

*DANIELA MEDEIROS DE CASTRO BARRETO*

**ESTUDOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA ATAXINA-3**

*CAMPINAS*

*2007*



***DANIELA MEDEIROS DE CASTRO BARRETO***

**ESTUDOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA ATAXINA-3**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

***ORIENTADORA: Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes***

***CAMPINAS***

***2007***

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B275e Barreto, Daniela Medeiros de Castro  
Estudos funcionais da proteína ataxina-3 / Daniela Medeiros de  
Castro Barreto. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

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

1. Ataxia. 2. Doença de Machado-Joseph. I. Cendes, Iscia  
Lopes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Functional studies of the ataxin-3 protein**

**Keywords:** • Ataxia

• Machado-Joseph disease

**Área de concentração : Ciências Biomédicas**

**Titulação: Doutorado em Ciências Médicas**

**Banca examinadora: Profa. Dra. Íscia Lopes-Cendes**

**Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo**

**Profa. Dra. Paula Regina Kuser Falcão**

**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**

**Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr**

**Data da defesa: 28-02-2007**

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Íscia Lopes Cendes

### Membros:

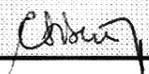
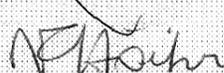
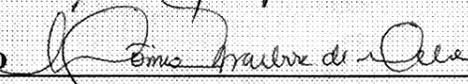
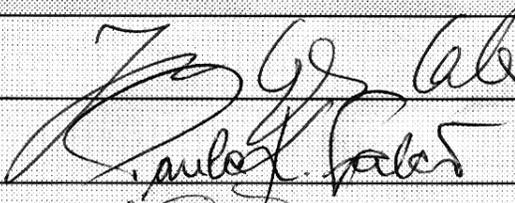
1. Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes

2. Profa. Dra. Paula Kuser Falcão

3. Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

4. Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

5. Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo



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

Data: 28/02/2007

*Trabalho realizado no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da FCM- UNICAMP e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)- Campinas*

*Apoio financeiro FAPESP*



***DEDICATÓRIA***

*Ao meu marido Sérgio e  
aos meus pais Angelina e Vitor*



## **AGRADECIMENTOS**

---

À minha orientadora, professora Dra. Iscia Lopes-Cendes, que além de me orientar foi uma amiga nestes oito anos de bom convívio, sempre sorrindo, otimista, com palavras de confiança e incentivo nos momentos mais difíceis, preocupando-se não somente com o trabalho, mas com meu bem estar emocional. Muito Obrigada Iscia!

À Maria Cristina Cabral Garcia, amiga extremamente prestativa, disposta a me auxiliar nas horas de grande volume de trabalho, em que eu sozinha mal dava conta. Obrigada também por compartilhar seus conhecimentos e trabalhos comigo.

À Flávia Cristina Nery que foi minha grande professora na técnica de Duplo-Híbrido, e que a despeito de seu grande potencial e de sua própria pesquisa, sempre esteve acessível de forma simpática, paciente e amiga.

Ao professor Dr. Jörg Kobarg que gentilmente concedeu os vetores e a biblioteca para o duplo-híbrido, permitiu meu acesso ao LNLS e cedeu tempo da Flávia para me acompanhar.

À professora Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, sempre tão alegre que aceitou ser da minha banca de mestrado e agora de doutorado.

Ao Fábio, por ser sempre prestativo e amigo de tantos anos.

À Tatiany, amiga que me auxiliou na execução do trabalho e por ser tão meiga e tranqüila.

À minha aluninha Taíza, pela ajuda na execução da metodologia e por sua simpatia.

Ao Tiago, exemplo de capacidade e que sempre esteve disposto a tirar dúvidas e compartilhar seus conhecimentos de forma humilde.



Ao pessoal do SMOLBnet: Miriam, Marcelo e Kalinca, colegas da difícil tarefa de trabalhar com proteínas por compartilharem e esclarecerem minhas dúvidas.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Cláudia, Cyntia, Érika, Leonardo, Luciana, Marilza, Rafaéis e Rodrigo por serem tão meigos e por permitirem grandes momentos de descontração e convívio alegre durante esses anos.

A meus irmãos, Victor e Marcello, que sempre torceram por mim.

A minha mãezinha linda que eu amo demais com quem eu sempre pude contar, desabafar e que sempre orou para que eu concluísse este trabalho. Ao meu pai, pelo amor, cuidado e por nunca ter deixado me faltar nada.

Ao meu amado marido Sérgio que agüentou tantas vezes minhas lamentações sobre as dificuldades na pesquisa, por não ter me deixado desistir, por cuidar de mim e ser meu querido companheiro que me completa e me realiza.

A Deus, por ter um amor que não desiste de mim nunca, que sempre está pronto a me receber mesmo quando eu não mereço. Ao meu querido Jesus, meu maior amigo, meu sustentador que tanto me ama e a quem eu tanto amo. Senhor tu és o que eu tenho de mais precioso e é pela tua graça que eu vivo.



*Porque dEle, e por Ele, e para Ele,  
são todas as coisas; A Ele seja a  
glória para sempre. Amém*

***Romanos 11:36***



	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xliv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xlix</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	53
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	55
<b>1.1-Doenças de repetição de CAG</b> .....	55
<b>1.2- Doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelar tipo 3</b> .....	56
1.2.1- Aspectos Históricos e Epidemiológicos.....	56
1.2.2- Aspectos Clínicos.....	57
1.2.3- Aspectos Moleculares.....	57
<b>1.3- Sistema de Duplo Híbrido</b> .....	61
<b>1.4- Estudos Estruturais de Proteínas</b> .....	63
1.4.1- Purificação de Proteínas.....	64
1.4.2- Dicroísmo Circular (CD) .....	66
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	69
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
<b>3.1- Plasmídios Utilizados</b> .....	75
<b>3.2- Microorganismos</b> .....	81
<b>3.3- A Biblioteca de cDNA de Cérebro Fetal Humano</b> .....	81
<b>3.4- Extração de RNA Total de Sangue Periférico</b> .....	83
<b>3.5- Transcrição em cDNA</b> .....	82
<b>3.6- Amplificação das Regiões de Interesse</b> .....	83



3.6.1- Oligonucleotídeos e Enzimas de Restrição.....	83
3.6.2- Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) .....	87
<b>3.7- Ligação dos Fragmentos de DNA.....</b>	<b>87</b>
<b>3.8- Transformação Bacteriana.....</b>	<b>88</b>
<b>3.9- Extração de DNA Plasmidial (Mini-prep) .....</b>	<b>88</b>
<b>3.10- Preparação para o Duplo-Híbrido.....</b>	<b>88</b>
3.10.1- Digestão do DNA com Enzimas de Restrição.....	88
3.10.2- Digestão do Plasmídio pBTM116.....	89
3.10.3- Defosforilação do Plasmídio pBTM116.....	89
3.10.4- Clonagem da Atx-3 em pBTM116.....	89
3.10.5- Seqüenciamento do cDNA da Atx-3.....	90
3.10.6- Transformação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40 com pBTM116.....	90
3.10.7- Testes de Auto-ativação pela Isca.....	90
3.10.7.1- Ensaio com X-gal.....	91
3.10.7.2- Ensaio em Meio sem Histidina.....	91
3.10.8- Amplificação da Biblioteca de cDNA de Cérebro Fetal Humano..	92
3.10.9- Extração de DNA Plasmidial em Larga Escala (Maxiprep).....	93
3.10.10- Ensaio de Duplo-Híbrido de Expressão em Levedura.....	93
3.10.10.1- Transformação Sequencial de L40 com pACT2.....	93
3.10.10.2- Seleção dos Clones.....	94
3.10.10.3- Ensaio para Determinação da Ativação do Gene Repórter <i>HIS3</i> .....	94
3.10.10.3.1- Teste de Pingos.....	94



3.10.10.4- Ensaio para Determinação da Ativação do Gene Repórter lacZ.....	95
3.10.10.4.1- Metabolização do X-gal.....	95
3.10.11- Extração de DNA Plasmidial de Leveduras (Mini-prep de Leveduras) .....	95
3.10.12- Transformação de <i>E. coli</i> com Vetor Presa.....	96
3.10.13- Mini-prep de <i>E. coli</i> .....	96
3.10.14- Digestão das Mini-preps com <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> .....	97
<b>3.11- Estudos Funcionais da Atx-3.....</b>	<b>97</b>
3.11.1- Digestão dos Insetos.....	98
3.11.2- Clonagem do Vetor de Expressão pET28a(+)......	98
3.11.3- Transformação de BL21(DE3) .....	98
3.11.4- Testes de Expressão.....	99
3.11.5- Teste de Solubilidade.....	100
3.11.6- Purificação da Atx-3 Normal e Mutante.....	101
3.11.7- Diálise.....	102
3.11.8- Dicroísmo Circular.....	102
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>103</b>
<b>4.1- Extração de RNA.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2- Amplificação da Atx-3 e de seus Domínios.....</b>	<b>106</b>
4.2.1- Amplicon da Atx-3 para Fusão em pBTM116.....	106
4.2.2- Amplicon dos Tratos de PoliQ Normal (PoliQ N) e PoliQ Expandida (PoliQ E) .....	107
4.2.3- Amplicon da Atx-3N sem o Trato de PoliQ.....	108



<b>4.3- Purificação dos Géis de Agarose.....</b>	<b>109</b>
<b>4.4- Mini-preps de pGEM-T Easy.....</b>	<b>111</b>
<b>4.5- Preparação para o Duplo-Híbrido.....</b>	<b>112</b>
4.5.1- Testes de Auto-ativação da Atx-3.....	116
4.5.1.1- Ensaio com X-gal.....	116
4.5.1.2- Ensaio em Meio sem Histidina.....	116
4.5.2- Maxiprep da Biblioteca de Cérebro.....	117
4.5.3- Experimentos do Sistema de Duplo-Híbrido.....	118
4.5.3.1- Placas SD-W, leu, his.....	118
4.5.3.2- Placas SD-W, his.....	119
4.5.3.3- Placas SD-W, leu.....	119
4.5.3.4- Placas Controle.....	119
4.5.3.5- Seleção dos Clones.....	120
4.5.3.6- Teste de Pingos.....	120
4.5.3.7- Ensaio com X-gal.....	121
4.5.4- Mini-prep de Levedura.....	122
4.5.5- Transformação em DH5 $\alpha$ .....	123
4.5.6- Digestão com <i>Eco/Xho</i> .....	123
4.5.7- Seqüenciamento.....	124
<b>4.6- Estudos Funcionais das Atx-3 Normal e Mutante.....</b>	<b>125</b>
4.6.1- Digestão das Mini-preps e do Vetor pET28.....	125
4.6.2- Expressão da Atx-3 em BL21 (DE3) .....	127
4.6.3- Teste de Solubilidade.....	130



4.6.4- Purificação.....	131
4.6.5- Dicroísmo Circular.....	136
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>139</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>147</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>151</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>161</b>
<b>Aspectos Éticos.....</b>	<b>163</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>164</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b><math>\beta</math>-Me</b>	$\beta$ -Mercaptoetanol
<b><math>\eta</math>g</b>	Nanograma
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b><math>\rho</math>mol</b>	Picomol
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Graus Celsius
<b>AD</b>	Domínio de ativação transcricional ( <i>Activation domain</i> )
<b>AIPs</b>	<i>Atrophin-1-interacting protein</i>
<b>Asn</b>	Aminoácido asparagina
<b>Atx-3</b>	Ataxina-3
<b>CAG</b>	Glutamina
<b>CD</b>	Dicroísmo circular ( <i>Circular Dicroism</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementar ao RNA
<b>CG</b>	Circle Grow
<b>cm</b>	Centímetros
<b>Cys</b>	Aminoácido cisteína
<b>DBD</b>	Domínio de ligação ao DNA ( <i>Binding domain</i> )
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos trifosfato



<b>DRPLA</b>	Atrofia dentopaldorrubrolusiana
<b>DTT</b>	1,4 Dithiothreitol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Água deuterada
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetra acético
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>ERAD</b>	Degradação associada ao retículo endoplasmático
<b>ET</b>	Extrato Total
<b>FT</b>	Filtrado
<b>g</b>	Gramas
<b>HAP1</b>	<i>Huntingtin-associated</i>
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HD</b>	Doença de Huntington
<b>HIP1</b>	<i>Huntingtin-interacting protein</i>
<b>His</b>	Aminoácido histidina
<b>IDA</b>	Ácido iminodiacético
<b>IMAC</b>	Immobilized Metal Affinity Chromatography
<b>IPTG</b>	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
<b>kb</b>	Quilobases
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>LAMP</b>	Proteína nuclear cerebelar ácida rica em leucina
<b>LB</b>	Meio Luria Bertani
<b>Leu</b>	Aminoácido leucina



<b>LiAc</b>	Acetato de Lítio
<b>LiCl</b>	Cloreto de Lítio
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama ( $10^{-3}$ g)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>min.</b>	Minutos
<b>MJD</b>	Doença de Machado-Joseph (Machado-Joseph Disease)
<b><i>MJD1</i></b>	Gene da Doença de Machado-Joseph
<b>MJD1a</b>	Proteína Atx-3 mutante
<b>mL</b>	Mililitro ( $10^{-3}$ L)
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MRE</b>	Elipticidade Molar Média
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NES</b>	Sinal de exportação nuclear
<b>NIIs</b>	Inclusões nucleares
<b>Ni-NTA</b>	Ácido níquel-nitrilotriacético
<b>NLS</b>	Sinais de localização nuclear
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>nt</b>	Nucleotídeo
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>OD</b>	Absorbância



<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenil metil sulfonila
<b>PoliQ</b>	Poliglutamina
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SAXS</b>	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
<b>SBMA</b>	Atrofia muscular espino bulbar
<b>SCA</b>	Ataxia Espinocerebelar
<b>SCA 3</b>	Ataxia Espinocerebelar tipo 3
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio (sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
<b>SD-W,leu,his</b>	Meio SD não suplementado dos aminoácidos: triptofano, leucina e histidina
<b>ss-DNA</b>	DNA de esperma de salmão desnaturado
<b>Taq</b>	<i>Termus aquaticus</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil aminometano



<b>U</b>	Unidades
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>UIM</b>	Motivo de interação com a Ubiquitina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VCP</b>	Proteína contedora de valosina
<b>W</b>	Triptofano
<b>W</b>	Watt
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indol beta-D-galactosídeo (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)
<b>YNB</b>	<i>Yeast nitrogen base</i>
<b>3-AT</b>	3-aminotriazol



## *LISTA DE TABELAS*

---

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1-</b> Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento da Atx-3 nos vetores.....	79
<b>Tabela 2-</b> Seqüência dos “primers” utilizados para amplificação das Ataxinas-3 normal e mutante e seus fragmentos.....	85
<b>Tabela 3-</b> Diversos fragmentos da Atx-3 e seus tamanhos.....	87



	<i><b>Pág.</b></i>
<b>Figura 1-</b> No sistema de duplo-híbrido a proteína conhecida é chamada de isca.....	63
<b>Figura 2-</b> Diversidade nas características dos espectros de diferentes tipos de estruturas secundárias.....	67
<b>Figura 3-</b> Desenho esquemático do plasmídeo pGEM <sup>®</sup> -T Easy.....	76
<b>Figura 4-</b> Seqüência do sítio múltiplo de clonagem (“polylinker”) do plasmídeo pBTM116 para a construção de proteínas de fusão Atx-3-LexA-DBD na mesma matriz de leitura relativa ao LexA.....	77
<b>Figura 5-</b> Desenho esquemático do plasmídeo pBTM116.....	78
<b>Figura 6-</b> Desenho esquemático do plasmídeo pET-28a(+)......	79
<b>Figura 7-</b> Desenho esquemático do plasmídeo pACT2 com seu mapa de restrição e sítio múltiplo de clonagem.....	80
<b>Figura 8-</b> Seqüência codificante da ataxina-3 depositada no banco de dados <b>GenBank</b> AB050194.....	84
<b>Figura 9-</b> Seqüência de aminoácidos e do cDNA da proteína Atx-3 com a localização dos “primers” desenhados para amplificação dos domínios funcionais.....	86
<b>Figura 10-</b> Gel de agarose 1%.....	105
<b>Figura 11-</b> Gel de agarose 1%.....	105
<b>Figura 12-</b> Gel de agarose 1%.....	107
<b>Figura 13-</b> Amplicons dos tratos de poliQ normal (N) e expandido (E).....	108
<b>Figura 14-</b> Amplicons dos cDNAs da Atx-3N com e sem o trato de poliQ.....	109
<b>Figura 15-</b> Gel de agarose 1%.....	110



<b>Figura 16-</b>	cDNA das poliQ N e E purificados.....	110
<b>Figura 17-</b>	Gel de agarose 1%.....	111
<b>Figura 18-</b>	G el de agarose 1%.....	111
<b>Figura 19-</b>	PCRs de colônia.....	112
<b>Figura 20-</b>	Gel de agarose 1%.....	113
<b>Figura 21-</b>	Gel de agarose 1%.....	113
<b>Figura 22-</b>	Gel de agarose 1%.....	114
<b>Figura 23-</b>	Gel de agarose 1%.....	115
<b>Figura 24-</b>	Ensaio da $\beta$ -galactosidase.....	116
<b>Figura 25-</b>	Placa controle: SD- W.....	117
<b>Figura 26-</b>	Gel de agarose 1%.....	118
<b>Figura 27-</b>	Placas controle.....	120
<b>Figura 28-</b>	Teste de Pingos.....	121
<b>Figura 29-</b>	Gel de agarose 1%.....	122
<b>Figura 30-</b>	Gel de agarose 1%.....	123
<b>Figura 31-</b>	Digestão parcial das mini-preps com <i>Eco RI/Xho</i> obtidas a partir da transformação de DH5 $\alpha$ com o vetor pACT2 mais as presas.....	124
<b>Figura 32-</b>	Gel de agarose 1%.....	125
<b>Figura 33-</b>	Gel de agarose 1% onde foram aplicados 10 $\mu$ L do produto da digestão com a enzima <i>Eco RI</i> .....	126
<b>Figura 34-</b>	Gel de agarose 1% onde foram aplicados 10 $\mu$ L do produto da PCR das mesmas colônias analisadas por digestão com a enzima <i>Eco RI</i> ...	127
<b>Figura 35-</b>	Gel SDS-PAGE 10%.....	128



<b>Figura 36-</b>	Expressão da Atx-3N e Atx-3E em Rosetta(DE3) após indução com IPTG a 30°C.....	129
<b>Figura 37-</b>	Expressão da Atx-3N após indução com IPTG a 37°C.....	129
<b>Figura 38-</b>	Expressão da Atx-3E em BL21(DE3)-pLysE (30°C e 37°C) após indução com IPTG.....	130
<b>Figura 39-</b>	Teste de solubilidade da Ataxina-3 em 30 e 37°C.....	131
<b>Figura 40-</b>	Gel SDS-PAGE 10%. Resultado da purificação da Atx-3N por afinidade em coluna Ni-NTA (Qiagen) .....	132
<b>Figura 41-</b>	Expressão de Atx-3N em BL21(DE3) a 37°C e purificação por afinidade (Talon) .....	133
<b>Figura 42-</b>	SDS-PAGE de proteína purificada por afinidade em coluna de Ni-NTA (Qiagen®).....	134
<b>Figura 43-</b>	Amostras de Atx-3N após diálise contra tampão 10 mM fosfato de sódio com 7 mM $\beta$ -Me.....	135
<b>Figura 44-</b>	Atx-3N após o uso do concentrador Amicon YM-30 (Millipore).....	135
<b>Figura 45-</b>	Espectro por CD da Atx-3N, os picos positivos obtidos a 208 e 220 nm indicam a presença de $\alpha$ -hélices na estrutura secundária.....	136
<b>Figura 46-</b>	Espectro por CD da Atx-3E, os picos positivos obtidos a 208 e 220 nm indicam a presença de $\alpha$ -hélices na estrutura secundária.....	136
<b>Figura 47-</b>	Espectro por CD a) da ataxina-3 em sua forma normal (N) e b) da ataxina-3 após liofilização e ressuspensão em D <sub>2</sub> O.....	137





## ***RESUMO***



A ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA 3) ou doença de Machado-Joseph (MJD) faz parte de um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central, caracterizadas por degeneração do cerebelo e de suas vias aferentes e eferentes.

O gene para a SCA3/MJD foi mapeado no braço longo do cromossomo 14 e foi denominado *MJD1*. A mutação é caracterizada pela expansão de trinucleotídeos CAG instáveis e o produto gênico, a proteína ataxina-3 mutante ou MJD1a, apresenta expansões do trato de poliglutamina (poliQ) próximas à região C-terminal. Evidências experimentais relacionam os mecanismos de neurodegeneração ao acúmulo da proteína ataxina-3 mutante no núcleo de neurônios levando à formação de inclusões intranucleares ubiquitina-positivas e à morte celular. Porém, a função da proteína normal permanece desconhecida.

Já que muitas funções celulares são realizadas quando as proteínas interagem umas com as outras, a caracterização de seus ligantes poderá fornecer informações importantes sobre os processos biológicos dos quais elas participam.

Assim, a identificação de interações de proteínas com a ataxina-3 juntamente com seu estudo estrutural, são o ponto de partida para análises funcionais bem como para a compreensão dos mecanismos patológicos da doença. Isto possibilitará, no futuro, a habilidade no projeto e síntese de novos catalisadores, materiais e fármacos que poderão contribuir para a eliminação da doença e/ou melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Com este objetivo, este trabalho implementou um protocolo reprodutível, robusto e confiável de expressão e purificação das formas normal e mutante da ataxina-3 humana, com isso, iniciando uma importante linha de pesquisa em nosso laboratório.





***ABSTRACT***



Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA 3) also known as Machado-Joseph disease (MJD) belongs to a heterogeneous group of neurodegenerative diseases of the central nervous system and is characterized by the degeneration of cerebellum and its afferent and efferent ways.

The SCA3/MJD gene was mapped on chromosome 14 and was named *MJD1*, the causative mutation is an instable CAG trinucleotide expansion in the gene product, the mutant ataxin-3, and polyglutamine tract is located near the C-terminus region.

Several experiments relate the ataxin-3 neurodegeneration mechanism with the formation of ubiquitin-positive neuronal intranuclear inclusions leading to cell death. However, the normal functions of the protein remain unknown.

Protein function is usually carried-out through protein interactions; therefore, the identification of protein binding substrates can give important functional information on relevant biological function and pathways.

Therefore, the identification of proteins that interact with ataxin-3 and its structural studies are important starting points for function analysis, as well as to better understand the mechanisms underlying the neurodegeneration in the disease condition. This will eventually lead to the development of compounds and drugs that could eliminate the disease or improve the patients' quality of life.

At completion of our study we were able to develop a robust and efficient protocol for expression and purification of large amounts of human ataxin-3 in its normal and expanded forms; thus starting a new line of research in our laboratory.





## ***1- INTRODUÇÃO***



## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1-Doenças de repetição de CAG

Expansões de repetições CAG, as quais codificam proteínas com tratos de poliglutamina (poliQ) expandidos, estão relacionadas a, pelo menos, nove doenças neurodegenerativas progressivas, dentre as quais estão a atrofia muscular espinho bulbar (SBMA), a doença de Huntington (HD), a atrofia dentopálidorrubrolusiana (DRPLA) e as ataxias espinocerebelares dominantes tipo 1 (SCA1), 2 (SCA2), 3 (SCA3) (ou doença de Machado-Joseph), 6 (SCA6), 7 (SCA7) e 12 (SCA12) (CHAI *et al.*, 1999; CHA, 2000; FUJIGASAKI *et al.*, 2000; SHIMOHATA *et al.*, 2000; SCHEEL, TOMIUK & HOFMANN, 2003; BURNETT, LI & PITTMAN, 2003; CHAI *et al.*, 2004).

Com exceção da SBMA, as demais são patologias predominantemente herdadas e, para cada uma, há um limiar de repetições que quando excedido leva a um fenótipo específico. Geralmente repetições acima de 35-40 CAGs são associadas a doenças, exceto para SCA6, cujo limiar é de 20 repetições (SUTHERLAND & RICHARDS, 1995; SHIMOHATA *et al.*, 2000).

Há uma correlação entre o tamanho das repetições expandidas, a dosagem gênica e a severidade do quadro clínico inversa à idade de início dos sintomas. Sugere-se que o comprimento do trato de poliQ expandido esteja ligado aos mecanismos patogênicos destas doenças (KAWAKAMI *et al.*, 1995; SUTHERLAND & RICHARDS, 1995; TAKIYAMA *et al.*, 1995; FUJIGASAKI *et al.*, 2000; SHIMOHATA *et al.*, 2000).

Geralmente o início dos sintomas ocorre aos 30-40 anos, causando perda de função e morte neuronal 10 a 20 anos após sua manifestação (ZOGHBI & ORR, *et al.*, 2000).

Em gerações sucessivas de famílias afetadas observa-se a antecipação, isto é, o início dos sintomas ocorre de forma precoce e com rápida progressão da doença em relação ao parental. A antecipação é ocasionada em consequência de uma instabilidade de transmissão das repetições de tripletos intergerações, particularmente marcada quando a transmissão é paterna (ZOGHBI & ORR, *et al.*, 2000).

As doenças de repetição de CAGs diferem clinicamente e patologicamente e embora tenham em comum os tratos de poliQ expandidos, as proteínas envolvidas não apresentam mais nenhuma homologia entre si. Em cada doença somente certas regiões do cérebro e populações de neurônios degeneram levando aos diferentes fenótipos. Esta neurodegeneração seletiva ocorre independentemente da ampla expressão das várias proteínas mutantes levando a crer que a composição única de cada proteína com tratos de poliQ expandidos deva ter um importante papel em especificar os detalhes de cada patogênese (CHAI *et al.*, 2001).

Dentro deste grupo, há uma grande variabilidade clínica e patológica, porém essa variabilidade parece ser maior na ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3) ou doença de Machado-Joseph (MJD). Devido a esta heterogeneidade, a descrição clínica de SCA3/MJD é bastante rica e complexa (RUBINSZTEIN & HAYDEN, 1998).

## **1.2- Doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelar tipo 3**

### 1.2.1- Aspectos Históricos e Epidemiológicos

A SCA3/MJD foi descrita pela primeira vez na década de 70, em três famílias americanas descendentes de imigrantes da ilha de Açores (NAKANO, DAWSON & SPENCE, 1972; WOODS & SCHAUMBURG, 1972; ROSENBERG *et al.*, 1976). Somente quando a doença foi melhor investigada na população açoreana, na qual apresenta alta prevalência, é que os pesquisadores concluíram se tratar de uma doença pleomórfica, passando a chamá-la doença de Machado-Joseph (COUTINHO & ANDRADE, 1978). Logo percebeu-se que não estava confinada aos açoreanos e seus descendentes, mas estava presente em populações de geografia e etnicidade distantes, como aborígenes australianos (BURT, BLUMBERGS & CURRIE, 1993), japoneses (SAKAI, OHTA & ISHINO, 1983) e negros (HEALTON *et al.*, 1980).

A prevalência da MJD é muito grande nos Açores, principalmente na Ilha das Flores, onde um em cada 100 habitantes é doente, um em cada 40 é portador do gene e um em cada 20 tem risco para a doença (COUTINHO, 1996).

Acredita-se que a SCA3/MJD seja a ataxia de herança dominante mais comum no Brasil (LOPES-CENDES *et al.*, 1997a; LOPES-CENDES *et al.*, 1997b) e no mundo (TAKIYAMA *et al.*, 1993; RUBINSZTEIN & HAYDEN, 1998; FUJIGASAKI *et al.*, 2000; GASPAR *et al.*, 2001).

### 1.2.2- Aspectos Clínicos

A despeito da grande variabilidade clínica, os sinais mais freqüentes são ataxia lenta e progressiva, oftalmoplegia externa progressiva, sinais piramidais e extrapiramidais e atrofia muscular distais, que surgem na meia-idade, mas podem afetar crianças ou adultos nas 4<sup>as</sup> e 5<sup>as</sup> décadas de vida. Os portadores da doença apresentam perda do equilíbrio, falta de coordenação motora geral, marcha alterada, dificuldade na deglutição, fala escandida, oftalmoplegia, perda sensitiva e de massa muscular, culminando em morte. Atualmente não existe tratamento específico ou cura (COUTINHO & ANDRADE, 1978; RUBINSZTEIN & HAYDEN, 1998; FUJIGASAKI *et al.*, 2000).

### 1.2.3- Aspectos Moleculares

O *locus* do gene *MJD1* foi mapeado no braço longo do cromossomo 14q32.1 (TAKIYAMA *et al.*, 1993). Seu produto gênico, a proteína ataxina-3 (Atx-3), quando mutada apresenta, próximo à porção C-terminal, os tratos de poliQ expandidos (TAKIYAMA *et al.*, 1993; RUBINSZTEIN & HAYDEN, 1998; FUJIGASAKI *et al.*, 2000; SHIMOHATA *et al.*, 2000). O número de repetições de CAGs é altamente pleomórfico, em indivíduos não acometidos variando de 12 a 40; já em pacientes com MJD a expansão atinge entre 55 a 84 tripletos.

A Atx-3 apresenta massa molecular de, aproximadamente, 42 kDa e é a menor proteína envolvida nas doenças por expansão de tratos de poliQ (KAWAGUCHI *et al.*, 1994).

Suas funções fisiológicas ainda não estão esclarecidas. Sabe-se que sua forma normal está presente tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, enquanto que a mutada, se localiza predominantemente no núcleo dos neurônios de pacientes com MJD formando inclusões nucleares (NIIs). Essa localização é mediada por sinais de localização nuclear (NLS) na proteína (FUJIGASAKI *et al.*, 2000; SHIMOHATA *et al.*, 2000).

Embora a expressão do gene associado à doença ocorra em uma grande variedade de tecidos, a degeneração atinge apenas populações específicas de neurônios que são vulneráveis na presença das NIIs e sofrem apoptose (ALBRECHT *et al.*, 2004).

A importância do acúmulo de proteínas mutantes no núcleo foi demonstrada pela observação de que camundongos transgênicos expressando ataxina-1 expandida com o domínio NLS mutado não desenvolveram ataxia e que a adição de sinais de exportação nuclear (NES) em uma huntingtina mutante suprimiu a formação de (NIIs) e a apoptose (SHIMOHATA *et al.*, 2000).

As NIIs apresentam-se como marcadores do processo de patogênese, independente de serem estruturas tóxicas ou não. Apesar de seu papel, sabe-se que o acúmulo nuclear da ataxina-3 mutante é essencial para sua citotoxicidade (CHAI *et al.*, 2001).

Não obstante muita pesquisa estar sendo desenvolvida, pouco se sabe sobre a função específica da Atx-3 e, principalmente, sobre as causas da disfunção neuronal e morte celular provocadas pela proteína mutante (CHOU *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2005; MAO *et al.*, 2005; NICASTRO *et al.*, 2005; NICASTRO *et al.*, 2006).

Já que muitas funções celulares são realizadas quando as proteínas interagem umas com as outras, a caracterização de seus ligantes juntamente com a análise da estrutura da ataxina-3 tem sido o alvo de pesquisas que visam a obtenção de informações sobre os processos biológicos e patogênicos envolvidos (ALBRECHT *et al.*, 2004; NICASTRO *et al.*, 2005; ZHONG & PITTMAN, 2006).

Estudos de bioinformática combinaram a análise da seqüência da Atx-3 com dados do genoma funcional de organismos modelo levando a uma predição da sua função biológica e classificando-a como pertencente ao grupo das cisteínas-proteases com atividade contra cadeias ubiquitinadas ou substratos relacionados (DONALDSON *et al.*, 2003; SCHEEL, TOMIUK, HOFMANN, 2003).

A ubiquitina (Ub) é uma proteína de 85 kDa presente em todas as células eucarióticas e possui um importante papel na marcação de proteínas para a destruição (DONALDSON *et al.*, 2003).

Outros estudos também reforçam uma função para a Atx-3 na via proteolítica dependente de ubiquitina (via proteassoma-ubiquitina) já que ela possui um domínio para interação com a ubiquitina, próximo ao domínio de poliglutamina, que a liga a proteínas poliubiquitinadas, (BURNETT, LI, PITTMAN, 2003; DONALDSON *et al.*, 2003; DOSS-PEPE *et al.*, 2003; CHAI *et al.*, 2004).

DOSS-PEPE *et al.* (2003) citaram a associação da ataxina-3 a fatores de ligação do proteassoma RAD23 e à proteína que contém valosina (VCP).

MICHALIK & BROECKHOVEN (2003) acreditam que as inclusões nucleares atuem sequestrando componentes do proteassoma e outras proteínas incluindo chaperonas moleculares e em vários modelos experimentais poderiam atuar como supressores efetivos de toxicidade (OPAL & ZOGHBI, 2002).

Alguns trabalhos sugerem que a Atx-3 regula negativamente a expressão de genes, talvez pela inibição de histonas acetiltransferases, embora não haja evidências diretas que ela atue como fator ou cofator de transcrição (CHAI *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2002).

ZHONG & PITTMAN (2006) sugeriram que uma função da Atx-3 normal seria regular os níveis de substratos de degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) já que, ao transfectarem células com Atx-3 normal, os níveis celulares de substratos ERAD aumentaram; porém, os níveis de substratos não degradados pelo retículo endoplasmático (ER) não foram alterados. Esta hipótese é reforçada já que a Atx-3 liga-se a VCP/p97, que é uma proteína responsável pela extração de substratos ERAD do ER.

Em 2003, MASINO *et al.* relataram a arquitetura do domínio da ataxina-3 e demonstraram que esta consiste de um domínio globular N-terminal com significativo conteúdo de  $\alpha$ -hélice que abrange o motivo *Josephin* e uma cauda C-terminal flexível contendo até três UIMs (motivo de interação com a ubiquitina), além do fragmento poliQ. Os autores ainda evidenciaram que o domínio *Josephin* é uma região funcional importante da Atx-3 que atua tanto nas funções da proteína normal quanto da proteína mutada.

Foi prevista uma provável função deste domínio por bioinformática, onde se sugere que o domínio *Josephin* apresenta um enovelamento tipo cisteína (Cys) protease e, desse modo, seria a região responsável pela atividade da Ub protease na proteína íntegra (SCHEEL, TOMIUK & HOFMANN, 2003). Recentemente, o domínio *Josephin* também foi implicado no desenovelamento da ataxina-3 e, desse modo, na patologia de SCA3 (MASINO *et al.*, 2004). NICASTRO *et al.* (2005) resolveram a estrutura do domínio *Josephin* pelo uso de técnicas de RMN e afirmam que apesar da baixa homologia de seqüência ( $\leq 16\%$ ), este domínio pertence à superfamília das papains de proteases cisteínicas, com a tríade catalítica Cys, His e Asn em um sítio ativo estruturalmente conservado. Desse modo, sua estrutura sugere regiões potencialmente importantes para interações proteína-proteína e especificidade por substrato.

Em um importante estudo foram observadas duas proteínas homólogas humanas da proteína de fungo RAD23 relacionada ao reparo de DNA, HHR23A e HHR23B que interagem com a ataxina-3 tanto normal quanto mutante, na região N-terminal que não contém os tratos de poliQ, sugerindo que esta associação estaria relacionada com a função normal da ataxina-3 (WANG *et al.*, 2000).

Algumas proteínas que interagem com tratos de poliQ expandidos têm sido identificadas nas doenças de Huntington, DRPLA e Ataxia-1. As proteínas que interagem com a huntingtina: *huntingtin-associated* (HAP1), *huntingtin-interacting* (HIP1) e SH3GL3 que contém um domínio SH3; as proteínas que interagem com a atrofina-1: IRSp53, uma homóloga humana da proteína do receptor de insulina tirosina quinase e as *atrophin-1-interacting proteins* (AIPs) que contêm um domínio WW; a proteína nuclear cerebelar ácida rica em leucina (LAMP) que interage com a ataxina-1, confirmando que as proteínas que se ligam aos tratos de poliQ são específicas em cada doença (WANG *et al.*, 2000).

Um resumo de artigo publicado em chinês (SHEN *et al*, 2005) descreveu 5 interações com a porção C-terminal da Atx-3, três proteínas já identificadas: “human rhodopsin guanosine diphosphate dissociation inhibitor alpha”, “small ubiquitin-like modifier 1”, e “human neuronal amiloride-sensitive cation channel 2” e duas proteínas desconhecidas.

Algumas interações apoiam a possibilidade de que proteínas com repetições de glutaminas poderiam afetar o funcionamento celular via alteração da expressão normal de genes, através de uma associação ou redistribuição intracelular anormais e/ou seqüestro de fatores de transcrição cruciais (CHA, 2000).

Assim, a identificação de interações de proteínas com a ataxina-3, juntamente com seu estudo estrutural, são o ponto de partida para análises funcionais bem como a compreensão dos mecanismos patológicos da doença, podendo contribuir, no futuro, para a habilidade no projeto e síntese de novos materiais e fármacos, eliminação da doença e/ou melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

### **1.3- Sistema de Duplo-Híbrido**

O sistema duplo-híbrido de expressão em levedura tem sido usado para investigação da função de novas proteínas e está entre os métodos mais poderosos para “screening” de genes que são funcionais em vários sistemas e processos fisiológicos e para determinação de interação gênica (BARTEL & FIELDS, 1997; PANDEY & MANN, 2000).

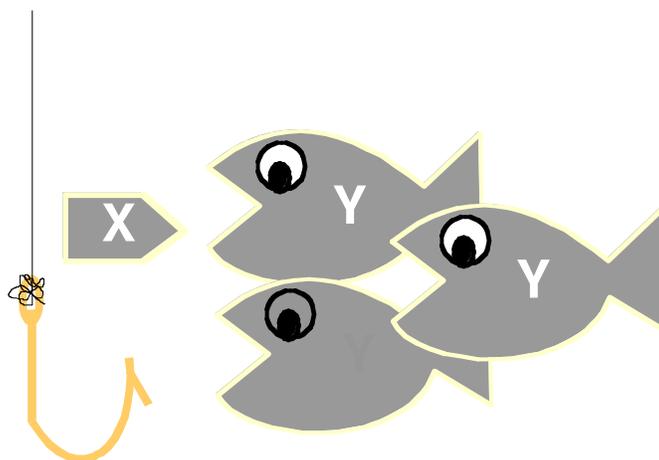
O modelo do sistema de duplo híbrido foi desenvolvido por FIELDS & SONG (1989) para a detecção de interações proteína-proteína específicas *in vivo*. Este sistema permite a identificação de genes que codificam proteínas que interagem com uma proteína alvo, mas pode, além disso, ser usado para definir domínios ou resíduos de aminoácidos que estão envolvidos, ou são necessários para a interação.

A tecnologia deste método explora o fato de vários ativadores de transcrição serem modulares, com dois domínios funcionais fisicamente separáveis: o domínio de ligação ao DNA (DBD) que se liga a uma seqüência promotora específica e o domínio de ativação (AD) que se liga aos componentes do complexo de transcrição basal. Ambos são necessários para que ocorra a transcrição.

O DBD se liga a uma seqüência promotora específica, que se situa na região controladora de um ou mais genes repórter. O AD recruta os componentes críticos do complexo de iniciação de transcrição (CHIEN *et al.*, 1991).

O sistema emprega duas proteínas híbridas: o gene que codifica uma proteína conhecida é fusionado ao DBD de um vetor isca (“bait”) na mesma matriz de leitura do domínio de ligação ao DNA; separadamente, para o “screening” de possíveis proteínas ligantes à proteína isca, um segundo gene, ou biblioteca de cDNA, codificando as proteínas que potencialmente serão identificadas é clonado adjacente ao domínio de ativação da transcrição em um vetor presa (“prey”) (Fig.1).

Se uma das proteínas desconhecidas interagir com a conhecida, isto trará o domínio de ativação sobre o domínio de ligação ao DNA, tornando funcional o fator de transcrição pela formação do duplo-híbrido. Assim, a transcrição dos genes repórter que estão sob seu controle será ativada (FIELDS & SONG, 1989; CHIEN *et al.*, 1991; VIDAL *et al.*, 1996; BARTEL & FIELDS, 1997; ARONHEIM, 2000; PANDEY & MANN, 2000; UETZ *et al.*, 2000; MACDONALD, 2001).



**Figura 1-** No sistema de duplo-híbrido a proteína conhecida é chamada de isca (X); a proteína que interage com ela e faz com que a transcrição dos genes reporter seja ativada é a presa (Y)

#### **1.4- Estudos Estruturais de Proteínas**

A clonagem, expressão e purificação de proteínas é um passo essencial para o estudo de seu enovelamento, estabilidade e estrutura.

Após a purificação, podem ser realizadas desnaturações por meio de temperatura e de desnaturantes químicos para observar a estabilidade das proteínas e de seus domínios. A caracterização da conformação dessas proteínas é feita principalmente por espectroscopia ótica: dicroísmo circular (CD), fluorescência e absorvância. Dependendo do resultado obtido, podem ser empregadas técnicas para estudar a cinética de enovelamento tais como calorimetria e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Para medidas de tamanho e forma são feitos os estudos das estruturas por difração de raios-X e por cristalografia, permitindo o conhecimento da estrutura dos materiais a nível atômico, independentemente do seu estado físico e de sua origem e das relações entre essa estrutura e suas propriedades (RUI, 2005).

#### 1.4.1- Purificação de Proteínas

O processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas e depende de suas características físico-químicas e de suas propriedades biológicas (RUI, 2005).

Os primeiros passos de uma purificação geralmente são aqueles que possuem um menor poder de resolução, porém que permitem o tratamento de grande quantidade de material, como: diálise, precipitação de proteínas por sais, etanol etc. Outros métodos de purificação são chamados métodos cromatográficos (RUI, 2005; CHOW *et al.*, 2006).

A cromatografia em coluna é um dos métodos mais comuns de purificação de proteínas (CHOW *et al.*, 2006).

Esta técnica consiste na passagem da proteína através de uma coluna preenchida com um material (fase estacionária) que é desenhada para reter ou diminuir a velocidade da passagem da fase móvel onde estão as macromoléculas (proteínas). Baseando-se numa propriedade particular, como tamanho, carga ou afinidade química. A solução a analisar deve conter a proteína concentrada e o método deve ser rápido para evitar a degradação da mesma, devendo, no entanto, utilizar-se inibidores de proteases (CHOW *et al.*, 2006).

A cromatografia é essencialmente um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais estacionária e outra móvel através da primeira. A separação ocorre como resultado de processos repetidos de adsorção e desorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária, e a separação é devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra. A distinção entre os principais métodos cromatográficos é feita em termos das propriedades da fase móvel (CASTANHO).

A cromatografia por afinidade empregando metais foi desenvolvida por PORATH *et al.* (1975) que apresentaram uma técnica para separação e purificação de proteínas baseada na afinidade das proteínas por metais de transição. Esta técnica foi denominada cromatografia de afinidade com metal imobilizado, do inglês, Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) (KARMALI).

O princípio fundamental do IMAC consiste na interação entre proteínas em solução e íons metálicos imobilizados num suporte sólido. Estes suportes contendo íons de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$  são adequados para o fracionamento de proteínas com base no seu conteúdo relativo de resíduos de histidina, cisteína, cadeias laterais aromáticas de aminoácidos e de grupos N-terminal acessíveis de aminoácidos. Estes resíduos devem estar disponíveis à superfície das proteínas com vista à formação de interações com esses metais de transição. Assim, esta técnica permite não só a purificação de proteínas com base na presença destes resíduos como também uma análise estrutural topológica detalhada das proteínas (KARMALI).

O princípio do IMAC baseia-se no fato de que os metais de transição ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ ) podem coordenar alguns aminoácidos como a histidina, cisteína e triptofano, através dos grupos doadores de elétrons nas cadeias laterais desses aminoácidos. A utilização destas interações para fins cromatográficos requer que o íon metálico seja imobilizado num suporte insolúvel. Esta imobilização pode ser efetuada ligando um grupo quelante à matriz cromatográfica. Existem vários agentes quelantes usados no IMAC sendo o ácido iminodiacético (IDA) o mais utilizado. Este composto pode ser acoplado a várias matrizes cromatográficas como Sepharose 6B, Sepharose 4B ou Sephadex G-100 através de um longo braço espaçador hidrófilo. O braço espaçador assegura que o quelante do metal esteja totalmente acessível para todos os centros de ligação disponíveis numa proteína (KARMALI).

A afinidade aparente de uma proteína para um metal quelado depende fortemente do íon metálico envolvido na coordenação. A retenção de uma proteína nos diferentes metais está de acordo com a afinidade do metal pelo Imidazol. Assim, quer a retenção de proteínas quer as constantes de estabilidade dos complexos com Imidazol obedecem à seguinte ordem:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \sim \text{Co}^{2+}$  (ARNOLD, 1991; KARMALI).

#### 1.4.2– Dicroísmo Circular (CD)

Para a caracterização da natureza e das propriedades da estrutura de proteínas pode ser utilizada uma combinação de métodos, dentre estes, o Dicroísmo Circular (CD), auxilia na elucidação da estrutura secundária destas (GALES *et al.*, 2005).

É um método espectroscópico que depende da absorção diferencial de luz polarizada circular à direita e à esquerda de moléculas opticamente ativas (GREENFIELD, 2004; MILES & WALLACE *et al.*, 2006).

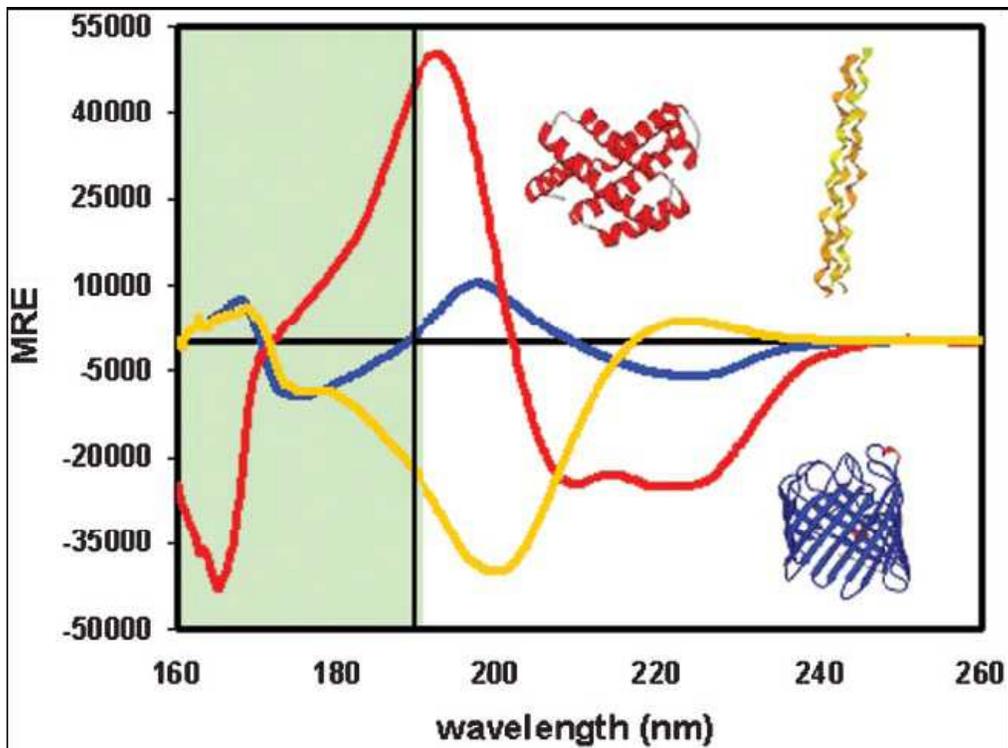
A forma do espectro de CD de uma proteína específica depende do conteúdo de sua estrutura secundária e permite que as proporções de alfa hélices, folhas beta, alças (turns) e estruturas randômicas sejam determinadas (Fig. 2).

Estudos dos sinais característicos de diferentes estruturas secundárias nos espectros de CD de proteínas possibilitaram classificá-las em 5 classes segundo LEVITT & CHOTHIA (1976): 1) principalmente alfa-hélices; 2) principalmente folhas beta-pregueadas; 3) alfa + beta (regiões alfa e beta separadas); 4) alfa/beta (regiões com alfa e beta misturadas) e 5) randômica (predominantemente desordenada).

As principais vantagens dessa técnica são a ampla gama de condições de soluções e temperaturas que podem ser exploradas, a rapidez na realização das medidas, o fato de somente pequenas quantidades de amostra serem requeridas bem como o de não haver restrições quanto à massa molar da proteína em estudo e a não necessidade de cristais (ITO, 2004; MILES & WALLACE *et al.*, 2006).

O CD também pode ser utilizado para fornecer informações sobre interações de proteínas, seu enovelamento e denaturação, sua estabilidade além da detecção de formação de complexos macromoleculares (MILES & WALLACE *et al.*, 2006).

Mesmo não informando sobre as posições dos átomos na macromolécula, o CD permite a observação da ocorrência de mudanças na conformação da proteína e, em caso positivo, a correlação com as características do meio circundante. Permite a observação de que se mudanças de temperatura, de pH ou a presença de outras moléculas no solvente são capazes de modificar a estrutura da proteína (ITO, 2004).



comprimento de onda (nm)

**Figura 2-** Diversidade nas características dos espectros de diferentes tipos de estruturas secundárias: um espectro de CD da maioria das proteínas alfa hélice em vermelho, a maioria das proteínas de folhas beta em azul e uma hélice poliprolina (colágeno) em amarelo. Figura adaptada de MILES & WALLACE, 2006. MRE: elipticidade molar residual





## ***2- OBJETIVOS***



- 2.1-** Investigar pela técnica de duplo-híbrido em levedura a interação da Atx-3 com proteínas humanas;
- 2.2-** Realizar o estudo espectroscópico de Dicroísmo Circular das Atx-3 normal e mutante;
- 2.3-** Clonar, expressar e purificar a proteína Atx-3 normal e mutante para realização de estudos funcionais e estruturais.





### ***3- MATERIAL E MÉTODOS***



### 3.1- Plasmídeos Utilizados

1. **pGEM<sup>®</sup>-T Easy**: plasmídeo comercial de clonagem (Promega<sup>®</sup>). A inserção de um fragmento leva à inativação do  $\alpha$ -peptídeo permitindo que os clones recombinantes sejam identificados diretamente pela coloração branca e os não recombinantes pela coloração azul (Fig. 3). Os cDNAs inseridos neste vetor podem ser seqüenciados pelos oligonucleotídeos de seu *polylinker* T7 e SP6 (Tab. 1).
2. **pBTM116 Kan**: plasmídeo de expressão em levedura (Clontech<sup>®</sup>) gentilmente fornecido pelo Dr. Jörg Kobarg (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas- SP).

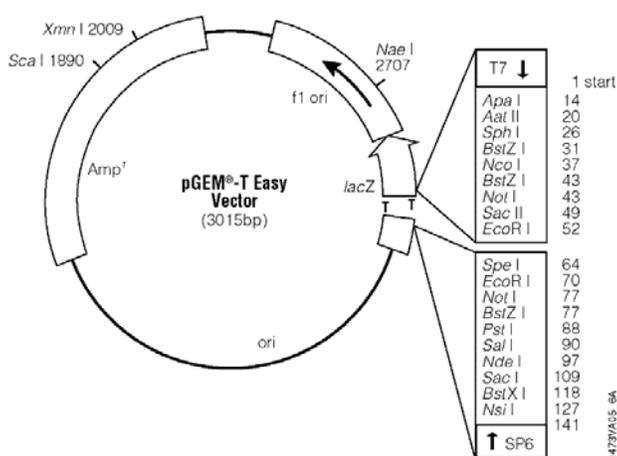
Este vetor foi construído por Bartel e Fields e é constituído pelos seguintes componentes: (1) o gene *TRP1*, um marcador de seleção para a levedura; (2) a seqüência codificante completa da proteína LexA (1-202), que está sob o controle do promotor de levedura ADH1 e que possui um sítio múltiplo de clonagem “downstream” para inserção dos genes de interesse na mesma matriz de leitura (Fig. 4); (3) uma origem de replicação para a levedura 2 $\mu$ ; (4) uma origem de replicação bacteriana; (5) o gene  $\beta$ -lactamase, um marcador de seleção para *Escherichia coli* (Fig. 5).

O pBTM116 utilizado contém o gene de resistência à canamicina para propagação em *E. coli* no lugar do de resistência à ampicilina. Em levedura, complementa a via metabólica para a biossíntese de triptofano (W). Os cDNAs inseridos neste vetor podem ser seqüenciados pelos oligonucleotídeos pBTM-S e pBTM-AS (Tab.1).

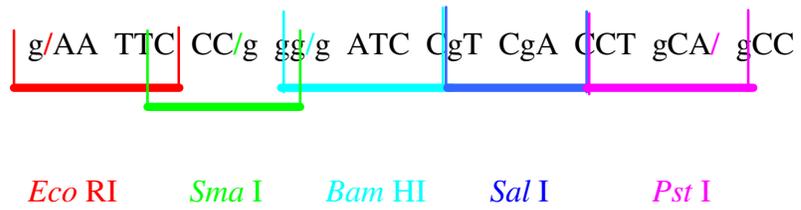
3. **pET28a(+)**: plasmídeo de expressão comercial (Novagen<sup>®</sup>) de 5369 pares de bases (pb). Contém na região N-terminal uma cauda de histidina que também pode estar presente na região C-terminal (Fig. 6). O cDNA pode ser inserido sob o controle do promotor T7 que é induzível por IPTG. Foi utilizado para transformar a *E. coli* BL21 (DE3). Como resultado, a proteína recombinante possui um sítio de clivagem por trombina na sua parte N-terminal seguida por uma seqüência que codifica consecutivamente seis resíduos de histidinas,

utilizadas para a purificação. Este plasmídeo possui um gene que confere resistência da bactéria ao antibiótico canamicina (RUI, 2005). Os cDNAs inseridos neste vetor podem ser seqüenciados pelos oligonucleotídeos pET-S e pET-AS (Tab.1).

4. **pACT2:** plasmídeo de expressão em levedura (Clontech®) contendo a biblioteca de cérebro fetal humana (Clontech®) gentilmente cedido pelo Dr. Jörg Kobarg (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas-SP). O pACT2 é derivado do pACT e contém um único sítio para *Eco* RI e para *Xho* I no “polylinker”. A proteína híbrida é expressa em altos níveis nas células da levedura hospedeira para o promotor constitutivo ADH1 (*P*); a transcrição termina no sítio de terminação da transcrição do ADH1 (*T*). O pACT2 é um vetor que replica autonomamente tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae* e carrega o gene *bla*, que confere resistência a ampicilina em *E. coli*. Também contém o gene nutricional *LEU2* que permite o crescimento de levedura auxotrófica em meio sintético limitante (Fig. 7). Os cDNAs inseridos nestes vetores, proveniente de uma biblioteca, podem ser seqüenciados pelos oligonucleotídeos Gal4 e ScrAmp-AS (Tab. 1).



**Figura 3-** Desenho esquemático do plasmídeo pGEM®-T Easy. Vetor utilizado na clonagem das ataxinas-3 normal e mutante e dos domínios funcionais

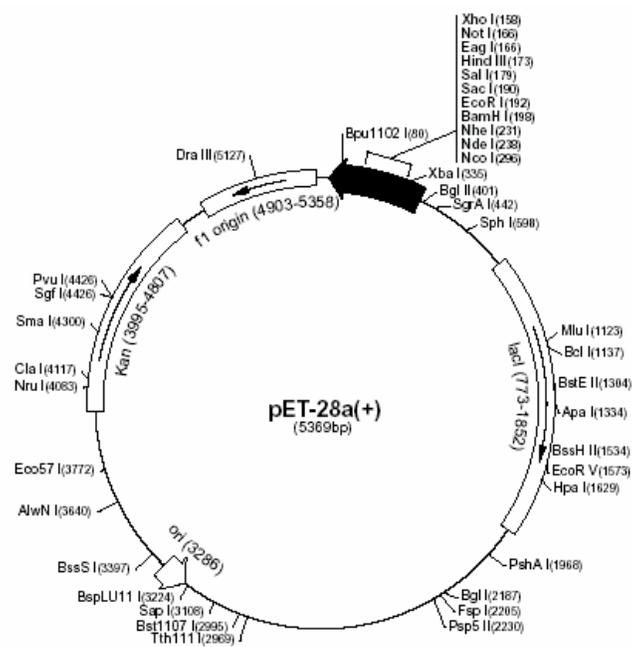


**Figura 4-** Seqüência do sítio múltiplo de clonagem (“polylinker”) do plasmídeo pBTM116 para a construção de proteínas de fusão Atx-3-LexA-DBD na mesma matriz de leitura relativa ao LexA



**Tabela 1-** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento da Atx-3 nos vetores (RUI, 2005)

Oligonucleotídeo	Sequência
pBTM-S	AACAACGTCGACCTGCGGAGCTCAGTTACAGCTTG
pBTM-AS	CAACCTGCAGCCTCAGTAAATATCTGTTAAGGA
pET-S	TAATACGACTCACTATAGGG
pET-AS	GCTAGTTATTGCTCGGCGG
Gal4	TACCACTACAATGGATG
ScrpAmp-AS	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG



**Figura 6-** Desenho esquemático do plasmídeo pET-28a(+). Vetor utilizado para a expressão de proteínas



A expressão de *HIS3* e *lacZ* é controlada, respectivamente, pelos promotores *HIS3* e *GAL1* fundidos ao sítios de ligação ao LexA multimerizados. A expressão de *HIS3* permite o crescimento da levedura na ausência de histidina, enquanto que a expressão da atividade do gene repórter *lacZ* pode ser detectada pela atividade da  $\beta$ -galactosidase.

### 3.3- A Biblioteca de cDNA de Cérebro Fetal Humano

A biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano foi gentilmente cedida pelo Dr. Jörg Kobarg (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas SP), tendo sido adquirida da Clontech<sup>®</sup> ( Cat.n<sup>o</sup> HL4028AH). Os cDNAs provenientes deste tecido foram inseridos no vetor pACT2 em fusão com o gene que codifica o domínio de ativação da proteína GAL4 de levedura. O uso de uma biblioteca oriunda de tecido em fase embrionária é recomendado já que as células estão em plena atividade metabólica. Muitos dos genes quiescentes no tecido “maduro” são ativos na fase embrionária (RUI, 2005).

### 3.4- Extração de RNA Total de Sangue Periférico

Foram coletados em tubos com EDTA cerca de 20 mL de sangue venoso de um paciente com SCA3/MJD e de um indivíduo normal para a doença.

Cada amostra foi diluída em solução de NaCl 0,9% na proporção de 1:1 (4 mL de sangue para 4 mL de solução NaCl 0,9%). A um tubo estéril de 15 mL contendo 6,0 mL de Ficoll-Paque<sup>Tm</sup> Plus (Amersham Bioscience<sup>®</sup>) foram adicionados os 8,0 mL da mistura anterior. O Ficoll-Paque é um polímero que separa o sangue em 4 fases: 1-hemácias, 2-FICOLL, 3- leucócitos e 4-plasma, sendo a última a fase de menor densidade. No processo de transferência do sangue diluído para o tubo contendo Ficoll-Paque<sup>Tm</sup> tomou-se o cuidado para que ambos não se misturassem. Cada tubo foi, então, centrifugado a 400 x g por 30 minutos a 18 °C, em rotor tipo “swinging bucket”. A camada de leucócitos foi coletada com auxílio de pipeta *Pasteur* e as células transferidas para novo tubo estéril de 15 mL. A seguir completou-se o volume para 14 mL com solução NaCl 0,9% e nova centrifugação foi realizada a 100 x g por 10 minutos a 18 °C.

Em seguida o sobrenadante foi descartado e o as células foram ressuspensas em 1 mL de Trizol (GibcoBRL) e homogeneizadas por agitação. O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina.

O conteúdo foi, então, transferido para tubo estéril de 1,5 mL onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio seguindo com agitação por 15 segundos. Cada tubo foi, então, incubado por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico, seguido de agitação e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C foi realizada, e o sobrenadante descartado. O RNA total foi lavado em 1 mL de etanol 75% e foi feita nova centrifugação por 5 minutos a 7500 x g a 4 °C. Após a completa secagem à temperatura ambiente, esse precipitado foi ressuspensado em 10 µL de água DEPC 0,01% (água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato) e incubado por 10 minutos a 55 °C para inativação de RNases.

A amostra foi, então, submetida 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 0,01% durante 12 horas para a eliminação de RNases. O gel e as soluções também foram preparados com água DEPC 0,01% em vidraria previamente tratada por aquecimento a 180 °C.

### **3.5- Transcrição em cDNA**

O cDNA foi sintetizado com o emprego do *ReverAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas®). O RNA (até 5,0 µg) foi incubado com 0,5 µg de oligo (dT) e água para um volume de 12 µL a 70 °C por 5 minutos e, então, resfriado em gelo. A seguir foi adicionada ao RNA/primer uma mistura de 1x Reaction Buffer (Tris-HCl 250 mM pH 8.3; KCl 250 mM; MgCl<sub>2</sub> 20 mM; DTT 50 mM), 20 unidades de Inibidor de ribonuclease e 1 mM de dNTPs. A mistura foi incubada a 37 °C por 5 minutos,

então 200 unidades de *Revertaid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* foram adicionadas. A amostra foi incubada a 42 °C por 60 minutos e a enzima inativada por aquecimento a 70 °C por 10 minutos.

### 3.6- Amplificação das Regiões de Interesse

#### 3.6.1- Oligonucleotídeos e Enzimas de Restrição

Para a amplificação dos cDNAs da Atx-3 normal e da mutante foram sintetizados oligonucleotídeos “primers” específicos para as extremidades da CDS da Atx-3 depositada no banco de dados **GenBank** AB050194 (Fig. 8).

Os oligonucleotídeos utilizados no duplo-híbrido foram desenhados com sítio de restrição para a enzima *Sal I* e um “overhang” na extremidade e foram denominados Atx-3-S e Atx-3-AS (Tab. 2).

Para os estudos funcionais foram sintetizados oligonucleotídeos que amplificavam o cDNA tanto da Atx-3 inteira (denominados F1 e R1) bem como de seus domínios funcionais (UIM e poliQ) inserindo-se sítios de restrição específicos (Tab.2).

Os domínios funcionais e seus tamanhos podem ser visualizados na tabela 3 e figura 9.

Para amplificação dos cDNAs da região de poliglutamina (poliQ) das Atx-3 normal e mutante foram desenhados “primers” (PoliQ-S e PoliQ-AS) flanqueando apenas a região de poliQ mais cerca de 10aa “upstream” e 10aa “dowstream” (Tab.2).

1 ATG GAG TCC ATC TTC CAC GAG AAA CAG CCT TCT GGA AAT ATG GAT  
46 GAC AGT GGT TTT TTC TCT ATT CAG GTT ATA AGC AAT GCC TTG AAA  
91 GTT TGG GGT TTA GAA CTA ATC CTG TTC AAC AGT CCA GAG TAT CAG  
136 AGG CTC AGG ATC GAT CCT ATA AAT GAA AGA TCA TTT ATA TGC AAT  
181 TAT AAG GAA CAC TGG TTT ACA GTT AGA AAA TTA GGA AAA CAG TGG  
226 TTT AAC TTG AAT TCT CTC TTG ACG GGT CCA GAA TTA ATA TCA GAT  
271 ACA TAT CTT GCA CTT TTC TTG GCT CAA TTA CAA CAG GAA GGT TAT  
316 TCT ATA TTT GTC GTT AAG GGT GAT CTG CCA GAT TGC GAA GCT GAC  
361 CAA CTC CTG CAG ATG ATT AGG GTC CAA CAG ATG CAT CGA CCA AAA  
406 CTT ATT GGA GAA GAA TTA GCA CAA CTA AAA GAG CAA AGA GTC CAT  
451 AAA ACA GAC CTG GAA CGA GTG TTA GAA GCA AAT GAT GGC TCA GGA  
496 ATG TTA GAC GAA GAT GAG GAG GAT TTG CAG AGG GCT CTG GCA CTA  
541 AGT CGC CAA GAA ATT GAC ATG GAA GAT GAG GAA GCA GAT CTC CGC  
586 AGG GCT ATT CAG CTA AGT ATG CAA GGT AGT TCC AGA AAC ATA TCT  
631 CAA GAT ATG ACA CAG ACA TCA GGT ACA AAT CTT ACT TCA GAA GAG  
676 CTT CGG AAG AGA CGA GAA GCC TAC TTT GAA AAA CAG CAG CAA AAG  
721 CAG CAA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG GGG GAC CTA TCA GGA  
766 CAG AG T TCA CAT CCA TGT GAA AGG CCA GCC ACC AGT TCA GGA GCA  
811 CTT GGG AGT GAT CTA GGT GAT GCT ATG AGT GAA GAA GAC ATG CTT  
856 CAG GCA GCT GTG ACC ATG TCT TTA GAA ACT GTC AGA AAT GAT TTG  
901 AAA ACA GAA GGA AAA AAA TAA 921

**Figura 8-** Seqüência codificante da ataxina-3 depositada no banco de dados **GenBank**  
AB050194

**Tabela 2-** Seqüência dos “primers” utilizados para amplificação das Ataxinas-3 normal e mutante e seus fragmentos. Os grifos em amarelo correspondem a seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição

Nome	Enzima de restrição	Seqüência
Atx-3-S	<i>Sal I</i>	5' GAC <b>GTCGAC</b> ACATGGAGTCCAT 3'
Atx3-AS	<i>Sal I</i>	5' GGG <b>GTCGAC</b> TTATTTTTTTTCC TTC 3'
<b>F1</b>	<i>Nde I</i>	5'- <b>CATATG</b> GAGTCCATCTTCCACGAG -3'
<b>R1</b>	<i>Bam HI</i>	5'- <b>GGATCC</b> TTATTTTTTTCCTTCTGTTTTCAAATC -3'
ATX-3Q`F	<i>Nde I</i>	5'- <b>CATATG</b> CGAGAAGCCTACTTTGAAAAAC -3'
<b>ATX-3Q`R</b>	<i>Bam HI</i>	5'- <b>GGATCC</b> TTATTTTTTCAAAGTAGGCTTCTC -3'
<b>PoliQ-S</b>	<i>Eco RI</i>	5' AAA <b>GAATTC</b> ATGCGGAAGAGACG 3'
<b>PoliQ-AS</b>	<i>Sal I</i>	5' TTT <b>GTCGAC</b> TTATGGATGTGAACTCTGT 3'
<b>PRIMERS PARA FRAGMENTAR A ATX-3 (sítios de UIM)</b>		
<b>UIM1F</b>	<i>Nde I</i>	5'- GCC <b>CAT ATG</b> GAA GAT TGA GGA GGA -3'
<b>UIM1R</b>	<i>Bam HI</i>	5'- <b>GGA TCC</b> CAT GTC AAT TTC TTG GCG -3'
<b>UIM2F</b>	<i>Nde I</i>	5'- GGC <b>CAT ATG</b> GAT GAG GAA GCA GAT CTC -3'
<b>UIM2R</b>	<i>Bam HI</i>	5'- <b>GGA TCC</b> TCT GGA ACT ACC TTG CAT -3'
<b>UIM3F</b>	<i>Nde I</i>	5'- <b>CAT ATG</b> AGT GAA GAA GAC <u>ATG</u> CTT CAG
<b>UIM3R</b>	<i>Bam HI</i>	5'- <b>GGA TCC</b> ATC ATT TCT GAC TGT TTC TAA

MESIFHEKQEGSLCAQHCLNLLQGEYFSPVELSSIAHQLDDEEERMMAEGGVTSEDYRTFLQQP SGNMDDSG  
 FFSIQVISNALKVWGLELILFNSPEYQRLRIDP INERSFICNYKEHWFTVRKLGKQWFNLNSLLTGPELISDT  
 YLALFLAQLQQEGYSIFVVKGDLPDCEADQLLQMI R VQOMHRPKLIGEELAQLKEQRVHKTDLERVLEANDGS  
 GMLD **EDEEDLQRALALSRQEIDME** **DEEADLRRAIQLSMOGSSRN** ISQDMTQTSGNTLTSEELRKRREAYFEKQ  
 QQQQQQQQQQQQGDLSGQSSHP CERPATSSGALGSDLGDAM **SEEDMLQAAVTMSLETVRND** LKTEGKK

**F1**

**1** - **ATGGAGTCCATCTTCCACGAG** AAACAAGAAGGCTCACTTTGTGCTCAACATTGCCTGAATAACTTATTGCAAG  
 GAGAATATTTTAGCCCTGTGGAATTATCCTCAATTGCACATCAGCTGGATGAGGAGGAGAGGATGAGAATGGC  
 AGAAGGAGGAGTTACTAGTGAAGATTATCGCACGTTTTTACAGCAGCCTT **- 196 (Josephin)**  
 CTGGAATATGGATGACAGTGGTTTTTCTCTATT CAGGTTATAAGCAATGCCTTGAAAGTTGGGGTTTAGA  
 ACTAATCCTGTTCAACAGTCCAGAGTATCAGAGGCTCAGGATCGATCCTATAAATGAAAGATCATT TATATGC  
 AATTATAAGGAACACTGGTTTACAGTTAGAAAATTAGGAAAACAGTGGTTTAACTTGAATTCTCTCTTGACGG  
 GTCCAGAATTAATATCAGATACATATCTTGCACTTTTCTTGGCTCAATTACAACAGGAAGGTTATTCTATATT  
 TGTCGTTAAGGGTGATCTGCCAGATTGCGAAGCTGACCAACTCCTGCAGATGATTAGGGTCCAACAGATGCAT  
 CGACCAAACTTATTGGAGAAGAATTAGCACAATAAAAGAGCAAAGAGTCCATAAAACAGACCTGGAACGAG  
 TGTTAGAAGCAAAT **GATGGCTCAGGAATGTTAGAC** **-669 (Frag1 R)**  
**(UIM-1)**  
**670**- **GAAGATGAGGAGGATTTGCA** GAGGGCTCTGGCTACTAAGT **CGCCAAGAAATTGACATGGAA** **-729**  
**(UIM-2)**  
**730**- **GATGAGGAAGCAGATCTCCGC** AGGGCTATT CAGCTAAGT **TATGCAAGGTAGTTCCAGAAAC** **-789**  
**790**- ATATCTCAAGATATGACACAGACATCAGGTACAAATCTTACTTCAGAAGAGCTT **CGGAAGAGA**  
**PoliQ-S**  
**CGAGAAGCCTACTTTGAAAAA** **-873 (ATX-3Q<sup>-</sup> R)**  
**874**- **CAGCAGCAA** AAG **CAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG** **-915** **poliQ**  
**PoliQ-AS**  
 GGGGACCTATCAGG **ACAGAGTTCACATCCAT** GTGAAAGGCCAGCCACCAGTTCAGGAGCACTTGGGAGTGATC  
 TAGGTGATGCTATG **UIM-3**  
**1003** - **AGTGAAGAAGACATGCTTCAG** GCAGCTGTGACCATGTCT **TTAGAAACTGTCAGAAATGAT** -  
**1062** **TTGAAAAACAGAAGGAAAAAATAA** **-1086**

**R1**

**Figura 9-** Sequência de aminoácidos e do cDNA da proteína Atx-3 com a localização dos “primers” desenhados para amplificação dos domínios funcionais. Os nucleotídeos grafados em azul correspondem à região da *Josephin*

**Tabela 3-** Diversos fragmentos da Atx-3 e seus tamanhos

	“Primers”	Fragmento (pb)	Posição na seq.
1	F1 + Frag1 R( <i>Bam</i> HI)	669	1-669
2	F1 + UIM1 R	729	1-729
3	F1 + UIM2 R	789	1-789
4	F1 + ATX-3Q` R	873	1-873
5	UIM1 F + ATX-3Q` R	204	670-873
6	PoliQ	126	844-946
7	UIM2 F + R1	357	730-1086
8	ATX-3Q` F + R1	213	874-1086

### 3.6.2 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Os sistemas de reação consistiram de 1,0 µL de cDNA (até 10 ng), 0,5 µL da Taq DNA polimerase (Biotools<sup>®</sup>), 2,0 µL da mistura de dNTPs (1,25 mM), 1,5 do tampão de reação (10X) com MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µL (10mM) dos “primers” sense e antisense (específicos para cada ensaio) e água deionizada para um volume final de 15 µL.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Perkin-Elmer<sup>®</sup> modelo Gene Amp PCR System 9700). As condições foram otimizadas especificamente para a amplificação de cada seqüência de interesse.

### 3.7- Ligação dos Fragmentos de DNA

Para a ligação dos fragmentos em pGEM-T Easy preparou-se uma solução composta de cerca de 100ng do vetor, o inserto a ser ligado (3x a concentração molar do vetor), 5 µL do tampão 2X da ligase (Promega<sup>®</sup>) e 1,0 µL da T4 DNA ligase (Promega<sup>®</sup>, 3U/µL). Esta solução foi mantida a 16 °C por 12-16 horas e em seguida foi estocada a 4 °C.

### 3.8- Transformação Bacteriana

As células competentes armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas em gelo. Foram adicionados a estas cerca de  $10\text{ }\mu\text{L}$  da reação de ligação. A mistura permaneceu em gelo por 30 minutos, em seguida foi levada à temperatura de  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um minuto e 30 segundos e novamente levada a gelo por 1 minuto. Em seguida adicionaram-se de 400 a  $800\text{ }\mu\text{L}$  de meio SOC sendo a cultura levada à agitação de 200 rpm a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Cerca de  $200\text{ }\mu\text{L}$  foram plaqueados em placas LB-ágar mais o antibiótico apropriado [ampicilina ( $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) e X-Gal para transformações com pGEM-T Easy]. As placas foram deixadas em incubadora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12-18 horas.

### 3.9- Extração de DNA Plasmidial (Mini-Prep)

Os plasmídeos recombinantes foram obtidos por mini-prep utilizando o kit *UltraClean™ Mini Plasmid Prep* (MoBio<sup>®</sup>), onde colônias transformantes foram inoculadas em 3 mL de LB contendo o antibiótico adequado ( $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  de ampicilina para transformações com pGEM-T Easy) e mantidas sob agitação de 200 rpm durante 12-16 horas. Seguiu-se protocolo sugerido pelo fabricante. Após as extrações plasmidiais, estes foram analisados em gel de agarose para verificação da presença do inserto, o que foi feito através da comparação do tamanho dos clones com uma massa molar.

Foram feitas culturas permanentes das colônias usadas para as mini-preps misturando  $500\text{ }\mu\text{L}$  da cultura a  $500\text{ }\mu\text{L}$  de glicerol 50%; em seguida as culturas foram estocadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.10- Preparação para o Duplo-Híbrido

#### 3.10.1- Digestão do DNA com Enzima de Restrição

O plasmídeo pGEM-T easy contendo o inserto de interesse, foi clivado pela enzima de restrição *Sal I* (Fermentas<sup>®</sup>). O sistema de digestão consistiu de  $8,0\text{ }\mu\text{L}$  de plasmídeo ( $500\text{ ng}/\mu\text{L}$ ),  $2,5\text{ }\mu\text{L}$  de tampão da enzima (Buffer O<sup>+</sup>) e  $0,4\text{ }\mu\text{L}$  de *Sal I* ( $10\text{U}/\mu\text{L}$ ) para um volume final de  $25\text{ }\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. A

inativação da enzima foi feita a 65 °C por 20 minutos. Em seguida foi feita a purificação da banda de interesse em gel de agarose com *QIAquick Extraction Gel Kit* (QIAGEN®), de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante.

### 3.10.2- Digestão do Plasmídeo pBTM116

Foi feita digestão do vetor de expressão PBTM116 com *Sal I* utilizando 6,0 µL da mini-preparação do vetor (1µg), 2,0 µL de tampão da enzima e 2,0 µL de *Sal I*, para um volume final de 20 µL. A reação foi feita por duas horas a 37 °C.

### 3.10.3- Defosforilação do plasmídeo pBTM116

Foi feita a defosforilação do plasmídeo pBTM116 para evitar o reanelamento desta após a digestão. A reação consistiu de 10 µL do vetor digerido, 4,0 µL do tampão OPA (Amershan®), 0,5 µL de fosfatase alcalina para um volume final de 20 µL. A reação foi mantida por 3 minutos a 37 °C. Em seguida a fosfatase alcalina foi inativada a 65 °C por 30 minutos.

### 3.10.4- Clonagem da Atx-3 em pBTM116

Para a ligação dos insertos digeridos em pBTM116 preparou-se uma solução composta de 1,5 µL do vetor, 7,5 µL do inserto a ser ligado 3,0 µL do tampão 5X da ligase (Invitrogen®) que foi levada a 45 °C por 5 minutos e em seguida resfriada em gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 1,5 µL da T4 DNA ligase (Invitrogen 1U/µL). Esta solução foi mantida a 16 °C por 12-16 horas e, em seguida, estocada a 4 °C. Foi feita nova transformação por choque térmico e as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e 50 µg/mL de canamicina. As reações de mini-prep foram feitas como descrito anteriormente.

### 3.10.5- Sequenciamento do cDNA da Atx-3

Três clones selecionados foram analisados em sequenciador automático da Applied Biosystems® - Modelo ABI 3100 no LNLS.

A reação de sequenciamento consistiu na mistura, 6,0 µL de Save \$\$, 2,0 µL de Big Dye, 1,0 µL de DNA, 1,0 µL de cada “primer” (5 µmol/µL) para um volume final de 20 µL, utilizando o seguinte programa: 35 ciclos repetitivos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 10 segundos, 60 °C por quatro minutos como o sugerido pela Applied Biosystems®.

### 3.10.6- Transformação da *Saccharomyces cerevisiae* L40 com pBTM116/Atx-3

Preparou-se o meio de cultura para levedura YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose). Foram transferidos 200 µL de uma cultura L40 estacionária fresca para um tubo de 1,5 mL que foi centrifugado a 5000 rpm por três minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspendido em 200 µL de tampão de transformação (40% PEG 3350; acetato de lítio 0,2 M; TE 1X; DTT 0,1M). Em seguida foram adicionados 50 µg de SS carrier DNA (solução a 10 mg/µL incubada a 95 °C por 10 minutos e resfriada em banho de gelo antes do uso). Acrescentaram-se de 2-5 µg do pBTM116/Atx-3 e a mistura foi incubada a 45 °C por 30 minutos e então plaqueada em meio seletivo SD- triptofano (SD- W). A seleção em levedura é geralmente nutricional e o vetor pBTM116 contém o gene *TRP* que confere prototrofia à célula de L40 auxotrófica para triptofano. As placas foram incubadas a 30 °C por três dias.

### 3.10.7- Testes de Auto-ativação pela Isca

A pesquisa da auto-ativação pela isca anteriormente aos ensaios de duplo-híbrido é de fundamental importância já que a expressão dos genes repórter só deve ocorrer como consequência da interação do sistema isca/presa. Assim para descartar falsos

positivos foram feitos testes para expressão dos genes *lacZ* e *HIS3* previamente à transformação da levedura com o vetor presa pACT2 ligado à biblioteca.

#### 3.10.7.1- Ensaio com X-gal

Selecionados os transformantes em meio SD-W, realizou-se o ensaio em X-gal para confirmar a não existência de auto-ativação do gene *lacZ* pela isca Atx-3. Para tal, os clones 3 e 6 de L40 contendo o vetor pBTM116/Atx-3 foram repicados em meio SD- W e as placas incubadas a 30 °C por três dias.

Um filtro de papel Whatman nº 5 estéril com diâmetro pouco inferior ao da placa foi embebido em cerca de 5 mL de solução tampão Z/ X-gal. A solução consistiu de 100 mL do tampão Z (16.1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 5.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 0.75 g KCl; 0.246 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O pH 7,0), 0,27 mL de β- mercaptoethanol e X-gal ( X-gal diluída em N, N-dimetilformamida à concentração de 20 mg/mL).

Simultaneamente, um filtro de papel seco foi posto sobre a superfície da placa e submetido a leve pressão para que ocorresse neste a adesão das colônias.

Em seguida o filtro foi retirado com uma pinça e transferido para nitrogênio líquido por 10 segundos. Após o filtro estar completamente congelado ele foi degelado à temperatura ambiente. Cuidadosamente os dois filtros foram postos em contato e incubados à temperatura ambiente, sendo observados por oito horas. Foi investigada, durante este período, a presença de coloração azul que indicaria a degradação do X-gal do meio como consequência da expressão de *lacZ*.

#### 3.10.7.2- Ensaio em Meio sem Histidina

Semelhantemente à pesquisa da ativação do gene *lacZ*, foi analisada a habilidade da levedura crescer em meio sem histidina devido à auto-ativação do gene *HIS3* pela isca Atx-3.

Foram preparadas placas com os meios SD sem triptofano que serviram de controle uma vez que continham o aminoácido histidina para permitir o crescimento das células L40; placas SD sem triptofano e histidina (SD- W, his) e placas SD- W, his com 5 mM de 3-aminotriazole e SD- W, his com 10mM de 3-aminotriazole (3- AT). Nestas placas foram plaqueadas colônias L40 transformadas com o vetor isca pBTM116/Atx-3. O crescimento em meio SD- W, his não deveria ocorrer já que a levedura L40 é auxotrófica para histidina. O 3-AT é um inibidor que compete com a proteína de levedura *HIS3*, e foi utilizado para inibir baixos níveis da expressão de His3p o que pode ocorrer por alguns genes reporter.

Foram feitos também testes em placas semelhantes aplicando-se 50 µL de diluições de 1:100, 1:1000 e 1: 10.000 obtidas a partir de colônias que cresceram por três dias a 30 °C em meio líquido SD- W. Todos os testes foram feitos em triplicata.

#### 3.10.8- Amplificação da Biblioteca de cDNA de Cérebro Fetal Humano

Foi feita a amplificação do vetor pACT2 contendo a biblioteca de cérebro fetal humano (Clontech®) para a obtenção de quantidades suficientes (100 a 500 µg) para o “screening” de  $1 \times 10^6$  células pelo sistema de duplo-híbrido.

Uma alíquota de 50 µL de células BNN-132 transformadas com o vetor pACT2 foi diluída em 15 mL de meio LB o qual foi agitado em vortex vigorosamente. Em seguida foram aplicados 500 µL das células em 28 placas (150 mm-15) contendo o meio LB-Ágar com ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 20 horas. Adicionaram-se 5,0 mL de LB + 25% glicerol em cada placa e as colônias foram raspadas e coletadas em um frasco estéril e, então, misturadas com bastão de vidro.

Este conteúdo foi dividido em alíquotas de 50 mL e armazenado a -80 °C.

### 3.10.9- Extração de DNA Plasmidial em Larga Escala (Maxiprep)

A mistura contendo a biblioteca foi descongelada em banho de gelo e, então, centrifugada a 6000 x g por 15 minutos a 4 °C.

A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com o manual dos kits *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega®) na primeira maxiprep realizada e *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen®) na segunda maxiprep feita.

### 3.10.10- Ensaio de Duplo-Híbrido de Expressão em Levedura

#### 3.10.10.1- Transformação Seqüencial de L40 com pACT2

Várias colônias L40-pBTM116/Atx-3 foram inoculadas em 1,0 mL de meio de cultura líquido SD–W e homogeneizadas vigorosamente em vórtex e, então, transferidas para 150 mL do mesmo meio de cultura. Foram mantidas em agitação de 250 rpm a 30 °C por cerca de 20 horas. Em seguida o meio foi centrifugado a 3.200 rpm a 20-21 °C por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em 1,0 L de meio de cultura SD –W. As células foram, então, incubadas a 30 °C até que atingissem a densidade óptica de  $0,5 \pm 0,1$  o que levou cerca de 5 horas. Depois de atingida esta densidade, a suspensão foi aliqüotada em frascos de 500 mL e centrifugada a 3000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 mL de TE 1X (pH 7,5). A solução foi centrifugada nas mesmas condições e o sobrenadante novamente descartado. Os precipitados foram ressuspensionados em 8,0 mL da solução 1X TE/LiAc (0,80 mL de TE 10X pH 7,5 + 0,80 mL de LiAc 10X pH 7,5 + água para completar 8,0 mL). Em seguida foram preparados 60 mL da solução PEG/LiAc (48 mL de PEG (3350 Sigma) 50%; 6,0 mL de TE 10X pH 7,5; 6,0 mL de LiAc 10X pH 7,5) sendo divididos em 2 tubos Falcon® de 50 mL. A cada um dos 2 tubos com a solução adicionou-se 4,0 mL das células ressuspensionadas, 20 µg do vetor presa pACT2 com a biblioteca e 100 µL de DNA carreador (fervido previamente por 30 minutos e resfriado e mantido em gelo) [salmon sperm DNA 20 mg (Invitrogen®)]. A solução foi homogeneizada em vórtex e, então, incubada a 30 °C por 30

minutos sob agitação de 200 rpm. Fez-se, então, um tratamento de choque a 42 °C por 15 minutos seguido de 2 minutos no gelo. A solução foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos e o sedimento ressuspendido em 10 mL de TE (1X pH 7,5). As células foram plaqueadas em 40 placas de 150 mm de diâmetro com meio SD –W, leu, his e a algumas adicionaram-se 5,0 mM de 3-aminotriazol. Foram feitas placas para controle da eficiência em meio SD –W, leu com diluições de 1:10, 1:100 e 1: 1000. Para o controle de autoativação do gene da histidina pela isca foram plaqueadas colônias sem a biblioteca em meio SD- W, his e para o controle da qualidade da isca foram feitas placas em meio SD- W

Paralelamente fez-se a transformação de leveduras L40 crescidas em meio YPD (segundo já descrito anteriormente) com o vetor pBTM116/Atx-3 que foram plaqueadas em meio SD- W e com o vetor pBTM116/Rack + pACT2 Amp/Ki plaqueadas em seguida em meio SD- W, leu para controle dos reagentes da transformação.

#### 3.10.10.2- Seleção dos Clones

Os clones obtidos na transformação da levedura foram selecionados em placas SD – W, leu, his. As colônias selecionadas expressaram ambos os plasmídeos pela ativação dos genes *lacZ* e *HIS3*. Transformantes +W, leu, his foram observados entre quarto e o sétimo dia após a transformação (GIETZ *et al.*, 1997).

Colônias que apareceram depois deste dia foram consideradas falsos-positivos.

#### 3.10.10.3- Ensaio para Determinação da Ativação do Gene Repórter *HIS 3*

##### 3.10.10.3.1- Teste de Pingos

As colônias obtidas em meio sólido SD – W, leu, his foram recuperadas em 20 µL de meio SD- W, leu líquido e foram pingadas em placas SD- W, leu, his contendo 10 mM de 3-AT para verificação da capacidade de crescimento.

### 3.10.10.4- Ensaio para Determinação da Ativação do Gene Repórter lacZ

#### 3.10.10.4.1- Metabolização de X-gal

As colônias selecionadas foram repicadas em meio SD- W, leu e após dois dias de crescimento foram transferidas para papel de filtro. Este foi mergulhado 3 vezes em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) para a lise das células, e em seguida foi posto sobre papel de filtro embebido com a solução *Z buffer*/ X-Gal. Deixou-se na estufa por vinte e quatro horas. Neste tempo as células que expressaram β- galactosidase apresentaram cor azul.

#### 3.10.11- Extração de DNA Plasmidial de Leveduras (Mini-prep de Leveduras)

As colônias selecionadas que apresentaram crescimento em meio SD- W, leu, his com 10 mM de 3-AT foram submetidas à extração de seus DNAs plasmidiais. Inocularam-se colônias em 0,5 mL de meio líquido SD –leu +W e homogeneizou-se vigorosamente em vórtex e, em seguida, transferiu-se para 3,0 mL do mesmo meio para que “perdessem” o vetor isca selecionado pelo triptofano, e mantivessem apenas o vetor presa pACT2 com a biblioteca. A incubação se deu por 2 dias a 30 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida, cerca de 1,0 mL de cultura foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em cerca 50 µL de cultura do meio residual e adicionaram-se 10 µL de liticase (5-10 U/ µL em TE). A solução foi incubada a 37 °C por uma hora sob agitação de 250 rpm. Foram então adicionados 10 µL de SDS 20% e as células foram congeladas e descongeladas quatro vezes em N<sub>2</sub> líquido. O volume foi elevado adicionando-se 200 µL de TE (1X pH 7,0) e 200 µL de solução 25 fenol: 24 clorofórmio:1 álcool isoamílico. A mistura foi homogeneizada em vórtex vigorosamente por 5 minutos e, então, centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo contendo 600 µL de etanol absoluto e 10 µL de LiCl (8M). A amostra foi incubada por 30 minutos a –80 °C e, então, centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 200 µL de etanol 70%. Fez-se nova centrifugação por 2 minutos a 14000 rpm. O precipitado foi mantido à temperatura ambiente para secagem e, então, ressuspensionado em 10 µL de água.

As extrações de plasmídeo de levedura costumam resultar em uma baixa quantidade de DNA devido à parede celular da levedura, o baixo número de cópias e o tamanho maior do vetor. Em geral o DNA plasmidial geralmente está contaminado com o genômico já que a levedura contém 3 vezes mais DNA genômico que a bactéria. Assim a quantidade utilizada para a transformação em *E. coli* deve ser a máxima possível.

#### 3.10.12- Transformação de *E. coli* com Vetor Presa

Células competentes DH5 $\alpha$  armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas em gelo. Adicionaram-se a estas os 9,0  $\mu\text{L}$  das mini-preps de levedura. A mistura permaneceu em gelo por 20 minutos em seguida foi levada a temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$  por um minuto e 30 segundos e novamente levada a gelo por um minuto. Foram adicionados de 1,0 mL de meio LB sendo a cultura levada a agitação de 200 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Cerca de 200  $\mu\text{L}$  foram plaqueados em placas LB-ágar com o antibiótico ampicilina. As placas foram deixadas em incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12-18 horas.

#### 3.10.13- Mini-prep de *E. coli*

As extrações dos plasmídeos pACT2 contendo as iscas foram realizadas utilizando o kit Wisard da Promega<sup>®</sup>.

As colônias transformantes foram inoculadas em 3 mL de LB contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e mantidas sob agitação de 200 rpm durante 12-16 horas. Seguiu-se protocolo sugerido pelo fabricante. Após extrações plasmidiais, estes foram analisados em gel de agarose.

#### 3.10.14- Digestão das Mini-preps com *Eco* RI/*Xho*

O plasmídeo pACT2 contendo os insertos ligantes foi clivado pelas enzimas de restrição *Eco* RI e *Xho* (Fermentas<sup>®</sup>). O sistema de digestão consistiu de 1,0 µL de plasmídeo (500 ng/µL), 10 µL do tampão universal 2x Y + /Tango™ (Fermentas<sup>®</sup>), 1,0 µL de cada enzima para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas.

Os insertos de cDNA ligados à biblioteca apresentam de 0,5 a 4,0 Kb de tamanho sendo a média de 2,0 Kb.

### 3.11- Estudos Funcionais da Atx-3

Com o intuito de potencializar a pesquisa brasileira na área de Biologia Molecular estrutural, a FAPESP em parceria com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), lançou o Programa Genoma Estrutural - SMOLBnet, visando estudar proteínas funcionalmente através da determinação de suas estruturas tridimensionais.

Como as ataxias espinocerebelares (SCAs) são doenças neurodegenerativas para as quais não há cura e cujas proteínas envolvidas ainda não têm função esclarecida, é de grande interesse incluí-las neste estudo.

Assim, como parte da pesquisa deste grupo do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica-FCM-UNICAMP, este projeto teve como objetivo a expressão, purificação e análise da estrutura secundária da Atx-3, sob supervisão da pós-doutoranda Maria Cristina Cabral Garcia que, concomitantemente, realizou os ensaios de SAXS, RMN e cristalização da mesma.

### 3.11.1- Digestão dos Insetos

Os plasmídeos recombinantes pGEM-T Easy/ Atx-3 normal e mutante foram purificados com *Miniprep Plasmid DNA Kit* (QIAGEN®) e digeridos com as enzimas de restrição específicas *Nde* I e *Bam* HI por 2 h a 37°C.

Para a verificação da presença de insetos estes foram seqüenciados utilizando os “primers” do *polylinker* do vetor T7 e SP6.

Confirmadas as seqüências, o fragmento digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/V) e purificado com *QIAquick Extraction Gel Kit* (QIAGEN®) para ligação no vetor de expressão pET28a+ (Novagen®), previamente digerido com as mesmas enzimas.

### 3. 11.2- Clonagem no Vetor de Expressão pET28a(+)

O inserto digerido foi clonado no vetor de expressão pET28a(+) (Novagen®) misturando 200 ng de inserto digerido, 50 ng de vetor, tampão de ligação 1x (Gibco®), 1µL de T4 DNA ligase (Gibco®) e 4 µL de água deionizada. A mistura foi incubada a 16 °C por 16 horas.

O volume total do produto de ligação foi usado para a transformação das bactérias competentes *Escherichia coli* BL21 (DE3), específica para expressar proteínas.

### 3.11.3- Transformação de BL21 (DE3)

Foram feitos dois tipos de transformação: a por choque térmico, já descrita anteriormente e a transformação com PEG, descrita a baixo.

O procedimento de transformação iniciou-se adicionando 80 µL de tampão de transformação (KCM 1x; PEG-6000 10% w/v) ao produto de ligação em gelo. Em seguida essa mistura foi adicionada às células competentes e incubada em gelo por 30 minutos, seguindo por nova incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Então foram

acrescentados 800 µL de meio LB, prosseguido por incubação por 50 minutos a 37 °C. Por último, as células foram centrifugadas a 11000 x g por 3 minutos e parte do sobrenadante descartado (~500 µL). As células foram então ressuspensas ao sobrenadante restante e plaqueadas em placas de petri contendo meio LB-ágar e 50 µg/mL de canamicina.

As colônias de bactérias transformadas foram selecionadas e foi feita mini-prep com o *Miniprep Plasmid DNA Kit* (QIAGEN®) a qual foi visualizada em gel de agarose a 0,8%, para a seleção daquela que continha inserto. Em seguida foram iniciados os testes de expressão.

#### 3.11.4- Testes de Expressão

As bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28+ contendo a seqüência do cDNA da Atx-3 foram pré-inoculadas em 3,0 mL de meio de cultura LB líquido contendo o antibiótico canamicina na concentração final de 50 µg/mL, sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Em seguida 1000 µL de cada pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio LB líquido mais antibiótico canamicina (50 µg/mL) contidos em erlenmeyers de 250 mL e inoculados a 37 °C, sob agitação constante de 250 rpm, até que fosse atingida pela cultura a absorvância (OD) de 0,6 em 600 nm de comprimento de onda. Atingida a OD o inóculo para a expressão da Atx-3N foi mantido a 37 °C e o da Atx-3E a 30 °C. Neste momento retirou-se dos inóculos de cada temperatura uma alíquota de 1,0 mL da cultura de bactérias, que foi centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspendido em 40 µL de água ultrapura autoclavada e foi adicionado 20 µL de tampão de amostra 2x (125mM Tris-HCl pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 20 %; β-ME 10%) e a amostra aquecida a 95 °C por 5 minutos e centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos. Essa amostra foi mantida em “freezer” e utilizada posteriormente na eletroforese como “não induzida”.

Ao restante das amostras, na fase logarítmica de crescimento bacteriano, acrescentou-se o indutor de síntese proteica IPTG a uma concentração final de 0,4 mM para “induzir” a expressão da Atx-3. Então foram retiradas alíquotas de 1 mL de cultura após 1,

2, e 3 horas de indução. Cada alíquota foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos e as células lisadas por incubação a 95 °C por 5 minutos com 40 µL de água ultrapura e 20 µL de tampão de amostra 2x.

As proteínas totais foram analisadas em gel SDS-PAGE 10% (SAMBROOK et al., 1989).

Foram também feitas transformações com o uso das cepas C41(DE3), C43(DE3), Rosetta(DE3), BL21(DE3)-pLysS, BL21-CodonPlus(DE3)-RP, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, foi seguindo o mesmo protocolo e alterado apenas o antibiótico específico para cada linhagem.

Para comparação, também foram expressas a Atx-3N e a Atx-3E transformadas com as cepas BL21(DE3) e BL21(DE3)-pLysS, respectivamente.

#### 3.11.5- Teste de Solubilidade

Para o teste de solubilidade foram crescidos 2,0 mL de cultura a 30 °C e 37°C “overnight” e repetiu-se o procedimento de indução por IPTG descrito anteriormente em ambas as culturas. Após indução por 3 horas as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm, por 15 min. a 4 °C), ressuspensas em 1,5 mL de tampão de lise TS-20 (20 mM Tris pH 7,5; 0,3 M NaCl; 0.068 g de Imidazol) e acrescidos de 40 µL de lisozima com incubação no gelo por 30 min. sendo em seguida submetidas ao ultrassom (aproximadamente 8 pulsos de 30 s a uma potência de 40 W). A suspensão foi centrifugada (14.000 rpm; 15 min. a 4 °C) e as frações do sobrenadante (S = fração solúvel) e “pellet” (P = fração insolúvel) analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sistema SDS-PAGE (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.11.6- Purificação da Atx-3 Normal e Mutante

A purificação das proteínas expressas foi feita com a cromatografia por afinidade.

O precipitado foi descongelado em gelo e ressuspendido cuidadosamente em 10 mL do tampão (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 100 mM;  $\beta$ -Me 7 mM; PMSF 1 mM). Em seguida foi adicionada lisozima (80-100  $\mu$ g/mL) e o material incubado em gelo por 30 minutos.

A solução foi levada ao Sonicador (cerca de 20 pulsos de 20 s com intervalos entre os pulsos de 1 min.) e centrifugada a 12.000 x g por 30 min. a 4 °C. Ao sobrenadante ou Extrato Total (ET) foi adicionada a resina (contendo níquel ou cobalto) e foram incubados por 60 min. a 4 °C. A solução foi vertida na coluna e deixada em repouso. Em seguida retirou-se uma pequena amostra do ET e após a passagem pela resina coletou-se o filtrado (FT).

Foi feita a primeira lavagem com 20 mL de tampão (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM;  $\beta$ -Me 7 mM) sem Imidazol. A segunda lavagem foi feita com 20 mL do mesmo tampão acrescentado de 15 mM de Imidazol (150  $\mu$ L 1 M). Foi feita a coleta total em ambos os casos

Após as lavagens a proteína foi eluída com 10 mL do mesmo tampão contendo 30 mM de Imidazol (300  $\mu$ L 1M) e em seguida com 10 mL de tampão com 50 mM de Imidazol (500 $\mu$ L 1M).

Na eluição foram coletadas alíquotas a cada 2 mL (5 frações) em cada caso. Em seguida, a coluna foi lavada novamente com 20 mL do mesmo tampão com 150 mM Imidazol (1,5 mL 1M) e depois 250 mM (2,5 mL 1M) (coleta total em cada caso), para retirada de toda proteína da resina.

A amostra foi visualizada em gel SDS- PAGE (10%) e as melhores frações da eluição foram dialisadas.

### 3.11.7- Diálise

Foram feitas diálises (membrana Spectrum<sup>®</sup>, mwco= 3500) para retirada do Imidazol e do tampão das frações de proteína que se apresentaram adequadas após a purificação. A proteína foi dialisada contra tampão (Tris 20mM pH 7,5; β-Me 7 mM; com ou sem glicerol 5%) ou tampão (Fosfato de Sódio 50mM; NaCl 100mM; β-Me 7mM) ON e em seguida foi coletada, quantificada com espectrofotômetro (Beckman-Coulter<sup>®</sup>), concentrada em concentrador Amicon YM-30 (Millipore<sup>®</sup>), novamente quantificada e analisada por CD (Dicroísmo Circular).

### 3.11.8- Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro JASCO J-810 (JASCO), à temperatura controlada de 24 °C por sistema Peltier.

Os espectros de dicroísmo circular no UV foram adquiridos utilizando uma cubeta de quartzo (Hellma) de 1 e 10 mm de caminho ótico e a concentração das amostras foi de 2-4 μM. O espectro final foi corrigido com a subtração do espectro de dicroísmo circular do tampão correspondente.

A decomposição do espectro foi realizada combinando os métodos CONTIN, SELCON e CDSSTR. Os dados gerados com a subtração dos espectros foram convertidos em elipticidade residual molar  $[\Theta]$ , dada pela equação:

$$[\Theta] = (\Theta / 10) \times l \times c \times n$$

onde  $\Theta$  é a elipticidade observada (graus),  $l$  é o caminho ótico em centímetros (cm),  $c$  é a concentração molar (M) e  $n$  é o número de aminoácidos da proteína.

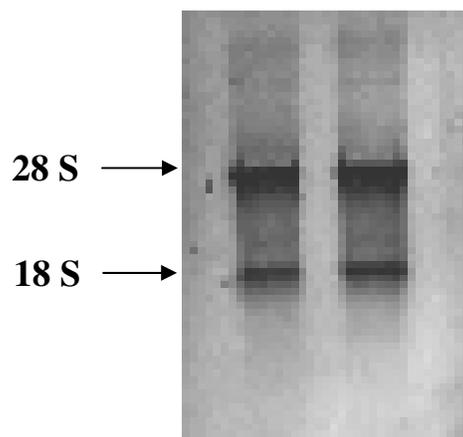


## ***4- RESULTADOS***

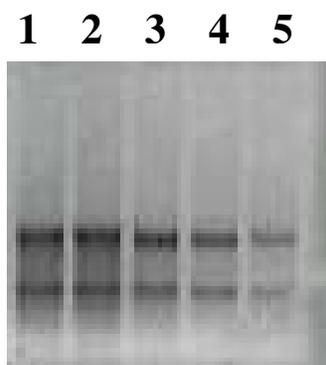


#### 4.1- Extração de RNA

Foram obtidos os RNAs totais de um indivíduo controle normal e de um paciente com a SCA3/MJD (Figs. 10 e 11).



**Figura 10-** Gel de Agarose 1%. Subunidades 28 S e 18 S do RNA total extraído de um indivíduo normal para MJD



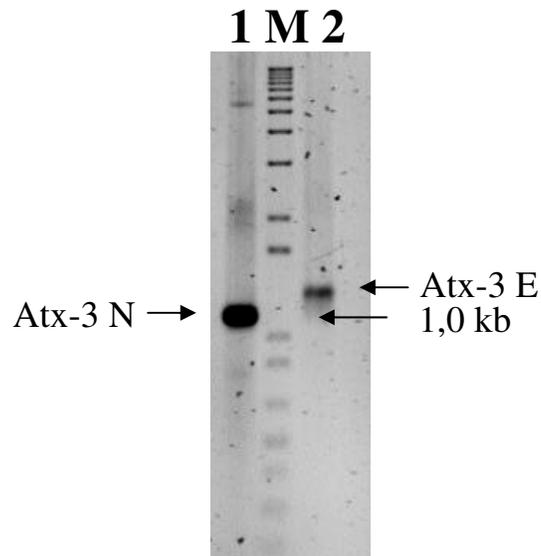
**Figura 11-** Gel de agarose 1%. Em 1-3 subunidades 28 S e 18 S do RNA total extraído de um paciente com MJD. Em 4 e 5 controles normais para a doença

## 4.2- Amplificação da Atx-3 e de seus Domínios

### 4.2.1- Amplicon da Atx-3 para Fusão em pBTM116

Para o sistema de duplo-híbrido de expressão em levedura, a seqüência do cDNA que codifica as Atx-3 completas normal e mutante foram amplificadas com “primers” contendo sítios específicos para enzima de restrição *Sal* I. A escolha da seqüência de reconhecimento e clivagem desta enzima para ambos os “primers” foi feita baseada no programa 'Webcutter 2.0', através do qual se observou que das enzimas do sítio múltiplo de clonagem do pBTM116 apenas *Sma* I, *Bam* HI e *Sal* I não cortavam a seqüência codificante da Atx-3. Optou-se pelo uso da enzima *Sal* I para clivagem das duas extremidades através de análise utilizando-se o programa “Gene Runner”.

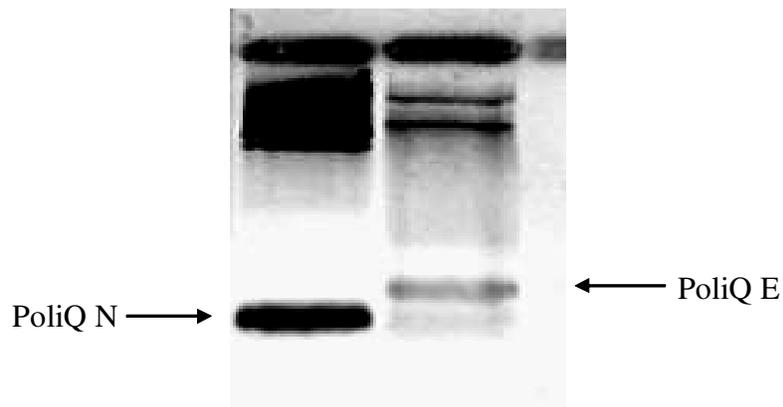
Como o número de repetições de CAG em indivíduos não acometidos é altamente pleomórfico variando de 12 a 40, o tamanho do gene para a Atx-3 apresenta um valor aproximado de cerca 1,0 kb. Já em pacientes com MJD o número de repetições de glutaminas pode variar de 55 a 84 sendo, que o amplicon da seqüência apresenta um tamanho ligeiramente maior (Fig. 12).



**Figura 12-** Gel de agarose 1%. **1:** Amplicon da Atx-3 normal (Atx-3N); **M:** Marcador de massa molecular 1,0 kb plus (Gibco®); **2:** Amplicon do alelo expandido da Atx-3 expandida (Atx-3E) purificado. A intensidade mais fraca da banda expandida se deve ao fato dos pacientes serem heterozigotos para este gene.

#### 4.2.2- Amplicon dos Tratos de PoliQ Normal (poliQ N) e PoliQ Expandida (poliQ E)

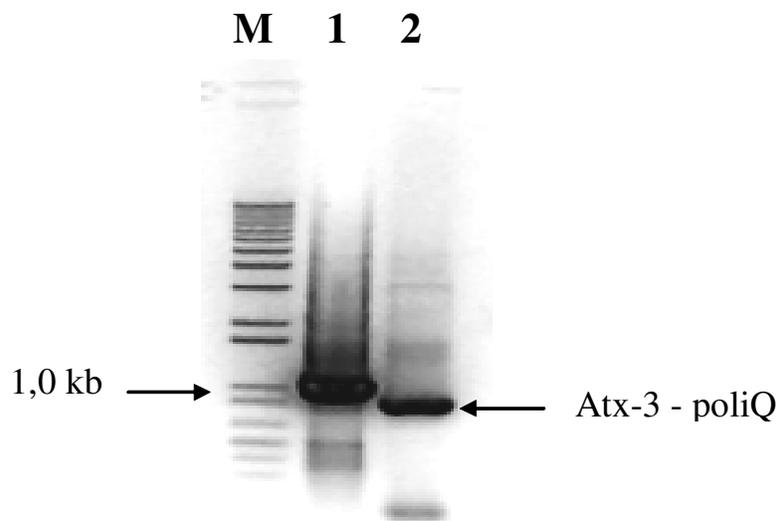
Para a amplificação dos tratos de poliQ normal e expandido foram utilizados primers contendo sítios específicos para as enzimas de restrição *Eco* RI e *Sal* I (Fig. 13).



**Figura 13-** Amplicons dos tratos de poliQ normal (N) e expandida (E). No trato de poliQ expandido nota-se a presença de duas bandas correspondentes ao alelo normal na mesma altura da poliQ-N e ao alelo que contém a expansão do triplete de CAG. Visualização em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo

#### 4.2.3- Amplicon da Atx-3N com e sem o Trato de PoliQ

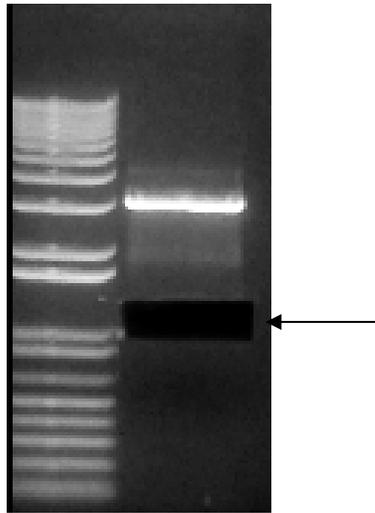
Utilizando os “primers” específicos (Tab. 2) foi amplificada a Atx-3 com e sem o trato de poliQ (Fig. 14).



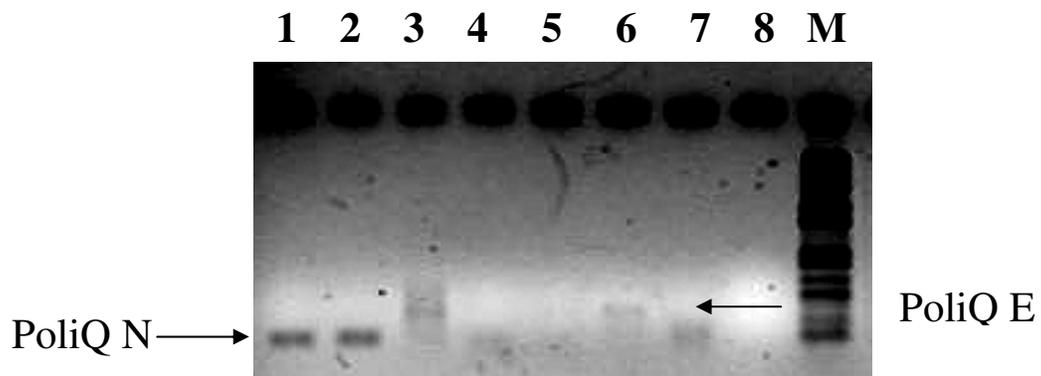
**Figura 14-** Amplicons dos cDNAs da Atx-3N com e sem o trato de poliQ. **M:** Marcador de massa molecular 1Kb plus (Gibco®); **1:** Fragmento de cerca de 1088 pb com sequência PoliQ; **2:** Fragmento com cerca de 873 pb sem a sequência PoliQ. Visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo

#### 4.3- Purificação dos Géis de Agarose

Todos os amplicons obtidos a partir da PCR foram purificados a partir dos géis de agarose para posterior digestão e clonagem no vetor pGEM-T Easy (Fig.15). A purificação do fragmento da poliQ E foi dificultada pela baixa quantidade de DNA correspondente ao alelo mutante (Fig. 16).



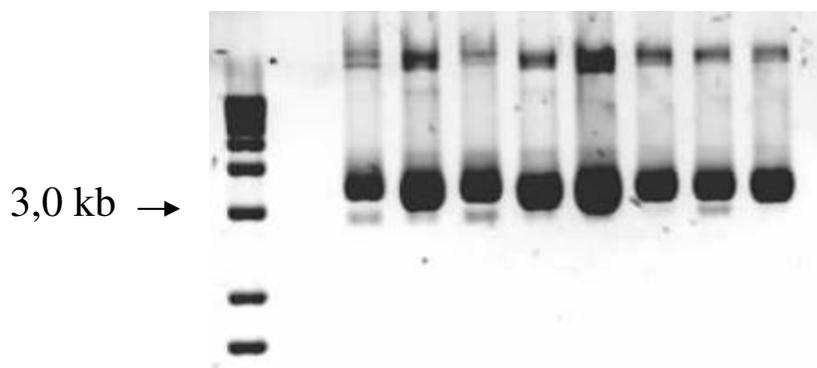
**Figura 15-** Gel de agarose 1%. Seta mostrando o local do qual foi removida a banda contendo o gene da Atx-3 para purificação com *QIAquick Extraction Gel Kit* (QIAgen®)



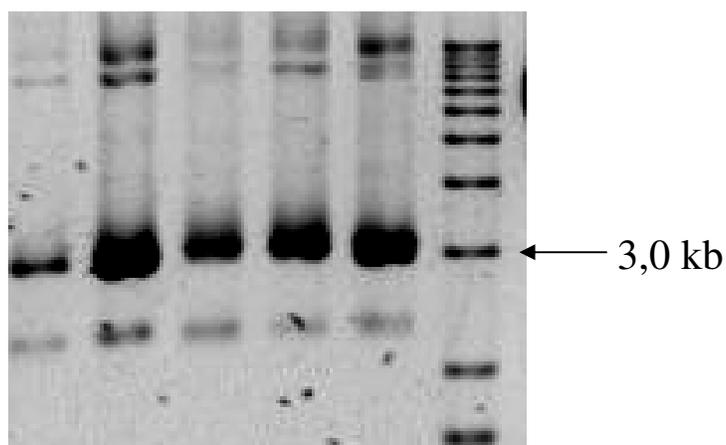
**Figura 16-** cDNA das poliQ N e E purificados. **1 e 2:** Fragmentos de PoliQ N; **3 a 8:** Fragmentos de poliQ E purificados. Nota-se que em apenas 3 e 6 o alelo mutante purificado é visualizado

#### 4.4- Mini-preps de pGEM-T Easy

A clonagem em pGEM-T Easy proporcionou a obtenção de grandes quantidades de inserto após a extração plasmidial devido a alta capacidade deste vetor em se replicar. As mini-preps para cada seqüência foram aplicadas em géis de agarose 1% para visualização e análise dos resultados (Fig. 17 e 18).

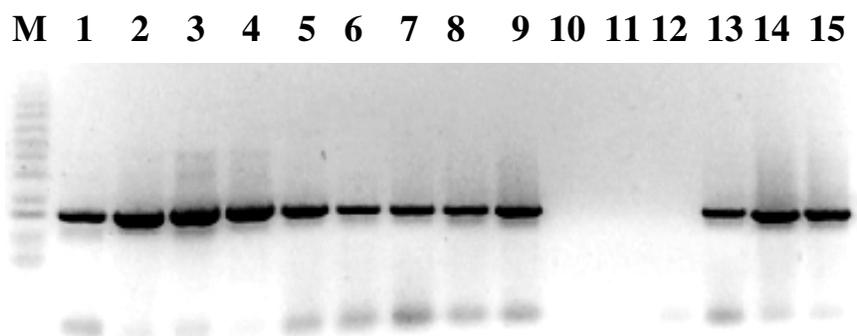


**Figura 17-** Gel de agarose 1%. Amostras de mini-preps da Atx-3 normal clonada no vetor pGEM-T Easy



**Figura 18-** Gel de agarose 1%. Amostras de mini-preps da Atx-3 E clonada no vetor pGEM-T Easy

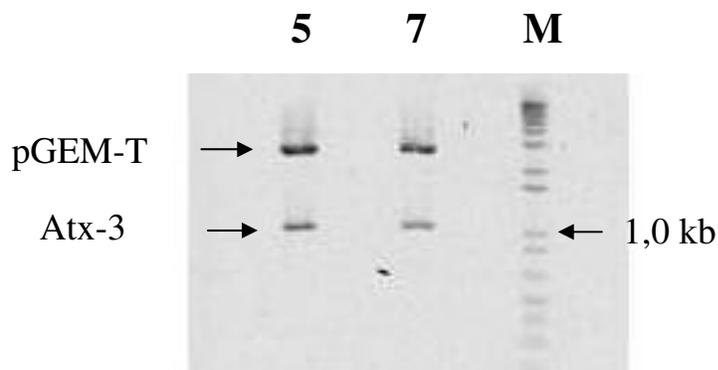
Foram realizadas PCRs de algumas colônias para verificar a presença de insertos, antes da execução das mini-preps como forma de confirmar as colônias que apresentavam coloração branca, pois mesmo o vetor pGEM T-Easy permitindo a seleção visual, algumas vezes ocorrem falsos positivos (Fig. 19).



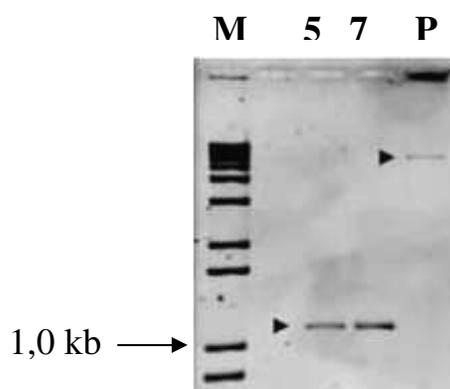
**Figura 19-** PCRs de colônia. **M:** Marcador de massa molecular 1kb plus (Gibco®); **1-15:** amplicons obtidos como resultado da PCR de colônia para verificar a presença do inserto Atx-3 sem PoliQ. Nota-se que apenas as colônias 10, 11 e 12 não apresentaram o inserto. Visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo

#### 4.5- Preparação para o Duplo-Híbrido

Tanto o vetor pBTM116 como as mini-preps de Atx-3/pGEM-T Easy foram digeridos com a enzima de restrição *Sal I* (Figs. 20 e 21) para a ligação.

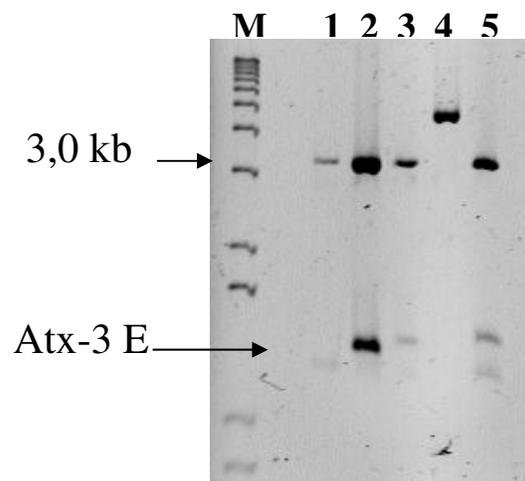


**Figura 20-** Gel de agarose 1%. Digestão das mini-preps pGEM/Atx-3 normal **5** e **7** com a enzima de restrição *Sal* I; **M**: marcador de massa molecular 1,0 kb plus (Gibco®)



**Figura 21-** Gel de agarose 1% . **M**: marcador de massa molecular 1,0 kb plus (Gibco®); **5** e **7**: amostras da Atx-3 digeridas com *Sal* I e purificadas; **P**: Plasmídeo pBTM116 digerido com *Sal* I após ser defosforilado e precipitado

Também foi feita a digestão do vetor pGEM-T easy contendo a Atx-3 E (Fig. 22).

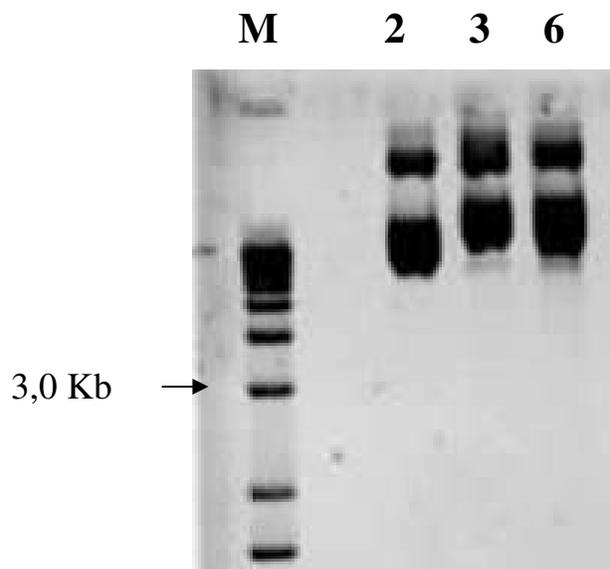


**Figura 22-** Gel de agarose 1%. Digestão das mini-preps pGEM/Atx-3E com a enzima de restrição *Sal I*. **M**: Marcador de massa molecular 1kb plus (Gibco®); **1-3 e 5**: amostras digeridas; **4**: não ocorreu digestão. A ligeira variação no tamanho dos insertos se deve à instabilidade do número de CAGs

Foi feita a ligação da Atx-3N ao vetor de expressão em levedura pBTM116 e em seguida fez-se a transformação de células DH5 $\alpha$  com o produto desta ligação. Antes de transformar a célula de levedura com a Atx-3/pBTM foi feita a transformação em *E. coli* para obter de maior quantidade de material já que os vetores em células de levedura se replicam em quantidades bem menores que em bactérias.

Não foram obtidos resultados na ligação da Atx-3E em pBTM116. Embora houvesse crescimento de colônias após a transformação, os vetores estavam sempre vazios. Após inúmeras tentativas sem sucesso, seguimos com os experimentos apenas para a Atx-3N.

Algumas colônias transformadas com pBTM116/Atx-3N foram selecionadas para a extração de seus plasmídeos (Fig. 23).



**Figura 23-** Gel de agarose 1%. **2, 3 e 6:** amostras de mini-prep da Atx-3 normal clonada no vetor de expressão pBTM116. **M:** Marcador de massa molecular 1,0 kb plus (Gibco®)

As três mini-preps foram seqüenciadas. Os clones 3 e 6 contendo o vetor pBTM116/Atx-3 com a seqüência da proteína correta confirmada pelo seqüenciamento foram transformados na levedura L40.

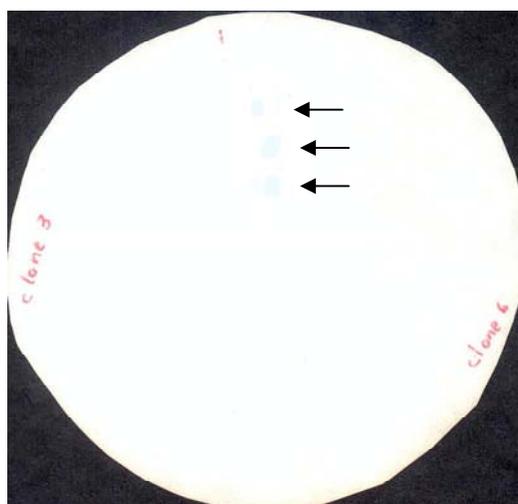
As leveduras transformadas são selecionadas nutricionalmente. O meio SD é um meio mínimo no qual são acrescentados os aminoácidos necessários para o crescimento das células.

Após a transformação, as células de L40 foram plaqueadas em meio sem W. Assim apenas as que receberam o vetor pBTM116 é que cresceram.

#### 4.5.1- Testes de Auto-ativação da Atx-3

##### 4.5.1.1- Ensaio com X-gal

Não foi detectada no clone 3 nenhuma ativação do gene *lacZ* pela isca após oito horas de observação. No clone 6 foi detectado um fraco sinal de expressão do gene *lacZ* (Fig. 24).

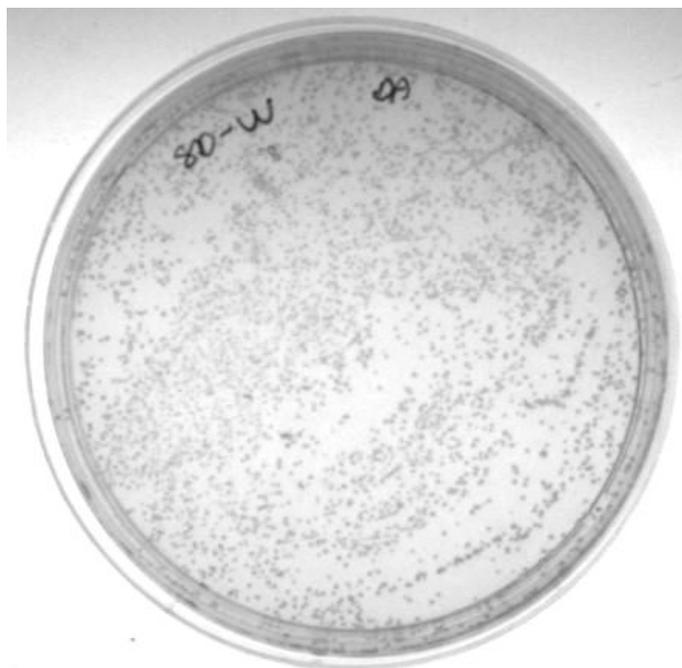


**Figura 24-** Ensaio da  $\beta$ -galactosidase. Papel de filtro contendo em uma metade colônias do clone 3 e na outra colônias do clone 6. Nota-se a presença de leve sinal azul no clone 6 indicando a auto-ativação do gene *LacZ* pela isca (setas)

##### 4.5.1.2- Ensaio em Meio sem Histidina

As placas contendo os meios SD- W, his e SD- W, his com 5 mM de 3-AT e com 10 mM de 3-AT não apresentaram crescimento de nenhuma colônia. Assim, não houve auto-ativação do gene *HIS3* pela Atx-3 nos dois clones testados. A placa controle apresentou o crescimento esperado (Fig.25).

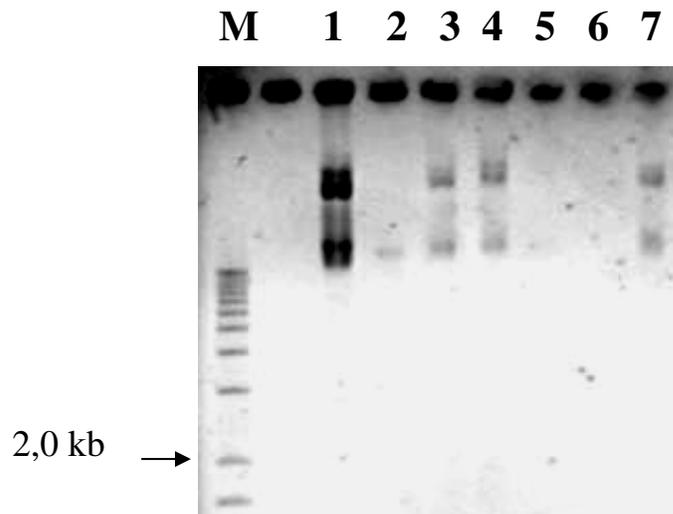
O 3-AT é um inibidor competitivo da proteína de levedura *HIS3* e é usado para inibir baixos níveis de expressão basal que podem ocorrer em algumas linhagens.



**Figura 25-** Placa controle: SD- W. As colônias cresceram devido à adição do aminoácido histidina ao meio de cultura

#### 4.5.2- Maxiprep da Biblioteca de Cérebro

A quantificação, integridade e pureza do DNA plasmidial obtido com a maxiprep foram determinadas no espectrofotômetro GeneQuant II (Amersham Pharmacia Biotech®) e por eletroforese em gel (Fig.26). A amostra apresentou uma concentração de DNA de 4,32 µg/mL.



**Figura 26-** Gel de agarose 1%. **M:** Marcador de massa molecular 1kb plus (Gibco®); **1:** Maxiprep do vetor pACT2 contendo a biblioteca de cérebro fetal humano diluída 1:100; **2:** lavado do tubo Eppendorf® que continha a maxiprep diluída 1:100; **3-7:** amostras recolhidas durante a realização da maxiprep para monitorização do experimento

#### 4.5.3- Experimentos do Sistema de Duplo-Híbrido

As células de levedura L40 com o vetor pBTM116/Atx-3 foram transformadas em seguida com o vetor pACT2 contendo a biblioteca de cDNA.

As leveduras, diferentemente de bactérias, podem suportar a propagação de mais de um plasmídeo com a mesma origem de replicação, assim, não existe incompatibilidade entre plasmídeos nestas células.

##### 4.5.3.1- Placas SD - W, leu, his

Houve o crescimento de muitos clones nas quarenta placas SD- W, leu, his sem e com 5 mM de 3-AT, sendo que os escolhidos foram os que apresentaram coloração rosa devido à alta atividade metabólica com o maior consumo do aminoácido adenina do meio de cultura e os que apresentaram tamanho maior que 3,0 mm.

#### 4.5.3.2- Placas SD – W, his

O controle negativo, não contendo a biblioteca, foi feito em placas sem histidina. Houve o crescimento de alguns clones, o que indica que a reação de transformação de alguma forma ativou a expressão da isca. Porém, os clones não adquiriram a cor rosa até o oitavo dia do experimento, apresentando um baixo nível de crescimento, já que quando a levedura está apresentando um alto metabolismo ela degrada rapidamente a adenina do meio de cultura, o que é indicado por esta coloração.

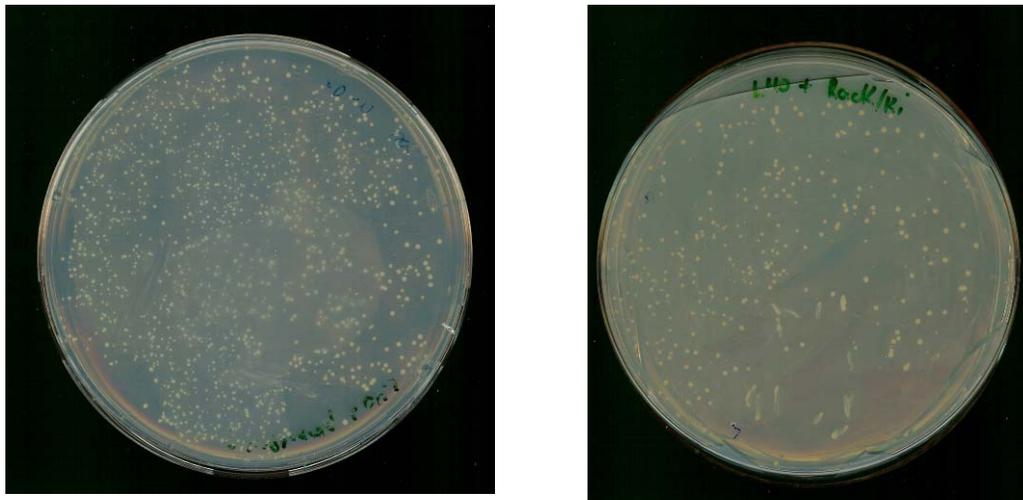
#### 4.5.3.3- Placas SD – W, leu

Foram feitas diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  da reação de transformação que foram plaqueadas em meio sem triptofano para controle da isca e sem leucina para controle da presa para cálculo da eficiência do experimento.

Nas placas com a reação de transformação diluída 10 vezes cresceram muitas colônias, na diluída cem vezes cresceram cerca de 116 colônias e na placa diluída mil vezes cresceram 13 colônias.

#### 4.5.3.4- Placas Controle

Quanto à integridade da isca e qualidade dos reagentes da transformação, obtiveram-se excelentes resultados. As leveduras L40 transformadas com o vetor isca, pBTM116/Atx-3 plaqueadas em meio sem triptofano apresentaram-se em grande quantidade (Fig. 27a) o mesmo para a transformação com pBTM116/Rack + pACT2 Ki plaqueada em meio sem triptofano e sem leucina que funcionou de controle de interação positiva para os testes subseqüentes (Fig. 27b).



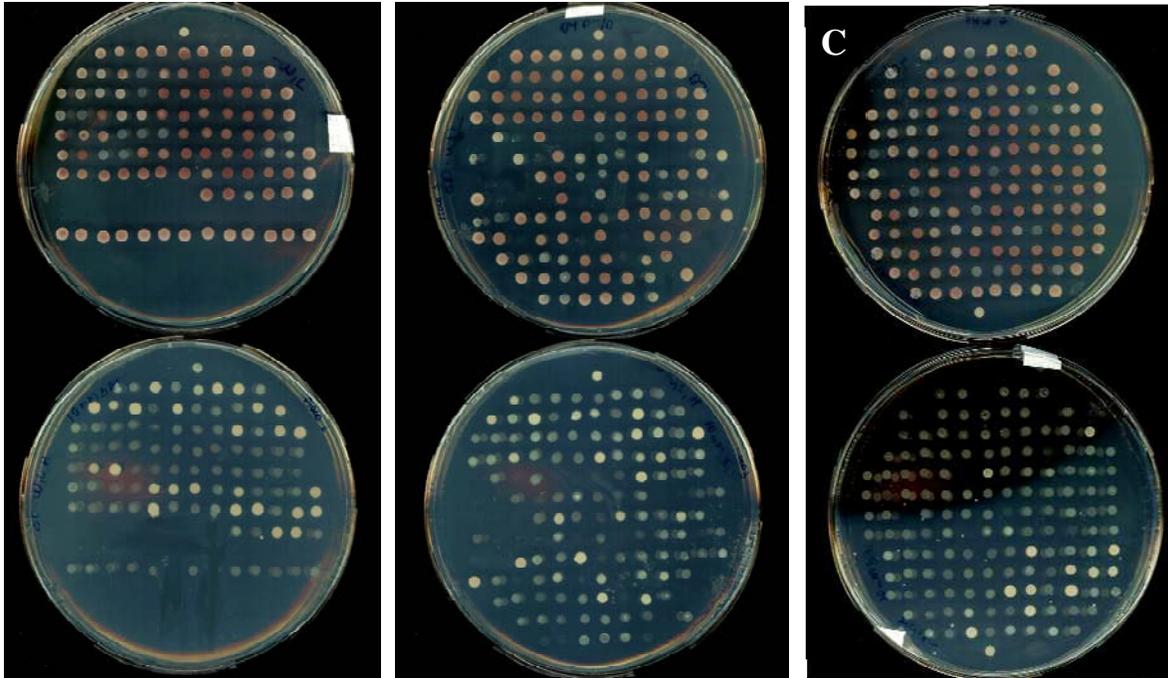
**Figura 27-** Placas controle: em **a** placa com meio de cultura SD- W apresentando o crescimento de clones L40 transformados com pBTM116/Atx-3 selecionados pelo crescimento em meio sem triptofano já que o vetor confere prototrofia à levedura. Em **b** placa com meio de cultura SD- W, leu, apresentando o crescimento de clones L40 transformados com pBTM116/ Rack + pACT2/Ki, o vetor pACT2 confere prototrofia para L40 em meio sem leucina

#### 4.5.3.5- Seleção dos Clones

Foram selecionados 383 clones que apresentaram tamanho maior que 3 mm e coloração rosa entre o 3<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dias após o ensaio em meio sem histidina.

#### 4.5.3.6- Teste de Pingos

Os clones foram recuperados e suas marcas de auxotrofia testadas para comprovar que não eram contaminantes. Todos os clones apresentaram marcas corretas e foram inoculados em meio líquido SD- W, leu para o teste de pingos feito em placas SD- W, leu, his e placas SD -W, leu, his + 10 mM de 3-AT ( Fig. 28). Foram extraídos os plasmídeos dos clones que apresentaram maior crescimento em meio com 10 mM de 3-AT.



**Figura 28-** Teste de Pingos. Em **A, B e C placas de cima:** Colônias plaqueadas em meio SD-W, leu, his sem 3-AT; Em **A, B e C placas de baixo:** Mesmas colônias plaqueadas em meio SD-W, leu, his com 10 mM de 3-AT. Nota-se que as colônias com a coloração branca mais intensa foram as que apresentaram maior taxa de crescimento; **A:** Clones selecionados no sexto dia após o ensaio; **B:** clones obtidos após o sétimo dia de ensaio; **C:** clones obtidos no oitavo dia após o ensaio

#### 4.5.3.7- Ensaio com X-gal

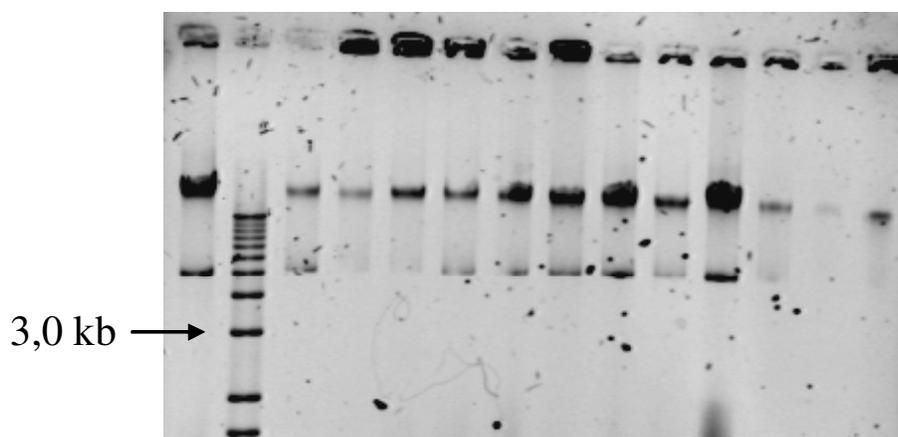
Os 368 clones também foram repicados em placas SD- W, leu para o ensaio X-gal utilizando como controle as proteínas ligantes Rack/Ki. Foram observadas colônias azuis. O teste não apresentou boa reprodutibilidade, mesmo com o controle positivo. Assim, as primeiras extrações plasmidiais foram feitas a partir dos clones selecionados em meio com 10mM de 3-AT.

Dos ensaios realizados obtiveram-se 82 clones que ficaram azuis; porém, quando repetidos os experimentos com os mesmos reagentes, algumas colônias diferentes tornaram-se azuis e o controle não.

#### 4.5.4- Mini-preps de Levedura

Isolar DNA plasmidial de levedura é um procedimento bem mais laborioso que o de bactéria. Primeiro, há dificuldade na quebra da parede celular, além dos plasmídeos serem maiores e apresentarem menor número de cópias. Depois o DNA plasmídial isolado de levedura apresenta-se freqüentemente contaminado por DNA genômico, já que este fungo apresenta três vezes mais DNA genômico que *E. coli* e o processo quebra cromossomos da levedura liberando-os do material celular.

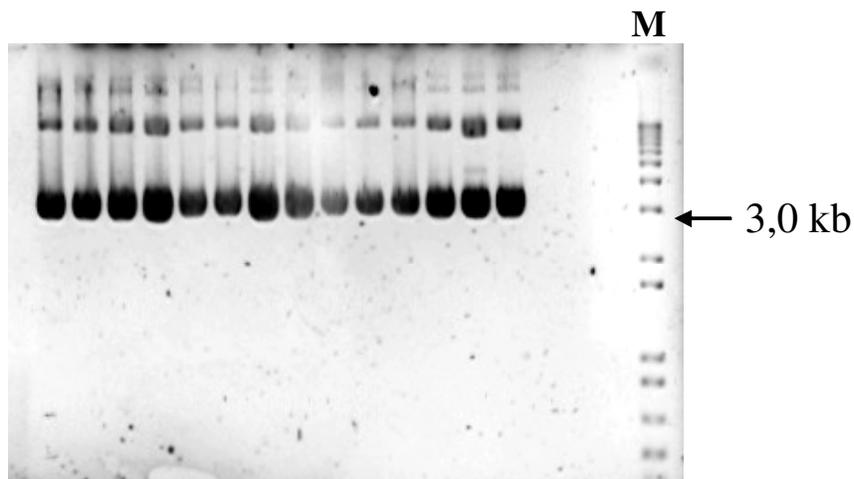
Foram feitas as extrações dos plasmídeos (Fig. 29) de cerca de 150 clones. Os que se apresentaram mais concentrados em gel de agarose foram transformados em bactéria.



**Figura 29-** Gel de agarose 1%. **M:** Marcador de massa molecular 1kb plus (Gibco®); Amostras de mini-preps de levedura. Foram aplicados 1,0  $\mu$ L de cada amostra

#### 4.5.5- Transformação em DH5 $\alpha$

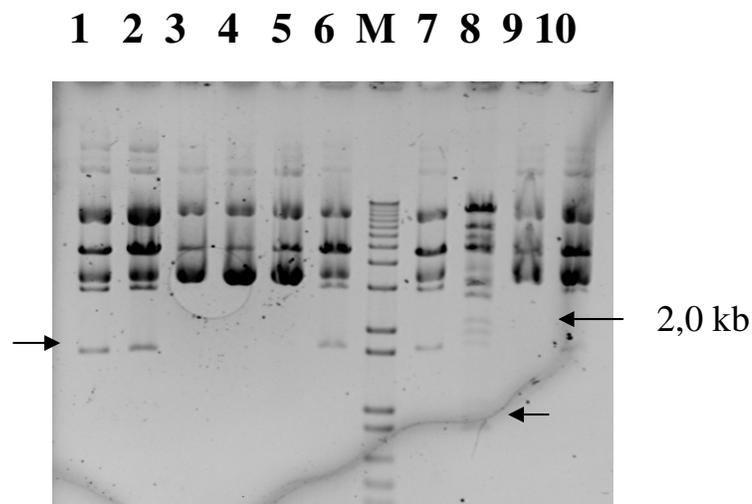
Após a observação dos DNAs plasmidiais em gel de agarose, estes foram transformados em DH5 $\alpha$  (Fig.30).



**Figura 30-** Gel de agarose 1%. **M:** Marcador de massa molecular 1kb plus (Gibco<sup>®</sup>); Minipreps do vetor pACT2 contendo insertos, notam-se os diferentes tamanhos dos insertos, correspondendo a diferentes fragmentos de cDNA da biblioteca de cérebro fetal humano Clontech<sup>®</sup>

#### 4.5.6- Digestão com *Eco*/*Xho*

Obteve-se a digestão parcial dos vetores, podendo notar-se a presença de insertos ligantes (Fig. 31).



**Figura 31-** Digestão parcial das mini-preps com *Eco/Xho* obtidas a partir da transformação de DH5 $\alpha$  com o vetor pACT2 mais as presas. Em 1, 2, 6, 7 e 8 notam-se fragmentos de tamanho compatível com os da biblioteca de CDNA

#### 4.5.7- Seqüenciamento

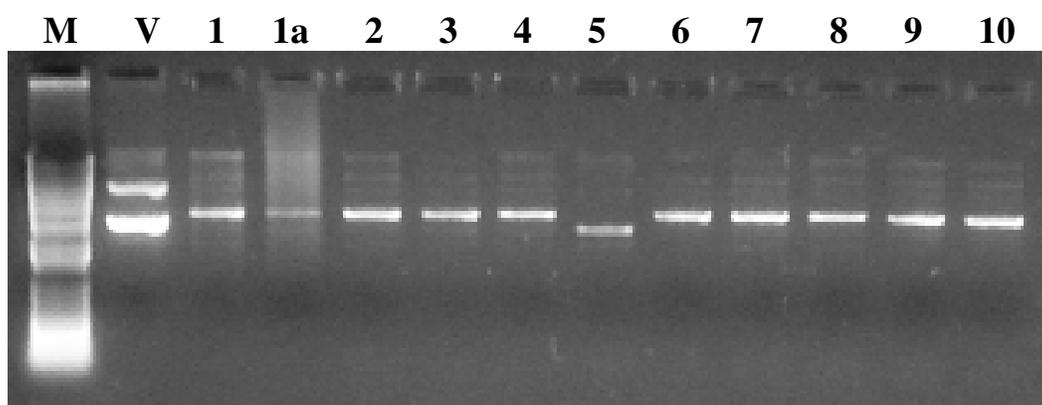
Os produtos da digestão com as enzimas *Eco* RI e *Xho* que apresentaram tamanhos compatíveis com os dos insertos clonados em pACT2 (0,5 a 4,0 kb) foram enviados para sequenciamento no LNLS como descrito anteriormente.

Não houve resultados de seqüências inseridas em pACT2. Assim, embora haja transcrição dos genes repórtes *HIS* e *LacZ*, não conseguimos identificar quais as proteínas que estariam interagindo com a Atx-3.

## 4.6- Estudos Funcionais com as Atx-3 Normal e Mutante

### 4.6.1- Digestão das Mini-preps e do Vetor pET28

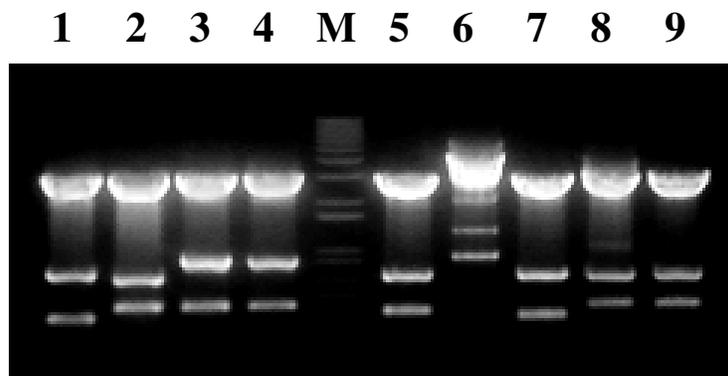
As colônias de bactérias transformadas com pGEM-T Easy/Atx-3N tiveram seus plasmídeos extraídos para digestão com *Bam* HI e *Nde* I. Após digestão foram visualizados em gel de agarose 0,8% para a seleção daqueles que continham o inserto (Fig. 32).



**Figura 32-** Gel de Agarose 1%. **M:** Marcador de massa molecular 1,0 kb plus (Gibco®); **V:** plasmídeo pET28/Atx-3N; **1-10:** vetores com inserto digeridos, exceto o 5 que estava vazio

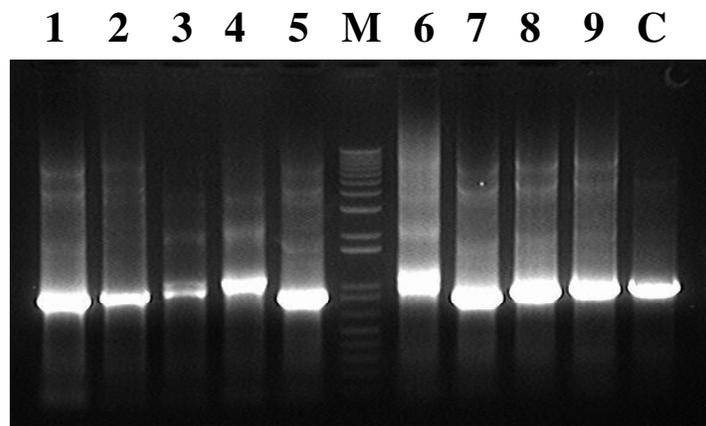
Já para a Atx-3E o procedimento desenvolvido levou em conta o fato de que os vetores pGEM-T Easy de diferentes colônias apresentariam insertos de tamanhos variados devido à instabilidade das repetições CAG.

Assim, foi feita digestão das mini-preps com *Eco* RI para seleção dos vetores com tamanho de inserto correspondente a uma expansão (Fig. 33).



**Figura 33-** Gel de agarose 1% onde foram aplicados 10 $\mu$ L do produto da digestão com a enzima *Eco* RI. **1 e 2** correspondem a clones com o amplicon de 1,0 kb para controle. As amostras **3, 4 e 6** apresentaram maior tamanho. Sendo assim, consideradas as melhores candidatas a possuírem trato poliQ mais extenso

Para confirmar a escolha, foi feita PCR desses clones usando como “primer” reverso o MJD25a (5’ GGC TGG CCT TTC ACA TGG AT 3’) que é o mesmo usado no Laboratório de Genética Molecular do DGM da FCM-UNICAMP para diagnóstico molecular da MJD. Este “primer” se anela à seqüência mais próxima da região poliQ oferecendo, assim, uma melhor resolução do tamanho da banda amplificada (Fig. 34). Desse modo os clones 4 e 6 foram confirmados e enviados para seqüenciamento.

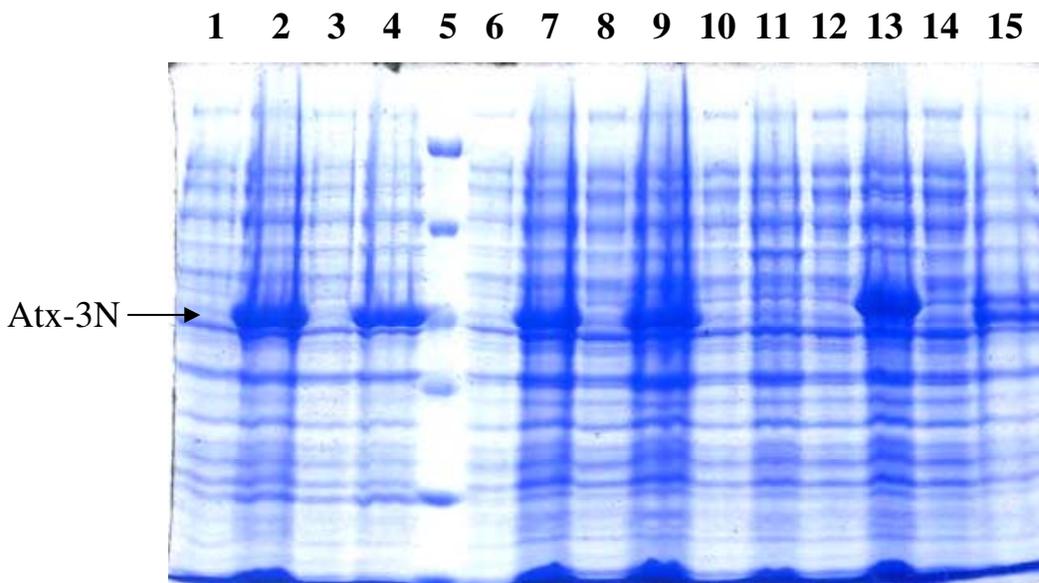


**Figura 34-** Gel de agarose 1% onde foram aplicados 10  $\mu$ L do produto da PCR das mesmas colônias analisadas por digestão com a enzima *Eco* RI. Pode-se observar que as amostras **4** e **6** apresentam tamanho um pouco superior ao da amostra controle (**C**: mini-prep pGEM+ATX-3N)

#### 4.6.2- Expressão de Atx-3 em BL21 (DE3)

Foi realizada a transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes com o vetor pET28a+/Atx-3N para os testes de expressão da proteína Ataxina-3.

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, sistema SDS-PAGE. Houve boa expressão da Atx-3 N a 37 °C tanto no meio de cultura Circle Grow (CG) quanto no Luria-Bertani (LB) (Fig. 35).



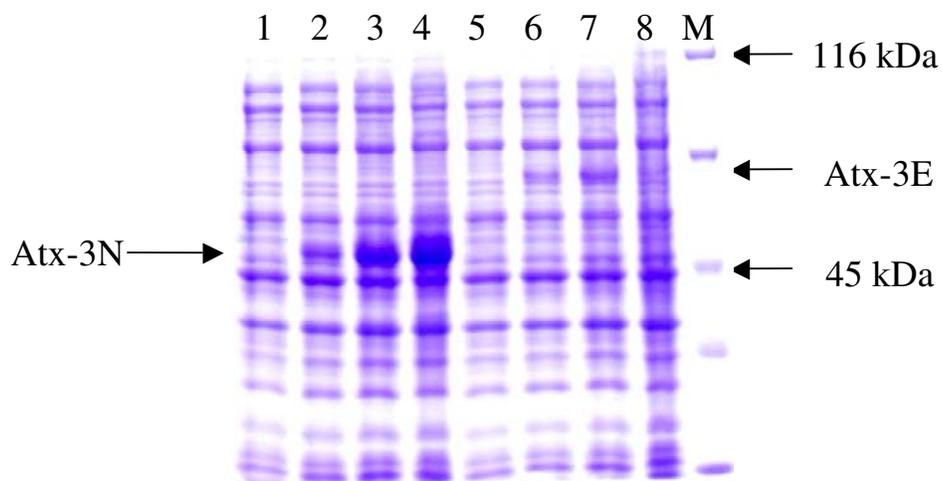
**Figura 35-** Gel SDS-PAGE 10%. **1:** NI em CG; **2:** I 4h em CG; **3:** NI em LB; **4:** I 4h em LB; Marcador Protein Markers (Promega®); **6:** NI-1 Inóculo 1; **7:** I 5h-1 Inóculo1; **8:** NI-2 Inóculo 2; **9:** I 5h-2 Inóculo 2; **10:** NI-3 Inóculo 1; **11:** I 5h-3 Inóculo 1; **12:** NI-4 Inóculo 2; **13:** I 5h-4 Inóculo 2; **14:** NI-5 Mix inóculos; **15:** I 5h-5 Mix

NI: Não induzida com IPTG; I: Induzida com IPTG

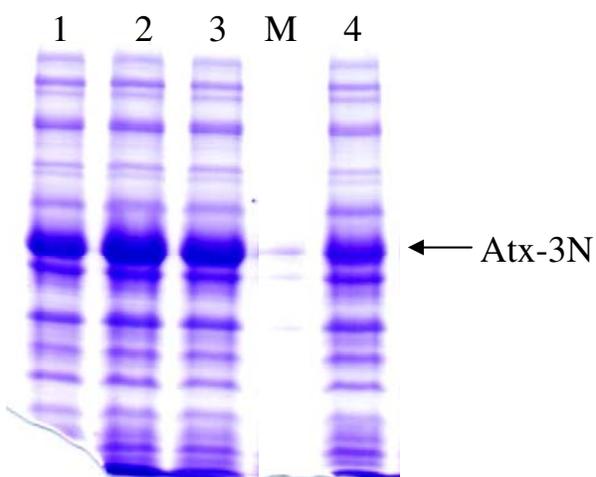
Foram realizados testes de expressão com cepas mais especializadas [C41(DE3), C43(DE3), BL21(DE3)-pLysS] além de cepas voltadas para a expressão de códon raros [Rosetta(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RP, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL].

Comparativamente, também foram expressas as Atx-3N e Atx-3E transformadas com as cepas BL21(DE3) e BL21(DE3)-pLysS, respectivamente.

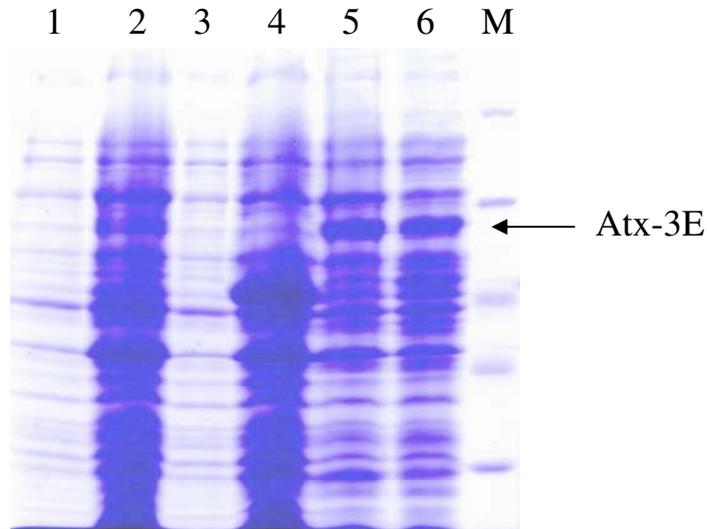
A Atx-3N aparentemente apresentou boa expressão quando transformada em quaisquer das cepas citadas. Por outro lado, a expressão da Atx-3E apresentou-se mais laboriosa e até ausente em diversas situações. Não obstante, houve alguns resultados positivos (Figs. 36-38).



**Figura 36-** Expressão da Atx-3N e Atx-3E em Rosetta(DE3) após indução com IPTG a 30°C. **1:** NI da Atx-3N; **2-4:** amostras coletadas após 1, 2 e 3h de indução; **5:** NI da Atx-3E; **6-8:** amostras coletadas após 1, 2 e 3h de indução; **M:** Marcador (Fermentas<sup>®</sup>)



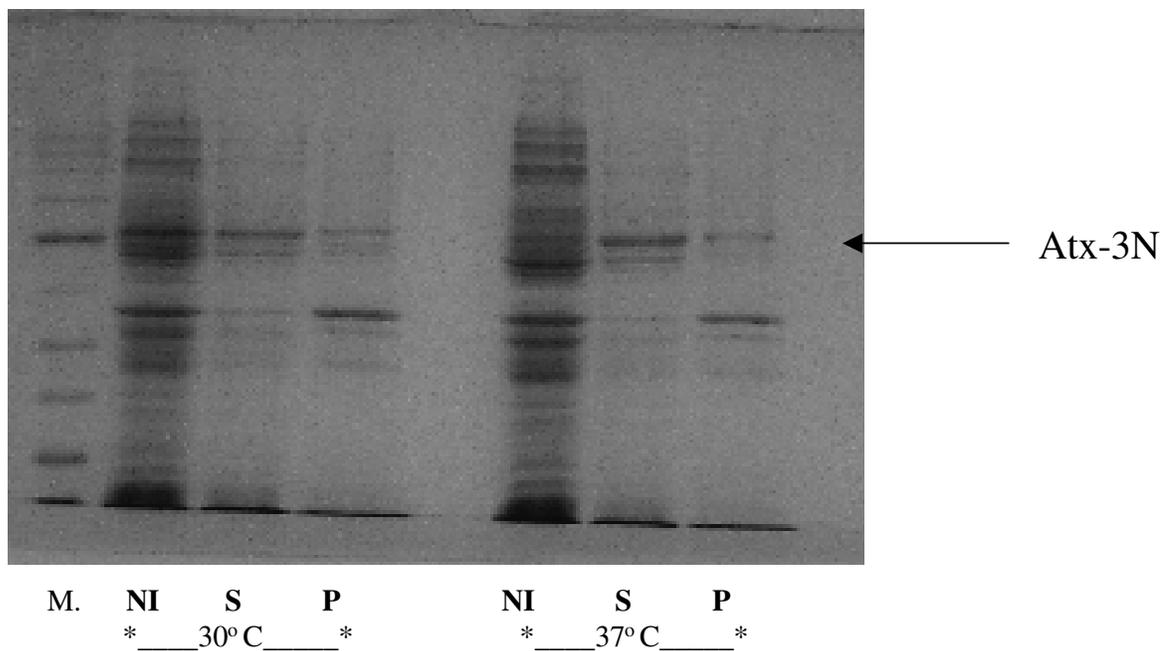
**Figura 37-** Expressão da Atx-3N após indução com IPTG a 37°C. **1 a 3:** Atx-3N em Rosetta(DE3) após 1, 2 e 3 h de indução respectivamente; **4:** Atx-3N em BL21(DE3) após 3 h de indução; **M:** Marcador (Fermentas<sup>®</sup>)



**Figura 38-** Expressão da Atx-3E em BL21(DE3)-pLysE (30°C e 37°C) após indução com IPTG. **1:** amostra NI Atx-3E (37°C); **2:** amostra da Atx-3E (37°C) coletada após 12h de indução; **3:** amostra NI Atx-3E (30°C); **4:** amostra da Atx-3E (37°C) coletada após 4h de indução ; **5:** amostra da Atx-3E (30°C) coletada após 7h de indução; **6:** amostra da Atx-3E (30°C) coletada após 4h de indução; **M:** Marcador (Fermentas<sup>®</sup>)

#### 4.6.3- Teste de Solubilidade

As frações do sobrenadante (S = fração solúvel) e “pellet” (P = fração insolúvel) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, sistema SDS-PAGE (Fig. 39).



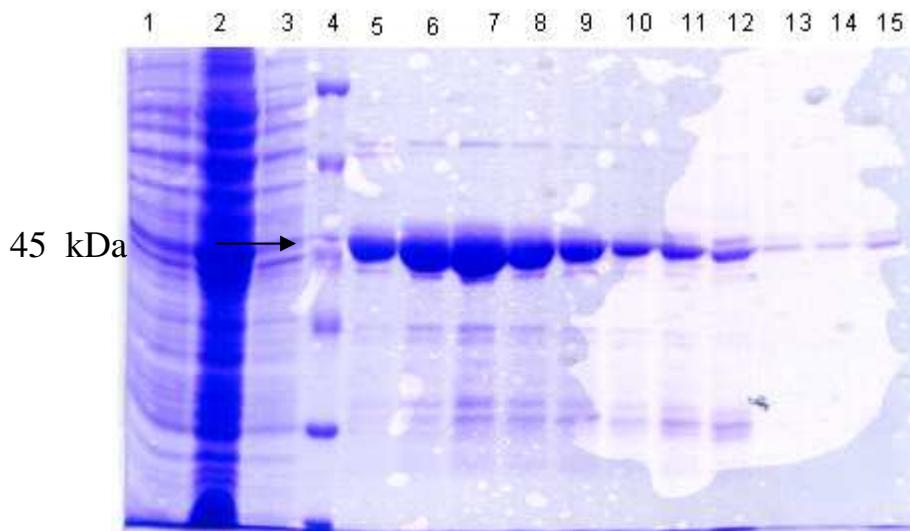
**Figura 39-** Teste de solubilidade da Ataxina-3 em 30 e 37°C

#### 4.6.4- Purificação

O vetor de expressão pET28a permite a expressão de proteínas com cauda de histidina (6xHis) na porção N-terminal. Dessa forma, as proteínas recombinantes induzidas nesses plasmídeos foram isoladas dos extratos celulares por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado utilizando a resina Ni-NTA *Superflow* (Qiagen).

Foram coletadas 5 frações de 2,0 mL de cada concentração e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, sistema SDS-PAGE.

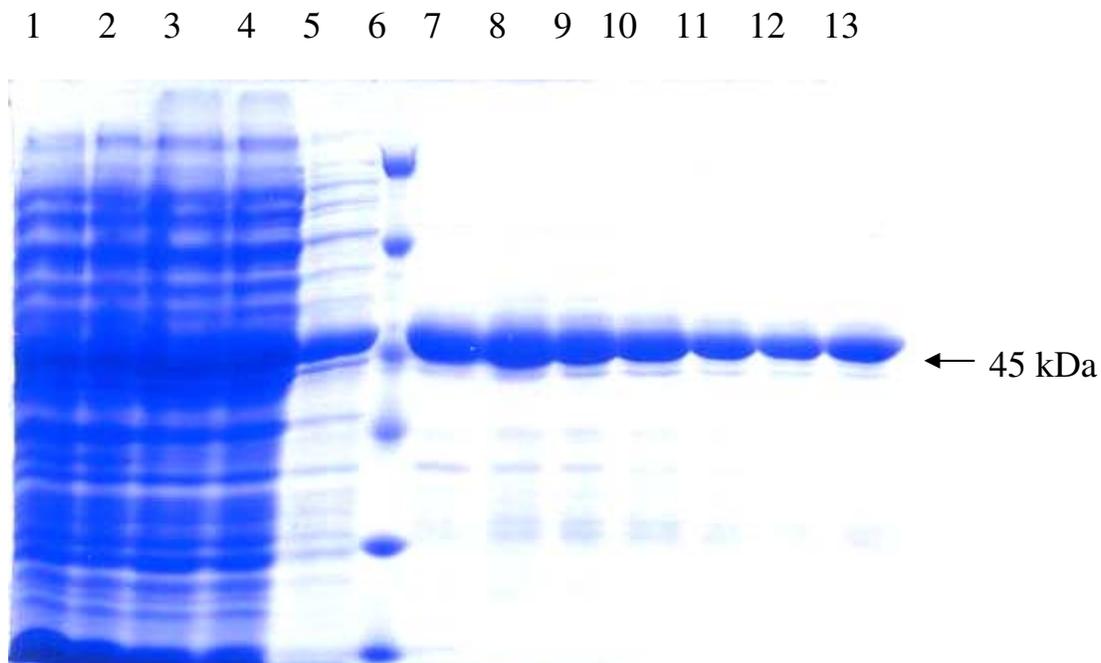
A proteína normal foi purificada com ótimo resultado já a partir da primeira lavagem, sendo excelente para envio para CD e SAXS. Para cristalografia seria ideal apresentar apenas a banda da proteína Atx-3 e nota-se pequena quantidade de outras proteínas expressas por *E. coli*. A expressão foi feita em meio LB (Fig. 40).



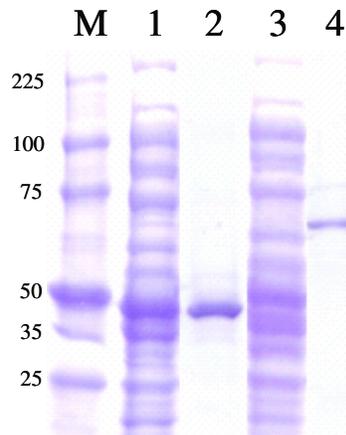
**Figura 40-** Gel SDS-PAGE 10%. Resultado da purificação da Atx-3N por afinidade em coluna Ni-NTA (Qiagen®). **1:** Filtrado (FT); **2:** Extrato Total (ET); **3:** Tampão (Tp) sem Imidazol; **4:** Marcador Protein Markers (Promega®); **5:** Tp 15Mm Imidazol; **6:** Tp 30Mm Imidazol (fração 1); **7:** fração 2; **8:** fração 3; **9:** fração 4; **10:** fração 5; **11:** Tp 5mM Imidazol (fração 1); **12:** fração 2; **13:** fração 3; **14:** fração 4; **15:** fração 5

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 desta proteína. Estes fatores são, na maioria das vezes, empíricos e dependentes de ensaios e testes de vários sistemas e condições de purificação de forma a encontrar-se o mais favorável.

Na Figura 41, após a expressão foi realizada purificação por gravidade utilizando resina de cobalto TALON Metal Affinity Resin (BD Clontech®). O procedimento utilizado para preparação da amostra e processo de purificação com a coluna de cobalto foi o mesmo adotado para o processo de purificação em resina Ni-NTA *Superflow* (Qiagen®). Na Figura 42 é demonstrada a purificação em resina Ni-NTA *Superflow* (Qiagen®) das formas normal e expandida da Atx-3.

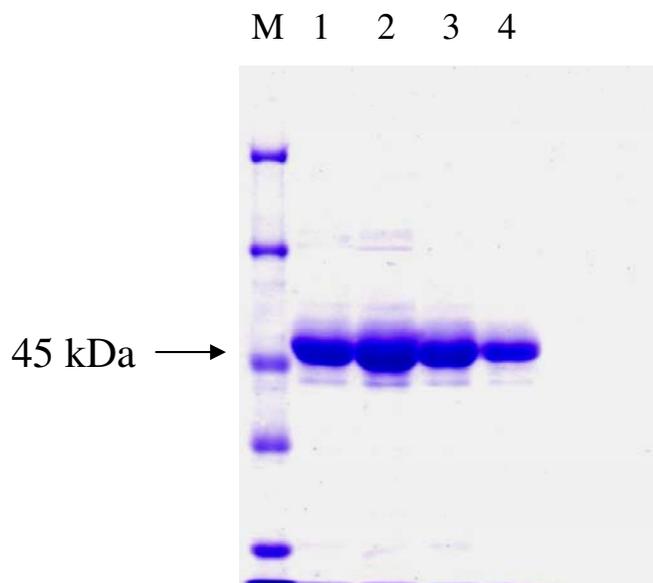


**Figura 41-** Expressão de Atx-3N em BL21(DE3) a 37°C e purificação por afinidade (Talon). **1:** I 4h CG; **2:** I 4h CG; **3:** ET; **4:** FT; **5:** Tp 0mM Imidazol; **6:** Marcador Protein Markers (Promega®); **7:** Tp 15mM Imidazol; **8:** Tp 30mM Imidazol - fração 1; **9:** Tp 30mM Imidazol - fração 2; **10:** Tp 30mM Imidazol - fração 3; **11:** Tp 30mM Imidazol - fração 4; **12:** Tp 30mM Imidazol - fração 5; **13:** Tp 30mM Imidazol - fração 6

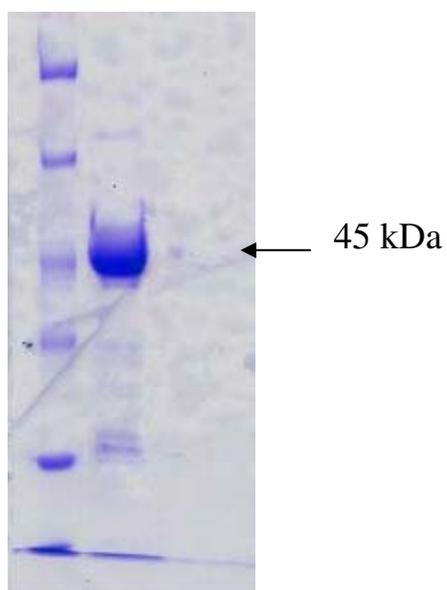


**Figura 42-** SDS-PAGE de proteína purificada por afinidade em coluna de Ni-NTA (Qiagen®). **M:** Marcador de massa molecular; **1:** “Flow-through” do extrato de Atx-3N; **2:** Atx-3N purificada; **3:** “Flow-through” do extrato da Atx-3E; **4:** Atx-3E purificada

Após diálise durante toda a noite em temperatura ambiente em tampão (50mM Tris pH 7,0; 50mM NaCl; 5mM DTT) (Fig. 43) as amostras foram concentradas usando concentrador Amicon YM-30 (Millipore®) (Fig. 44).



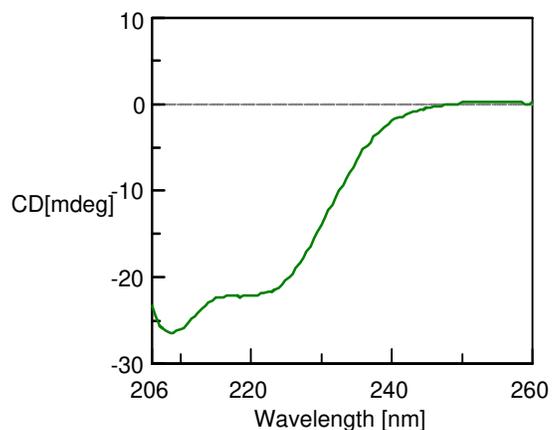
**Figura 43-** Amostras de Atx-3N após diálise contra tampão 10mM fosfato de sódio com 7,0 mM  $\beta$ -Me. **1:** Amostra 1 concentração (C) = 5,9mg/mL; **2:** Amostra 2 C= 2,46 mg/mL ; **3:** Amostra 3 C= 3 mg/mL; **4:** Amostra 4 C= 9,84mg/mL; **M:** Marcador (Fermentas<sup>®</sup>)



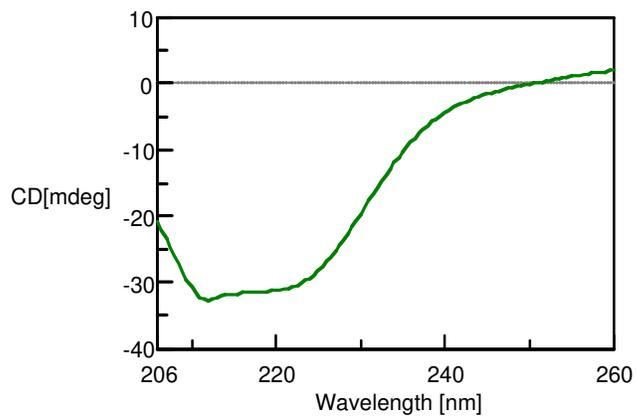
**Figura 44-** Atx-3N após o uso do concentrador Amicon YM-30 (Millipore<sup>®</sup>)

#### 4.6.5- Dicroísmo Circular

O enovelamento da Atx-3N e Atx-3E foi confirmado como pode ser observado pelas bandas características de  $\alpha$ -hélices nos comprimentos de onda de 208 e 220 nm (Fig. 45 e 46).

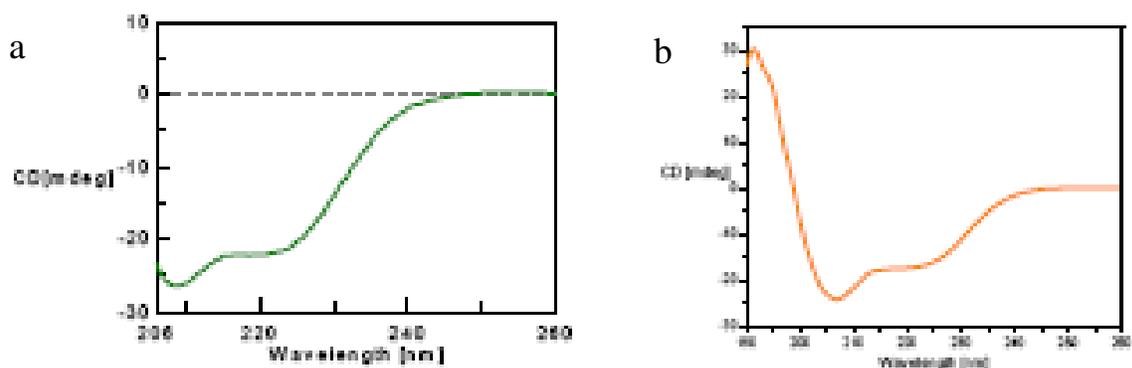


**Figura 45-** Espectro por CD da Atx-3N, as bandas negativas obtidas a 208 e 220 nm indicam a presença de  $\alpha$ -hélices na estrutura secundária



**Figura 46-** Espectro por CD da Atx-3E, as bandas negativas obtidas a aproximadamente 208 e 220 nm indicam a presença de  $\alpha$ -hélices na estrutura secundária

A Atx-3N clonada, expressa e purificada foi liofilizada e ressuspensa em D<sub>2</sub>O para posterior análise em RMN. Foi feita análise de CD da Atx-3 antes e depois de liofilizada para a observação de possíveis alterações que a liofilização poderia acarretar



(Fig. 47).

**Figura 47-** Espectro por CD a) da ataxina-3 em sua forma normal (N) e b) da ataxina-3 após liofilização e ressuspensão em D<sub>2</sub>O. observamos que a estrutura secundária da proteína foi conservada após a liofilização. As bandas negativas obtidas a 208 e 220 nm indicam a presença de  $\alpha$ -hélices na estrutura secundária.

O espectro de CD da Atx-3 N expôs duas bandas negativas em 208 e 222 nm, indicando que a proteína é preponderantemente  $\alpha$ -hélice. O CD revelou também que a Atx-3 expõe uma estrutura secundária contendo 33% de  $\alpha$ -hélice, 20% de folha- $\beta$  e 30% de estruturas randomizadas.





## ***5- DISCUSSÃO***



Os grandes avanços da biologia molecular no último século culminaram com a geração de milhares de seqüências gênicas resultantes do sequenciamento total do genoma humano. Estas abriram uma nova frente para um desafio ainda maior: o entendimento desses genes em termos de estrutura e função de seu produto, a proteína.

A análise estrutural de proteínas é um componente crítico para o entendimento da molécula e suas interações com outras moléculas nas atividades celulares. A compreensão do papel de uma proteína na célula pode fornecer informações fundamentais para o entendimento dos processos biológicos envolvidos em muitas doenças hereditárias sem cura ou tratamento eficiente.

A ataxina-3 é uma proteína de 43 kDa que está envolvida no desenvolvimento da doença neurodegenerativa dominante de Machado Joseph. Apesar dos muitos esforços para compreensão de seu papel nas atividades celulares, sua função em células normais ainda não está completamente elucidada, colaborando para tal a dificuldade em expressar e purificar a Atx-3 em quantidades suficientes para análises funcionais e biofísicas.

Obtivemos sucesso na purificação de cinco diferentes amostras de Atx-3, quatro para isoforma normal e uma para a mutante (71Q) e descrevemos um protocolo bem sucedido de expressão e purificação não apenas da forma normal, mas também da forma patológica desta proteína. A utilização de uma cauda com seis resíduos de histidina na região N-terminal da proteína permitiu sua ligação em resina de níquel e esta foi purificada com ótimo resultado já a partir da primeira lavagem, estando em condições excelentes para análises de CD e SAXS. Para cristalografia o ideal seria que proteínas expressas pela própria *E. coli* não fossem detectadas. Contudo, apesar de uma ótima purificação, ainda permaneceram traços de outras proteínas além da Atx-3.

Ainda para cristalografia, a concentração de proteína necessária foi de 10 mg/mL, sendo que obtivemos no máximo 9,8 mg/mL. Embora fosse uma concentração inferior para o ensaio, consideramos a concentração obtida satisfatória, já que se trata de uma proteína humana expressa em *E. coli*.

Uma das desvantagens da expressão heteróloga em sistema procarioto ocorre quando a utilização de códons no mRNA do gene recombinante difere do da célula hospedeira. Existem alguns códons que são os menos utilizados por *E. coli* e codificam raros tRNA, como por exemplo os que transportam a arginina (AGG/AGA/CGA), a isoleucina (AUA), a leucina (CUA) e a prolina (CCC). Estudos sugerem que um excesso na frequência de qualquer um desses códons cria problemas durante a tradução, levando a uma redução na quantidade de proteína sintetizada. Desse modo, a expressão de proteína recombinante em *E. coli* pode ser severamente prejudicada (ao ponto de ser indetectável) se a ORF que codifica a proteína utiliza-se de tais códons raros (SCHENK *et al.*, 1995; WAKAGI *et al.*, 1998; KLEBER-JANKE & BECKER, 2000). Levando em consideração essas informações, realizamos análises de nossas proteínas no site <http://www.doe-mbi.ucla.edu/~sumchan/caltor.html> onde foi possível constatar a presença de diversos códons raros, principalmente para a arginina (Arg).

Além disso, muitas vezes a obtenção de grandes quantidades de proteínas com alto grau de pureza a partir de sistemas procariotos é dificultada já que organismos como *E. coli* possuem um citoplasma redutor que dificulta a correta formação de pontes dissulfeto. Como consequência, as proteínas produzidas por este organismo podem não ser funcionais, seja pelas formações inespecíficas de pontes dissulfeto, seja pela agregação quando em solução, ou ainda na formação de corpos de inclusão (proteínas insolúveis) (RUI, 2005).

Mesmo com estes obstáculos obtivemos proteína normal e expandida (71Q) solúvel à temperatura e pH fisiológicos e com integridade confirmada por nossas análises funcionais.

A concentração mínima de proteína para que pudéssemos enviar para análise por Dicroísmo Circular é 1 mg/mL a qual foi obtida sem grandes dificuldades. O espectro de CD da Atx-3 N expôs duas bandas a 208 e a 222 nm, indicando que a proteína é preponderantemente formada por  $\alpha$ -hélices. O CD revelou também que a Atx-3 expõe uma estrutura secundária contendo 33% de  $\alpha$ -hélices, 20% de folhas- $\beta$  e 30% de estruturas randomizadas.

Este espectro de CD da Atx-3N foi concordante com os dados previamente descritos (BEVIVINO & LOLL, 2001; CHOW, PAULSON & BOTTOMLEY, 2004). Agregados de proteína insolúvel são frequentemente encontrados em doenças neurodegenerativas causadas por tratos de poliQ expandidos. A porcentagem significativa da conformação de estruturas randomizadas estimada neste estudo sugere a presença de porções desestruturadas da molécula em uma ou mais regiões. Os agregados contém vários componentes do sistema ubiquitina/proteassoma, sugerindo uma tentativa da célula superar o substrato aberrante. As NIIs também contém chaperonas que juntamente com os componentes do sistema ubiquitina/proteassoma, têm função em remodelar ou destruir as proteínas desenoveladas.

O papel destas inclusões nucleares na patogênese da doença é controversa. Estudos indicam que elas são tóxicas para os neurônios e, assim, causam a neurodegeneração (ORR, 2001; PERUTZ & WINDLE, 2001). Entretanto, há estudos que sugerem que as NIIs não são requeridas para o início da doença, podendo ser consequência desta ou, até mesmo, um mecanismo de defesa da célula ao tentar eliminar a proteína mutante (SCHERZINGER *et al.*, 1997; SCHERZINGER *et al.*, 1999).

Embora a clonagem da Atx-3 normal e de seus fragmentos tenha ocorrido sem problemas, a obtenção do clone que continha o cDNA da Atx-3E foi mais trabalhosa. Isso pode ser justificado pelo fato do portador da doença (do qual foi obtido o cDNA) ser obrigatoriamente heterozigoto com um alelo normal (30Q) e um alelo expandido (71Q). Também parece existir uma amplificação preferencial do alelo normal em detrimento do alelo mutante.

Além disso, o alelo expandido apresenta mosaicismosomático em todos os pacientes, ou seja, praticamente cada célula do indivíduo possui um tamanho diferente da seqüência poliQ expandida. Portanto, a clonagem do cDNA resultou em um gradiente de seqüências CAG expandidas de diversos tamanhos. Obviamente, estávamos interessados no clone que apresentasse a maior seqüência poliQ, o que facilitaria comparações futuras com a Atx-3N. Finalmente, após diversas tentativas obtivemos dois clones, um apresentando 51Q e outro com 71Q.

A Atx-3N apresentou boa expressão quando transformada em quaisquer das cepas aqui estudadas. Já a expressão da Atx-3E apresentou-se mais laboriosa e até ausente em diversas situações, mas após vários testes obtivemos resultados positivos. Observamos que diferentemente da forma normal, que é expressa muito bem a 37 °C, a mutante apresentou melhor expressão a 30° C.

A rifampicina é um antibiótico semi-sintético que especificamente inibe o início da síntese de RNA por ligar-se a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (TRAVERS & BURGEES, 1969; di MAURO *et al.*, 1969; JIN & ZHOU, 1996; KUDEROVÁ *et al.*, 1999). Com base nesses dados decidimos realizar um teste para verificar a eficiência deste antibiótico em aumentar o rendimento da expressão e a qualidade da Atx-3E transformada em BL21(DE3)-pLysS.

Desse modo, o antibiótico foi adicionado a uma concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  somente 25 minutos após o início da indução que foi realizada a 30°C. Pudemos observar que realmente houve uma expressão global das proteínas da *E. coli* significativamente menor com a sua adição. Porém, cabe ressaltar que o antibiótico, aparentemente, foi tóxico para as células, pois com o passar do tempo de indução, a quantidade de células diminuiu e uma menor quantidade de proteínas foi expressa.

As dificuldades apresentadas na pesquisa da forma expandida da Atx-3 também foram observadas na construção do sistema de duplo-híbrido, pois não obtivemos quantidades suficientes do alelo mutante para a ligação no vetor de expressão pBTM116, havendo reanelamento deste sem o inserto, mesmo já tendo sido defosforilado.

Para obtenção de informações funcionais sobre a Atx-3, o conhecimento de seus ligantes é de grande relevância já que resultados experimentais estão consistentes com um modelo no qual a poliglutamina adota uma “conformação patológica” resultando em interações proteína-proteína inapropriadas, podendo até mesmo incluir agregações da proteína doente (TROTTIER *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 1996).

Para tal, construímos o sistema de duplo-híbrido a fim de isolar proteínas já descritas e identificar possíveis novas proteínas que interagissem com Atx-3. Com este objetivo, transformamos a cepa L40 de *Saccharomyces cerevisiae* com a isca pBTM116-Atx-3 e usamos como presa uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano clonada no vetor pACT2.

O sistema foi corretamente montado e não foi detectada ativação dos genes reporter pela isca, o que poderia vir a gerar falsos positivos, os quais ocorrem principalmente pela ativação da isca independentemente da presa.

Os ensaios de duplo-híbrido foram extremamente laboriosos e o volume de testes foi muito grande. Os resultados foram sendo obtidos dentro do esperado, de forma satisfatória. Porém, apenas após o ensaio, detectou-se ativação da expressão de *HIS3* em alguns clones que não receberam a biblioteca. Como em meio sem histidina e com adição de 10mM de 3-AT alguns clones não cresceram, acreditamos que estes estavam apresentando uma ativação basal de *HIS3* ou uma interação muito fraca no meio SD – W, leu, his.

As colônias selecionadas cresceram em 10 mM de 3-AT, o que foi mais do que suficiente para inibir qualquer expressão basal que gerasse um falso positivo. Além disso, as mini-preps de levedura foram realizadas com êxito. A transformação em *E. coli* com o produto destas mini-preps permitiu a seleção de colônias resistentes à ampicilina. O que foge ao nosso entendimento, é o fato de que ao serem feitos os sequenciamentos das possíveis proteínas ligantes, não conseguimos encontrar o vetor pACT2. Como os clones transformantes teriam crescido em meio com ampicilina sem o vetor pACT2 não sabemos explicar, já que foram feitas mais de uma centena de mini-preps, com várias digestões liberando insertos no tamanho adequado.

Uma hipótese seria a de que houve interação de proteínas devido à ativação dos genes reporter, entretanto, não foi possível a identificação destas, talvez por serem proteínas da própria levedura, e não ligadas ao pACT2, que devido ao choque térmico da transformação tenham sido ativadas. Isto pode ser cogitado já que foi descrita a homologia de ligantes à Atx-3 com uma proteína de levedura (WANG *et al.*, 2000).

Embora seja necessário que o fator de transcrição seja completo para ativação dos genes reporter, de alguma forma isto poderia estar ocorrendo por ação de componentes da própria levedura.

Antes de quaisquer especulações mais profundas a este respeito, faz-se necessário que outros grupos façam a construção de outros ensaios utilizando vetores diferentes para que possamos entender se o problema esteve no sistema utilizado, pois já foram descritas em literatura, pelo menos duas proteínas que se ligam à Atx-3 em pesquisa com duplo-híbrido (WANG *et al.*, 2000).

Com esta pesquisa podemos concluir que muitos são os desafios para o entendimento da função das ataxinas e sobre as causas da disfunção neuronal e morte celular provocadas pelas proteínas mutantes. Com nossos resultados, acreditamos termos dado um importante passo, já que grandes obstáculos foram superados: a obtenção de sistemas eficientes de expressão e purificação das ataxinas-3 normal e mutante; a constatação de que se trata de uma proteína solúvel e a observação de sua estrutura secundária. Com isto, colaboramos com nosso grupo de pesquisas estruturais e ajudamos na consolidação desta importante linha de pesquisa em nosso laboratório.



## ***6- CONCLUSÕES***



- 4.1- Embora o sistema de duplo-híbrido tenha sido construído de forma eficiente e os genes reporter tenham sido expressos, o resultado do seqüenciamento dos clones selecionados não permitiu a identificação de possíveis proteínas ligantes;
- 4.2- As proteínas Atx-3 normal e mutante foram eficientemente expressas e purificadas em sistema procarioto de expressão apresentando-se solúveis e permitindo a execução de seus estudos funcionais e estruturais;
- 4.3- Os dados de CD mostraram que as proteínas normal e mutante apresentam-se enoveladas, sendo sua estrutura secundária composta principalmente por  $\alpha$ -hélices.





## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



Albrecht, M.; Golatta, M.; Wüllner, U. & Lengauer, T. – Structural and Functional Analysis of Ataxin-3 and Ataxin-3. **Eur. J. Biochem.**, 271: 3155-70, 2004.

Arnold, F. H. – Metal-affinity Separations: a new Dimension in Protein Processing. **Bio. Technol.**, 9: 151-6, 1991.

Aronheim, A. - Protein Recruitment Systems for the Analysis of Protein-Protein Interactions. **Biochem. Pharm.**, 60: 1009-13, 2000.

Bartel, P. L.; Fields, S. - **The Yeast Two-Hybrid System**. Oxford University Press, Oxford, England, 1997.

Bevivino, A. E. & Loll, P. J.- An Expanded Glutamine Repeat Destabilizes Native Ataxin-3 Structure and Mediates Formation of Parallel Beta -Fibrils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98(21): 11955-60, 2001.

Burnett, B.; Li, F. & Pittman, R. N. - The Polyglutamine Neurodegenerative Protein Ataxin-3 binds Polyubiquitylated Proteins and has Ubiquitin Protease Activity. **Hum. Mol. Genet.**, 12:3195-205, 2003.

Burt, T.; Blumbergs, P. & Currie, B. - A Dominant Hereditary Ataxia Resembling Machado-Joseph Disease in Arnhem Land, Australia. **Neurology**, 43: 1750-2, 1993.

Castanho, J. – Cromatografia – Um Processo de Separar Substâncias. (in: <http://jacintocastanho.planetaclix.pt/cromatografia.htm>). Acesso em 10/01/2007.

Cha, J-H. J. - Transcriptional Dysregulation in Huntington's Disease. **Trends. Neurosci.**, 23: 387-92, 2000.

Chai, Y.; Berke, S. S.; Cohen, R. E. & Paulson, H. L. - Poly-Ubiquitin Binding by the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Links its Normal Function to Protein Surveillance Pathways. **J. Biol. Chem.**, 279 (5): 3605-11, 2004.

Chai, Y.; Koppenhafer, S. L.; Shoesmith, S. J.; *et al.* - Evidence for Proteasome Involvement in Polyglutamine Disease: Localization to Nuclear Inclusions in SCA3/MJD and Suppression of Polyglutamine Aggregation *in vitro*. **Hum. Mol. Genet.**, 8(4): 673-82, 1999.

Chai, Y.; Wu, L.; Griffins, J. D. & Paulson, H. L. - The Role of the Protein Composition in Specifying Nuclear Inclusions Formations in Polyglutamine Disease. **J. Biol. Chem.**, 276(48): 44889-97, 2001.

Chien, C.; Bartel, P. L.; Sternglanz, R. & Fields, S. - The Two-Hybrid System: A Method to Identify and Clone Genes for Proteins that Interact with a Protein of Interest. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 9578-82, 1991.

Chou, A. H.; Yea, T. H.; Kuo, Y. L.; *et al.* – Poliglutamine-expanded Ataxin-3 Activates Mitochondrial Apoptotic Pathway by Upregulating Bax and Downregulating Bel-X<sub>L</sub>. **Neurobiol. Disease**, article in press, 2005.

Chow, M. K.; Ellisdon, A. M.; Cabrita, L. D. & Bottomley, S. P. - Purification of Polyglutamine Proteins. **Methods Enzymol.**, 413:1-19, 2006.

Chow, M. K.; Paulson, H. L. & Bottomley, S. P. - Destabilization of a Non-Pathological Variant of Ataxin-3 Results in Fibrillogenesis Via a Partially Folded Intermediate: A Model for Misfolding in Polyglutamine Disease. **J. Mol. Biol.**, 335(1):333-41, 2004.

Coutinho, P. - Aspectos Clínicos, História Natural e Epidemiologia na Doença de Machado –Joseph. **O Teste Preditivo da Doença de Machado-Joseph**. UniGENe, IBMC, Porto, 1996.

Coutinho, P. & Andrade, C. - Autosomal Dominant System Degeneration in Portuguese Families of the Azores Islands: a new Genetic Disorder Involving Cerebellar, Pyramidal, Extrapyramidal and Spinal Cord Motor Functions. **Neurology**, 28: 703-9, 1978.

di Mauro, E.; Synder, L.; Marino, P. *et al.* - Rifampicin Sensitivity of the Components of DNA-Dependent RNA Polymerase. **Nature**, 222(5193): 533-7, 1969.

Donaldson, K. M.; Li, W.; Ching, K. A.; *et al.* -Ubiquitin-Mediated Sequestration of Normal Cellular Proteins into Polyglutamine Aggregates. **PNAS**, 100: 8892-7, 2003.

Doss-Pepe, E.W.; Stenroos E. S.; Johnson, W. G. & Madura, K. - Ataxin-3 Interactions with Rad23 and Valosin-Containing Protein and its Associations with Ubiquitin Chains and the Proteasome are Consistent with a Role in Ubiquitin-Mediated Proteolysis. **Mol. Cell. Biology**, 18: 6469-83, 2003.

Fields, S. & Song, O. - A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions. **Nature**, 340: 245-6, 1989.

Fujigasaki, H.; Uchihara, T.; Koyano, S.; *et al.* - Ataxin-3 is Translocated into the Nucleus for the Formation of Intranuclear Inclusions in Normal and Machado-Joseph Disease Brains. **Exp. Neurol.**, 165: 248-56, 2000.

Gales, L.; Cortes, L.; Almeida, C.; *et al.* - Towards a Structural Understanding of the Fibrillization Pathway in Machado-Joseph's Disease: Trapping Early Oligomers of Non-expanded Ataxin-3. **J. Mol. Biol.**, 353: 642-54, 2005.

Gaspar, C.; Lopes-Cendes, I.; Hayes, S.; *et al.* - Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: a Worldwide Haplotype Study. **Am. J. Hum. Genet.**, 68: 523-8, 2001.

Gietz, R. D.; Triggs-Raine, B.; Robbins, A.; *et al.* – Identification of Proteins that Interact with a protein of Interest: Applications of the Yeast-Two-Hybrid System. **Mol. Cell. Biochem.**, 172: 67-79, 1997.

Greenfield, N. J. - Circular Dichroism: 1-39, 2004 (in: <http://www2.umdj.edu/cdrwjweb/handout.pdf>). Acesso em 10/01/2007.

Healton, E. B.; Brust, J. C. M.; Kerr, D. L.; *et al.* - Presumably Azorean Disease in a Presumably non-Portuguese Family. **Neurology**, 30: 1084-9, 1980.

Ikeda, H.; Yamaguchi, M.; Sugai, S.; *et al.* – Expanded Polyglutamine in the Machado-Joseph Disease Protein Induces Cell Death *in vitro* and *in vivo*. **Nat. Genet.**, 13: 196-202, 1996.

Ito, J. A. - Técnicas Espectroscópicas em Biofísica. **Caderno de Física da UEFS**, 03(01): 21-9, 2004.

Jin, D. J. & Zhou, Y. N. - Mutational Analysis of Structure-Function Relationship of RNA Polymerase in *Escherichia coli*. **Methods. Enzymol.** 273:300-19, 1996.

Karmali, A. – Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado e suas Variantes. **Bol. Biotec.**, 2-7.

Kawagushi, Y.; Okamoto, T. & Taniwaki, M.; - A. CAG Expansions in a Novel Gene for Machado-Joseph Disease at Chromosome 14q32.1. **Nature Genet.**, 8: 221-8, 1994.

Kawakami, H.; Maruyama, H.; Nakamura, S.; *et al.* - Unique Features of the CAG Repeats in Machado-Joseph Disease. (Letter) **Nature Genet.**, 9: 344-5, 1995.

Kleber-Janke, T. & Becker, W. M. - Use of Modified BL21(DE3) *Escherichia coli* Cells for High-Level Expression of Recombinant Peanut Allergens Affected by Poor Codon Usage. **Protein. Expr. Purif.**, 19(3): 419-24, 2000.

Kuderova, A.; Nanak, E.; Truksa, M. & Brzobohaty, B. - Use of Rifampicin in T7 RNA Polymerase-Driven Expression of a Plant Enzyme: Rifampicin Improves Yield and Assembly. **Protein. Expr. Purif.**, 16(3): 405-9, 1999.

Levitt, M. & Chotia, C. - Structural Patterns in Globular Proteins. **Nature**, 261(5561): 552-8, 1976.

Li, F.; Macfarlan, T.; Pittman, R. N. & Chacravarti, D. - Ataxin-3 is a Histone-Binding Protein with two Independent Transcriptional Corepressor Activities. **J. Biol. Chem.**, 277: 45004-12, 2002.

Lopes-Cendes, I.; Teive, H. G. A.; Calcagnotto, M. E.; *et al.* - Frequency of the Different Mutations Causing Spinocerebellar Ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a Large Group of Brazilian Patients. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 55 (3-B): 519-29, 1997.

Lopes-Cendes, I.; Teive, H. G. A.; Cardoso, F.; *et al.*- Molecular Characteristics of Machado-Joseph Disease Mutation in 25 Newly Described Brazilian Families. **Braz. J. Genet.**, 20: 717-24, 1997.

MacDonald, P. N. - **Two-Hybrid Systems (Methods and Protocols)**. Humana Press, 177, 2001.

Mao, Y.; Matuglia, F. S.; Di Fiore, P. P. *et al.* – Deubiquitinating Function of Ataxin-3: Insights from the Solution Structure of the Josephin Domain. **PNAS**, 102(36): 12700-5, 2005.

Masino, L.; Nicastro, G.; Menon, R. P. *et al.* - Characterization of the Structure and the Amyloidogenic Properties of the Josephin Domain of the Polyglutamine-Containing Protein Ataxin-3. **J. Mol. Biol.**, 344(4): 1021-35, 2004.

Masino, L.; Musi, V.; Menon, R.P.; *et al.* - Domain Architecture of the Polyglutamine Protein Ataxin-3: a Globular Domain Followed by a Flexible Tail. **FEBS Lett.**, 549: 21-5, 2003.

Michalik, A. & Van Broeckhoven, C. - Pathogenesis of Polyglutamine Disorders: Aggregation Revisited. **Hum. Mol. Genet.**, 12: 179-86, 2003.

Miles, A.J. & Wallace, B.A. – Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins and Applications in Structural and Functional Genomics. **Chem. Soc. Rev.**, 35: 39-51, 2006.

Nakano, K. K.; Dawson, D. M. & Spence, A. - Machado Disease: a Hereditary Ataxia in Portuguese Emigrants to Massachusetts. **Neurology**, 22: 49-55, 1972.

Nicastro, G.; Menon, R.P.; Masino, L.; *et al.* - The Solution Structure of the Josephin Domain of Ataxin-3: Structural Determinants for Molecular Recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102(30): 10493-8, 2005.

Nicastro, G.; Habeckb, M.; Masino, L. *et al.* - Structure Validation of the Josephin Domain of Ataxin-3: Conclusive Evidence for an open Conformation. **J. Biomol. NMR**, 36:267-77, 2006.

Opal, P. & Zogbi, H. Y. – The Role of Chaperones in Polyglutamine Disease. **Trends. Mol. Med.**, 8 (5): 232-6, 2002.

Orr, H.T. - Hereditary Ataxia. An Unfolded Protein. **Lancet.**,358 Suppl: S35, 2001.

Pandey, A. & Mann, M. - Proteomics to study Genes and Genomes. **Nature**, 405: 837-46, 2000.

Porath, J; Carlsson, J; Olsson, I. & Belfrage, G. – Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. **Nature**, 258: 598-9, 1975.

Perutz, M. F. & Windle, A. H. - Cause of Neural Death in Neurodegenerative Diseases Attributable to Expansion of Glutamine Repeats. **Nature**, 412(6843):143-4, 2001.

Rosenberg, R. N.; Nyhan, W. L.; Bay, C. & Shore, P. - Autosomal Dominant Striato-nigral Degeneration: a Clinical, Pathologic and Biochemical Study of a new Genetic Disorder. **Neurology**, 26: 703-14, 1976.

Rubinsztein, D. C. & Hayden, M. R. - **Analysis of Triplet Repeat Disorders**, 1th ed. Oxford: Washington DC, pp 129-141, 1998.

Rui, E.- **Mutagênese da Proteína HBX do Vírus da Hepatite B e Estudo da Interação com RNA e Proteínas Humanas**. Campinas, 2005. [tese- Doutorado - UNICAMP].

Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. **Molecular Cloning: A laboratory Manual 2nd**. Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sakai, T.; Ohta, M. & Ishino, H. - Joseph Disease in a non-Portuguese Family. **Neurology**, 33: 74-80, 1983.

Scheel, H.; Tomiuk, S. & Hofmann, K. - Elucidation of Ataxin-3 and Ataxin-7 Function by Integrative Bioinformatics. **Hum. Mol. Genet.**, 12: 2845-52, 2003.

Schenk, P .M.; Baumann, S.; Mattes, R. & Steinbiss, H .H. - Improved High-Level Expression System for Eukaryotic Genes in *Escherichia coli* Using T7 RNA Polymerase and Rare ArgRNAs. **Biotechniques**, 19(2):196-8, 1995.

Scherzinger, E.; Lurz, R.; Turmaine, M.; *et al.* - Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-Like Protein Aggregates *in vitro* and *in vivo*. **Cell**, 90(3): 549-58, 1997.

Scherzinger, E.; Sittler, A.; Schweiger, K.; *et al.* - Self-Assembly of Polyglutamine-Containing Huntingtin Fragments Into Amyloid-Like Fibrils: Implications for Huntington's Disease Pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96(8): 4604-9, 1999.

Shen, L.; Tang, J. G.; Tang, B. S.; *et al.* - Research on Screening and Identification of Proteins Interacting with Ataxin-3. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, 22(3): 242-7, 2005.

Shimohata, T.; Nakajima, T.; Yamada, M.; *et al.* - Expanded Polyglutamine Stretches Interact with TAF<sub>II</sub> 130, Interfering with CREB-Dependent Transcription. **Nature Genet.**, 26: 29-36, 2000.

Sutherland, G. R. & Richards, R. I. - Simple Tandem DNA Repeats and Human Genetic Disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 3636-41, 1995.

Takiyama, Y.; Igarashi, S.; Rogaeva, E. A.; *et al.* - 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. **Hum. Molec. Genet.**, 4: 1137-46, 1995.

Takiyama, Y.; Nishizawa, M.; Tanaka, H.; *et al.* - The Gene for Machado-Joseph Disease Maps to Human Chromosome 14q. **Nature Genet.**, 4: 300-4, 1993.

Travers, A. A. & Burgessrr. - Cyclic Re-use of the RNA Polymerase Sigma Factor. **Nature**, 222(5193): 537-40, 1969.

Trottier, Y.; Lutz, Y.; Stevanin, G.; *et al.* – Polyglutamine Expansion as a Pathological Epitopo in Huntington’s Disease and Four Dominant Cerebellar Ataxias. **Nature**, 378(6555): 403-6, 1995.

Uetz, P.; Giot, L.; Cagney, G.; *et al.* - A Comprehensive Analysis of Protein-Protein Interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, 403: 623-32, 2000.

Vidal, M.; Brachmann, R. K.; Fattaey, A.; *et al.* - Reverse Two-Hybrid and One -Hybrid Systems to Detect Dissociation of Protein-Protein and DNA-Protein Interactions. **Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 10315-20, 1996.

Wakagi, T.; Oshima, T.; Imamura, H. & Matsuzawa, H. - Cloning of the Gene for Inorganic Pyrophosphatase from a Thermoacidophilic Archaeon, *Sulfolobus sp.* strain 7, and Overproduction of the Enzyme by Coexpression of tRNA for Arginine Rare Codon. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 62(12): 2408-14, 1998.

Wang, G.; Sawai, N.; Kotliarova, S.; *et al.* - Ataxin-3, the *MJD1* Gene Products, Interacts with the two Human Homologs of Yeast DNA Repair Protein RAD23, HHR23A and HHR23B. **Hum. Mol. Genet.**, 9(12): 1795-803, 2000.

Woods, B. T. & Schaumburg, H. H. - Nigro-Spino-Dentatal Degeneration with Nuclear Ophthalmoplegia: a Unique and Partially Treatable Clinico-Pathological Entity. **J. Neurol. Sci.**, 17: 149-66, 1972.

Zhong, X. & Pittman, R. N. - Ataxin-3 Binds VCP/p97 and Regulates Retrotranslocation of ERAD Substrates. **Hum. Mol. Genet.**, 15(16): 2409-20, 2006.

Zoghbi, H. Y. & Orr, H.T. - Glutamine Repeats and Neurodegeneration. **Annual Rev. Neurosc.**, 23: 217-47, 2000.



## ***8- ANEXOS***



O RNA necessário para os experimentos descritos foi obtido 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.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas-S.P.  
☎ (019) 289.3749 ou 7232  
(019) 289.3114 fax  
✉ [barbic@turing.unicamp.br](mailto:barbic@turing.unicamp.br)

PARECER: Nº 055/98

**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