessa longa jornada do doutorado, vocês foram o motivo pelo qual a jornada ficou mais longa, porém mais gratificante. E SEMPRE! SEMPRE! Que a mamãe tiver que fazer escolhas, vocês serão minha prioridade e também minha escolha mais acertada.

É com imensa alegria e com profundo reconhecimento que agradeço a minha orientadora a Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes, por respeitar minhas decisões e ter paciência para esperar minhas prioridades e também e por toda a ajuda para que esse trabalho fosse finalmente concluído.

Agradeço à FAPESP, que permitiu a viabilidade prática e a possibilidade de dedicar-me a este trabalho.

Agradeço a todos do departamento de Genética Médica-FCM, funcionários, professores e alunos.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Pessine e a sua equipe do Instituto de Química da Unicamp que contribuíram disponibilizando seus equipamentos e compartilhando seus conhecimentos.

Agradeço a Profa. Dra. Iris Torriane e a sua equipe do LNLS que contribuíram realizando os experimentos de SAX.

Agradeço o apoio dos meus queridos amigos e amigas do laboratório: Miriam, Claudia, Mariangela, Rejane, Fabio Rossi, Marcelo, Neide, Leonardo, Luciana, Rafael, Patricia, Vanessa, Vinicius, Thiago, Rodrigo e Marilza pelas alegrias e frustrações que pudemos compartilhar. Agradeço aos profissionais do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron- LNLS por fornecer uma excelente infraestrutura que possibilitou a realização de diversos experimentos.

Agradeço em especial minha amiga Neide, pois foi ela quem me apresentou a Dra. Iscia e sempre me apoiou esteve ao meu lado me dando “dicas” para vida pessoal e profissional.

Agradeço e tenho muitas saudades das minhas grandes e eternas amigas Miriam, Rejane, Mariangela, Neide e Claudia que foram e sempre serão importantes em minhas lembranças, mesmo que eu não mantenha contato vocês (eu avisei!) sempre estarão em meu coração.

Agradeço aos meus pais Valter e Sonia pelo amor, educação, dedicação, apoio emocional e financeiro. Por me fazer acreditar que independente do que aconteça sempre estarão do meu lado.

Ao meu querido irmão Felipe pela amizade, amor e respeito.

Sou muito grata a todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos de estudo. Em especial a minha querida vó Dina que sempre com sua fé inabalável me coloca em suas orações. Aos meu tios Renato e Cilene pelo carinho e amizade de uma vida inteira.

A família Caixeta e Santos por serem tão maravilhosos.

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida.

Dedico este meu trabalho e a minha vida
aos meus filhos **Pedro Henrique e Julio Cesar.**

E ao amor da minha vida meu marido **Marcio,**
pois sem voces nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.

“Começe fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o
impossível.”

São Francisco de Assis.

A análise molecular de proteínas é um componente crítico para o entendimento da molécula como um todo e de suas interações com outras moléculas nos mecanismos celulares. O papel de uma proteína no contexto celular fornece informações fundamentais para o entendimento de mecanismos biológicos causadores de muitas doenças hereditárias, cujas formas de tratamento ou cura são desconhecidas. Para que estas causas sejam elucidadas é necessário o entendimento dos processos de funcionamento das células, que em última análise depende essencialmente da descoberta das interações proteína-proteína no ambiente celular.

Dentro deste contexto, é grande o interesse nas proteínas envolvidas nos mecanismos causadores de uma classe de doenças neurodegenerativas hereditárias por repetições de poliglutaminas (poliQ), as ataxias espinocerebelares (SCAs). Dentre elas nosso interesse recaiu sobre a proteína relacionada à doença ataxia espinocerebelar do tipo1 (SCA1). A mutação responsável pela SCA1 foi atribuída a expansões instáveis de poliQ localizadas na região codificadora do gene *ATX1* que codifica uma proteína, a ataxina 1. A ataxina 1 apresenta entre 782-869 aminoácidos dependendo do número de glutaminas, tem massa molecular de aproximadamente 100 kDa, e é normalmente uma proteína predominantemente citoplasmática. No entanto, nos estados patológicos ela parece agregar-se no núcleo dos neurônios de pacientes com a SCA1 (Paulson et al., 1997).

O papel exato da proteína ataxina 1 normal ainda é desconhecido, embora evidências sugiram que sua função possa estar ligada a fatores de transcrição (Tsai et al., 2004). O mesmo acontece com o único domínio identificado e caracterizado na ataxina denominado *AXH* (De Chiara et al., 2005), que exibe uma similaridade significativa com a proteína *HBP1* que age como ativador da transcrição para diversos genes (Levender et al., 1997; Tevosian et al., 1997).

Neste estudo, o objetivo principal foi expressar e purificar o domínio AXH da proteína ataxina 1 e fragmento com poliQ nas formas normal e mutada, a fim de caracterizar essas regiões quanto às suas propriedades moleculares através da aplicação de técnicas de dicroísmo circular e raios-X de baixo ângulo.

Molecular analysis of proteins is a critical component to understanding the molecule as a whole and its interactions with other molecules in cellular mechanisms. The role of a protein in the cellular context provides information essential to understanding the biological mechanisms that cause many inherited diseases whose treatment or cure are unknown. For these causes are elucidated it is necessary to understanding the processes of cell function, which ultimately depends essentially on the discovery of protein-protein interactions in cellular environment.

Within this context, it is great interest in the proteins involved in the mechanisms causing a class of hereditary neurodegenerative diseases by repeats of polyglutamine (poliQ), the spinocerebellar ataxias (SCAs). Among them our interest fell on the protein related to the disease spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). The mutation responsible for SCA1 was attributed to unstable expansions of poliQ located in the coding region of *ATX1* gene that encodes a protein ataxin 1. Ataxin-1 shows between 782-869 amino acids depending on the number of glutamine, has a molecular mass of approximately 100 kDa, and is usually a predominantly cytoplasmic protein. However, in pathological states it seems to aggregate in the nucleus of neurons of patients with SCA1 (Paulson et al., 1997).

The exact role of the protein ataxin-1 standard is still unknown, although evidence suggests that its function may be linked to transcription factors (Tsai et al., 2004). The same applies to the only area identified and characterized in ataxin named AXH (De Chiara et al., 2005), which displays a significant similarity to HBP1 protein that acts as an activator of transcription for several genes (Levender et al., 1997; Tevosian et al., 1997).

In this study, the main objective is to express and purify the AXH domain of ataxin-1 protein in normal and mutated forms in order to characterize this region in terms of some of its molecular properties with the application of the techniques of circular dichroism and X-rays of low angle.

LISTA DE ABREVIATURAS

A= Adenina

aa= aminiácido

Akt= serina/ treonina proteína quinase (*serine / threonine protein kinase*)

AXH= Alanina- Aminoácido não especificado-Histidina

ATXN= Ataxina (*ataxin*)

C= Citosina

CAG= Citosina-Adenina-Guanina

CD= Dicroísmo Circular

DEPC= Dietilpirocarbonato

DH= Doença de Huntington

DMJ= Doença de Machado-Joseph

DNA= Ácido Desoxirribonucleico (*Desoxiribonucleic acid*)

DRPLA= Atrofia Dentatorubropalidoluisana (*Dentatorubropallidoluysian Atrophy*)

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetracético

FPLC = Cromatografia Líquida de proteína rápido (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

G= Guanina

GAPDH= Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

H= Heterozigosidade

HPRT = Hipoxantina Fosforibosil Transferase

IR= Imunorreativa

KDa= Quilo Dalton

LANP= *Leucine Rich Acidic Nuclear Protein*

Lns= Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

NIs= Inclusões Nucleares

NII= Inclusões Intranucleares Neurais

PAGE= Eletroforese em gel de Poliacrilamida (*Polyacrylamide gel electrophoresis*)

pb= Pares de Bases

PCR= Reação em cadeia da Polimerase (*Polimerase chain reaction*)

PoliQ= poliGn=Poliglutaminas

Q= aa Glutamina

RMN= Ressonância Magnética Nuclear

RNA= Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic acid*)

SAXS= Sistema de Espalhamento de raios-X

SBMA= Atrofia Muscular Bulbo Espinal (*Spinal and bulbar muscular atrophy*)

SCAs= Ataxias espinocerebelares

SCA1= Ataxia espinocerebelar tipo1

SCA2= Ataxia espinocerebelar tipo2

SCA3= Ataxia espinocerebelar tipo3

SCA7= Ataxia espinocerebelar tipo7

SCA17= Ataxia espinocerebelar tipo17

SDS= N-Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl sulfate*)

SNC= Sistema Nervoso Central

SOD= Superóxido Desmutase (*superoxide dismutase*)

T= Timina

TE= Tris - EDTA

TRIS= *Hidroximetil-aminometano*

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
I- INTRODUÇÃO	13
1.1- Doenças causadas por expansão de repetições do tríplice CAG	16
1.2- Ataxia	16
1.2.1- Ataxias espinocerebelares (SCAs) causadas por expansões CAG	17
1.3- Expressão de proteínas contendo expansões de trinucleotídeos	19
1.3.1- Knock-out de genes em camundongos	20
1.3.2- Animais transgênicos	20
1.4- Agregados intracelulares	22
1.5- Ataxia espinocerebelar tipo1	23
1.6- Ataxina 1 e seu Domínio AXH	26
II. JUSTIFICATIVA	27
III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1- Obtenção do cDNA da ATX	29
4.1.1- Separação dos leucócitos de sangue e extração do RNA total	29
4.1.2- Síntese de cDNA	29
4.1.3- Eluição do DNA do gel	30
4.1.4- Amplificação do cDNA completo de ATX1	30
4.1.5- Clonagem do fragmento AXH do cDNA ATX1	30
4.1.6- Amplificação do DNA plasmidial através de Mini-preparação. do DNA plasmidial	30
4.1.7- Sequenciamento do cDNA AXH.....	31
4.1.8- Digestão do Inseto	31
4.2- Expressão	31
4.2.1- Clonagem em Vetor de Expressão	31
4.2.2- Clonagem dos fragmentos ATX1N e ATX1E em vetores de expressão pET28a	32
4.2.3- Inserção das construções em linhagens de bactérias para a expressão dos fragmentos ATX1	33
4.2.4- Testes de Expressão	33
4.2.5- Expressão do fragmento 750 N e 750E	33
4.2.6- Expressão do domínio AXH da ataxina 1	34
4.3.- Purificação da proteína	34
4.3.1- Preparação das amostras para purificação	36
4.3.2- Purificação do domínio AXH	36
4.4- Diálise da amostra	37
4.5- Concentração da amostra	37

4.6.1- Dicroísmo circular (CD)	37
4.6.2- Difração de raio-X a baixo ângulo (SAXS)	38
4.7 Análise de Informática	40
4.7.1- Identificação de regiões conservadas na proteína ataxina 1 humana	40
V. RESULTADOS	41
5.1- Extração do RNA total	41
5.2- PCR controle reação de transcrição com β -actina	41
5.3- Amplificação do gene ATX1 1750 pb sem trato poliQ	42
5.4- Amplificação do gene ATX1N- 750 pb com poliQ	43
5.5- Clonagem e Mini-prep	43
5.6- Amplificação do cDNA completo de ATX1	44
5.7- Digestão do inserto	44
5.8- Amplificação do gene ATX1E- 750 pb com poliQ	45
5.9- Eluição do DNA do gel	46
5.10- Clonagem em vetor de expressão	47
5.11- Sequenciamento automático	47
5.12- Testes de expressão dos fragmentos 750N e 750E da proteína ataxina 1	47
5.13- Testes de expressão do fragmento 1750 pb sem trato poliQ	48
5.14- Expressão e Purificação dos fragmentos 750 N e 750E da proteína ataxina 1	48
5.15- Expressão e purificação do domínio AXH	52
5.16- Análises de Dicroísmo Circular (CD) das proteínas 750 N e do domínio AXH	54
5.17- Informações estruturais do domínio ATX1-AXH	56
5.18- Análises de raio-X a baixo angulo (SAXS) do Domínio AXH ligado a GST	57
5.19- Domínio AXH da ataxina 1 em solução tampão TEV	60
5.20- Domínio AXH da ataxina 1 em solução de tampão de cristalização	62
VI. DISCUSSÃO	66
VII. CONCLUSÕES.....	70
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
IX. ANEXOS	85

Os grandes avanços da biologia molecular no último século culminaram com a geração de milhares de sequências genômicas resultantes do sequenciamento total do genoma humano, estas por sua vez abriram uma nova frente para um desafio ainda maior: o entendimento desses genes em termos de estrutura e função de seus produtos, as proteínas. A análise molecular e estrutural de proteínas é um componente crítico para o entendimento das moléculas e suas interações nas atividades celulares. A compreensão do papel de uma proteína no contexto celular fornece dados fundamentais para o entendimento dos processos biológicos causadores de muitas doenças hereditárias cujas formas de tratamento ou de cura são desconhecidas. A possibilidade de tratamento destas doenças pode aumentar se conhecermos mecanismos que dependem essencialmente das interações proteína-proteína (Zoghbi e Orr, 2000).

Dentro deste contexto, é de grande interesse a investigação dos mecanismos envolvidos nas doenças neurodegenerativas hereditárias causadas pela expansão das poligutaminas (poliQ). Atenção a esse grupo de doenças iniciou-se em 1991, quando um novo mecanismo mutacional causador de doenças foi descoberto: a expansão instável de trinucleotídeos (ANEXO I)(Fu et al., 1991; La Spada et al., 1991).

As doenças por repetição de trinucleotídeos podem ser categorizadas em dois grandes grupos, baseando-se na localização das repetições: doenças envolvendo repetições não codificadoras (seqüências intrônicas) e doenças envolvendo repetições dentro da região codificadora (exônica), sendo essas últimas caracterizadas por expansões da seqüência trinucleotídica CAG (Childs et al., 2000; Cummings et al., 2000). Expansões de repetições geralmente possuem repetições de CAG, que codificam um segmento de (poliQ) na proteína mutada, dentro de regiões codificantes, são a causa de várias doenças neurodegenerativas, dentre as quais estão: a atrofia muscular espinobulbar (SBMA), doença de Huntington (HD), atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA) e ataxias espinocerebelares (SCAs) tipo 1, 2, 3, 6 e 7 (ANEXO II) (La Spada et al., 1991; Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Orr et al., 1993; Kawagushi et al., 1994; Koide et al., 1994; Pulst et al., 1996; Sanpei et al., 1996; Zhuchenko et al., 1997).

1.1- Doenças causadas por expansão de repetições do tríplice CAG

Antes dos avanços da genética molecular, a classificação destas doenças baseava-se na patogênese das mesmas, não havendo o conhecimento da causa específica e dos *loci* envolvidos. Foram amplamente denominadas como ataxias espinocerebelares dominantes ou recessivas, conforme seu padrão de herança. Com o avanço da genética molecular foi possível a identificação das mutações que levavam aos diferentes tipos de ataxias espinocerebelares. Os principais avanços no entendimento das SCAs ocorreram a partir dos anos 80 com o uso de marcadores genéticos (Stevanin et al., 2000). Sendo possível comprovar que as SCAs são causadas por mutações em genes distintos (Orr et al., 1993).

Expansões de repetições de CAG foram identificadas pela primeira vez no receptor andrógeno, em 1991, associada à atrofia muscular espinho-bulbar (SBMA) (Zoghbi et al., 1991). As ataxias SCA8 e SCA10 são exceções, pois apresentam expansões do trinucleotídeo CTG e do pentanucleotídeo ATTCT, respectivamente (Trott, 2006). Este tipo de mutação é conhecido como mutação dinâmica e pode ser encontrado em outras doenças neurológicas, como a doença de Huntington e a atrofia muscular ligada ao X (Gatchel e Zoghbi, 2005). Esse dinamismo provavelmente deve-se a base biológica das repetições na expansão e a sua instabilidade durante a divisão celular tanto na meiose quanto na mitose (Takiyama et al., 1995; Deka et al., 1999; Takiyama et al., 1999). Esta instabilidade gera, pelo processo de contração e expansão gênica, diferentes populações celulares com diferentes números de repetições formando um mosaico de células. A instabilidade na meiose ocasiona o mosaicismo gonadal observado no esperma de pacientes. Durante a transmissão estes pacientes apresentam tendência ao aumento do tamanho da expansão através das gerações. Este mosaicismo quando ocorre durante a mitose, é detectado em células somáticas (mosaicismo somático) incluindo linfócitos, células musculares e sistema nervoso central, porém é menos acentuado que o mosaicismo gonadal (Kameya et al., 1995; Maciel et al., 1997; Stevanin et al., 2000).

Apesar das diferentes proteínas afetadas, as doenças de poliglutaminas partilham algumas características, tais como a idade de início da doença mais comum na meia-idade, a perda progressiva de células neuronais, declínio de funções motoras e cognitivas (Jana e Nukina, 2003) e

uma proporcionalidade inversa entre o número de repetições de CAG e a idade de início da doença; contudo, fatores familiares e ambientais podem alterar esta correlação (Maciel et al., 1995). A conformação anormal da proteína mutada, resultando na sua agregação proteica a nível citosólico, nuclear e/ou outras organelas (tais como a mitocôndria) é também uma característica comum às doenças de poliglutaminas (Gatchel and Zoghbi, 2005).

Vários autores descrevem que na maior parte dessas doenças causadas por aumento no número de repetições, há diferenças quanto à gravidade das manifestações clínicas e a idade de início dos sintomas dependendo de qual genitor o alelo expandido é herdado. Entre as SCAs quando a transmissão é paterna, verifica-se uma tendência ao aumento no número de repetições nos filhos, ao contrário de quando o alelo expandido é transmitido pela mãe, no qual essa tendência não é observada. Portanto, esta transmissão paterna implica em manifestações clínicas mais graves nos filhos que muitas vezes podem apresentar os primeiros sintomas de ataxia em idades mais precoces que seus pais. Esta observação é conhecida como antecipação de sintomas e é comum nas doenças por expansão de poliglutaminas (Fraser, 1998).

O mecanismo pelo qual as mutações levam a neurodegeneração ainda não é pouco compreendido, o que é sabido até o momento é que indivíduos normais possuem os segmentos de trinucleotídeos dentro de um limite normal. Por outro lado, os pacientes apresentam esses segmentos de tamanho aumentado ou "expandido" (Li et al., 1993; Pulst et al., 2003). Existe um limite de repetições CAG característico de cada uma das SCAs para pessoas não acometidas e para indivíduos que apresentam a doença (Tabela 1). Além disso, encontram-se alelos intermediários em estudos com famílias. A presença desses grupos distintos de alelos evidencia a importância da definição da faixa de repetições CAG para indivíduos normais e pacientes. Indivíduos com alelos intermediários podem não manifestar clinicamente a doença enquanto outros indivíduos com o mesmo alelo intermediário podem apresentar sinais e sintomas, podendo ser considerados alelos com penetrância reduzida (Andrew et al., 1997).

Outra questão importante e ainda sem resposta é porque as proteínas com tratos expandidos de poliQ serem tóxicas ao neurônio. Várias pesquisas têm demonstrado que as proteínas com poliQ

desempenham suas funções em importantes vias metabólicas tais como interação com fatores transcricionais, modulação da tradução protéica e controle do dobramento e degradação proteica através da via ubiquitina-proteasomo (Berke et al., 2005; Evert et al., 2000; La Spada e Taylor, 2003; Latouche et al., 2006; Lebre et al., 2001; Michalik e Broeckhoven, 2003; Nicastro et al., 2005; Nicastro et al., 2006; Verhoef et al., 2002). Acredita-se que alterações dessas funções como no caso das proteínas com expansão, leva a um desequilíbrio em vias que mantêm o a estabilidade das células. Assim diferentes proteínas celulares passam a ser mal elaboradas desencadeando um efeito crônico e possivelmente deletério para o neurônio. Três vias parecem estar envolvidas nas doenças de expansão de poliQ: chaperoninas moleculares, ubiquitina-proteasomo e autofagia de poliQ (Soong e Paulson, 2007).

As chaperoninas moleculares parecem suprimir a toxicidade dos resíduos poliQ expandidos participando da síntese de proteínas nascentes e prevenindo a agregação e toxicidade das mesmas (Behrends et al., 2006).

Tabela 1- Limite de repetições das SCAs dominantes.

Doença	Repetições	Normal	Intermediário	Expandido	Referências Bibliografica
SCA1	CAG	6-39	36-41	39-81	Matilla et al., 1993 Zhulke et al., 2002
SCA2	CAG	14-31	32-34	34-57	Cancel et al., 1997
SCA3	CAG	13-41	46-56	62-84	Giunti et al., 1995; Takiyama et al., 1995 Van Alfen et al., 2001
SCA6	CAG	4-16	19-20	21-27	Zuchenko et al., 1996
SCA7	CAG	4-17	28-36	37->300	Stevanin et al., 1998

1.2- Ataxia

A ataxia, que significa a perda de coordenação dos movimentos musculares voluntários, é um sintoma que faz parte do quadro clínico de numerosas doenças que comprometem o sistema nervoso.

A perda de coordenação pode afetar os membros, a fala, os movimentos dos olhos ou de outras regiões do corpo. Os sintomas geralmente decorrem de disfunções do cerebelo (parte do cérebro responsável pela coordenação motora), lesões na medula espinhal, neuropatia periférica ou de uma combinação desses fatores. As ataxias podem ser hereditárias ou adquiridas. As ataxias adquiridas geralmente ocorrem em indivíduos que não têm histórico familiar de ataxia e podem ter causas diversas tais como: trauma craniano, alguns tipos de câncer, exposição a certas drogas, o alcoolismo ou a deficiência de determinadas vitaminas (Koob et al., 1999, Orr e Zoghbi, 2001).

1.2.1- Ataxias espinocerebelares (SCAs) causadas por expansões CAG

As ataxias espinocerebelosas (SCA, do inglês “spinocerebellar ataxia”) são causadas por um funcionamento anormal do cerebelo ou das suas conexões aferentes ou eferentes (Carlson et al., 2009). As SCA são um grupo complexo e heterogêneo clínico e genético. A idade de início da doença é normalmente entre os 30 e os 50 anos de idade, evoluindo progressivamente para um estado fatal (Zoghbi and Orr, 2000).

Os portadores de SCA apresentam os seguintes sintomas e sinais: ataxia (alteração de equilíbrio), disartria (dificuldade na articulação das palavras), dismetria (dificuldade em realizar movimentos para alcançar um alvo), alterações na voz, na escrita e na coordenação motora. Os sintomas, a velocidade de progressão da doença e a intensidade do quadro clínico podem variar bastante entre diferentes famílias e entre pessoas de uma mesma família. A prevalência das SCAs é estimada em 1-4/1000000 (Manto, 2005). Nas SCAs também ocorre o fenômeno de antecipação, claramente observado na SCA2 e SCA7, que consiste na manifestação mais grave e mais precoce nas gerações mais recentes (Jardim, 2000; Paulson, 2007).

Todas as formas de SCAs causadas por expansões (CAG)_n conhecidas têm um padrão de herança autossômico, no qual indivíduos de ambos os sexos são igualmente afetados e o risco de que um filho ou filha de um afetado apresente a doença é de 50%. As SCAs foram classificadas de acordo com a ordem de identificação da mutação no gene responsável pelas ataxias do tipo 1, 2, 3, e assim

por diante. Até o momento, 30 *loci* distintos foram associados às formas mendelianas de SCA (Bird, 2009).

A incidência das diferentes formas de SCA é variável entre as populações mundiais. A Doença de Machado Joseph (DMJ), também, conhecida como ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3, do inglês “spinocerebellar ataxia type 3”), é a ataxia autossômica dominante mais comum no mundo e também entre a população brasileira (Gan et al., 2010; Schols et al., 2004). Tal como na maioria das doenças poliglutamínicas, os cérebros dos doentes com mutação no gene associado à doença apresentam agregados intranucleares e apresentam perda de células neuronais em áreas seletivas do cérebro (Paulson, 2007). Na DMJ essas áreas incluem o cerebelo, núcleo dentado, núcleos pontinos, a substância negra e o estriado, entre outras (Alves et al., 2008; Hands et al., 2008). A mutação responsável pela SCA3/MJD está localizada no cromossomo 14. Esta doença foi descrita inicialmente em famílias com origem portuguesa, mas hoje se sabe que famílias com outras origens também apresentam esta mutação (Harding, 1984).

O entendimento crescente das doenças por expansão de repetição de trinucleotídeos proporcionou explicações moleculares para esses fenômenos incomuns, que podem também ter impacto em outras doenças, tais como as doenças psiquiátricas. Primeiro, a gravidade do fenótipo é geralmente associada ao comprimento crescente da repetição trinucleotídica e todas as mutações têm tratos de repetições mais longas do que os alelos normais. Essas mutações ocorrem tanto em células somáticas como em linhagens germinativas (Cumplings e Zoghbi, 2000). Além disso, as repetições de trinucleotídeos em cromossomos normais são comparativamente estáveis quando passadas de uma geração a outra, em contraste, as doenças por expansões de trinucleotídeos são altamente mutáveis e tendem a expandirem mais frequentemente do que contraírem em gerações sucessivas (Paulson, 2007).

A patogênese gerada por expansões de poliglutaminas envolve uma proteólise específica das proteínas alteradas gerando fragmentos tóxicos com longos tratos de poliglutaminas, que agregam e são acumulados em corpos de inclusão nos neurônios (Warrick et al., 1998). As proteínas implicadas nas doenças por expansão de poliglutaminas estão envolvidas na produção de fragmentos

proteolíticos, acúmulo celular e processamento por caspases (Young et al., 2007). O acúmulo da proteína alterada ocorre no núcleo das células para SCA1, SCA7 e SCA17, no citoplasma para SCA2 e SCA6, e em ambos para SCA3 (Gatchel et al., 2005). Estudos mostram que mesmo peptídeos sem função celular, contendo longas sequências de poliglutaminas, se agregam, apresentando toxicidade, sugerindo que grande parte dos problemas causados por expansões de CAG não são causados pela deficiência na função das proteínas alteradas, mas por um ganho de função tóxica (Marsh et al., 2000).

1.3- Expressão de proteínas contendo expansões de trinucleotídeos.

A função de tratos de poliglutaminas associados a alelos normais ainda não é clara, tratos são encontrados em uma série de proteína tais como no fator de transcrição Sp1, todas as proteínas Sp são fatores de transcrição que se ligam a sequência de DNA ricas em CG. Sp1 é um fator de transcrição ubíquo, envolvido no controle de uma grande quantidade de genes que participam em processos biológicos como apoptose, inibição do crescimento celular, diferenciação e carcinogênese (Kolell et al., 2002; Lee et al., 2005). É possível que estas sequências estejam frequentemente presentes em cromossomos humanos normais porque são tolerados dentro de uma faixa de tamanho normal (Rubinsztein e Hayden, 1998).

A maioria das evidências provém de estudos da HD, causada por expansões de repetições de CAG no gene codificador da huntingtina, uma proteína de função desconhecida. Análises imunocitoquímicas e de *Western blot* para verificação da expressão da huntingtina mutante e normal em diferentes tecidos demonstraram que a mutação na HD não elimina a expressão do gene, mas produz uma proteína alterada com expansão de poliglutaminas, próxima a sua porção N-terminal (Persichetti et al., 1995).

Considerando a hipótese de que longos tratos de poliQ alteram a expressão gênica, Lin e colaboradores em 2000 encontraram alguns genes neuronais, abundantes em células de Purkinje (sítio primário da neurodegeneração em SCA1), envolvidos em transdução de sinal e homeostase de

cálcio com baixa expressão em camundongos com SCA1. Eles verificaram ainda que esta regulação ocorria antes da detecção da patologia. Processo semelhante ocorreu em tecidos humanos, de modo que a modulação da expressão gênica pode ser o primeiro mediador da toxicidade de poliQ.

Vários modelos experimentais tentam explicar o processo de neurodegeneração neste grupo de doenças. Três diferentes abordagens têm sido utilizadas na busca de maiores informações sobre este mecanismo: *knock-out* dos genes envolvidos, animais transgênicos e expressão de proteínas.

1.3.1- *Knock-out* de genes em camundongos

Para distinguir entre “perda” ou “ganho de função”, modelos do homólogo murino de HD, o Hdh, foi inativado pela técnica de *gene targeting*. Ratos heterozigotos para Hdh são fenotipicamente normais, enquanto que a homozigose resulta em morte embrionária. O fato da inativação do Hdh não reproduzir a neuropatologia da HD no adulto sugere um ganho de função na doença (Duyao et al., 1995; Woda et al., 2005).

Camundongos com deleção dirigida do gene de SCA1 também foram criados (Clark et al., 1997). Animais heterozigotos são normais e os homozigotos apresentam déficits de comportamento e aprendizagem, mas não foram observadas evidências de degeneração neuronal progressiva como é vista na SCA1 (Zu et al., 2004)

1.3.2- Animais transgênicos

Uma das principais células afetadas pela expansão de poliglutaminas, principalmente nas ataxias espinocerebelares, é a célula cerebelar de Purkinje. A expressão dirigida de ataxina 1 mutante em células de Purkinje de ratos transgênicos produz um fenótipo atáxico com similaridades patológicas à doença humana. Outros experimentos com animais transgênicos, usando formas alteradas de ataxina 1, mostraram que a localização nuclear da proteína mutante é necessária para a patogênese e que agregados nucleares da proteína mutante ubiquitinada, uma característica de SCA1 e outras doenças de poliQ, não são um requisito para a patogênese em modelos transgênicos de SCA1 (Klement et al., 1998).

A fim de verificar se estes fenótipos são resultantes meramente de uma toxicidade generalizada do trato de poliQ ou se obedecem a um mecanismo de degeneração de neurônios semelhante ao que ocorre em pacientes, Ordway e colaboradores, 1997 inseriram um trato com 146 repetições de CAG em um gene codificador de uma proteína, que previamente não apresentava trato de poliQ, a hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) de rato. De forma similar aos transgênicos de HD, estes ratos desenvolveram crises, tremores, disfunção motora e morreram prematuramente. Entretanto, a perda neuronal seletiva característica de HD não foi observada nos ratos HPRT. Assim, as evidências das diversas linhas de estudo confirmam a toxicidade do trato expandido de poliQ e mostram que isto ocorre independentemente do contexto da proteína (Cummings e Zoghbi, 2000).

O uso de animais transgênicos desenvolvidos com variadas expansões de poliglutaminas é frequente na investigação da DMJ (Chou et al., 2008; Boy et al., 2010; Silva-Fernandes et al., 2010), bem como a utilização de vetores virais e não virais que permitem a expressão de Atx3 mutante (Alves et al., 2008; Todi et al., 2007).

Para identificar os produtos protéicos resultantes da interação com o tipo selvagem de ataxina 1, Koshy e colaboradores, 1996 realizaram também experimentos do tipo duplo híbrido com os alelos normais de SCA1 contendo 30 glutaminas usando uma biblioteca de embrião de rato; eles identificaram a GAPDH como uma proteína que interage com a ataxina 1. Uma possível hipótese para explicar o papel da GAPDH seria a de um lento declínio de energia metabólica da célula neuronal pós-mitótica disparando um mecanismo degenerativo. Em 1997, Matilla e colaboradores identificaram outra proteína que interage com a ataxina 1, uma proteína nuclear ácida e rica em leucina (LANP – *Leucine Rich Acidic Nuclear Protein*), de função ainda desconhecida, mas possivelmente com papel na morfogênese cerebelar. Esses autores verificaram que a ataxina 1 altera a localização normal de LANP que antes era distribuída de forma homogênea no núcleo para subestruturas nucleares ligadas à matriz nuclear, fazendo da LANP uma excelente candidata a mediadora tecido-específica da patogênese.

Estudos com ratos forneceram também a evidência que a degradação acelerada da ataxina 1 mutante pode estar associada com a patogênese da doença (Cummings et al., 1998). Embora os

ratos sejam úteis para estudar os mecanismos da doença, este modelo somente apresenta o fenótipo associado com a disfunção das células de Purkinje.

1.4- Agregados intracelulares

Muitos trabalhos têm destacado uma característica morfológica comum a várias doenças com expansões de poliQ: agregados intracelulares têm sido encontrados em pacientes afetados (DiFaglia et al., 1997), em modelos murinos (Davies et al., 1997) e em modelos *in vitro* de HD (Cooper et al., 1998; Hackam et al., 1998; Li e Li, 1998, Martindale et al., 1998), SCA1 (Skinner et al, 1997), SCA3 (Paulson et al., 1997), SBMA (Ellerby et al., 1999; Merry et al., 1998) e DRPLA (Becher et al., 1998; Igarashi et al., 1998). Esses agregados podem ser encontrados tanto no núcleo como em regiões extranucleares. A composição específica destes agregados é desconhecida, mas evidências sugerem que fragmentos truncados de poliQ estão associados a uma frequência aumentada de formação de agregados e que todos eles são marcados por anticorpos de ubiquitina, sugerindo serem passíveis de sofrer ubiquitinação (Davies et al., 1997; Becher et al., 1998; Di Faglia et al., 1997; Paulson et al., 1997). A relação entre estes agregados e morte celular não foi ainda definitivamente comprovada. Entretanto, existem evidências de que os agregados têm correlação com uma suscetibilidade aumentada de morte celular (Hackam et al., 1998; Martindale et al., 1998), e que a inibição de clivagem associada com a diminuição da formação de agregado está correlacionada a menor morte celular (Ellerby et al., 1999), sugerindo que os agregados estão de alguma forma relacionados à morte celular.

Descobertas em humanos sugerem que os agregados estão presentes em numerosas células onde a morte celular não ocorre ou ocorre menos frequentemente (Klement, 1998). Agregados têm sido encontrados também em tecidos periféricos, fora do sistema nervoso central em doenças de poliQ, sugerindo que enquanto os agregados celulares podem estar associados à morte celular, outros fatores, tais como composição celular específica e condições do meio ambiente celular e tecidual tornam algumas células específicas mais suscetíveis aos efeitos tóxicos da formação dos agregados (Paulson et al, 1999).

1.5- Ataxia espinocerebelar tipo 1

Dentro do grupo das ataxias espinocerebelares (SCAs) está a ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA1), também conhecida por ataxia de Marie. A SCA1 foi descrita em famílias de diferentes origens geográficas e étnicas sendo encontrada mais frequentemente entre descendentes de italianos e europeus orientais, além de canadenses e japoneses (Ranum et al., 1994; Kraft et al., 2005). No Brasil, a maioria dos indivíduos acometidos por SCA1 foram diagnosticados na população do sul do país (Trott et al., 2006).

A SCA1 é uma doença neurodegenerativa progressiva autossômica dominante causada pela expansão de trinucleotídeos CAG na região codificadora do gene ATX 1 no *locus* 6p22-p23. O número de repetições varia de 6 a 39 em alelos normais e de 40 a 82 nos alelos mutados, sendo que ambos os alelos, tanto os normais como os expandidos, são transcritos (Zoghbi, 1995; Zoghbi, 2005). A faixa normal pode apresentar interrupções de 1 a 3 CAT, o que estaria envolvido na estabilidade da sequência de repetições de trinucleotídeos durante a replicação do DNA (Zuhlke et al., 2002).

O gene *ATXN1* possui 450 kb e está organizado em 9 exons. Os primeiros sete exons fazem parte da região 5' não traduzida, enquanto que os dois últimos contêm a região codificadora de 7.277 pb e a região 3' não traduzida. Os primeiros quatro exons não codificadores apresentam sítios para processamento alternativo em vários tecidos (Banfi et al., 1996). A proteína ataxina 1 apresenta cerca de 792-869 aminoácidos (aa) dependendo do número de glutaminas, com um peso molecular de aproximadamente 100 kDa e é predominantemente citoplasmática, mas estudos relatam a ocorrência de agregação dessa proteína no núcleo dos neurônios de pacientes afetados (Paulson et al., 1997; Kim et al., 2003).

A expressão da ataxina 1 é amplamente distribuída no sistema nervoso central (SNC) e tecidos periféricos, apresentando localização nuclear e citoplasmática no neurônio (David et al., 1997; Cancel et al., 2000). Vários grupos estudaram a localização da ataxina 1 com anticorpos monoclonais e policlonais em tecidos do SNC e fora do SNC (Cancel et al., 2000; Lindenberg et al., 2000; Einum et al., 2001; Jonasson et al., 2002), demonstrando que a ataxina 1 é amplamente expressa, mas que os níveis de expressão variam entre os tecidos, sendo encontrada no compartimento citoplasmático e

nuclear. A ataxina 1 nuclear imunorreativa (IR) mais intensa foi encontrada em neurônios, os que apresentavam maior intensidade de ataxina 1 nuclear IR são mais suscetíveis a SCA1 (Lindenberg et al., 2000). A expansão trinucleotídica do gene da SCA1 é a mais instável das repetições CAG conhecidas. Como ocorre em outras doenças de trato de poliglutaminas o comprimento da expansão de CAG está correlacionado diretamente com a severidade da doença, quanto mais longa a expansão mais severo os sintomas, e mais precoce a idade de início da doença.

Clinicamente, esta doença é caracterizada por ataxia progressiva, manifestando-se tardiamente, geralmente aos 30 ou 40 anos de idade, frequentemente levando ao óbito após 10 anos do aparecimento dos primeiros sintomas (Zoghbi e Orr, 1995). Os sintomas neurodegenerativos são caracterizados por ataxia cerebelar, disartria, oftalmoparesia, oftalmoplegia, sinais piramidais e extrapiramidais, apresentando um grau variável de amiotrofia e neuropatia. Os sinais neuropatológicos incluem perda neuronal severa no cerebelo e bulbo, bem como degeneração das áreas espinocerebelares (Matilla-Dueñas et al., 2008).

Quando mutado, o gene ATX 1 produz uma proteína que apresenta uma expansão do trato de poliglutamina (poliQ) levando a uma morte seletiva das células de Purkinje no córtex cerebelar (Klement et al., 1998) devido a interações anormais com outras moléculas dos neurônios envolvidos. A expansão de poliglutamina leva à agregação da proteína ataxina 1, sendo que a enzima superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), envolvida na patogênese de outras doenças neurodegenerativas que também apresentam agregados protéicos localizados no citoplasma das células é translocada para dentro do núcleo de células HeLa na presença de ataxina 1 expandida (Davidson et al., 2000; Hong et al., 2002; Kim et al., 2003; Chen et al., 2003). Quanto maior for a expansão de poliglutamina, mais alto é o nível de translocação de Cu/Zn-SOD (*superoxide dismutase*). Além disso, a oxidação de proteínas intracelulares ocorre com maior frequência na presença da proteína ataxina 1 mutada, sugerindo que a atividade funcional de Cu/Zn-SOD deve ser diminuída pela ataxina 1 mutante (Kim et al., 2003). Já a proteína 14-3-3, uma molécula regulatória multifuncional, tem como função intermediar a neurotoxicidade da ataxina 1 ligando-se e estabilizando a proteína, ou seja, diminuindo a degradação da mesma. A associação da ataxina 1 com 14-3-3 é regulada pela fosforilação Akt (*serine/threonine*

protein kinase), sendo que 14-3-3 e Akt modulam a neurodegeneração. Ambas cooperam para modular a neurotoxicidade da ataxina 1, sendo então potenciais alvos para intervenção terapêutica (Chen et al., 2003).

O núcleo celular e o sítio subcelular onde a proteína ataxina 1 mutada atua para causar a doença no cerebelo indicam que a expansão do trato de poliglutamina altera suas propriedades estruturais (Orr e Zoghbi, 2001). Proteínas adicionais têm sido identificadas, sendo que alterações conformacionais ocorrem através de interações destas com a região de poliglutamina ou com as demais regiões da ataxina 1, o que leva à citotoxicidade de SCA1 (Kang e Hong, 2009). Na SCA1, e também em outras doenças causadas por poliglutaminas, a proteína expandida se agrega como inclusões nucleares (NIs). Esta característica ultra-estrutural comum às doenças em questão, também denominada de inclusões intranucleares neuronais (NII), inclui as proteínas expandidas (Klockgether et al., 2000).

Os mecanismos tóxicos de ganho de função pelos quais a expansão poliQ induz a morte neuronal não estão completamente eluciados e nenhuma terapia efetiva está disponível ainda. Contudo, a elucidação de rotas moleculares reguladas pela ataxina 1 está levando à descoberta de novos caminhos implicados na SCA1, sugerindo que efeitos negativos exercidos pela proteína mutante, mais do que apenas mecanismos de ganho de função, também devem ser responsáveis pela patogênese de SCA1 (Matilla-Dueñas et al., 2008). Estudos bioquímicos e genéticos evidenciam que a expansão da poliglutamina aumenta as interações que são normalmente reguladas por fosforilação na Ser776 da proteína alterada e uma subsequente alteração na sua interação com outras proteínas celulares. Além disto, os achados de que outras interações da ataxina 1 estão diminuídas na doença, sugerem que a expansão de poliQ contribua para SCA1 por ganho de função e também por perda de função parcial (Zoghbi e Orr, 2009).

Há ainda evidências de que a ataxina 1 tenha uma atividade de ligação a RNA, inversamente afetada pelo tamanho do trato de poliglutamina, sugerindo que a proteína ataxina 1 tenha algum papel no metabolismo do RNA, e que a expansão do trato de poliglutamina possa alterar esta função (Yue, et al., 2001).

1.6- Ataxina 1 e seu Domínio AXH

Uma maneira eficiente de prever a função de uma proteína é identificando homologia entre sua sequência e a de outras proteínas (Bork, 1996). A identificação e caracterização de um domínio em comum em proteínas aparentemente não relacionadas podem ser considerada como ferramenta poderosa para detectar unidades conservadas e até mesmo prever algo sobre suas funções (Mushegian, 1997). A única região descrita para ataxina 1 é um domínio pequeno de 130 aa conhecido como AXH (Alanina-aminoácido não especificado-Histidina) e que também não tem sua função conhecida. Esta região exibe uma similaridade significativa com a sequência da proteína HBP1 (HMG box- containing transcription factor 1), que está envolvida na transcrição e na interação com RNA.

O domínio AXH apresenta-se dimérico com estrutura β - pregueada semelhante a outras proteínas com sítios de ligação ao RNA. Este domínio AXH parece também ter interações distintas com outras proteínas, possuindo, provavelmente funções desconhecidas dentro da célula (Chen et al., 2004). Estudos com regulação da transcrição em cultura celular e em *D. melanogaster* evidenciaram que a proteína mutante inibe a transcrição através da diminuição de função do domínio AXH envolvido na modulação do processo transcricional (repressor transcricional) (Okazawa et al., 2002; De Chiara et al., 2005; Tsuda et al., 2005; Lam et al., 2006).

O estado agregado nas duas famílias de proteínas, AXH e da HBP1 mostram-se diferentes, pois enquanto as curvas de equilíbrio de sedimentação na Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aproximam-se de dímeros, a AXH dependendo da concentração de sal tem uma tendência elevada de combinar-se na formação de tetrâmeros (De Chiara et al., 2003). Os autores especulam que esses tetrâmeros poderiam estar relacionados à função proteica normal, portanto, os dados demonstrando a formação de tetrâmeros do domínio AXH podem ser muito importantes funcionalmente, pois podem estar relacionados ao mecanismo de ação da ataxina 1 (De Chiara et al., 2005).

O papel da proteína ataxina 1 normal e mutante ainda é desconhecido, sendo assim qualquer descoberta a respeito dessa proteína tem chances de contribuir de maneira significativa para o avanço na direção do conhecimento da fisiopatologia da ataxia espinocerebelar do tipo 1, uma doença debilitante e sem tratamento disponível. E é com o intuito de avançar no entendimento sobre proteínas de importância médica, e suas interações, que este trabalho foi concebido.

A maior relevância deste nosso projeto está no fato do papel da proteína ATX1 normal e mutada ser desconhecido e ela estar envolvida em uma doença que implica em prejuízos emocionais, afetivos e sócio econômicos, uma vez que atinge e debilita indivíduos na fase produtiva de sua carreira, além de ter um grande impacto emocional dentro de famílias com indivíduos afetados, pois os primeiros sintomas se manifestam na idade adulta quando o indivíduo na maioria das vezes já constituiu família.

Objetivo Geral

- Estudar características moleculares *in vitro* da proteína ataxina 1 normal e mutada.

Objetivos Específicos

- Clonar, isolar, sequenciar e caracterizar a proteína ataxina 1 normal e mutada.
- Expressar o domínio AXH da ataxina 1 em sistema bacteriano.
- Purificar quantidades suficientes do domínio AXH da ataxina 1 para permitir estudos moleculares e estruturais.
- Aplicar técnicas de dicroísmo circular (CD) para verificar a estrutura secundária do domínio AXH.
- Aplicar técnicas de difração de raio-X a baixo ângulo (SAXS) para avaliar a forma adquirida pelo domínio AXH em solução.

4.1- Obtenção do cDNA *ATX1*

4.1.1- Separação dos leucócitos de sangue e extração do RNA total

Para o isolamento das células brancas dos demais componentes do sangue foram utilizados 20 mL de sangue periférico coletado de um indivíduo normal e outro afetado. A separação dos componentes do sangue realizou-se utilizando *Ficoll-Paque Plus* (Amersham/ Bioscience), um polímero que separa o sangue por meio de uma mistura de quatro fases: 1-hemácias, 2- FICOLL, 3- linfócitos, 4- plasma, que é a fase de menor densidade. O RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante e adaptado (ANEXO III). O RNA foi ressuspensionado em 10 µL de água DEPC a 0,01% (água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato). As amostras foram submetidas à eletroforese para a constatação da integridade das bandas de RNA ribossômico 18S e 28S. As cubas e acessórios utilizados na eletroforese de amostras de RNA foram previamente lavados com água e detergente neutro e tratados por imersão em água DEPC a 0,01% durante 12 horas para a eliminação de RNases. O gel e as soluções também foram preparados com água DEPC a 0,01% em vidraria previamente tratada por aquecimento a 180 °C por 4 horas..

4.1.2- Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado com o emprego do kit *ReverAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) com oligo(dT) e também iniciadores antisenso específicos. Para a amplificação do fragmento de DNA específico AXH foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para essa sequência de cDNA, utilizando como molde a sequência de aminoácidos da *ATX1*, depositada no banco de dados GenBank gi |4506793| (ANEXO IV). Os *primers* iniciadores foram desenhados com sítios de reconhecimento para enzimas *NdeI* (senso) e *XhoI* (antisenso) (ANEXO V) para inserção do cDNA no vetor de expressão pET28a (Novagen), que possui sítio de restrição destas enzimas entre as suas duas sequências codificantes de poli-histidinas. As análises das sequências foram feitas em programas disponíveis na rede (www.EMBL-heidelberg.de).

4.1.3- Eluição do DNA do gel

A purificação do fragmento amplificado da ataxina 1 realizou-se com o emprego do kit [S.N.A.P.™ UV-Free Gel Purification](#) (Invitrogen). Para a verificação do rendimento, 5 µL da amostra foi analisado em gel de agarose a 1%.

4.1.4- Amplificação do cDNA completo de ATX1

Para obtenção da sequência completa do cDNA (2450 pb) utilizou-se duas reações de RT-PCR, uma reação gerou um fragmento de 970 pb (com poliGn) e outra de 1750 pb (sem a poliGn) (ANEXO VI). A porção de 970 pb contém o sítio de restrição *NdeI* no *primer* senso, e a porção de 1750 pb contém o sítio de restrição *XhoI* no *primer* antisenso. Após a amplificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose e isolados com o *kit GFX* (Amershan). Os fragmentos eluídos foram desnaturados a 95 °C por 5 minutos e submetidos a novo anelamento com temperatura (48 °C) para que ocorresse uma nova extensão e assim a obtenção da sequência completa em um novo PCR.

A sequência completa de cDNA ATX1 foi clonada em vetor TOPO, após digestão com *NdeI* e *XhoI*, o inserto foi clonado em vetor pET28a e a construção foi inserida em *E. coli* DH5α. Foi feito o sequenciamento das extremidades e confirmado tratar-se do cDNA completo de ATX1.

4.1.5- Clonagem do fragmento AXH do cDNA ATX1

A clonagem do fragmento AXH do cDNA *ATX1* e também a transformação das bactérias competentes com o vetor contendo o inserto foram realizadas com o kit *TOPO CLONING* (Invitrogen) ou pGen (Trasy).

4.1.6- Amplificação do DNA plasmidial através de Mini-preparação do DNA plasmidial

Os plasmídeos recombinantes foram obtidos por mini-preparação utilizando o Kit UltraClean Mini Plasmid Prep Kit (MoBio) seguindo as instruções do fabricante. Após extrações plasmidiais, estes foram analisados em gel de agarose 1% para verificação da presença do inserto, através da comparação do tamanho dos clones com o peso molecular esperado. Aqueles que apresentaram o

tamanho esperado (vetor+inserto) foram sequenciados, para nos certificarmos da integridade da sequência do inserto.

4.1.7- Sequenciamento do cDNA AXH

Os clones foram sequenciados em tubos de reação contendo o *primer M13* universal direto (5'– GTA AAA CGA CGG CCA G –3') e o *primer M13* universal reverso (5'– AAC AGC TAT GAC CAT G –3'). O sequenciamento das amostras foi obtido seguindo recomendações do fabricante (Amersham Biosciences) em sequenciador Mega Bace1000 (Amersham Biosciences). A reação de sequenciamento consistiu na mistura, em placa de 96 poços, de 1 µL da reação de PCR, 1 µL do oligo direto ou reverso (5 µmols/µL), 7 µL de água ultrapura e 4 µL de premix kit DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), utilizando o seguinte programa: 94 °C por 2 minutos, 94 °C por 20 segundos, 56 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto

4.1.8- Digestão do Inserto

O plasmídio contendo o inserto de interesse foi clivado com as enzimas de restrição *NdeI* (Fermentas), seguida por digestão com *XhoI* (Fermentas). A mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. A inativação das enzimas foi feita a 95 °C por 5 minutos.

4.2 Expressão

4.2.1- Clonagem em Vetor de Expressão

O inserto digerido foi clonado em vetor de expressão pET28a (Novagen) misturando-se 200 µg de inserto digerido, 50 µg de vetor pET28a previamente digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, tampão de ligação 1x (Gibco), 1 µL de T4 DNA ligase (Gibco) e 4 µL de água deionizada. A reação foi incubada a 16 °C por 16 horas.

O volume total do produto de ligação (10 µL) foi usado para a transformação, primeiramente das bactérias competentes *Escherichia coli* linhagem *JM109* ou *DH5α* uma segunda transformação foi realizada em *E. coli* competente das linhagens *BL21*(DE3, C41, C43 Plys-E, PLys-S), RP, RIL, Rosetta, Origami, que são cepas específicas para expressão de proteínas.

4.2.2- Clonagem dos fragmentos *ATX1N* e *ATX1E* em vetores de expressão pET28a.

Após serem inseridos em vetor de clonagem pGEM-T (Promega), os fragmentos 750 pb normal (750 N) e 750 pb expandido (750E), e também um outro fragmento de 1750 pb que não contém o trato poliQ. Os sítios de restrição senso *Nde* e antisenso *XhoI* foram digeridos, e inseridos em vetores de expressão pET28a (Novagen), que contém tags com cauda de poli-histidina (6xHis) (Amersham Bioscience). A digestão dos fragmentos foi realizada com 3 µg de cada miniprep (pGEM+ inserto), 1% de BSA, 20 unidades da enzima de restrição *NdeI* e 1X tampão D (60 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1,5 M NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT) da enzima *NdeI*, completado o volume para 20 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C, por um período de 4 horas e em seguida inativadas a 65 °C por 20 minutos. A verificação das bandas foi feita em gel de agarose, e a eluição com o *kit WIZARD SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A seguir, foi realizado a digestão com a enzima *XhoI*, para a liberação do fragmento do vetor, foram utilizados 17 µL de material digerido com *NdeI*, 5 unidades da enzima de restrição *XhoI*, 1X tampão H da enzima *XhoI* (900 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂). As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas e em seguida inativadas a 65 °C por 20 minutos. O vetor pET28a foi digerido utilizando-se 1 µg das minipreps, 1% de BSA, 4 unidades da enzima de restrição *NdeI*, 1X tampão da enzima *NdeI*, para um volume final de 20 µL. Esse material foi incubado por 4 horas a 37 °C e em seguida inativado a 65 °C por 20 minutos. A digestão foi verificada em gel de agarose e purificada por eluição das bandas do gel, utilizando o *kit WIZARD SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Para a segunda digestão, utilizou-se 17 µL de material digerido com *NdeI*, duas unidades da enzima de restrição *XhoI* e 1X de tampão H *XhoI*. O material digerido foi submetido a eletroforese e a banda correspondente foi eluída do gel de agarose utilizando o *kit WIZARD SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Os fragmentos de insertos e vetores, gerados pelas digestões foram então ligados, utilizando-se uma proporção aproximada de 3:1 de inserto e vetor respectivamente, 1X tampão da enzima ligase, 20 unidades da enzima ligase, a um volume final de 10 µL. Este material permaneceu em incubação a 16 °C por toda à noite, após este período o produto da ligação foi inserido em bactérias DH5α através de choque térmico.

4.2.3- Inserção das construções em linhagens de bactérias para a expressão dos fragmentos

ATX1

As construções 750 N-pET28a, 750E-pET28-a, 1750-pET28a foram inseridas nas cepas de expressão das linhagens BL21(DE3) (Novagen), BL21(DE3) plysS (Novagen), CódonPlus (DE3)-RIL (Stratagene), Rosetta (DE3) (Novagen) e C43(DE3), com exceção da cepa BL21(DE3) plusS, as demais foram co-transformadas com o plasmídeo para códons raros pRARE (Novagen). As colônias de bactérias transformadas foram submetidas a testes de expressão e analisadas por SDS-PAGE 10%.

4.2.4- Testes de Expressão

Testes de expressão foram feitos da seguinte forma: colônias de clones de expressão transformadas foram pré-inoculadas em 3 mL de meio de cultura LB líquido contendo o antibiótico necessário na concentração final de 50 µg/mL, sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Após as 16 horas, foram adicionados 1000 µL de cada pré-inóculo a 100 mL de meio LB e deixados em agitação constante de 200 rpm, até atingir a densidade ótica de 0,6 em 600 nm (GeneQuant), as culturas em erlenmeyers de 250 mL foram incubados a 25 °C, 30 °C e 37 °C, sob agitação 250 rpm. Após adicionar-se 0,4 mM de IPTG para induzir a expressão da proteína, alíquotas de 1 mL de cultura foram retiradas após 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas de indução. Cada alíquota foi centrifugada a 12000 g por 5 minutos e as células foram lisadas a 95 °C por 5 minutos, com 20 µL de água deionizada e 20 µL de tampão de amostra 2x. As proteínas totais foram analisadas por 10% SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989) para verificar qual a melhor condição para cada expressão.

4.2.5- Expressão do fragmento 750 N e 750E

Confirmadas as melhores condições para a expressão dos fragmentos, iniciaram-se os experimentos nas mesmas condições indicadas pelos testes de expressão, para obtenção de grandes quantidades do inserto+pET28a. Um pré-inóculo foi obtido em erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL meio LB com antibióticos kanamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), e mantidos sob agitação de 250 rpm a 37 °C, por toda a noite. Na manhã seguinte, 10 mL (1%) deste pré-inóculo

(inserto+pET28a) foi inoculado em erlenmeyers de volume para 2 L, contendo 1 L de meio LB com antibióticos kanamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Os frascos foram mantidos a 30 °C sob agitação de 250 rpm até que a densidade ótica de 0,6 em 600 nm fosse atingida pela cultura. Neste momento, foi adicionado 0,4 mM de IPTG para “induzir” a expressão do inserto, mantendo essa indução por 4 horas. Após o período de 4 horas, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e os *pellets* armazenados a -20 °C.

4.2.6 - Expressão do domínio AXH da ataxina 1

O clone do domínio AXH da ataxina 1 foi gentilmente cedido pela Dra. Annalise Pastore do *National Institute for Medical Research*, The Ridgeway, London, UK (De Chiara, 2003). A construção recebida (HIS-GST-AXH) (ANEXO VII) foi transformada usando a cepa BL21-DE3. Uma colônia transformada foi inoculada em 250 mL de meio de cultura LB líquido (pré-inóculo) contendo o antibiótico necessário (Kanamicina) na concentração final de 50 µg/mL, sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Após as 16 horas, 20 mL do pré-inóculo foi adicionado a 1000 mL de meio LB e deixados em agitação constante de 200 rpm, até atingir a densidade ótica de 0,5 em 600 nm (GeneQuant), retirou-se 1 mL de cultura para avaliar o não induzido e o restante das culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação 200 rpm. Após a adição de 0,5 mM de IPTG para “induzir” a expressão e de um período de 3 horas de indução, a expressão da proteína foi analisada por SDS-PAGE a 12%.

4.3.- Purificação da proteína

Para a purificação adequada fizemos vários testes descritos abaixo:

1- Purificação por gravidade utilizando resina de níquel

O vetor de expressão pET28a permite a expressão de proteínas com cauda de fusão contendo 6 histidinas (6xHis) na porção N-terminal (ANEXO VIII). Por apresentarem esta cauda de histidina, as proteínas recombinantes induzidas por esses plasmídeos foram isoladas dos extratos celulares por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, utilizando-se a resina Ni-NTA *Superflow* (Qiagen). Para 1 L de cultura de células, os extratos preparados foram incubados com 400

μ L de resina Ni-NTA *Superflow* (1 volume de coluna- CV) por 1 hora a 4 °C em um homogeneizador rotatório. Após esse período, a matriz (fase estacionária) foi transferida para uma coluna BioSpin (BioRad) e o extrato foi coletado em uma única amostra, o *Flowthrough*– FT. Em seguida, a coluna de níquel foi extensivamente lavada (20 volumes CV) com o tampão de afinidade acrescido de 1,5 mM de imidazol, esse material foi coletado também em uma amostra, o Lavado– L. As proteínas ligadas à resina foram eluídas em um gradiente crescente de imidazol de 5 a 500 mM. Neste procedimento a proteína é liberada da coluna, quando o imidazol adicionado “compete” com a histidina pelo níquel da fase estacionária. A proteína foi liberada lavando a coluna por 3 vezes com 5 CV (2 mL) de tampão TA contendo 5 mM de imidazol, e coletando-se o material em 3 tubos, seguindo-se com 2 x 5 CV com 20 mM de imidazol, 2 x 3 CV com 50 mM de imidazol, 2 x 3 CV com 100 mM de imidazol, e por último 3 x 3 CV com 100 mM a 500 mM de imidazol. As amostras coletadas foram preparadas utilizando-se 5 μ L do purificado, com 5 μ L de tampão da amostra 2X SDS (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 20 %; β -mercaptoetanol 10%) (Laemmli, 1970), foram aquecidas a 95 °C por 3 minutos e submetidas a eletroforeses SDS-PAGE 10%.

2- Purificação por gravidade utilizando resina de cobalto

O procedimento utilizado para preparação da amostra e processo de purificação com coluna de cobalto foi o mesmo adotado para o processo de purificação em resina de níquel Ni-NTA *Superflow*.

3- Purificação do fragmento por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*).

O procedimento de preparação das amostras utilizado para a purificação em sistema FPLC foi o mesmo realizado para as purificações em colunas de níquel Ni-NTA *Superflow* e Cobalto *TALON Metal Affinity Resin*. A purificação foi realizada utilizando-se o sistema FPLC-Fast Protein Liquid Chromatograph (Amersham Biosciences). O fracionamento das proteínas foi realizado em coluna de afinidade HiTrap – Chelating de volume 1 mL (Amersham Biosciences). Os tampões utilizados foram: tampão ALEX, contendo fosfato de sódio a 10 mM pH 7,2, 5% de glicerol, NaCl 20 mM e β -mercaptoetanol (β ME) 3,5 mM e tampão B_{LEX} contendo fosfato de sódio a 10 mM pH 7,2, 5% de glicerol, NaCl a 1 M e β ME a 3,5 mM.

4.3.1- Preparação das amostras para purificação

O procedimento de preparação das amostras para purificação foi iniciado descongelando-se o *pellet* de células da cultura de expressão em água corrente e o volume ajustado para 20 mL de tampão de afinidade– TA (50 mM de tampão fosfato, pH 7,2; 100 mM de NaCl; 3,5 mM de β -mercaptoetanol; 5 % de glicerol), na proporção 20 mL de tampão para 1 L de cultura. Em seguida, foi adicionado 10 μ g de lisozima por 1 mL de extrato de células e incubado por aproximadamente 1 hora em gelo. Após este período as amostras foram homogeneizadas em sonificador com potência 4 por 10 vezes com 15 segundos de duração cada homogeneização, mantendo-se um intervalo de 15 segundos para cada homogeneização. Durante todo o processo as amostras foram mantidas em gelo para evitar o aquecimento das mesmas. As amostras foram centrifugadas a 5000 g, por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi incubado com 400 μ L de resina.

4.3.2- Purificação do domínio AXH

A amostra foi preparada para a purificação como descrito anteriormente para os outros fragmentos da *ATX1*. Foi usado tampão TRIS (20 mM tris pH=8,0; 200 mM NaCl; 10 mM imidazol; 2 mM de β - mercaptoetanol; 0,2% triton X-100).

Purificação por gravidade utilizando resina de níquel

O vetor de expressão pETM30, assim como o pET28a, permite a expressão de proteína com cauda de histidina (6xHis) na porção N-terminal. Por apresentar esta cauda de histidina, o domínio foi isolado do extrato celular por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, utilizando-se a resina Ni-NTA *Superflow* (Qiagen). Para 1 L de cultura de células, os extratos preparados foram incubados com 1000 μ l de resina Ni-NTA *Superflow* (1 volume de coluna- CV) por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, a matriz foi transferida para uma coluna BioSpin (BioRad) e o extrato foi coletado em uma única amostra, o *Flowthrough* – FT. Em seguida, a coluna de níquel foi lavada com 50 ml de tampão (20mM tris pH= 8,0; 200mM NaCl; 10 mM imidazol; 2 mM de β -mercapto etanol; 0,2% Triton X-100), esse material foi coletado em uma única amostra, o Lavado– L. As proteínas ligadas à resina foram eluídas em um gradiente crescente de tampão imidazol (20 mM

Tris pH=8,0; 1 M de NaCl; 2 mM de β -mercaptoetanol) acrescido de 10, 30 e 300 mM de imidazol. Nesta etapa a proteína é liberada da coluna. A coluna foi então lavada com 50 mL de tampão para cada concentração de imidazol, sendo o material coletado em três tubos. As amostras coletadas foram preparadas utilizando-se 10 μ L do purificado, em 10 μ L de tampão da amostra 2X SDS (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 20 %; β -mercaptoetanol 10%) (Laemmli, 1970), sendo aquecidas a 95 °C por 3 minutos e submetidas a eletroforese por SDS-PAGE 12%.

4.4- Diálise da amostra

A diálise da amostra foi feita em tubo flexível (*spectra membrane* 32 mm), durante toda a noite em temperatura ambiente (tampão 50 mM Tris pH=7,0; 50 mM NaCl; 5 mM DTT).

4.5- Concentração da amostra

As amostras foram concentradas usando concentrador da Amicon ultra-4 da Millipore, seguindo recomendações do fabricante.

4.6- Estudo estrutural, coleta e processamento de dados.

4.6.1- Dicroísmo circular (CD)

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica não-destrutiva de fácil manuseio que permite a análise da estrutura secundária de proteínas em solução. Esta técnica é amplamente utilizada para a avaliação dos aspectos conformacionais de preparações de proteínas e da estabilidade destes preparados frente a diferentes condições ambientais tais como: temperatura, força iônica, presença de solutos, ligantes, etc. Apesar de fornecer apenas uma imagem de baixa resolução de uma proteína, em comparação com outras técnicas possui uma série de vantagens como: rapidez da medida e não requerimento de amostras altamente concentradas (Ramos, 2008). As análises são feitas em solução pois, no processo de cristalização pode ocorrer alteração na estrutura da molécula,

principalmente em sistemas biológicos. Em solução a reprodução é muito próxima da realidade dos sistemas biológicos “in vivo” (Khurana et al., 2001).

A técnica de CD foi usada para verificar o enovelamento das proteínas e dar informações da estrutura secundária das proteínas em solução. As medidas de espectrometria de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Tokio, Japão) com um controlador de temperatura Peltier PTC-348WI, utilizando cubetas de quartzo de 1,00 mm, 2,00, 5,00 ou 10,00 mm de caminho óptico. Os espectros foram resultantes da acumulação de, no mínimo, quatro medidas consecutivas abrangendo comprimentos de onda de 180 a 260 nm. As aquisições foram obtidas na velocidade de 50 nm por minuto com subtração adequada dos espectros de linha de base acumulados empregando-se os mesmos parâmetros de aquisição. Os resultados são expressos como valores de elipicidade bruta (em miligraus) ou em elipicidade molar ($\text{mgra} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$). A solução tampão utilizada para os experimentos de CD foi acetato de sódio 20 mM a pH 4,0 contendo SDS a 100 mM.

Todas as análises foram feitas no LNLS-Laboratório Nacional de Luz Síncrotron para as proteínas 750 N (concentração= 1,5 mg/ml) e o domínio AXH (concentração=2 mg/ml). A análise dos resultados foi feita com o programa CONTIN Provencher & Glockner Method, DICHROWEB <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>.

4.6.2- Difração de raio-X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de SAXS de pequeno ângulo é de relevante importância, pois fornece informações sobre a forma e o tamanho de nano-objetos em solução diluída. SAXS fornece parâmetros estruturais de macromoléculas com tamanhos entre 5 nm e 25 nm. Resultados obtidos via SAXS podem revelar o estado de oligomerização, raio de giração, diâmetro máximo de proteínas e até alterações conformacionais induzidas pela associação de ligantes (Koch et al., 2003).

As vantagens práticas do uso da SAXS está no fato dessa técnica funcionar em líquidos e sólidos além de ser menos complexa do que a cristalografia, pois dispensa o uso de cristais, consome

menos tempo para produzir resultados e necessita de menor quantidade de proteína, podendo ser utilizada para acompanhar processos biológicos em tempo real (Svergun e Koch, 2003).

Para investigarmos a conformação da proteína em solução, utilizamos a técnica de difração de raio-X em baixo ângulo (SAXS). Os experimentos de espalhamento de raios-X foram realizados na linha de luz D11-SAS do Laboratório Nacional de Luz Sincontron (LNLS) em várias configurações para obter o intervalo angular mais adequado para análise das curvas de intensidade x vetor de espalhamento. A análise e interpretação dos dados foram realizadas com o apoio da profa. Dra. Iris Torriane do Instituto de Física da Unicamp. Diversas medidas em concentrações diferentes permitiram o controle da dispersidade da amostra e possível efeito de agregação. Foram realizadas exposições do solvente (*buffer*) para correção de cada um dos espectros obtidos com a proteína e medidas com albumina (como controle) com o objetivo de calcular o peso molecular de AXH por métodos de comparação. O tratamento de dados foi feito usando o programa TRAT1D (Oliveira et al.,1997) disponível na linha de SAXS do LNLS. A análise dos difratados permite a obtenção do raio de giro das moléculas usando a aproximação de Guinier. Uma análise mais criteriosa pode ser feita usando o programa de cálculo GNOM (Svergun, 1991) que, além do raio de giro, permite obter a função de distribuição de distâncias intramoleculares $P(r)$ e a dimensão máxima da proteína mostrando, assim, a conformação que ela adota em solução. O cálculo de uma “função envelope” tridimensional obtida a partir dos dados de espalhamento pode ser feito dependendo da qualidade dos dados, usando programas especialmente desenvolvidos para esse fim (Stuhrmann, 1970).

Outro experimento realizado e os dados experimentais obtidos foram filtrados usando o pacote de programas GNOM. Os parâmetros obtidos para cada amostra são: raio de giro R_g (Å), dimensão máxima D_{max} (Å) e peso molecular. Também indícios da forma da proteína são obtidos do comportamento dos pares da função de distribuição da distância. Para cada amostra, medidas com três diferentes concentrações foram usadas para obter os valores de R_g para diluições infinitas usando um plot R_g (Å) vs. C (mg/ml). Foram utilizados dois tampões: tampão de cristalização (50 mM Tris-Cl pH 7.0; 50 mM NaCl; 5 mM DTT), e tampão padrão TEV (50 mM Tris-Cl pH 8.0; 0.5 mM EDTA; 1 mM DTT). As concentrações usadas em cada caso foram 4.78 mg/ml, 9.56mg/m, 14.35 mg/ml para a solução tampão TEV e 4.16 mg/ml, 8.33 mg/ml, 12.5 mg/ml para o tampão de cristalização.

4.7- Análise de Bioinformática

4.7.1- Identificação de regiões conservadas na proteína ataxina 1 humana.

Para a busca de sequências homólogas a ataxina 1, foi usado o programa PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997) e para o reconhecimento de regiões conservadas dentro da sequência de ataxina 1 foram realizados alinhamentos múltiplos (<http://ebi.ac.uk/clustaw/>) (Higgins e Sharp, 1988) entre ataxina 1 e sequências homólogas identificadas no banco de dados GenBank (ANEXOS IX, X, XI, XII, XIII, XIV).

5.1- Extração do RNA total

Tivemos que otimizar o protocolo de extração de RNA total de sangue, pois não conseguíamos um RNA de boa qualidade. Realizamos gradiente com Ficoll e uma lise inicial com solução salina antes do Trizol (Invitrogen), desta forma um RNA de ótima qualidade foi obtido (Figura 1). Foram extraídos RNAs de um indivíduo controle e um afetado.

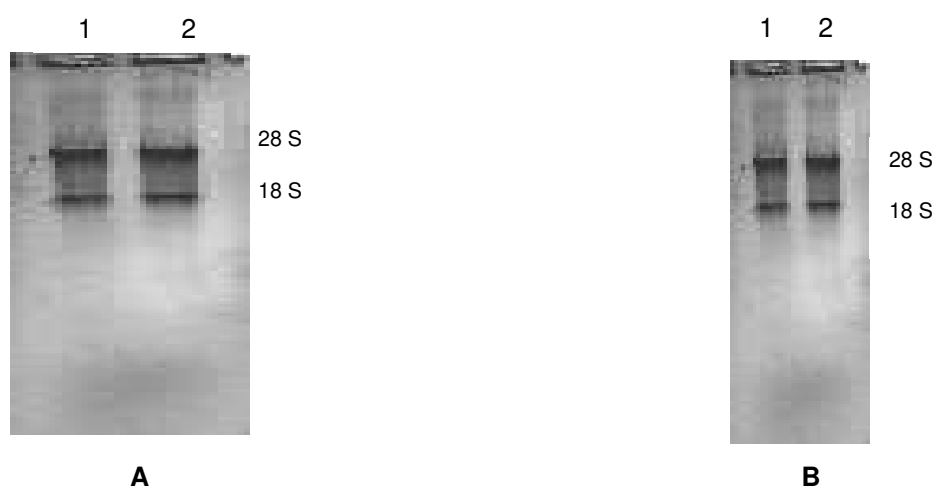


Figura 1. A- 1 e 2= 2 μ L de RNA total de indivíduo controle.

Figura 1. B- 1 e 2= 2 μ L de RNA total do indivíduo afetado com SCA1. Gel de agarose a 1%.

5.2- PCR controle reação de transcrição reversa com β -actina

Para testar se o RNA total havia sido convertido para cDNA, fizemos reações de PCR utilizando *primers* que amplificam um fragmento do gene da β -actina (~500 pb) expresso no sangue humano (Figura 2).

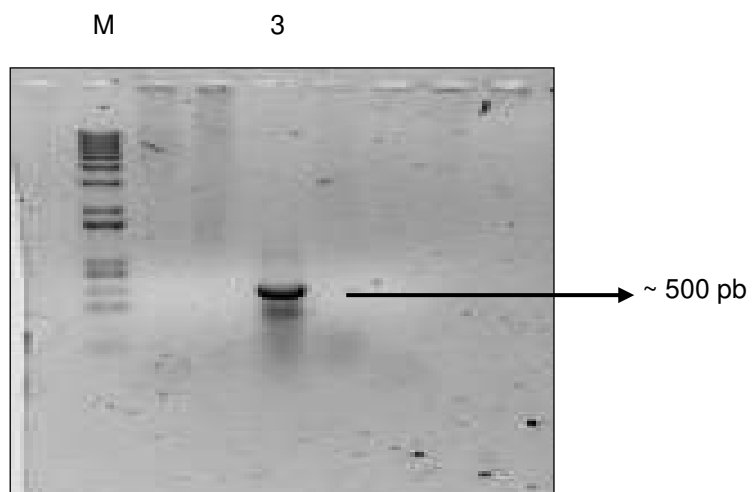


Figura 2- 3=PCR com o *primers* da β -actina. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose a 1%.

5.3- Amplificação do segmento do gene *ATX1*-1750 pb sem trato poliQ

A sequência *ATX1*-1750 pb foi amplificada com os *primers* senso 3 e antisense 4 sem os sítios de restrição para evitar maiores dificuldades na amplificação. Depois de otimizada a reação de PCR, a sequência foi novamente amplificada com os primers sense 3 com sítio de restrição *NdeI* e antisense 4 com sítio de restrição *XhoI* (Figura 3).

A purificação dos fragmentos de 1750 pb amplificados da ataxina 1 foi realizada com o emprego do kit

[S.N.A.P.™ UV-Free Gel Purification](#) (Invitrogen).

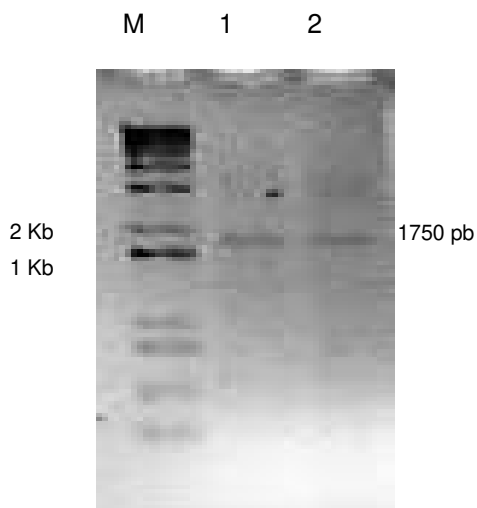


Figura 3- 1 e 2=Amplificação do segmento do gene *ATX1*-1750 pb sem o trato poliQ. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose a 1%.

5.4- Amplificação do gene ATX1N-750 pb com poliQ

A sequência ATX1N-750 pb com 23 Q na região poliQ foi amplificada (Figura 4). com os primers 1 e 2 (ANEXO III).

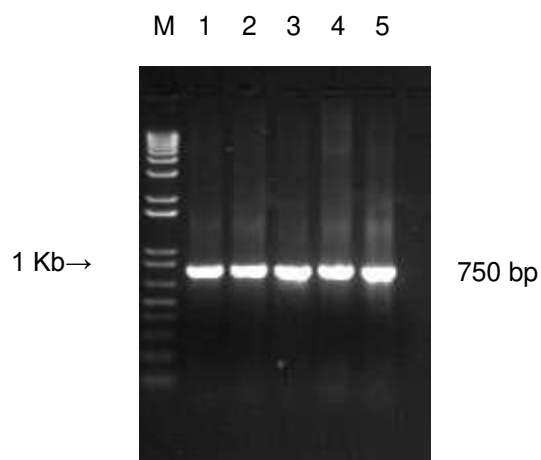


Figura 4- Amplificação da porção do gene ATX1N-750 pb com o trato poliQ. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose a 1%.

5.5- Clonagem e Minipreparação dos fragmentos de 750 e 1750 pb

Após a clonagem e minipreparação (Figura 5), fez-se a digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, após eletroforese em gel de agarose e eluição (GFX), foram clonados em vetor PET28a com *E. coli* DH5 α .

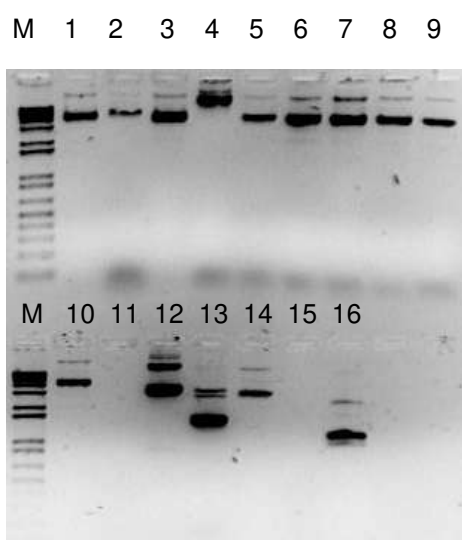


Figura 5- 1 a 9= Minipreparação do fragmento de ATX1N-750 pb com poliQ. 10 ao 16= Minipreparação do fragmento ATX1-1750 pb sem poliQ. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose a 1%.

5.6- Amplificação do cDNA completo de ATX1

Usando o produto do PCR de re-anelamento dos fragmentos de ATXN-750N e ATX-1750 pb. Amplificamos o cDNA completo de ATX1 (Figura 6). A sequência completa de cDNA ATX1 obtida foi clonada em vetor TOPO, após digestão com *NdeI* e *XhoI*, o inserto foi clonado em vetor pET28a e a construção foi inserida em *E. coli* DH5 α . Fez-se o sequenciamento das extremidades e foi confirmado tratar-se do cDNA completo de ATX1.

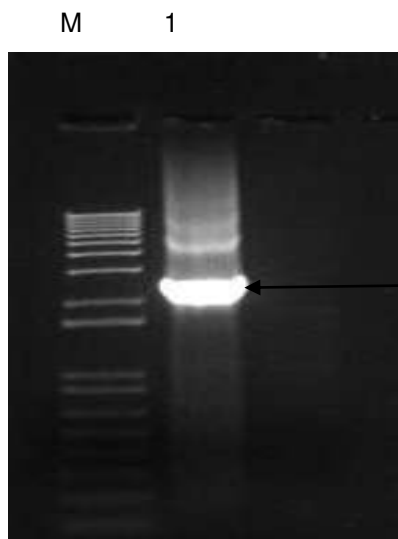


Figura 6- M= marcador 1 Kb plus. 1= cDNA completo de *ATX1*. Gel de agarose a 1%.

5.7- Digestão do inserto

Os produtos das minipreparação (vetor+inserto 750 pb) foram digeridos com enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Figura 7). Após a digestão do inserto fez-se a transformação com células *E. Coli* DH5 α . Para a expressão do fragmento de 750 pb com poliQ foram usados vetores de expressão *pET28a* e *BL21-DE3*.

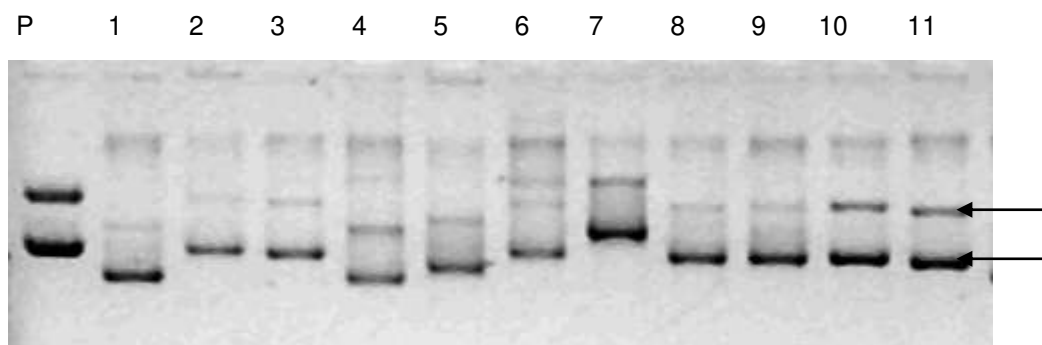


Figura 7- P= Plasmídeo sem inserto; 1 a 11= plasmídeo com ATX1N-750 pb

A banda de aproximadamente 750 pb foi eluída do gel e ligada em vetor de expressão pET28a (Novagen), na proporção de 3:1 com células BL21-DE3 (Figura 8).

M 1 2

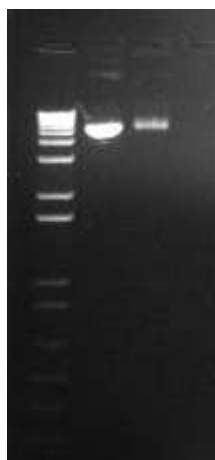


Figura 8- 1= pET28a digerido com enzima de restrição *NdeI*, 2= pET28a+inserto de 750 pb digerido com enzima de restrição *NdeI*. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose a 1%.

5.8- Amplificação do fragmento *ATX1E*-750 pb com poliQ

Para obtermos os fragmentos da *ATX1E*-750 pb usamos o cDNA do indivíduo afetado com ATX que possui 57 Q na sua porção poliQ e os mesmos *primers 1 e 2* da obtenção dos fragmentos da *ATX-1N*.

No momento da remoção das bandas foi preciso mais cautela devido a obtenção de amplificação das duas porções normal e expandida (heterozigoto para SCA1) (Figura 9). Desse modo, a eletroforese foi realizada por mais tempo para que as bandas ficassem afastadas o suficiente para serem removidas somente o produto da amplificação relativo aos alelos expandidos.

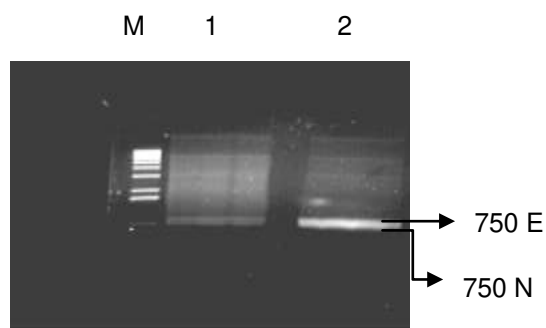


Figura 9- 1 e 2= Amplificação ATX1-E 750 pb. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose 0,8%.

5.9- Eluição do DNA do gel

Para a verificação do rendimento da purificação dos fragmentos 750E e 1750 pb com o kit [S.N.A.P.™ UV-Free Gel Purification](#) (Invitrogen), 5 µL das amostras foram analisadas em gel de agarose 1% (Figura 10).

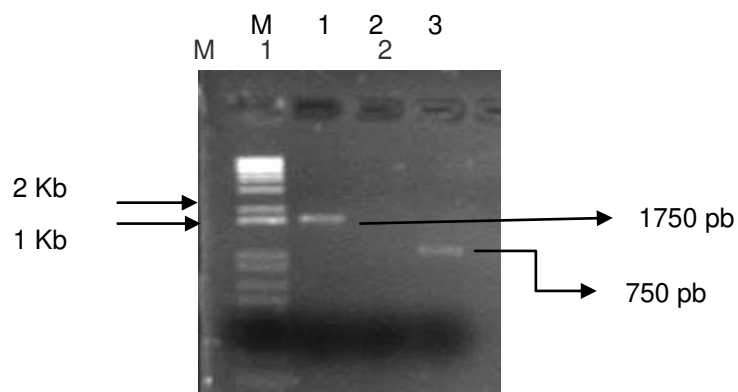


Figura 10- 1= Eluição do fragmento 1750 pb. 3= Eluição ATX-1E 750 pb. M= marcador 1 Kb plus.

5.10- Clonagem em vetor de expressão

Os insertos foram clonados em vetor de expressão pET28a, após a inserção fez-se mini-prep para a verificação da presença dos insertos (Figura 11)



Figura 11- 1= vetor pET28a (sem inserto); 2= MiniPreparação da construção pET28a+inserto de 750E. M= marcador 1 Kb plus. Gel de agarose 1%.

5.11- Sequenciamento automático

Os clones foram sequenciados usando-se o oligo universal M13 em sequenciador automático Mega Bace1000 (Amersham Biosciences). Antes da reação de sequenciamento realizou-se uma pré-amplificação do produto por meio da mesma reação de PCR descrita anteriormente para os fragmentos de 750 N e 750 E. Depois, fizemos o BLASTn das sequências obtidas com o banco de dados disponível no NCBI. Assim confirmamos que a sequência era a de interesse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/BLASTQ3>).

Optamos por nos dedicar ao estudo dos fragmentos com as poliQ normal e expandida com 750 pb (27 kDa), e a região de domínio AXH com 130 amino ácidos (18 kDa).

5.12- Testes de expressão dos fragmentos ATXN-750 e ATXE-750 da proteína ataxina 1

Vários testes de expressão foram feitos usando diferentes cepas como para o fragmento ATXN-750 foram testados em Rosetta, BL21(DE3) plysS, BL21-C-41, DE3-RIL, DE3-C43, BL21-DE3 devido as características de cada cepa foram testadas diferentes temperaturas, 25 °C, 30 °C, 37 °C, além de diferentes tempos de indução. Para o fragmento ATXE-750, foram tesados as cepas de BL21(DE3) plysS, BL21-C-41, DE3-RIL, C3-DE3, BL21-DE3. Mas, obteve-se sucesso na expressão do fragmento ATXN-750 e ATXE-750, utilizando-se as cepas BL21(DE3) (Figura 12). A maior expressão da proteína ocorreu após 4 horas a 30 °C para 750 N e 3 horas a 30 °C para 750 E (Figura 13).

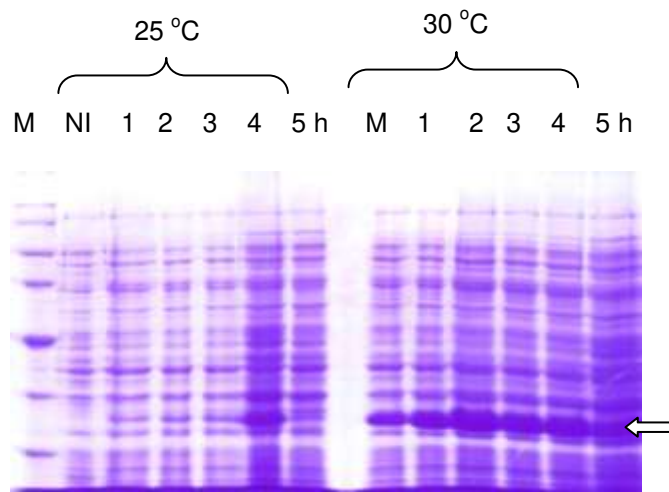


Figura 13- Expressão do fragmento 750 N em BL21(DE3).

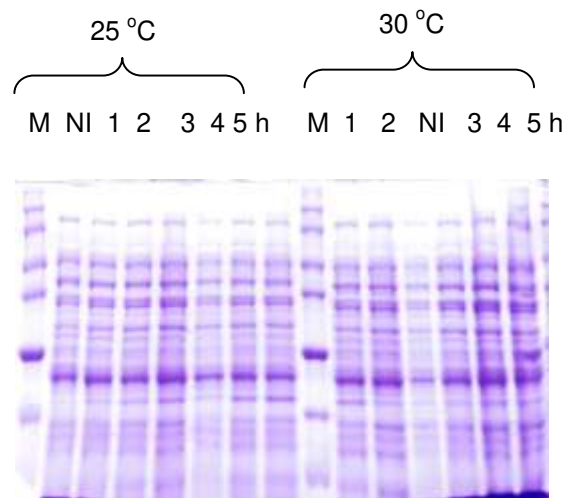


Figura 14- Expressão do fragmento ATXE-750 em BL21(DE3).

5.13- Testes de expressão do fragmento 1750 pb sem trato poliQ

Diferente do fragmento com poliQ não obtivemos sucesso na expressão do fragmento de 1750 pb sem poliQ. Foram feitos testes conforme descrito para os fragmentos de 750 pb, mas não houve expressão do mesmo em nenhuma das condições testadas. Optamos então por concentrar nossos esforços nos fragmentos com trato poliQ normal e expandido.

5.14- Expressão e Purificação dos fragmentos ATXN-750 e ATXE-750 da proteína ataxina 1

Foram realizados os procedimentos para expressão em larga escala dos fragmentos 750 N e 750 E e purificação em coluna de afinidade a níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen) e cobalto TALON Metal Affinity Resin (BD Clontech). A purificação dos fragmentos 750 N (Figura 15) e fragmento 750 E (Figura 16), nota-se as bandas no tamanho esperado, aproximadamente 27 e 30 kDa, a 50 mM de imidazol (6 e 7) e 100 mM de imidazol (8 e 9). A 200 mM de imidazol praticamente toda proteína foi eluída da coluna. Outros fragmentos proteicos contaminantes de tamanho menor e maior que 27 kDa e 30 kDa foram vistos no gel de purificação.

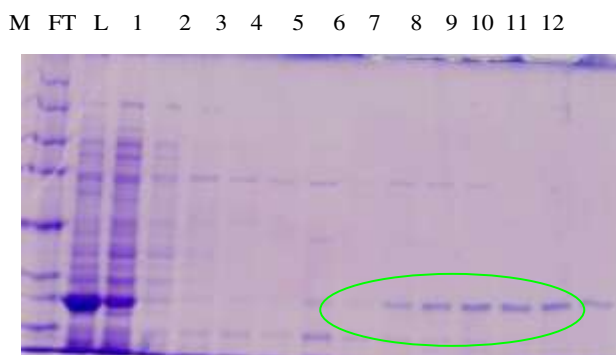


Figura 15- M= marcador; FT= *flowthrough*; L= lavado. Verde= proteína 750 N purificada.

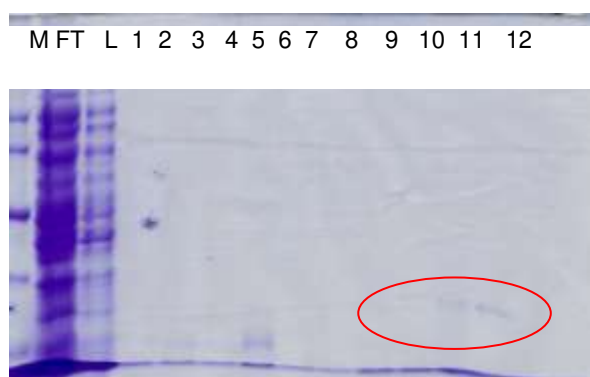


Figura 16- M= marcador; FT= *flowthrough*; L= lavado; 1. Círculo vermelho= proteína 750E purificada.

No sistema de purificação FPLC, utilizando coluna de afinidade HiTrap Chelating de 1 mL, foi possível obter os fragmentos das proteínas 750 N e 750 E. As amostras número 4, 5, 6, 7 e 8, selecionadas de acordo com o pico de absorbância mostrado no gráfico de purificação (Figura 17), são as que poderiam conter o fragmento de 27 kDa eluído. Entretanto na figura 18, o gel de eletroforese contendo as amostras purificadas 4, 5, 6, 7 e 8, não apresentou esse fragmento, portanto o pico apresentado pelo gráfico se refere a outro contaminante.

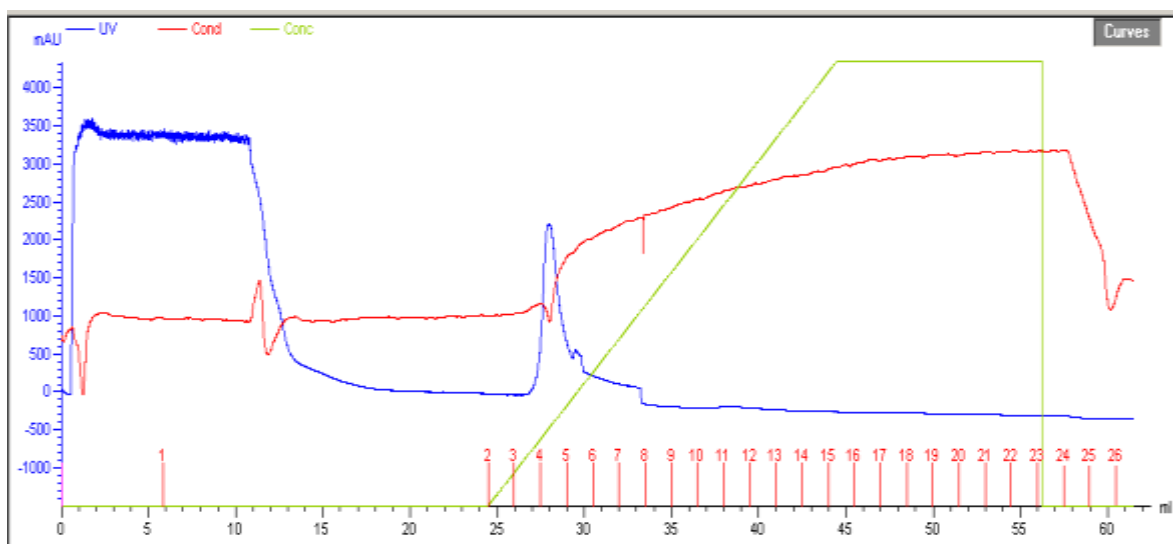


Figura 17- Gráfico de purificação pelo sistema FPLC da proteína 750 N.

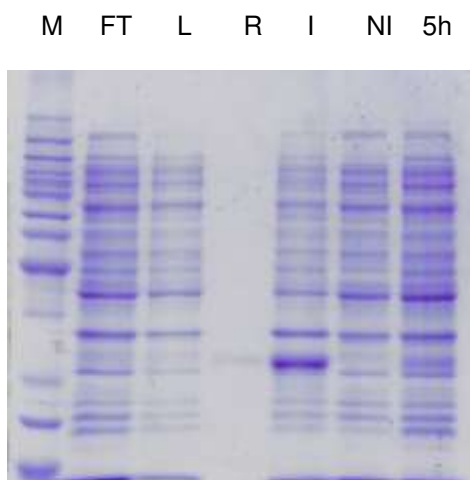


Figura 18- M= marcador; FT= *flowthrough*; L= lavado; R= resina; I= insolúvel; NI= não induzido; 5h= induzido 5 horas.

5.15- Expressão e purificação do domínio AXH

A construção HIS-GST-AXH foi transformada e a expressão da proteína foi analisada em suporte SDS-PAGE 12%. Após a clivagem e novas purificações em coluna de afinidade a níquel (Figura 19) foi realizada nova purificação em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração sistema FPLC (Figuras 20 A-B). O fragmento esperado de aproximadamente 18 kDa foi identificado e a diálise e concentração da proteína AXH foram feitas conforme protocolo descrito anteriormente. A proteína foi concentrada a 2 mg/ml e 20 mg/ml.

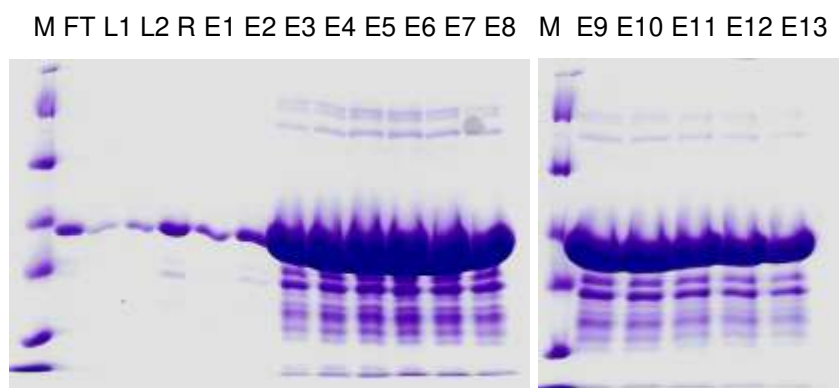


Figura 19- M= marcador; FT= flowthrough; Lavados= L1 e L2; R= Resina; E1 a E13= AXH eluída com 300 mM de imidazol. Gel SDS-PAGE 12%.

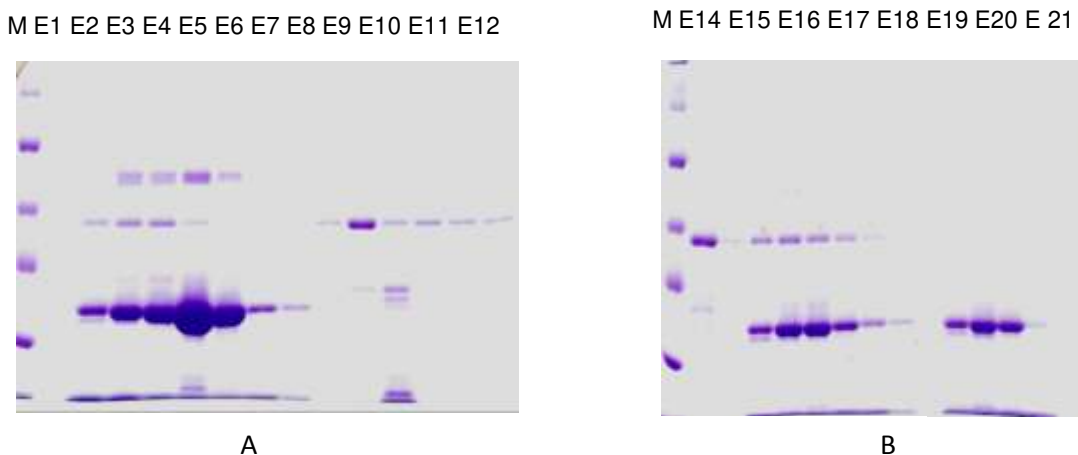


Figura 20 A-B- M= marcador. A= E1 a E7= AXH clivada e congelada (TEV); E8 a E13= AXH fresca não clivada (cristalização). B=.E14 a E20= AXH fresca, clivada (cristalização); E21= AXH fresca, clivada (TEV).

5.16- Análises de Dicroísmo Circular (CD) das proteínas 750 N e do domínio AXH

Após a obtenção das proteínas 750 N e AXH em concentrações e qualidades adequadas para a realização dos experimentos de CD. Análise feita com o programa CONTIN Provencher & Glockner Method na página do sítio DICHROWEB <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/> em 17/03/2006 (Tabela 2 e Tabela 3):

Tabela 2- Proteína 750 pb N.

<i>Concentração da proteína</i>	<i>1,5 mg/mL</i>
Número de aminoácidos	250
Massa molecular	26.679,9
NRMSD	0,936
Segmentos de hélices por 100 resíduos	1.517
Média de comprimento das hélices por segmento	4.351
Segmento de β -Folha por 100 resíduos	7.472
Média de comprimento de β -Folha	5.879
Resultados de estrutura secundária	
α -hélice1	0,5%
α -hélice2	6,1%
β -Folha1	28,0%
β -Folha2	14,9%
Estrutura Randômica	49,5%

Solução média de possíveis “matchings”	37
--	----

Tabela 3- Proteína Domínio AXH.

<i>Concentração da proteína</i>	2.0 mg/mL
Número de aminoácidos	122
Massa molecular	13434.3
NRMSD	1.547
Segmentos de hélices por 100 resíduos	1.266
Média de comprimento das hélices por segmento	4.200
Segmento de β -Folha por 100 resíduos	7.272
Média de comprimento de β -Folha	5.927
Resultados de estrutura secundária	
α -hélice1	0,3%
α -hélice2	5,1%
β -Folha1	28,6%
β -Folha2	14,5%
Estrutura Randômica	51.6%
Solução média de possíveis “matchings”	36

NRMSD =Normalized Residual Mean Square Difference.

Com relação a estrutura secundária, pode-se afirmar que a proteína 750 N e o domínio AXH apresentam poucas estruturas α -hélice, algumas estruturas de β -folha e metade das estruturas tem formas randômicas. A média de resíduos nas α -hélices 4.3 e 4.2 colocam as proteínas 750 N e o domínio AXH entre a maioria de proteínas de α -hélice curta no PDB (cerca de 500 no *Protein data bank*).

5.17- Informações estruturais do domínio ATX1-AXH

A estrutura cristalográfica desta proteína está depositada no Banco de Dados de Proteína (PDB) <http://www.rcsb.org/pdb/> com código de acesso 1OA8. A unidade assimétrica desta estrutura, reportada por Chen et al. (2004) é um tetrâmero com 532 resíduos e peso molecular de aproximadamente 56 kDa (Figura 21). Cada monômero da estrutura tetramérica conteria então 133 resíduos com peso molecular de 14 kDa.



Figura 21- Estrutura cristalográfica do domínio AXH da ataxina 1-PDB 1OA8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>. Formação de tetrâmeros.

5.18- Análises de raio-X a baixo angulo (SAXS) do Domínio AXH ligado a GST

Foram realizados experimentos da AXH ligada à GST. Dados de SAXS foram coletados utilizando GST+AXH numa concentração de 10 mg/mL. Embora os dados indicassem que a amostra não estava completamente monodispersa, foi possível obter a estrutura de baixa resolução da AXH ligada a GST. As figuras 22 e 23 ilustram a estrutura cristalográfica de um dímero de GST ([código 1Y6E do PDB, http://rutgers.rcsb.org/pdb/](http://rutgers.rcsb.org/pdb/)) e a estrutura do domínio AXH, determinado em forma tetramérica. Mais de uma interface dimérica é também possível (Figuras 24 e 25).

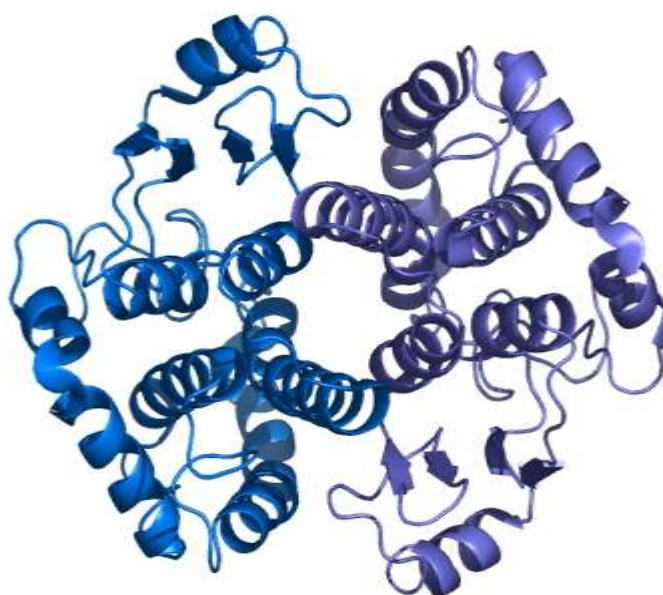


Figura 22- Estrutura da GST no PDB 1Y6E|B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.

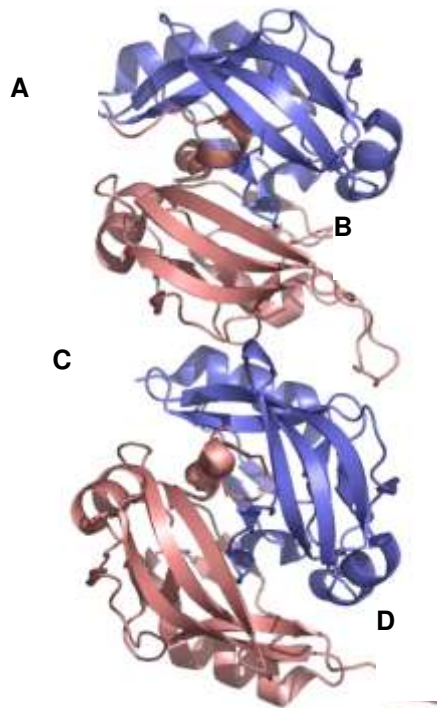


Figura 23- Estrutura do AXH. Formação de tetrâmeros A-D. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

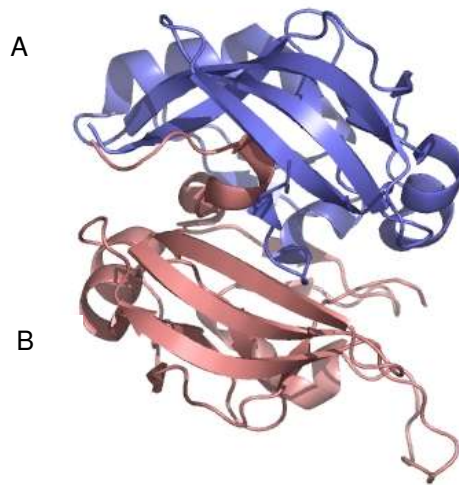


Figura 24 - Formação de dímeros de AXH. A-B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

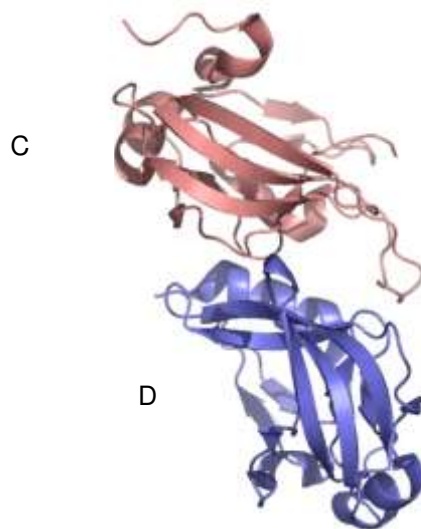


Figura 25 - Formação de dímeros de AXH. C-D. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

O envelope obtido na SAXS também é mostrado (perspectivas ao longo de três eixos perpendiculares) exibindo clara simetria (Figura 26). O raio máximo da estrutura obtida na SAXS foi estimado em 105 Å e o raio de giro em 35 Å. Estes parâmetros indicam que, possivelmente, o envelope obtido na SAXS possa ser explicado a partir de duas unidades (GST+AXH) interagindo em solução.

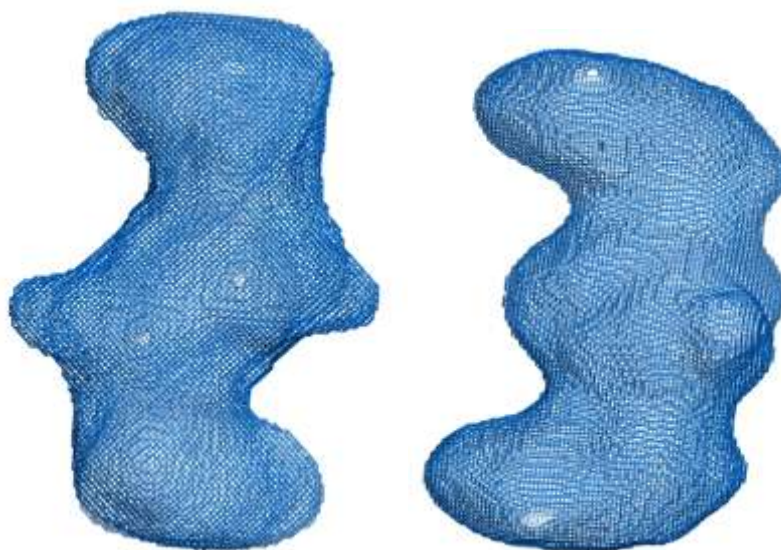




Figura 26- Estruturas geradas pelo SAXs de baixa resolução (envelopes). GST+AXH.

5.19- Domínio AXH da ataxina 1 em solução tampão TEV

Os dados experimentais obtidos foram filtrados usando o pacote de programas GNOM. Os resultados também deram indícios de que a forma da proteína obtidos do comportamento dos pares da função de distribuição da distância. (Figura 27).

As curvas mostram o efeito de concentração protéica quando examinada a região q (módulo do vetor de espalhamento com $q = 4 \pi / \lambda \sin \Theta$), onde o comprimento de onda utilizado e o ângulo de espalhamento muito baixo por meio dos *plots Guinier*. Os valores dos raios de giro (R_g) para cada concentração foram obtidos colocando cada grupo de dados no programa GNOM (Svergun e Stuhrmann, 1991) (Figura 28). Os valores R_g obtidos foram $21.7 \pm 0.3 \text{ \AA}$.

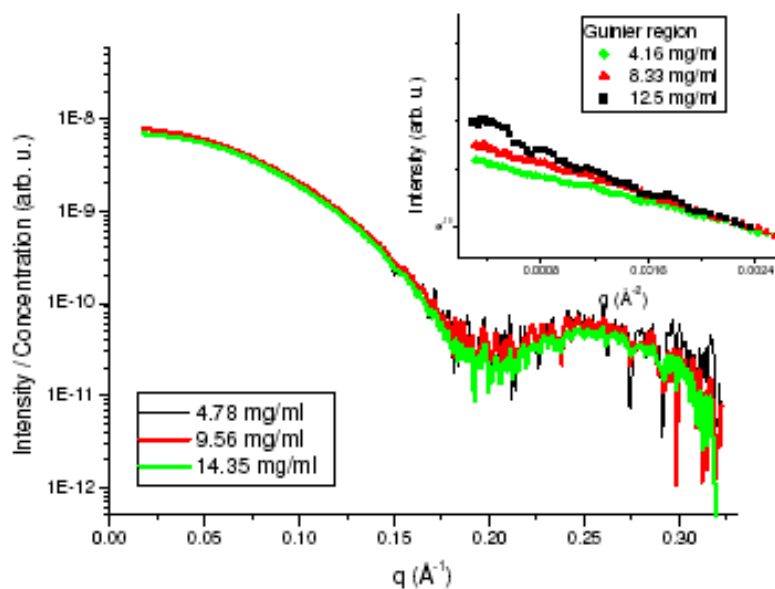


Figura 27- Curvas de intensidade do domínio AXH, para as concentrações: 4.78 mg/mL, 9.56mg/mL e 14.35 mg/mL.

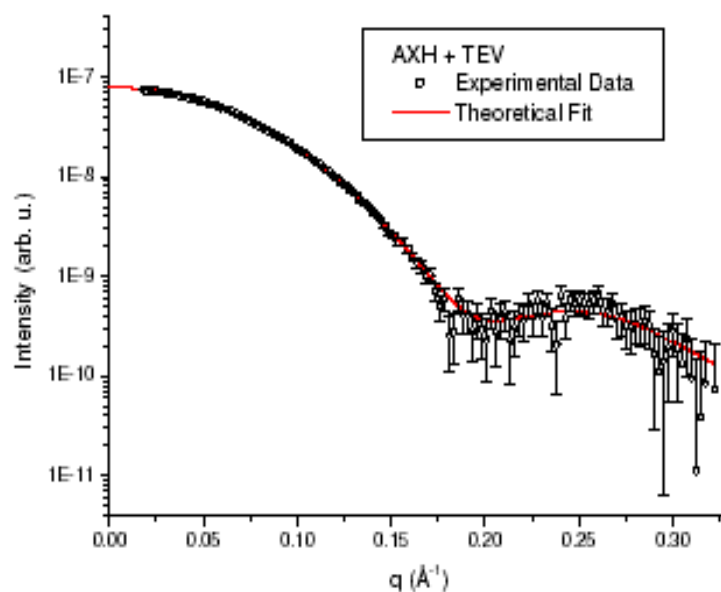


Figura 28- Valores dos raios de giro (R_g) para cada concentração AXH.

O peso molecular determinado do valor $I(0)$ não é muito exato neste caso, devido aos efeitos de concentração em ângulo muito baixo ($q \rightarrow 0$). Todavia, os valores obtidos (26.7 ± 0.4 kDa), podem confirmar a presença de dímeros em solução, desde que cada monômero tenha um peso molecular calculado de 13.7 kDa. A estimativa de dimensão máxima D_{max} obtida da função de distribuição de pares de distância (PDDF) é de aproximadamente 70 Å (Figura 29). A PDDF denota uma forma globular para esta proteína, podendo ser ligeiramente alongada.

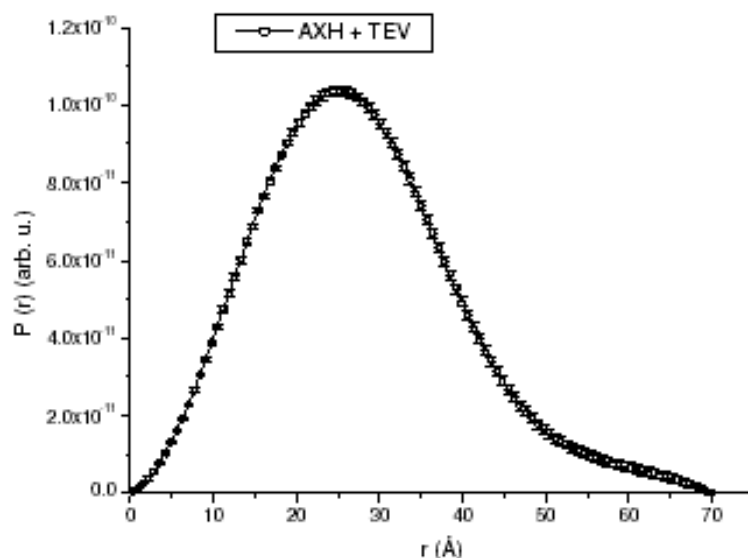


Figura 29- Estimativa de dimensão máxima D_{max} obtida da função de distribuição de pares de distância (PDDF).

5.20- Domínio AXH da ataxina 1 em solução de tampão de cristalização

As curvas de intensidade obtidas em três diferentes concentrações 4.16 mg/mL, 8.33 mg/mL e 12.5 mg/mL (Figura 30) mostrou que nenhum efeito de concentração está presente nestas amostras, onde o cálculo gira em torno de parâmetros dimensionais mais confiáveis.

Os valores dos raios de giro (R_g) foram obtidos de cada grupo de dados usando o programa GNOM. Os valores R_g obtidos foram 24.6 ± 0.3 Å (Figura 31).

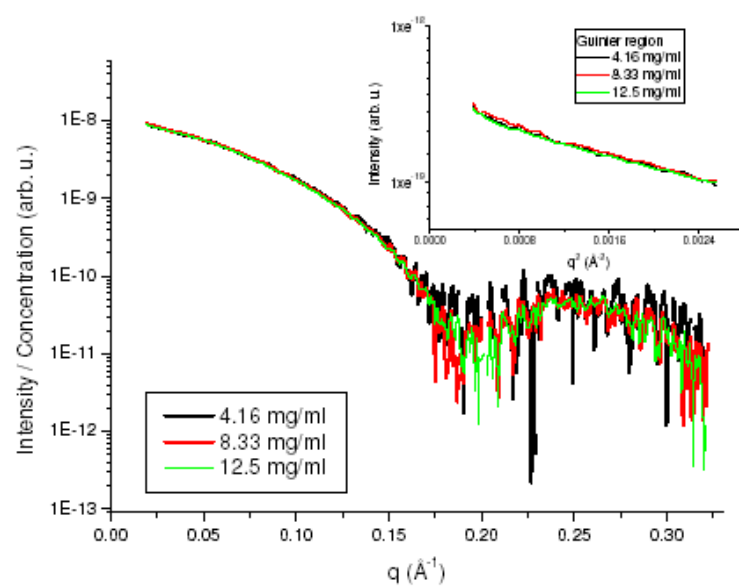


Figura 30- Curvas de intensidade para as três concentrações 4.16 mg/ml, 8.33 mg/ml e 12.5 mg/ml.

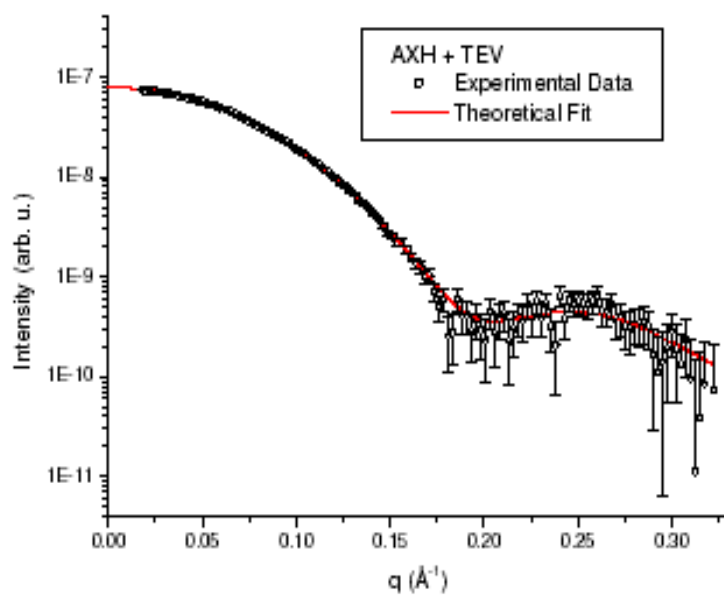


Figura 31- Valores dos raios de giro (R_g) obtidos de cada grupo de dados.

O peso molecular determinado da intensidade extrapolada para a origem $I(0)$ foi $(29.1 \pm 0.4 \text{ kDa})$, e também confirma a presença de dímeros em solução. A estimativa da dimensão máxima D_{max} obtido da função de distribuição de pares de distância (PDDF) é aproximadamente $76 \text{ \AA}$ (Figura 32). A PDDF denota uma forma globular da proteína, podendo ser ligeiramente distorcida.

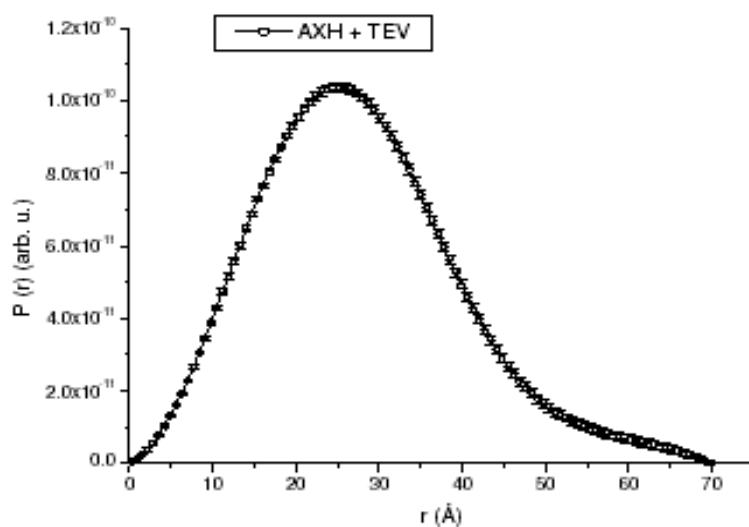


Figura 32- Estimativa da dimensão máxima D_{max} obtido da função de distribuição de pares de distância (PDDF).

Neste trabalho propôs-se o estudo de uma proteína humana complexa na forma normal e mutada (expandida), com alto peso molecular e sem função conhecida. Qualquer informação obtida a respeito dessa proteína seria de grande valia para pesquisas e projetos futuros. O primeiro grande passo para que doenças neurodegenerativas sejam elucidadas, e eventualmente tratadas, é o melhor conhecimento dos mecanismos das mesmas, o que, em última análise, depende essencialmente do entendimento das interações que ocorrem entre proteínas normais e mutantes em nível celular. Além disso, verificar porque em determinadas condições, estas moléculas enovelam-se de forma incorreta. O enovelamento incorreto de uma proteína pode inativá-la ou, como ocorre nesses casos, levar à agregação da mesma, o que acaba comprometendo a sua função no organismo.

As dificuldades para a realização do projeto começaram já nas etapas iniciais do mesmo. Na extração de RNA, pois trabalhávamos com material biológico de um único paciente já bastante debilitado pela doença. Na amplificação do cDNA completo da *ATX1*, pois a sequência tem aproximadamente 2,7 kb e com alta porcentagem de CG aumentando a a probabilidade de formar estruturas secundárias principalmente na região da repetição CAG. Mas o resultado final obteve-se sucesso na amplificação completa do cDNA da ATX-1N.

Após diversas tentativas de expressão do fragmento completo do cDNA da ATX-1N, optamos pela obtenção de fragmentos menores dessa proteína. Fomos cuidadosos em escolher fragmentos que pudessem gerar informações relevantes e, assim escolhemos um fragmento sem o trato poliQ (1750 pb), um outro com o trato poliQ (750 pb) e a única região de domínio AXH do gene conhecida. Para agilizar nossa investigação, o cDNA do domínio AXH foi gentilmente cedido pelo grupo das pesquisadoras Dra. Pastore e Dra. Cesira do Instituto de Pesquisa Médica de Londres. Após várias tentativas de expressão dos fragmentos de cDNA de 1750 e 750 pb e do domínio AXH, obtivemos sucesso em quantidade e qualidade de proteína expressa apenas do fragmento com o trato poliQ e do domínio AXH. Demos continuidade ao projeto com as porções com a poliglutamina e com a

única região de domínio identificada. O estudo das duas regiões é importante pois as mesmas são muito relevantes funcionalmente.

As regiões do trato poliQ e as próximas a ela apresentam grande interesse funcional, uma vez que podemos verificar se ocorre alguma mudança significativa na estrutura secundária ou envelope protéico nas formas normal e expandida utilizando as técnicas disponíveis para estudo. Já a região do domínio AXH por ser uma região com estrutura já estudada por RNM poderia ser explorada em nossos estudos de CD e SAXS.

Nossos resultados obtidos com os experimentos de CD e SAXS demonstraram que em relação a estrutura secundária esses dois fragmentos da proteína ATX1 comportam-se de forma semelhante pois tanto o fragmento 750 N com poliQ e o domínio AXH possuem poucas estruturas α -hélice (média de 4.3 e 4.2, respectivamente), enquanto os resultados do experimento de SAXS feito com o domínio AXH ligado com GST em diferentes tampões caracterizam uma proteína com forma globular e ligeiramente alongada que em solução tende a se complexar formando oligômeros (ANEXO XVI). Assim sendo, podemos concluir que nossos dados estão muito próximos aos resultados obtidos anteriormente por técnicas de RNM (De Chiara et al. 2003), pois nossos experimentos também demonstram que o domínio AXH tende a formar estruturas dimérica formando um *OB-fold*, apoiando seu suposto papel como uma proteína que se liga ao RNA., já que esta é uma característica estrutural de muitas proteínas de ligação. No entanto, apesar da similaridade que o modelo estrutural da AXH apresenta com o fator de transcrição HBP1 e com muitas outras proteínas de ligação de oligonucleotídeos, não foi possível identificar, através dos estudos estruturais, uma região obrigatória para ligação de RNA na AXH. Além disso, foram identificadas regiões de sequência bem conservadas que parecem se localizar na superfície da AXH, formando uma segunda região de ligação. Portanto é plausível que a ataxina 1 interaja com outra proteína, ainda não identificada, através do domínio AXH para fazer a ligação com RNA.

A ausência da banda de 27 kDa, pode ser resultado do método de purificação aplicado ser ineficiente, pois não houve captura da proteína. A otimização e padronização das condições de purificação, para uma determinada proteína, dependem de uma relação estreita entre o sistema

adotado para purificação e as características da proteína. Estes fatores são na maioria das vezes empíricos, dependentes de ensaios e testes de vários sistemas e condições de purificação de forma a encontrar o mais favorável. A partir dessas estruturas geradas, eventualmente poderia ser possível interpretar o modelo obtido por SAXS. Entretanto, esta análise é bastante complexa por não haver informações sobre quais interações a construção GST+AXH sofre em solução, sendo muito difícil determinar com certeza possíveis interfaces de dimerização. O mais importante é que esta análise dificilmente traria alguma informação segura a respeito da AXH isolada, já que a presença da GST muito provavelmente influenciou significativamente os dados obtidos. Desta forma, esta primeira análise em solução parece indicar que, provavelmente, seja possível obter com sucesso, a estrutura da AXH em solução após clivagem da GST. Além do que, esses resultados poderão ser usados como marcação da porção N-terminal para o SAXS da AXH sem GST.

Chiara et al., 2008 publicaram o resultado de um trabalho de análise do papel do domínio LRR (rica em leucina) da Anp32 na patogênese da SCA1, com base na observação de sua interação com a proteína ataxina 1, estudos de imunofluorescência e RMN demonstraram que LRR-Anp32 e ataxina 1 se co-localizam na matriz nuclear. Essa interação foi mapeada e mostrou-se mais forte quando a ataxina 1 era expandida. Já é sabido que o grupo das proteínas ANP32 provavelmente desempenham um papel na modulação da sinalização celular e transdução de expressão gênica para regular a morfologia e a dinâmica do citoesqueleto, adesão celular, o desenvolvimento neural ou morfogênese cerebelar. O padrão de expressão temporal em células específicas de Anp32 em células de Purkinje do cerebelo e o principal local de patologia na SCA1, bem como a sua maior interação com ataxina 1 mutante, têm sugerido um papel para LRR-Anp32 na patogênese da SCA1.

A análise da estrutura terciária caracteriza uma proteína globular, portanto mais complexa estruturalmente e funcionalmente além de ter cadeias polipeptídeas muito longa organizando os domínios com estruturas terciárias semi-independentes ligadas entre si por segmentos lineares da cadeia polipeptídica. Os domínios são considerados as unidades funcionais e de estrutura tridimensional de uma proteína (ANEXO XVII). O domínio AXH é uma região bastante conservada e localizada na extremidade amino-terminal da sequência de aa, enquanto a porção de poliQ localiza-se na outra extremidade a porção Carboxi-terminal.

Compreendemos que trabalhar na determinação de estruturas das proteínas não é tarefa fácil, pois resolver a estrutura de uma proteína em solução pode levar anos, dependendo de como esta se comporta em solução. Porém esse trabalho foi recompensado com a geração de diversas informações e novas pesquisas em nosso laboratório que possam no futuro colaborar no desenvolvimento de drogas que bloqueiem processos biológicos indesejáveis.

Neste trabalho estabeleceu-se protocolos mais adequados para a obtenção de RNA, sequencia completa do cDNA da ATX1, fragmento sem poliglutamina e com trato de poliglutamina normal e expandido, foram expressos determinando qual sistema bacteriano é mais adequado para o estudo dessa proteína. Determinamos qual método de purificação apresenta maior benefício, levando em conta tempo, recursos disponíveis, qualidade da amostra, concentração de proteína obtida.

Foi possível também expressar e purificar com sucesso a proteína do domínio AXH em quantidade suficiente para realizar os experimentos de CD e SAXS e do fragmento 750 N para experimentos de CD. As análises por CD do domínio AXH e do fragmento 750 N mostraram que mesmo estando localizados nas extremidades opostas nas cadeias de aminoácidos ambos possuem poucas estruturas α -hélice (média de 4.3 e 4.2, respectivamente).

A análise por SAXS do domínio AXH mostrou uma proteína com forma globular e ligeiramente alongada que em solução tende a se complexar na formação de oligômeros. Essa tendência a formar estruturas dimérica através de um OB-fold, apóia seu suposto papel como uma proteína ligante de RNA.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.; RÉGULIER, E.; NASCIMENTO-FERREIRA, I.; HASSIG, R.; DUFOUR, N.; KOEPPEN, A.; CARVALHO, A.L.; SIMÕES, S.; DE LIMA, M.C.; DE ALMEIDA, L.P. Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. **Human Molecular Genetics**. 15;17: 2071-2083, 2008.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 1; 25: 3389-3402, 1997.
- ANDREW, S.E.; GOLDBERG, Y.P.; HAYDEN, M.R. Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. **Human Molecular Genetics**. 6: 2005-2010, 1997.
- BANFI, S.; SERVADIO, A.; CHUNG, M.; CAPOZZOLI, F.; DUVICK, L.A.; ELDE, R.; ZOGHBI, H.Y.; ORR, H.T. Cloning and developmental expression analysis of the murine homolog of the spinocerebellar ataxia type 1 gene (Sca1). **Human Molecular Genetics**. 5: 33-40, 1996
- BAO, J.; SHARP, A.H.; WAGSTER, M.V.; BECHER, M.; SCHILLING, G.; ROSS, C.A.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Expansion of poliglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**. 93, 5037-5042, 1996.
- BATES, G. Expanded glutamines and neurodegeneration—a gain of insight. **Bioessays**. 18, 175-178, 1996.
- BECHER, M.W.; KOTZUK, J.A.; SHARP, A.H.; DAVIES, S.W.; BATES, G.P. et al. Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidoluybian atrophy: correlation between density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. **Neurobiology of Disease**. 4: 387-397, 1998.
- BEHRENDTS, C.; LANGER, C.A.; BOTEVA, R.; BÖTTCHER, U.M.; STEMP, M.J.; SCHAFFAR, G.; RAO, B.V.; GIESE, A.; KRETZSCHMAR, H.; SIEGERS, K.; HARTL, F.U. Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. **Molecular and Cellular Biology**. 15; 23: 887-97, 2006.

- BERKE, S.J.; CHAI, Y.; MARRS, G.L.; WEN, H.; PAULSON, H.L. Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. **Journal of Biological Chemistry**. 9: 32026-32034, 2005.
- BIRD, T.D. Progranulin plasma levels in the diagnosis of frontotemporal dementia. **Brain**. 132: 568-569, 2009.
- BORK, P.; DOWNING, A.K.; KIEFFER, B.; CAMPBELL, I.D. Structure and distribution of modules in extracellular proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**. 29:119-167, 1996.
- CANCEL, G.; DUYCKAERTS, C.; HOLMBERG, M.; ZANDER, C.; YVERT, G.; LEBRE, A.S.; RUBERG, M.; FAUCHEUX, B.; AGID, Y.; HIRSCH, E.; BRICE, A. Distribution of ataxin-7 in normal human brain and retina. **Brain**. 123; 12:2519-2530, 2000.
- CHEN, Y.W.; ALLEN, M.D.; VEPRINTSEV, D.B.; LÖWE, J.; BYCROFT, M. The structure of the AXH domain of spinocerebellar ataxin-1. *Journal of Biological Chemistry*. 30; 279:3758-3765, 2003.
- CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; DAMANN, K.E.; CLEVELAND, T.E. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. **Phytopathology**. 94:938-945, 2004.
- CHILDS, B.; VALLE, D. Genetics, biology and disease. **Annual Review of Genomics Human Genetics**. 1-19, 2000.
- CLARK, H.B.; BURRIGHT, E.N.; YUNIS, W.S.; LARSON, S.; WILCOX, C. Purkinje cell expression of mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. **Journal Neuroscience**. 17: 7385-7395, 1997.
- COOPER, J.K.; SCHILLING, G.; PETERS, M.F.; HERRING, W.J.; SHARP, A.H.; KAMINSKY, Z.; MASONE, J.; KHAN, F.A.; DELANBOY, M.; BORCHELT, D.R., et al. Formation on neuronal intranuclear inclusion (NII) underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the mutation. **Cell**. 90: 537-548, 1997.

COOPER, J.K.; SCHILLING, G.; PETERS, M.F.; HERRING, W.J.; SHARP, A.H.; KAMINSKY, Z.; MASONE, J.; KHAN, F.A.; DELANBOY, M.; BORCHELT, D.R.; DAWSON, V.L. E ROSS, C.A. Truncate N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmatic aggregates in cell culture. **Human Molecular Genetics**. 7: 738-790, 1998.

CUMMINGS, C.J; ZOGHBI, H.Y. Trinucleotide Repeat Disorders: Mechanisms and Pathophysiology in : **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. 1: 281-328, 2000.

CUMMINGS, C.J.; ZOGHBI, H.Y.; LANDER, E.; PAGE, D.; LIFTON, R. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. **Annual Reviews**. 281-328, 2000.

DAVIDSON, J.D.; RILEY, B.; BURRIGHT, E.N.; DUVICK, L.A.; ZOGHBI, H.Y.; ORR, H.T. Identification and characterization of an ataxin-1-interacting protein: A1Up, a ubiquitin-like nuclear protein. **Human Molecular Genetics**. 22;9: 2305-2312, 2000.

DAVIES, S.W.; TURMAINE, M.; COZENS, B.A.; DIFIGLIA, M.; SHARP, A.H., et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. **Cell**. 90: 537-548, 1997.

DE CHIARA, C.; DGIANNINI,C.; ADINOLFI, S.; DE BOER, J.; GUIDA,S.; RAMOS,S.; JODICE, C.; KOUSSIS, D.; PASTORES, A. The AXH module an independently folded domain commom to ataxin -1 and HBP. **FEBS Letters**. 11: 107-112, 2003.

DE CHIARA, C.; MENON, R.P.; ADINOLFI, S.; DE BOER, J.; KTISTAKI, E.; KELL, G.; CALDER, L.; KIOUSSIS, D.; PASTORE, A. The AXH domain adopts alternative folds the solution structure of HBP1 AXH. **Structure**. 13:743-753, 2005.

DE CHIARA, C.; MENON, R.P.; PASTORE, A. Structural bases for recognition of Anp32/LANP proteins. **FEBS Journal**. 275: 2548-2560, 2008.

DEKA, R.; GUANGYUN, S.; WIEST, J.; SMELSER, D.; CHUNHUA, S.; ZHONG, Y.; CHAKRABORTY, R. Patterns of instability of expanded CAG repeats at the ERDA1 locus in general populations. **American Journal Human Genetics**. 65):192-198, 1999.

- DUYAO, M.P.; AUERBACH, A.B.; RYAN A.; PERSICHETTI, F.; BARNES, G.T.; MCNEIL, S.M.; DE, P.; VONSATTEL, J.P.; GUSELLA, J.F.; JOYNER, A.L. Inactivation of mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. **Science**. 269: 407-410, 1995.
- EINUM, D.D.; TOWNSEND, J.J.; PTÁČEK, L.J.; FU, Y.H. Ataxin-7 expression analysis in controls and spinocerebellar ataxia type 7 patients. **Neurogenetics**. 3(2):83-90, 2001.
- ELLERBY, L.M.; HACKAM, A.S.; PROPP, S.S.; ELLERBY, H.M.; RABIZADEH, S. Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. **Journal Neurochemistry**. 72: 185-195, 1999.
- EVERT, B.O.; WÜLLNER, U.; KLOCKGETHER, T. Cell death in polyglutamine diseases. **Cell and Tissue Research**. 301:189-204, 2000.
- FRASER, F.C. Trinucleotide repeats are not the only cause of genetic anticipation. **American Journal Medical Genetics**. 23;75:337, 1998.
- FU, Y.H.; KUHL, D.P.A.; PIZUTTI, A.; PIERETTI, M.; SUTCLIFFE, J.S. et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**. 67: 1047-1058, 1991.
- GAN, S.R.; SHI, S.S.; WU, J.J.; WANG, N.; ZHAO, G.X.; WENG, S.T, MURONG, S.X.; LU, C.Z.; WU, Z.Y. High frequency of Machado-Joseph disease identified in southeastern Chinese kindreds with spinocerebellar ataxia. **BMC Medical Genetics**. 11: 47, 2010.
- GASSER, T.; GROBHADERN, K. Advances in the genetics of movement disorders: implications for molecular diagnosis. **Journal of Neurology**. 244: 341-348, 1997.
- GATCHEL, J.R.; ZOGHBI, H.Y. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. **Nature Reviews Genetics**. 6: 743-755, 2005.
- HARDING, C.M.; O'LOONEY, B.A. Perceptions and beliefs about nine diseases. **Public Health**. 98: 284-93, 1984.
- HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M.; CLUSTAL, A. A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**. 15; 73:237-244, 1988.
- HONG, S.; KA, S.; KIM, S.; PARK, Y.; KANG, S. P80 coilin, a coiled body-specific protein, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product. **Biochimica of Biophysica Acta**. 20: 35-42, 2003.

- HOUSMAN, D. Gain of glutamines, gain of function? **Nature**. 10, 3-4, 1995.
- IGARASHI, S.; KOIDE, R.; SHIMOHATA, T.; YAMADA, M.; HAYASHI, Y. Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. **Nature Genetics**. 18: 111-117, 1998.
- IKEDA, H.; YAMAGUSHI, M.; SUGAI, S.; AZE, Y.; NARUMIYA, S.; KAKIZUKA, A. Expanded poliglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death *in vitro* and *in vivo*. **Nature**.13: 667-668, 1996.
- JANA, N.R.; NUKINA, N. Recent advances in understanding the pathogenesis of polyglutamine diseases: involvement of molecular chaperones and ubiquitin-proteasome pathway. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. 2: 95-101, 2003.
- JARDIM, A.; LIU, W.; ZHELEZNOVA, E.; ULLMAN, B. Peroxisomal targeting signal-1 receptor protein *PEX5* from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization. **Journal of Biological Chemistry**. 5; 275: 13637- 13644, 2000.
- JONASSON, J.; STRÖM, A.L.; HART, P.; BRÄNNSTRÖM, T.; FORSGREN, L.; HOLMBERG, M. Expression of ataxin-7 in CNS and non-CNS tissue of normal and SCA7 individuals. **Acta Neuropathologica**.104: 29-37, 2002.
- KAHLEM, P.; TERRE, C.; GREEN, H.; DJIAN, P. Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed crosslinking: relevance to disease of the nervous system. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**. 93: 14580-14585, 1996.
- KAMEYA, T.; ABE, K.; AOKI, M.; SAHARA, M.; TOBITA, M.; KONNO, H.; ITOYAMA, Y. Analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)-related CAG trinucleotide expansion in Japan. **Neurology**. 45:1587-1594, 1995.
- KANG, S.; HONG, S. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 1 disease. **Molecular Cell**. 30;27: 621-627, 2009.
- KAWAGUSHI, Y.; OKAMOTO, T.; TANIWAKI, M.; AIZAWA, M.; INOUE, M.; KATAYAMA, H.; NAKAMURA, S.; NISHIMURA, M.; AKIGUSHI, I.; KIMURA, J.; NARUMIYA, S.; KAKIZUKA, A. CAG

- expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. **Nature Genetics**. 8: 221-228, 1994.
- KIM, S.J.; KIM, T.S.; HONG, S.; RHIM, H.; KIM, I.Y.; KANG, S. Oxidative stimuli affect polyglutamine aggregation and cell death in human mutant ataxin-1-expressing cells. **Neuroscience Letters**. 4: 21-24, 2003
- KLEMENT, I.A.; SKINNER, P.J.; KAYTOR, M.D.; YI, H.; HERSCH, S.M.; CLARK, H.B.; ZOGHBI, H.Y. E ORR, H.T. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. **Cell**. 95: 41-53, 1998.
- KLOCKGETHER, T.; EVERT, B. Genes involved in hereditary ataxias. **Trends in Neurosciences**. 1: 413-418, 1998.
- KLOCKGETHER, T.; WULLNER, U.; SPAUSCHUS, A.; EVERT, B. The molecular biology of the autosomal-dominant cerebellar ataxias. **Movement Disorders**. 15: 604-612, 2000.
- KOIDE, R.; IKEUCHI, T.; ONODERA, O.; TANAKA, H.; IGARASHI, S.; ENDO, K.; TAKAHASHI, H.; KONDO, R.; ISHIKAWA, A.; HAYASHI, T. et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). **Nature Genetics**. 6: 9-13, 1994.
- KOLELL, K.J.; CRAWFORD, DL. Evolution of Sp transcriptions factores. **Molecular Biology and Evolution**. 2002
- KOOB, M.D.; MOSELEY, M.L.; SCHUT, L.J.; BENZOW, K.A.; BIRD, T.D.; DAY, J.W.; RANUM, L.P. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). **Nature Genetics**. 21: 379-384, 1999.
- KHURANA, R.; GILLESPIE, J.R.; TALAPATRA, A.; MINERT, L.J.; MILLETT, I.; FINK, A.L. Partially Folded Intermediates as Critical Percursors Of Light Chain Amyloid Fibrils and Amorphos Aggregates. **Biochemistry**. 40: 3525-3535, 2001.
- KRAFT, S.; FURTADO, S.; RANAWAYA, R.; PARBOOSINGH, J.; BLEOO, S.; MCELLIGOTT, K.; BRIDGE, P.; SPACEY, S.; DAS, S.; SUCHOWERSKY, O. Adult onset spinocerebellar ataxia in a Canadian movement disorders clinic. **Journal of the Neurological Science**. 32: 450-458, 2005.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 15: 680-685, 1970.
- LAM, Y.C.; BOWMAN, A.B.; JAFAR-NEJAD, P.; LIM, J.; RICHMAN, R.; FRYER, J.D.; HYUN, E.D.; DUVICK, L.A.; ORR, H.T.; BOTAS, J.; ZOGHBI, H.Y. ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology. **Cell**. 29:1335-1347, 2006.
- LA SPADA, A.; WILSON, E.; LUBAHN, D.; HARDING, A.; FISCHBECK, K. Androgen receptor gene mutational in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. **Nature**. 352: 77-79, 1991.
- LA SPADA A.R.; TAYLOR J.P. Polyglutamines placed into context. **Neuron**. 38: 681-684, 2003.
- LATOUCHE, M.; FRAGNER, P.; MARTIN, E.; HACHIMI, K.H.; ZANDER, C.; SITTLER, A.; RUBERG, M.; BRICE, A.; STEVANIN, G. Polyglutamine and polyalanine expansions in ataxin7 result in different types of aggregation and levels of toxicity. **Molecular and Cellular Neuroscience**. 31: 438-445, 2006.
- LEBRE, A.S.; JAMOT, L.; TAKAHASHI, J.; SPASSKY, N.; LEPRINCE, C.; RAVISÉ, N.; ZANDER, C.; FUJIGASAKI, H.; KUSSEL-ANDERMANN, P.; DUYCKAERTS, C.; CAMONIS, J.H.; BRICE, A. Ataxin-7 interacts with a Cbl-associated protein that it recruits into neuronal intranuclear inclusions. **Human Molecular Genetics**. 15: 1201-1213, 2001.
- LEE, J.A.; SUH, D.C.; KANG, J.E.; PARK, H. Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interactions is modulated by MEK. **Journal of Biological Chemistry**. 2005.
- LEVENDER, P.; VANDEL, L.; BANNISTER, A.J.; KOUZARIDES T. The HMG-box transcription factor HBP1 is targeted by the pocket proteins and E1A. **Oncogene**. 14: 2721-2728, 1997.
- LI, S.H.; MCINNIS, M.G.; MARGOLIS, R.L.; ANTONONARAKIS, S.E.; ROSS, C.A. Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphisms. **Genomics**. 16: 572-579, 1993.

- LINDENBERG, K.S.; YVERT, G.; MÜLLER, K.; LANDWEHRMEYER, G.B. Expression analysis of ataxin-7 mRNA and protein in human brain: evidence for a widespread distribution and focal protein accumulation. **Brain Pathology**. 10: 385-394, 2000.
- LIN, X.; ANTALFFY, B.; KANG, D.; ORR, H.T.; ZOGHBY, H.Y. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. **Nature Neuroscience**. 57-63, 2000.
- MACIEL, P.; LOPES-CENDES, I.; KISH, S.; SEQUEIROS, J.; ROULEAU, G.A. Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. **American Journal Human Genetics**. 60: 993-996, 1997.
- MANTO, M.U. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). **Cerebellum**. 4: 2-6, 2005.
- MARSH, L. Neuropsychiatric aspects of Parkinson's disease. **Psychosomatics**. 41: 15-23, 2000.
- MARTINDALE, D.; HACKAM, A.S.; WIECZORECK, A.; ELLERBY, L.; WELLINGTON, C. et. al. Length of huntingtina and its poliglutamine tract influences localization and frequency of intracellular and aggregates. **Nature Genetics**. 18: 150-154, 1998.
- MATILLA-DUEÑAS, A.; GOOLD, R.; GIUNTI, P. Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1. **Cerebellum**. 7: 106-114, 2008.
- MERRY, D.E.; KOBAYASHI, Y.; BAILEY, C.K.; TAUE, A.A.; FISCHBECK, K.H. Cleavage, aggregation and toxicity of expanded androgen receptor in spinal and bulbar muscular atrophy. **Human Molecular Genetics**. 7: 693-701, 1998.
- MICHALIK, A.; BROECKHOVEN, C. Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. **Human Molecular Genetics**. 12: 173-186, 2003.
- MUSHEGIAN, A.R.; BASSETT, D.E. JR.; BOGUSKI, M.S.; BORK, P.; KOONIN, E.V. Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. **Proceedings of National Academy of Science**. 27; 94: 5831-5836, 1997.

NICASTRO, G.; MENON, R.P.; MASINO, L.; KNOWLES, P.P.; MCDONALD, N.Q.; PASTORE, A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. **Proceedings of National Academy of Science**. 26;102: 10493-10498, 2005.

NICASTRO, G.; HABECK, M.; MASINO, L.; SVERGUN, D.I.; PASTORE, A. Structure validation of the Josephin domain of ataxin-3: conclusive evidence for an open conformation. **Journal of Biomolecular NMR**. 36: 267-277, 2006

OKAZAWA, H.; RICH, T.; CHANG, A.; LIN, X.; WARAGAI, M.; KAJIKAWA, M.; ENOKIDO, Y.; KOMURO, A.; KATO, S.; SHIBATA, M.; HATANAKA, H.; MOURADIAN, M.M.; SUDOL, M.; KANAZAWA, I. Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. **Neuron**. 30; 34: 701-713, 2002.

ORDWAY, J.M., TALLAKSEN-GREENE, S., GUTEKUNST, C.A., BERSTEIN, E.M., CEARLEY, J.A. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and progressive late onset neurological phenotype in the mouse. **Cell**. 91: 753-763, 1997.

ORR, H.T.; CHUNG, M.; BANFI, S.; KWIATKOWSKI, T.J.; SERVADIO, A.; BEAUDER, A.L.; McCALL, A.E.; DUVICK, L.A.; RANUM, L.P.W.; ZOGHBI, H.Y. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. **Nature Genetics**. 4: 221-226, 1993.

PAULSON, H.L.; PEREZ, M.K.; TROTTIER, Y.; TROJANOWSKI, J.Q.; SUBRAMONY, S.H.; DAS, S.S.; VIG, P.; MANDEL, J.L.; FISCHBECK, K.L.; PITTMAN, R.N. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. **Neuron**. 19: 333-344, 1997.

PAULSON, H.L. Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. **Semin Neurol**. 27: 133-142, 2007.

PAULSON, H.L. The spinocerebellar ataxias. **Journal of Neuro-Ophthalmology**. 29: 227-237, 2009.

PERSICHETTI, F.; AMBROSE, C.M.; GE, P.; McNEIL, S.M.; SRINIDHI, J. Normal and expanded Huntington's disease gene produce distinguishable proteins due translation across the CAG repeat. **Molecular Medicine**. 1: 374-383, 1995.

- PERULTZ, M.F.; JOHNSON, T.; SUZUKI, M.; FINCH, J.T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurologic disease. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**. 91: 5355-5358, 1994.
- PERULTZ, M.F. Glutamine repeatz and inheted neurodegenerative disease: molecaular aspects. **Current Opinion Structure Biology**. 6: 848-858, 1996.
- PULST, S.M.; NECHIPORUK, A.; NECHIPORUK, T.; GISPert, S.; CHEN, X.N.; LOPES-CENDES I.; PEARLMAN, S.; STARKMAN, S.; OROZCO-DIAZ, G.; LUNKES, A.; DEJONG, P.; ROULEAU, G.A.; AUBURGER, G.; KORENBERG, J.R.; FIGUEROA, C.; SAHBA, S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. **Nature Genetics**. 14: 269-276. 1996
- PULST, S.M. Neurogenetics: single gene disorders. **Journal of Neurololy, Neurosurgery, Psychiatry**. 74, 2003.
- RAMOS, C.H.; OLIVEIRA, C.L.; FAN, C.Y.; TORRIANI, I.L.; CYR, D.M. Conserved central domains control the quaternary structure of type I and type II Hsp40 molecular chaperones. **Journal Molecular Biology**. 31;383: 155-166, 2008.
- RANUM, L.P.; SCHUT, L.J.; LUNDGREN, J.K.; ORR, H.T.; LIVINGSTON, D.M. Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. **Nature Genetics**. 8: 280-284, 1994.
- RUBINSZTEIN, D.C. e HAYDEN, M.R. Introduction in: Analysis of triplet Repeat Disorders. **Bios. Scientific Publishers**. 1-12, 1998.
- SANPEI, K.; TAKANO, H.; IGARASHI, S.; SATO, T.; OYAKE, M.; SASAKI, H.; WAKISAKA, A.; TASHIRO, K.; ISHIDA, Y.; IKEUCHI, T.; KOIDE, R.; SAITO, M.; SATO, A.; TANAKA, T.; HANYU, S.; TANAKA, H.; TAKAHASHI, H.; TSUJI, S. Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. **Nature Genetics**. 14: 277-284, 1996.
- SCHÖLS, L.; BAUER, P.; SCHMIDT, T.; SCHULTE, T.; RIESS, O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. **Lancet Neurololy**. 3: 291-304, 2004.

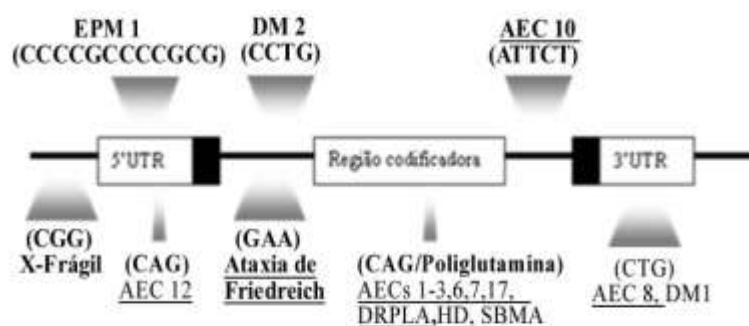
- SCOTT, K.; BLACKBURN, J.M.; BUTLE, P.J.G.; PERULTZ, M.F. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative disease. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**. 92: 6509-6513, 1995.
- SILVA-FERNANDES, A.; COSTA, M.D.O.; DUARTE-SILVA, S.; OLIVEIRA, P.; BOTELHO, C.M.; MARTINS, L.; MARIZ, J.A.; FERREIRA, T.; RIBEIRO, F.; CORREIA-NEVES, M.; COSTA, C.; MACIEL, P. Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. **Neurobiology Disease**. 40: 163-176, 2010.
- SKINNER, P.J.; KOSHY, B.; CUMMINGS, C.; KLEMENT, I.A.; HELIN, K. et al. Ataxin-1 with extra glutamines induces alterations in nuclear matrix-associated structures. **Nature**. 389: 971-974, 1997.
- SOONG, B.W.; PAULSON, H.L. Spinocerebellar ataxias: an update. **Biochemistry and Cell Biology**. 85: 337-346, 2007.
- STEVANIN, G.; TROTTIER, Y.; CANCEL, G.; DURR, A.; DAVID, G. et al. Screening for proteins with polyglutamine expansions in autosomal dominant cerebellar ataxias. **Human Molecular Genetics**. 5: 1887-1892, 1996.
- STEVANIN, G.; GIUNTI, P.; BELAL, G.D.S.; DURR, A.; RUBERG, M.; et al. Screening for proteins with polyglutamine expansions in autosomal dominant cerebellar ataxias. **Human Molecular Genetics**. 7: 1809-1813, 1998.
- STEVANIN, G.; DÜRR, A.; BRICE, A. Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology. **European Journal Human Genetics**. 8: 4-18. 2000.
- TAKIYAMA, Y.; IGARASHI, S.; ROGAEVA, E.A.; ENDO, K.; ROGAEV, E.I.; TANAKA, H.; SHERRINGTON, R.; SANPEI, K.; LIANG, Y.; SAITO, M. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. **Human Molecular Genetics**. 4: 1137-1146, 1995.

- TAKIYAMA, Y.; SAKOE, K.; NAKANO, I.; Nishizawa, M. Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the MJD1 gene. **Neurology**. 49: 604-606, 1997.
- TEVOSIAN, S.G.; SHIH, H.H.; MENDELSON, K.G.; SHEPPARD, K.A.; PAULSON, K.E.; YEE, A.S. HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. **Genes Development**. 1;11: 383-396, 1997.
- TODI, S.V.; LACO, M.N.; WINBORN, B.J.; TRAVIS, S.M.; WEN, H.M.; PAULSON, H.L. Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity. **Journal of Biological Chemistry**. 5; 282: 29348-29358, 2007.
- TROTT, A.; JARDIM, L.B.; LUDWIG, H.T.; SAUTE, J.A.; ARTIGALÁS, O.; KIELING, C.; WANDERLEY, H.Y.; RIEDER, C.R.; MONTE, T.L.; SOCAL, M.; ALONSO, I.; FERRO, A.; GIUGLIANI, R.; SARAIVA-PEREIRA, M.L. Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. **Clinical Genetics**. 70: 173-176. 2006.
- TROTT, A. Análise Molecular e Clínica das Ataxias Espinocerebelares. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007, 105p.
- TROTTIER, Y.; STEVANIN, G.; IMBERT, G.; DEVYS, D.; CANCEL, G.; SAUDOU, F.; WEBER, C.; DAVID, G.; TORA, L.; AGID, Y.; BRICE, A.; MANDEL, J.L. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. **Nature**. 378: 403-406, 1995.
- TSAI, C.C.; KAO, H.Y.; BANAYO, E. Ataxin1 a SCA1 neurodegenerative disorder protein is functionally linked to the silencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 4047-4052, 2004.
- TSUDA, H.; JAFAR-NEJAD, H.; PATEL, A.J.; SUN, Y.; CHEN, H.K.; ROSE, M.F.; VENKEN, K.J.; BOTAS, J.; ORR, H.T.; BELLEN, H.J.; ZOGHBI, H.Y. The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. **Cell**. 26; 122: 633-644, 2005.

- VERHOEF, L.G.; LINDSTEN, K.; MASUCCI, M.G.; DANTUMA, N.P. Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. **Human Molecular Genetics**. 15;11: 2689-2700, 2002.
- YOUNG, J.R. Biometrical Discovery with DNA arrays. **Cell**. 102: 9-15, 2000.
- YU, W.C.; MARK, D.A.; DIMITRY, B.; VEPRINTSEV, J. L. The Structure of the AXH Domain of Spinocerebellar Ataxin-1. **The Journal of biological chemistry**. 279: 3758–3765, 2004.
- YUE, S.; SERRA, H.G.; ZOGHBI, H.Y.; ORR, H.T. The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. **Human Molecular Genetics**. 10: 25-30, 2001
- WARRICK, J.M.; PAULSON, H.L.; GRAY-BOARD, G.L.; BUI, Q.T.; FISCHBECK, K.H.; PITTMAN, R.N.; BONINI, N.M. Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions. **Cell**. 12; 93: 939-949, 1998.
- WODA, J.M.; CALZONETTI, T.; HILDITCH, P.; DUYAO, M.P.; CONLON, R.A.; MACDONALD, B.M.C. Inactivation of the Huntington's disease gene (Hdh) impairs anterior streak formation and early patterning of the mouse embryo. **Developmental Biology**. 05-17, 2005.
- ZHUCHENKO, O.; BAILEY, J.; BONNEN, P.; ASHIZAWA, T.; STOCKTON, D.W.; AMOS, C.; DOBYNS, W.B.; SUBRAMONY, S.H.; ZOGHBI, H.Y.; LEE, C.C. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. **Nature Genetics**. 15: 62-69, 1997
- ZOGHBI, H.Y.; ORR, H.T. Glutamine repeats and neurodegeneration. **Annual Review of Neuroscience**. 23: 217-247, 2000.
- ZOGHBI, H.Y.; ORR, H.T. Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1. **Journal of Biological Chemistry**. 284: 7425-7429, 2009.
- ZU, T.; DUVICK, L.A.; KAYTOR, M.D.; BERLINGER, M.S.; ZOGHBI, H.Y.; CLARK, H.B.; et. al. Recovery from polyglutamine-induced neurodegeneration in conditional SCA1 transgenic mice. **Journal Neuroscience**. 24: 8853-8861, 2004.

ZÜHLKE, C.; DALSKI, A.; HELLENBROICH, Y.; BUBEL, S.; SCHWINGER, E.; BÜRK, K.
Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles. **European Journal of Human Genetics**. 10: 204-209, 2002.

ANEXO I



Doenças com repetições expandidas - O mecanismo molecular da doença é determinado pela repetição na sequência, tamanho e posição, qual gene e qual função. As sequências repetidas para cada doença estão mostradas nos parênteses. As ataxias estão sublinhadas.

ANEXO II

Genética molecular das principais ataxias cerebelares autossômicas dominantes:

Doença	Locus	Gene/proteína	Mutação	Referências
SCA1	6p23	<i>ATXN1</i> /ataxina-1	CAG/resíduo poliQ	Rich et al., 1987
SCA2	12q23-24.1	<i>ATXN2</i> /ataxina-2	CAG/resíduo poliQ	Gispert et al., 1993
MJD/SCA 3	14q21	<i>ATXN3</i> /ataxina-3	CAG/resíduo poliQ	Kawaguchi et al., 1994
SCA4	16q24	Desconhecida	Desconhecida	Flanigan et al., 1996
SCA5	11q11-q11	<i>SPTBN2</i> /Cadeia β da espectrina do cérebro	Desconhecida	Ikeda et al., 2006
SCA6	19p13	<i>CACNA1</i> /Canal de Cálcio	CAG/resíduo poliQ	Ishikawa et al., 1997
SCA7	3p21.2-12	<i>ATXN7</i> /Ataxina-7	CAG/resíduo poliQ	Benomar et al., 1994
SCA8	13p21	<i>KLHL1AS</i> /?	CTG/3'UTR	Vincent et al., 2000
SCA10	22q13	<i>ATXN10</i> /Ataxina- 10/	ATTCT/Intron9	Matsuura et al., 2000

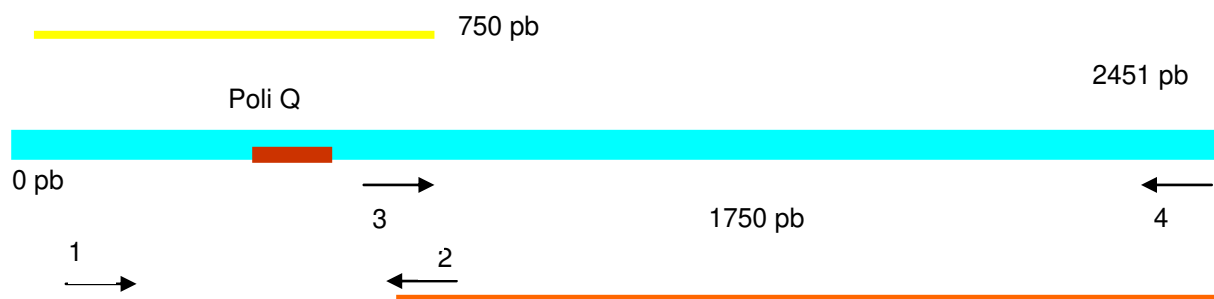
ANEXO III

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

(Otimizado pelo Dr. Celso E. Benedetti, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS)

1. Coletar 4 mL de sangue e manter à temperatura ambiente (TA);
2. Adicionar 4 mL de solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) em tubo estéril de 15 mL.
3. Depositar cuidadosamente esta mistura (8 mL) sobre 6 mL de Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Biosciences) já aliquotados em outro tubo estéril de 15 mL, de forma que as duas fases não se misturem.
4. Centrifugar à 400 x g por 30 minutos (min.) à 18°C, com a utilização de rotor tipo ângulo livre.
5. Remover as células brancas para um novo tubo de 15 mL com o auxílio de pipeta *pasteur* e completar o volume do mesmo com solução salina em TA.
6. Centrifugar a 100 x g por 10 min. à 18 °C.
7. Descartar o sobrenadante, ressuspender o pellet em 1mL de TrizolTM (Invitrogen) e incubar à TA por 5 min.
8. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio, agitando-se o tubo vigorosamente por 15 segundos.
9. Incubar por 3 min. em TA e centrifugar a 12000 x g por 15 min. a 18 °C.
10. Transferir a fase aquosa (sobrenadante) para novo tubo e adicionar 0,5 mL de álcool isopropílico 100%, deixando em TA por 10 min.
11. Centrifugar a 12000 x g por 10 min a 5 °C.
12. Descartar o sobrenadante e em seguida, lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 75%. Desse modo, o RNA em solução de etanol deve ser centrifugado à 7500 x g por 5 min a 5 °C, o sobrenadante descartado com auxílio de pipeta e aguardar até que o *pellet* esteja seco.
13. Ressuspender o RNA em 30 µL de água DEPC e incubar por 10 min. a 55 °C. Armazenar em freezer -80 °C em pequenas alíquotas.

ANEXO VI



Representação da posição dos *primers* (1, 2, 3 e 4) utilizados para a amplificação do cDNA da ATX1N em duas porções. Com poliQ =750 pb, e sem poliQ=1750 pb

MKSNQERSNE	CLPPKKREIP	ATSRSSSEKA	PTLPSDNHRV	EGTAWLPGNP	GGRGHGGGRH
GPAGTSVELG	LQQGIGLHKA	LSTGLDYSP	SAPRSVPVAT	TLPAAYATPQ	PGTPVSPVQY
HLPHTFCQFI	GSSQYSGTYA	SFIPSQLIPP	TANPVTSAVA	SAAGATTPSQ	RSQLEAYSTL
LANMGSLSQT	PGHKAEE	Q0000	Q000000000HQ	H0000000000	Q000000HLSR
PPAQQNQYVH	ISSSPQNTGR	TASPPAIPVH	LHPHQTMIPH	TLTLGPPSQV	VMQYADSGSH
FVPREATKKA	ESSRLQQAIO	AKEVLNGEME	KSRRYGAPSS	ADLGLGKAGG	KSVPHPHYESR
HVVVHPSPSD	YSSRDPGVR	ASVMVLPNSN	TPAADLEVQQ	ATHREASPST	LNDKSGHLHG
KPGHRSYALS	PHTVIQTTHS	ASEPLPVGLP	ATAFYAGTQP	PVIGYLSGQQ	QAITIYAGSLP
QHLVIPGTQP	LLIPVGSTDM	EASGAAPAIV	TSSPQFAAVP	HTFVTTALPK	SENFNPEALV
TQAAYPAMVQ	AQIHLPPVQS	VASPAAPP	T	LPPYFMKGS	IQLANGELKK
QSAEISNDLK	IDSSTVERIE	DSHSPGVAVI	QFAVGEHRAQ	VSVEVLVEYP	FFVFGQGWSS
CCPERTSOLF	DLPCSKLSVG	DVCISLTLKN	LKNGSVKKGQ	PVDPASVLLK	HSKADGLAGS

ANEXO VII

Sequência de aminoácidos da proteína *ATX1* gi |4506793|. Sequência de aminoácidos do domínio AXH em vermelho. Poliglutaminas em verde.

ML	HHHHHH	ATSSAMSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV
KLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERA	EISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCH	
KTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI	PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDH	
PPTSGSGGGGSMSENLYFQGAMAPPTLPPYFMKGS	IQLANGELKKVEDLKTEDFIQSAEISNDLKIDSSTVERI	
EDSHSPGVAVIQFAVGEHRAQVSVEVLVEYPFFVFGQGWSSCCPERTSOLF	DLPCSKLSVG	DVCISLTLK

his-tag GST de *Schistosoma mansoni*

sequência AXH

Sequencia= 42 kDa (*ProtParam*)

ANEXO VIII

ProtParam DO FRAGMENTO 750n

1 MKSNQERSNE CLPPKKREIP ATSRSSSEKA PTLPSDNHRV EGTAWLPGNP GGRGHGGGRH 60
61 GPAGTSVELG LQQGIGLHKA LSTGLDYSPP SAPRSVPVAT TLPAAYATPQ PGTPVSPVQY 120
121 AHLPHTFQFI GSSQYSGTYA SFIPSQLIPP TANPVTSAVA SAAGATTPSQ RSQLEAYSTL 180
181 LANMGSLSQT PGHKAEQQQQ QQQQQQQQHQQ HQQQQQQQQQ QQQQQQHLSRPLITPGSP240
241 PPAQQNQYVH

Number of amino acids: 250

Molecular weight: 26694.3

Theoretical pI: 9.33

Amino acid composition:

Ala (A)	23	9.2%
Arg (R)	9	3.6%
Asn (N)	7	2.8%
Asp (D)	2	0.8%
Cys (C)	1	0.4%
Gln (Q)	42	16.8%
Glu (E)	9	3.6%
Gly (G)	22	8.8%
His (H)	11	4.4%
Ile (I)	6	2.4%
Leu (L)	17	6.8%
Lys (K)	6	2.4%
Met (M)	2	0.8%
Phe (F)	3	1.2%
Pro (P)	29	11.6%
Ser (S)	26	10.4%
Thr (T)	18	7.2%
Trp (W)	1	0.4%
Tyr (Y)	7	2.8%
Val (V)	9	3.6%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 11

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 15

Atomic composition:

Carbon	C	1152
Hydrogen	H	1807
Nitrogen	N	355
Oxygen	O	373
Sulfur	S	3

Formula: C₁₁₅₂H₁₈₀₇N₃₅₅O₃₇₃S₃ **Total number of atoms:** 3690

Conditions: 6.0 M guanidium hydrochloride; 0.02 M phosphate buffer; pH 6.5

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm.

Ext. coefficient 15930

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.597, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 15930

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.597, assuming NO Cys residues appear as half cystines

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

The instability index (II) is computed to be 81.51

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 55.52

ANEXO IX

ProtParam do dominio AXH clivado

1 MAPPTLPPYF MKGSIQLAN GELKKVEDLK TEDFIQSAEI SNDLKIDSST VERIEDSHSP 60
61 GVAVIQFAVG EHRAQVSVEV LVEYPPFVFG QGWSSCCPER TSQFLDLPCS KLSVGDVCIS 120
21 LTLK

Number of amino acids: 124 **Molecular weight:** 13636.6

Theoretical pI: 4.68 **Amino acid composition:**

Ala (A)	6	4.8%
Arg (R)	3	2.4%
Asn (N)	2	1.6%
Asp (D)	7	5.6%
Cys (C)	4	3.2%
Gln (Q)	6	4.8%
Glu (E)	10	8.1%
Gly (G)	7	5.6%
His (H)	2	1.6%
Ile (I)	8	6.5%
Leu (L)	11	8.9%
Lys (K)	7	5.6%
Met (M)	2	1.6%
Phe (F)	7	5.6%
Pro (P)	8	6.5%
Ser (S)	14	11.3%
Thr (T)	5	4.0%
Trp (W)	1	0.8%
Tyr (Y)	2	1.6%
Val (V)	12	9.7%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 17

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 10

Atomic composition:

Carbon	C	610
Hydrogen	H	959
Nitrogen	N	153
Oxygen	O	188
Sulfur	S	6

Formula: C₆₁₀H₉₅₉N₁₅₃O₁₈₈S₆

Total number of atoms: 1916

Conditions: 6.0 M guanidium hydrochloride; 0.02 M phosphate buffer; pH 6.5

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm. Ext. coefficient 8730

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.640, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 8480

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.622, assuming NO Cys residues appear as half cystines

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 42.65

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 92.66

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.031

ANEXO X

The ExPASy Server requires Javascript to be fully functional. You may not see all the information available for this page.

ProtParam do domínio AXH

```
1 MLHHHHHHAT SSAMSPILGY WKIKGLVQPT RLLLEYLEEK YEEHLYERDE GDKWRNKKFE 60
61 LGLEFPNLPY YIDGDVKTQ SMAIRYIAD KHNMLGGCPK ERAEISMLEG AVLDIRYGV 120
121 RIAYSKDFET LKVDFLSKLP EMLKMFEDRL CHKTYLNGDH VTHPDFMLYD ALDVVLYMDP 180
181 MCLDAFPKLV CFKKRIEAP QIDKYLKSSK YIAWPLQGWQ ATFGGGDHPP TSGSGGGGGS 240
241 MSENLYFQGA MAPPTLPPYF MKGSHQLAN GELKKVEDLK TEDFIQSAEI SNDLKIDSST 300
301 VERIEDSHSP GVAVIQFAVG EHRAQVSVEV LVEYPPFFVG QGWSSCCPER TSQFLDLPCS 360
361 KLSVGDVCIS LTLK
```

Number of amino acids: 374

Molecular weight: 42319.6

Theoretical pI: 5.62

Ala (A)	19	5.1%
Arg (R)	12	3.2%
Asn (N)	7	1.9%
Asp (D)	24	6.4%
Cys (C)	8	2.1%
Gln (Q)	12	3.2%
Glu (E)	27	7.2%
Gly (G)	28	7.5%
His (H)	14	3.7%
Ile (I)	21	5.6%
Leu (L)	40	10.7%
Lys (K)	27	7.2%
Met (M)	13	3.5%
Phe (F)	17	4.5%
Pro (P)	21	5.6%
Ser (S)	28	7.5%
Thr (T)	13	3.5%
Trp (W)	5	1.3%
Tyr (Y)	17	4.5%
Val (V)	21	5.6%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 51

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 39

Atomic composition:

Carbon	C	1912
Hydrogen	H	2945
Nitrogen	N	489
Oxygen	O	554
Sulfur	S	21

Formula: C₁₉₁₂H₂₉₄₅N₄₈₉O₅₅₄S₂₁

Total number of atoms: 5921

Conditions: 6.0 M guanidium hydrochloride; 0.02 M phosphate buffer; pH 6.5

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm.

Ext. coefficient 53330

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.260, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 52830

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.248, assuming NO Cys residues appear as half cystines

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

ANEXO XII

ProtParam SCA1

1	MKSNQERSNE	CLPPKKREIP	ATSRSSEEKA	PTLPSDNHRV	EGTAWLPGNP	GGRGHGGGRH	60
61	GPAGTSVELG	LQQGIGLHKA	LSTGLDYSPP	SAPRSVPVAT	TLPAAYATPQ	PGTPVSPVQY	120
121	AHLPHTFQFI	GSSQYSGTYA	SFIPSQLIPP	TANPVTSAVA	SAAGATTPSQ	RSQLEAYSTL	180
181	LANMGSLSQT	PGHKAEQQQQ	QQQQQQQQHQ	HQQQQQQQQQ	QQQQQQHLSR	APGLITPGSP	240
241	PPAQONQYVH	ISSSPQNTGR	TASPPAIPVH	LHPHQTMIPH	TLTLGPPSQV	VMQYADSGSH	300
301	FVPREATKKA	ESSRLQQAII	AKEVLNGEME	KSRRYGAPSS	ADLGLGKAGG	KSVPHPYESR	360
361	HVVVHPSPSD	YSSRDPSGVR	ASVMVLPNSN	TPAADLEVQQ	ATHREASPST	LNDKSGLHLG	420
421	KPGHRSYALS	PHTVIQTTHS	ASEPLPVGLP	ATAFYAGTQP	PVIGYLSGQQ	QAITYAGSLP	480
481	QHLVIPGTQP	LLIPVGSTDM	EASGAAPAIV	TSSPQFAAVP	HTFVTTALPK	SENFNPEALV	540
541	TQAAYPAMVQ	AQIHLPVVQS	VASPAAPPT	LPPYFMKGS	IQLANGELKK	VEDLKTEDFI	600
601	QSAEISNDLK	IDSSTVERIE	DSHSPGVAVI	QFAVGEHRAQ	VSVEVLVEYP	FFVFGQGWSS	660
661	CCPERTSQLF	DLPCSKLSVG	DVCISLTLKN	LKNGSVKKGQ	PVDPASVLLK	HSKADGLAGS	720
721	RHRYAEQENG	INQGSQMLS	ENGELKFPEK	MGLPAAPFLT	KIEPSKPAAT	RKRRWSAPES	780
781	RKLEKSEDEP	PLTLPKPSLI	PQEVKICIEG	RSNVGK			

Number of amino acids: 816

Molecular weight: 87050.7

Theoretical pI: 8.49

Amino acid composition:

Ala (A)	76	9.3%
Arg (R)	29	3.6%
Asn (N)	22	2.7%
Asp (D)	19	2.3%
Cys (C)	6	0.7%
Gln (Q)	74	9.1%
Glu (E)	43	5.3%
Gly (G)	60	7.4%
His (H)	31	3.8%
Ile (I)	30	3.7%
Leu (L)	63	7.7%
Lys (K)	37	4.5%
Met (M)	11	1.3%
Phe (F)	17	2.1%
Pro (P)	87	10.7%
Ser (S)	89	10.9%
Thr (T)	48	5.9%
Trp (W)	3	0.4%
Tyr (Y)	19	2.3%
Val (V)	52	6.4%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 62

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 66

Carbon	C	3821
Hydrogen	H	6055
Nitrogen	N	1101
Oxygen	O	1193
Sulfur	S	17

Formula: C₃₈₂₁H₆₀₅₅N₁₁₀₁O₁₁₉₃S₁₇ Total number of atoms: 12187

Conditions: 6.0 M guanidium hydrochloride; 0.02 M phosphate buffer; pH 6.5

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹.

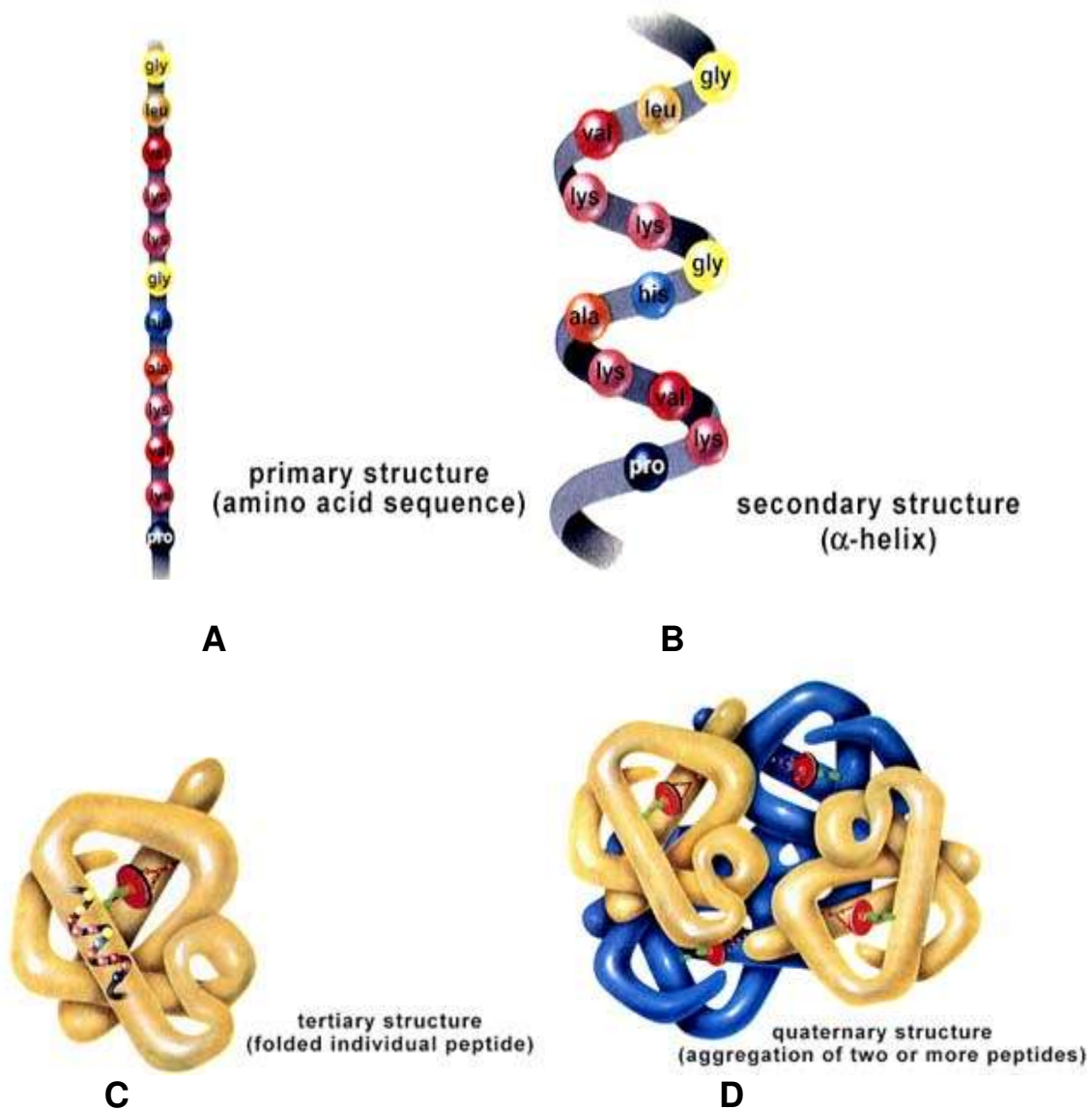
The first table lists values computed assuming ALL Cys residues appear as half cystines, whereas the second table assumes that NONE do.

PSIPRED PREDICTION RESULTS SCA1

PSIPRED HFORMAT (PSIPRED V2.3 by David Jones)

AA: RKLEKSEDEPPLTLPKPSLIPQEVKICIEGRSNV GK
790 800 810

ANEXO XIV

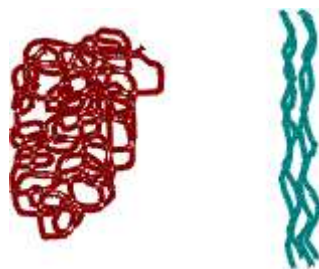


A= Estrutura Primária de uma proteína, sequencia de aa e ligações peptídeas da molécula;

B= Estrutura Secundária de uma proteína, é dado pelo arranjo espacial dos aa; último nível de organização das proteínas fibrosas;

C= Estrutura Terciária de uma proteína, forma tridimensional (arranjo) ocorre em proteínas globulares;

D= Estrutura quaternária de uma proteína, apenas em proteínas oligoméricas.



Esquemas de proteínas globulares e fibrosas

Proteínas são compostos orgânicos de alto peso molecular, são formadas pelo encadeamento de aminoácidos. Representam cerca de 50 a 80% do peso seco da célula sendo, portanto, o composto orgânico mais abundante de matéria viva.

Proteínas Fibrosas - Na sua maioria, as proteínas fibrosas são insolúveis nos solventes aquosos e possuem pesos moleculares muito elevados. São formadas geralmente por longas moléculas mais ou menos retilíneas e paralelas ao eixo da fibra. A esta categoria pertencem as proteínas de estrutura, como colágeno do tecido conjuntivo, as queratinas dos cabelos, as esclerotinas do tegumento dos artrópodes, a conchiolina das conchas dos moluscos, ou ainda a fribrina do soro sanguíneo ou a miosina dos músculos. Algumas proteínas fibrosas, porém, possuem uma estrutura diferente, como as tubulinas, que são formadas por múltiplas subunidades globulares dispostas helicoidalmente.

Proteínas Globulares - De estrutura espacial mais complexa, são mais ou menos esféricas. São geralmente solúveis nos solventes aquosos e os seus pesos moleculares situam-se entre 10.000 e vários milhões. Nesta categoria situam-se as proteínas ativas como os enzimas, transportadores como a hemoglobina, etc.

ANEXO XVI

ASPECTOS ÉTICOS

O RNA necessário para os experimentos descritos foram obtidos a partir de sangue colhido de indivíduos normais e pacientes atendidos no ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP (código: 26066). Os pacientes são atendidos pela Dra. Iscia Lopes-Cendes, que realiza toda a orientação sobre a doença, discute a possibilidade de realizar testes moleculares diagnósticos e faz a orientação genética pré e pós-teste.

É assegurado a todos os membros da família, o direito de obter informações e atendimento nesse mesmo ambulatório. O projeto de pesquisa que envolve o diagnóstico molecular das ataxias espinocerebelares já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP (parecer 055/98). O laboratório de Genética Médica também detém a licença para realizar os trabalhos que envolvem biotecnologia, concedida pelo CQB e identificada pelo número 0072/98.

ANEXO XVII

PESQUISA: DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA E DAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DAS MUTAÇÕES RESPONSÁVEIS PELAS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES

PESQUISADOR: Dra. Iscia Lopes Cendes

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós-Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 25/06/98



Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP