

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



José Luiz Rosenberis Cunha Júnior

**“Análises de mutações e de seus efeitos na expressão do gene
SRY em casos de disgenesia gonadal XY”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JOSÉ LUIZ ROSENBERIS CUNHA JÚNIOR
Maricilda Palandi de Mello
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Caroline Soardi

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C914a	<p>Cunha Júnior, José Luiz Rosenberis Análises de mutações e de seus efeitos na expressão do gene SRY em casos de disgenesia gonadal XY / José Luiz Rosenberis Cunha Júnior. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadora: Maricilda Palandi de Mello. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Disgenesia gonadal. 2. Genes sry. 3. Diferenciação dos sexos. 4. Mutação (Biologia). 5. Análise funcional. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: SRY gene mutation analysis and functional effects in cases of XY gonadal dysgenesis.

Palavras-chave em inglês: Gonadal dysgenesis; Sry genes; Sex differentiation; Mutation (Biology); Functional analysis.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maricilda Palandi de Mello, Adriano Rodrigues Azzoni, Luciana Campos Paulino.

Data da defesa: 25/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 25 de fevereiro de 2010

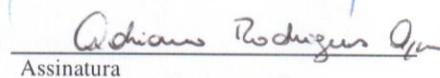
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni



Assinatura

Profa. Dra. Luciana Campos Paulino



Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Alexandrino

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Assinatura

"O essencial é invisível aos olhos..."

Antoine de Saint-Exupéry

"Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre..."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Professora Dra. Maricilda pela confiança e pela oportunidade de desenvolver um projeto que para mim foi muito desafiador, e que me proporcionou um grande aprendizado. Não só acadêmico, mas sim um aprendizado de vida, trazido pela convivência com um ser humano tão bom e exemplar quanto a Professora!

À Professora Dra. Edi Sartorato, por ter me acolhido no Laboratório de Genética Humana e proporcionado toda a base de meus conhecimentos.

Ao Professor Dr. Celso Benedetti, por aceitar a co-orientação, pelas diversas dicas e conselhos valiosos para o andamento e conclusão do projeto. Agradeço também por ceder gentilmente a estrutura de seu laboratório no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) para a realização de diversos procedimentos.

À minha co-orientadora, Dra. Fernanda Caroline Soardi, ou simplesmente Fer II... foi com você que aprendi praticamente TUDO o que era necessário para realizar o projeto. Muito obrigado pela paciência, pelas cobranças na hora certa, pelo incentivo e por ser a profissional exemplar que você é!

Ao Renan, que em sua iniciação científica ajudou muito a concluir uma das etapas do projeto. Muito obrigado pelo companheirismo nos diversos problemas enfrentados! Desejo muito sucesso em sua nova jornada!

Aos amigos moradores e ex-moradores da Gloriosa República Subako de Kobra, por todos os momentos inesquecíveis desde 2003: Roger (Skol), Marcos (Borghe), Luís (Wando), Arian (Lemão), Pedro (Pepa), Gustavo (Amizade), Maurício (Cabelo), Portuga, Emerson (Creyto), Marcos (Toty), Guilherme (Kbça), Tiago (Padre), Marco Antônio (Remédio),

Edson (Menga), Erich (Erich), Augusto (Kid), Norivaldo (Nori), Diogo (Revertério), Tiago (Banana), Adriano (Mandrake), Benito (Azeite), Lucas, Subakinho e Gorda.

Aos meus bons e velhos amigos de Sampa, cuja amizade de longa data faz muito parte de tudo o que sou hoje em dia: Daniel, Virgínia, Pablo, Paola, Rachel, Cláudio, Zahi-êni, Paolo, Luís e Bruno (*in memorian*).

À Dani... uma pessoa muito especial! Obrigado primeiramente pelo auxílio com a modelagem da proteína. Mas agradeço principalmente por ter me tornado uma pessoa melhor... e por ser tudo o que você é!

Aos meus primos, primas, tios e tias, espalhados por aí, obrigado por tantos momentos maravilhosos que só os momentos em família podem proporcionar.

Aos amigos e colegas da turma de Biologia 02N. Cada um tomou seus rumos, vejo alguns ainda de vez em quando, mas nunca vão deixar de ser especiais e parte das lembranças da melhor época de minha vida! Desejo muito sucesso pra todos vocês!

A todos os meus professores do curso de biologia e do mestrado, por terem construído os meus conhecimentos e minha paixão pela mais perfeita das ciências.

Às secretárias do CBMEG, as super-competentes e charmosas Sandra e Tânia! Obrigado pela ajuda em todos esses anos!

Aos demais funcionários do CBMEG, que estão ou já passaram por lá: Andressa, Andreza, Cidinha... e todos os outros!

Aos professores participantes da qualificação, pré-banca e banca, pela grande contribuição.

Aos enfermeiros, médicos e estudantes envolvidos nesta pesquisa.

Aos pacientes e famílias, sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado. Permanece a esperança que um dia possamos fornecer-lhes respostas e soluções que amenizem as dificuldades que enfrentam.

Aos colegas e professores do CBMEG, muito obrigado pela amizade e “empréstimos”! Ao pessoal do Laboratório da Dra. Anete (Marcelo, Dilaine, Adriano, etc.), muito obrigado também pelas diversas dicas!

À impagável Madá... que tanta falta faz...

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”, frase do pensador chinês Confúcio. Agradeço aos amigos que estão ou já passaram pelo Laboratório de Genética Humana, e tornaram esses anos de trabalho tão especiais, as tristezas e decepções menos amargas e as alegrias e realizações mais doces: primeiramente aos Bazukas (Paulo, Creito, Diego); Flávia Elfo, Ana Letícia, Flávia Flor, Daiane, Xuxa, Denise, Carol-PR, Priscila, Nathy Graviola, Mari Codorna, Carolzinha, Prizinha, Creuza, Creidy, Milena, Bruna, Vanzuda, Suelosa, Paula, Jéssica, Frau, Gilmar, Reginaldo, Renan, Victor, Rodrigo, Luiz Eduardo (Wando), Tércio, Eduardo (Fido), DaniBoy, Rock, FerI, Fer II, Fer III, Fer IV, Mara Guaraná, Luli, Débora, Helena, Cíntia, Ju Magal, Pri II, Renata, Vanessinha, Gleice, Carol Lincoln, Rose, Renata, Regiane, Dra. Juliana, Mariana, Thalita, Uiara, Marcinha, Fran, Carlinha, Tammy, Carla, Camila, Lucy... Provavelmente estou esquecendo alguns nomes, mas muito obrigado a todos pelos bons momentos e pela amizade!

Às agências financiadoras CNPq e FAPESP.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta Tese.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, José e Ana...

Por me darem a vida... me ensinarem a vivê-la com dignidade... iluminarem os meus caminhos... pelo inexplicável amor!

Aos meus queridos avós, Irene e José Pereira (in memoriam), e à Tatá...

Pelo carinho e amor incondicionais... pelo grande exemplo que sempre foram para mim... muito do que tem de bom em mim veio de vocês!

À Rachel...

Minha querida e eterna irmãzinha... me orgulho muito de você!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIX
RESUMO	XXIII
ABSTRACT	XXV
INTRODUÇÃO	27
1. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL	28
2. O GENE E A PROTEÍNA SRY	33
3. SRY E A COMPLEXIDADE DA DETERMINAÇÃO SEXUAL	37
4. DISGENESIA GONADAL 46,XY E SRY	42
5. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE SRY	44
6. O FATOR DE TRANSCRIÇÃO SPI	46
OBJETIVOS	49
1. OBJETIVOS GERAIS	50
CASUÍSTICA E MÉTODOS	51
1. CASUÍSTICA	52
2. MÉTODOS	56
2.1 Sequenciamento Do Gene SRY	56
2.1.1 Reação de Sequenciamento	56
2.1.2 Purificação da reação de sequenciamento	57
2.1.3 Sequenciamento da reação purificada	57
2.2 Expressão De Proteína Sry Mutante E Verificação De Sua Interação Com Dna Por Ensaio De Emsa	58
2.2.1 Amplificação e purificação dos genes SRY controle e mutante	58
2.2.2 Clonagem pGEM-T Easy	59
2.2.3 Preparo de células competentes DH5 α para transformação química (PEG)	59
2.2.4 Transformação da Ligação Inserto + pGEM-T Easy	61

2.2.5 Isolamento das colônias recombinantes e confirmação da clonagem dos insertos	62
2.2.6 Minipreparação dos plasmídios pGEM-T Easy recombinantes	63
2.2.7 Sequenciamento dos plasmídios extraídos	64
2.2.8 Digestão e subclonagem no vetor pET28a	65
2.2.9 Transformação da ligação fragmento SRY+ pET28a	67
2.2.10 Isolamento das colônias recombinantes e confirmação da clonagem dos insertos.....	67
2.2.11 Minipreparação dos plasmídios pET28a recombinantes e sequenciamento dos plasmídios extraídos	67
2.2.12 Transformação vetor pET28a recombinante na linhagem BL21DE3	67
2.2.13 Isolamento das colônias recombinantes e confirmação dos insertos.....	68
2.2.14 Teste de expressão em pequena escala.....	68
2.2.15 Preparo das amostras e eletroforese SDS-PAGE	68
2.2.16 Teste de solubilidade da proteína SRY.....	69
2.2.17 Extração da proteína SRY em larga escala.....	70
2.2.18 Purificação proteína SRY	71
2.2.19 Ensaio de EMSA	72
2.3 Estudo In Silico Da Proteína Sry Mutante E89k	75
2.4 Ensaio De Emsa Com Fator De Expressão Sp1	76
2.4.1 Síntese dos oligonucleotídeos.....	76
2.4.2 Ligação das sondas	77
2.4.3 Marcação das sondas.....	77
2.4.4 Purificação das sondas.....	78
2.4.5 Preparação do gel.....	78
2.4.6 Reação de Ligação (Reação Shift).....	78
2.4.7 Eletroforese.....	79
2.4.8 Pós-eletroforese	79
2.5 Avaliação De Expressão Com Gene Repórter - Região Promotora Sry	79
2.5.1 Amplificação do promotor do gene SRY	80
2.5.2 Clonagem no vetor pGEM-T Easy	81
2.5.3 Digestão e sub-clonagem nos vetores de expressão pGL3.....	82
2.5.4 Obtenção das construções para transfecção.....	84
2.5.5 Cultivo Celular e Transfecção das células Hela	84
2.5.6 Quantificação da expressão e atividade da luciferase	86

RESULTADOS.....87

1. SEQUENCIAMENTO DO GENE SRY EM NOVOS PACIENTES COM DG.....	88
2. EXPRESSÃO DE PROTEÍNA SRY E89K MUTANTE E VERIFICAÇÃO DE SUA INTERAÇÃO COM DNA POR ENSAIO DE EMSA	89
2.1 Expressão E Purificação Da Proteína Sry Normal E Mutante	90
2.2 Ensaio De Emsa Com As Proteínas Sry Normal E Mutante	95
3. ANÁLISE IN SILICO DA PROTEÍNA SRY MUTANTE E89K	96

<i>4. ENSAIO DE EMSA - FATOR SPI</i>	<i>100</i>
<i>5. ENSAIO DE EXPRESSÃO COM GENE REPÓRTER</i>	<i>105</i>
DISCUSSÃO	109
<i>1. SEQUENCIAMENTO DO GENE SRY EM NOVOS PACIENTES COM DISGENESIA GONADAL</i>	<i>110</i>
<i>2. EXPRESSÃO DE PROTEÍNA SRY E89K MUTANTE E VERIFICAÇÃO DE SUA INTERAÇÃO COM DNA POR ENSAIO DE EMSA</i>	<i>110</i>
<i>3. ANÁLISE IN SILICO DA PROTEÍNA SRY MUTANTE E89K</i>	<i>112</i>
<i>4. ENSAIO DE EMSA - FATOR SPI</i>	<i>114</i>
<i>5. ENSAIO DE EXPRESSÃO COM GENE REPÓRTER</i>	<i>116</i>
CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	121
ANEXOS	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição clínica dos indivíduos analisados no projeto	555
Tabela 2. Resumo dos diagnósticos clínicos e dos achados moleculares no gene <i>SRY</i>	889
Tabela 3. Resultados das médias dos experimentos de transfecção transiente em células HeLa.	105

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Visão geral da diferenciação gonadal.	29
Figura 2. Formação dos genitais internos, à partir da diferenciação gonadal.	30
Figura 3. Formação dos genitais externos, à partir da diferenciação gonadal.....	31
Figura 4. Quadro síntese da diferenciação sexual masculina, desencadeada pelos hormônios testiculares.	32
Figura 5. Abordagem computacional da proteína SRY ligada ao DNA.	34
Figura 6. Modelo da estrutura resolvida por RMN da <i>HMG-Box</i> de SRY ligada ao DNA.	35
Figura 7. Modelo simplificado da “cascata” de genes envolvidos na determinação do sexo, e patologias decorrentes de distúrbios no processo de determinação e diferenciação gonadal.	42
Figura 8. Diagrama esquemático de um <i>zinc-finger</i> do tipo C2H2.....	46
Figura 9. Representação de um complexo entre o fator Sp1 e o DNA, contendo os 3 domínios <i>zinc-finger</i>	47
Figura 10. Heredograma da paciente com disgenesial gonadal completa 46,XY.	52
Figura 11. Alinhamento da região promotora do gene <i>SRY</i>	53
Figura 12. Ilustração do sequenciamento automático evidenciando a mutação e a troca de aminoácidos, assim como a localização da mutação na proteína SRY.	54
Figura 13. Construções I e II.....	83
Figura 14. Construções III e IV.....	83
Figura 15. Vetor de expressão pGL3-Control, utilizado como controle positivo.	85
Figura 16. Vetor de expressão pGL3-Basic, utilizado como controle negativo.....	85
Figura 17. Vetor de expressão RL-TK, utilizado como controle interno do experimento de transfecção.....	86
Figura 18. Comparação da seqüência com a mutação Glu89Lys com a seqüência normal presente nos familiares e nos pacientes analisados..	88
Figura 19. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células <i>E. coli BL21DE3</i> transformadas com o vetor de expressão pET28a (Teste tempo de indução)..	90

Figura 20. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células <i>E. coli BL21DE3</i> transformadas com o vetor de expressão pET28a (Teste concentração de IPTG).....	91
Figura 21. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células <i>E. coli BL21DE3</i> transformadas com o vetor de expressão pET28a (Teste de Solubilidade).....	92
Figura 22. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células <i>E. coli BL21DE3</i> transformadas com o vetor de expressão pET28a (Teste purificação).. ..	93
Figura 23. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células <i>E. coli BL21DE3</i> transformadas com o vetor de expressão pET28a (Purificação em larga escala).....	94
Figura 24. Ensaio de EMSA, testando a capacidade de ligação das proteínas SRY selvagem e mutante ao DNA.....	95
Figura 25. Modelo da <i>HMG-Box</i> de SRY complexada com o DNA	96
Figura 26. Modelo 1J46.pdb, representando a <i>HMG-Box</i> da proteína SRY selvagem, alinhado com a modelo gerado da proteína SRY mutante E89K.....	97
Figura 27. Gráfico de contatos internos perdidos ou estabelecidos pelas trocas de aminoácidos (fornecido pelo programa <i>STING</i>).....	98
Figura 28. Gráfico de contatos internos (fornecido pelo programa <i>STING</i>) verificando o efeito da nova interação estabelecida entre o aminoácido mutante lisina (K) na posição 89 e o aminoácido asparagina (N) na posição 87.	99
Figura 29. Análise de conservação do aminoácido ácido glutâmico (K) na posição 89 da proteína SRY.	100
Figura 30. Ensaio de EMSA com o fator Sp1	101
Figura 31. Ensaio de EMSA com o fator Sp1	102
Figura 32. Ensaio de EMSA com o fator Sp1	103
Figura 33. Ensaio de EMSA com o fator Sp1	104
Figura 34. Atividade da luciferase apresentada pelas construções gênicas e controles em células HeLa.	106
Figura 35. Atividade relativa da luciferase apresentada pelas construções gênicas e controles em células HeLa.....	107

Figura 36. Relação Firefly/Renilla, normalizando a média dos dados obtidos com os vetores experimentais pGL3 com a média dos dados obtidos com vetor controle pRL-TK	108
Figura 37. Resíduo de isoleucina (branco) na posição 90, formando complexo na junção das α -hélices 1 e 2.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	albumina sérica bovina
β-gal	β-galactosidase
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CO₂	dióxido de carbono
Control	controle
DG	disgenesia gonadal
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamono tetracético
EMSA	<i>electrophoresis mobility shift assay</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
Glu	aminoácido ácido glutâmico
°C	graus Celsius
HAM	hormônio anti-Mulleriano
HCl	ácido clorídrico
HeLa	linhagem de células imortal, derivada de células de um câncer cervical da paciente Henrietta Lacks
HSSP	<i>homology-derived secondary structure of proteins database</i>
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
KCM	tampão cloreto de potássio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio
KTS	domínio do fator de transcrição WT1, formado pelos resíduos lisina (K), treonina (T) e serina (S)
LH	hormônio luteinizante
LB	Meio Luria-Bertani
Lys	aminoácido lisina
μg	micrograma
μL	microlitro

μM	micromolar
M	molar
MgCl₂	cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mUI/mL	miliunidades/militro
N	Normal
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NR	<i>normal range</i>
NT2-D1	linhagem celular Ntera2/clone D1, derivada de uma carcinoma testicular embrionário
OD	<i>optical density</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	pares de base
PBS	solução tampão fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	polietilenoglicol
pM	picomolar
K⁺	potássio
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SF1	<i>steroidogenic factor-1</i>
SOX9	<i>SRY (sex determining region Y) - box 9</i>
SP1	<i>Sp1 transcription factor</i>

SRY	<i>sex determining region Y</i>
STING	<i>Sequene To and withIN Graphics</i>
SV40	promotor do <i>Simian virus 40</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
TBE	Tris - Borato – EDTA
TDF	<i>Testis Determining Factor</i>
TE	Tris - EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade
ULR	Unidade Relativa de Luz
WT1	<i>Wilms' tumor suppressor gene</i>
X-Gal	bromo-cloro-indolil-galactopiranosídeo

RESUMO

A expressão do gene *SRY* (*Sex Determining Region in chromosome Y*) é responsável por desencadear a determinação testicular durante o desenvolvimento embrionário, a partir das gônadas ainda indiferenciadas. Mutações nesse gene são encontradas em muitos casos de anomalias do desenvolvimento gonadal. O projeto teve por objetivo principal a análise funcional do efeito de uma mutação na região promotora do gene *SRY*, sendo que essa mutação consiste em uma deleção de 3 pares de base em um dos sítios consenso de ligação do fator de transcrição Sp1 ao promotor do gene. O portador dessa mutação é um indivíduo com disgenesia gonadal pura 46,XY, sendo que outros membros da família apresentavam ambiguidade genital e o pai, também portador da mutação, possuía grave hipospádia ao nascimento.

Para tentar esclarecer os efeitos desta mutação nos mecanismos moleculares de regulação da expressão do gene *SRY*, este trabalho primeiramente analisou a interação da proteína Sp1 com os sítios localizados na região promotora de *SRY* e o efeito da mutação nesta interação, através de ensaios de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Concluiu-se que os sítios Sp1A e Sp1B se ligam a duas moléculas de Sp1 e que a mutação no Sp1A praticamente abole esta ligação. Possivelmente a ausência dessa ligação impediu a formação de um complexo de transcrição, causando uma diminuição na expressão do gene *SRY* e levando à ausência de formação dos testículos e reversão sexual completa na paciente. Complementando, foi analisado o efeito dessa mutação na expressão através de ensaio de expressão com gene repórter, no qual o promotor normal se mostrou em média duas vezes mais eficiente na ativação da expressão da luciferase que o promotor mutante. Entretanto, mais experimentos de transfecção, inclusive com outras linhagens celulares, devem ser realizados para confirmação desse resultado.

Além disso, foi analisado o efeito de uma nova mutação (localizada na região codificante do gene *SRY*) na ligação da proteína SRY com o DNA, através de ensaios de EMSA. Concluiu-se que a mutação E89K, associada com disgenesia gonadal pura 46,XY, reduziu em alto nível a atividade de ligação *in vitro* da proteína SRY mutante ao DNA, o que representa um forte indício de que atividade reduzida da proteína mutante não foi suficiente para desencadear o processo de determinação testicular. Paralelamente, foi feito o rastreamento de mutações no gene *SRY* e sua região promotora em novos casos de disgenesia gonadal, não tendo sido encontradas, porém, alterações nos pacientes analisados.

ABSTRACT

The *SRY* (Sex Determining Region in chromosome Y) gene expression is responsible for testicular determination during embryonic development. Mutations in *SRY* are found in many cases of anomalies of gonadal development. This project analyzed the functional effect of a mutation in *SRY* promoter region; the mutation is a 3-bp deletion in a consensus binding site for Sp1 transcription factor. The patient presented 46,XY pure gonadal dysgenesis, and a family history of relatives with different levels of genital ambiguity. Her father shares the same mutation in the *SRY* promoter region.

In order to investigate the effects of the mutation upon the molecular mechanisms that regulate *SRY* gene expression, the interaction of the Sp1 transcription factor with normal and mutant binding sites was analyzed by EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Each of Sp1A and Sp1B normal sites binds to a single Sp1 molecule, whereas the 3-bp deletion in Sp1A abolishes the binding to this site. Probably, the lack of Sp1 binding to the Sp1A site prevented the formation of a stable transcription complex, reducing the level of *SRY* expression and leading to the absence of testicles and complete sex reversal in the patient. Parallely, the effect of the mutation was analyzed by a reporter gene assay, indicating that the normal promoter is almost two times more efficient than the mutant promoter in the activation of luciferase gene expression using HeLa cells. However, further transfection experiments with other cell lineages must be performed to confirm this result.

In addition, the effect of a new mutation (E89K, located in the *SRY* gene coding region) was analyzed by testing the ability of the SRY mutant protein to bind its DNA consensus sequence. EMSA assays revealed that the E89K mutation, which is associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis, strongly reduced the SRY protein binding activity *in vitro*. This result is a strong evidence that the reduced activity of SRY mutant protein was not sufficient to trigger the testicular determination in the patient, leading to the pure gonadal dysgenesis phenotype.

Screening of mutations in the *SRY* gene coding and promoter regions was also performed in six different patients with 46,XY gonadal dysgenesis. However, other mutations have not been identified.

INTRODUÇÃO

1. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

Nos mamíferos a determinação do sexo é estabelecida no momento da fertilização através da herança de um cromossomo X ou Y paterno. O cariótipo 46,XY corresponde ao sexo masculino, enquanto o cariótipo 46,XX corresponde ao sexo feminino. Apesar do sexo cromossômico já estar definido no zigoto, o dimorfismo sexual não é observado em embriões humanos com menos de 7 semanas. A partir daí, as gônadas diferenciam-se em testículos nos embriões portadores do cromossomo Y ou em ovários na ausência deste (Jost *et al.*, 1973).

O evento principal na determinação sexual é a especialização das gônadas, sendo que as demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários devidos a hormônios produzidos por elas. Sendo assim, a expressão “determinação sexual” é utilizada para definir a soma dos processos de determinação do sexo genético e diferenciação das gônadas, enquanto que “diferenciação sexual” refere-se às ações hormonais específicas subsequentes à determinação que levam ao fenótipo sexual de cada indivíduo (Goodfellow & Darling, 1988), contribuindo para o desenvolvimento dos genitais externos e internos e para o amadurecimento sexual na puberdade. No modelo clássico da determinação sexual, é afirmado que no primeiro estágio do desenvolvimento sexual (determinação sexual primária), o sexo é definido pela presença (nos homens) ou ausência (nas mulheres) de um fator genético presente no cromossomo Y, denominado TDF (*Testis Determining Factor*), que atuando na gônada indiferenciada leva ao seu desenvolvimento em testículo (Jost *et al.*, 1973). Após quase duas décadas de estudo e contínuos refinamentos no mapeamento do cromossomo Y em pacientes com reversão sexual (homens XX ou mulheres XY), chegou-se ao resultado de que o TDF seria o gene *SRY* (*Sex determining Region on the Y chromosome*) (Berta *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990).

A função principal da proteína SRY é acionar na gônada primordial a diferenciação das células de Sertoli, que é um dos primeiros indícios morfológicos da diferenciação sexual masculina (*Figura 1*).

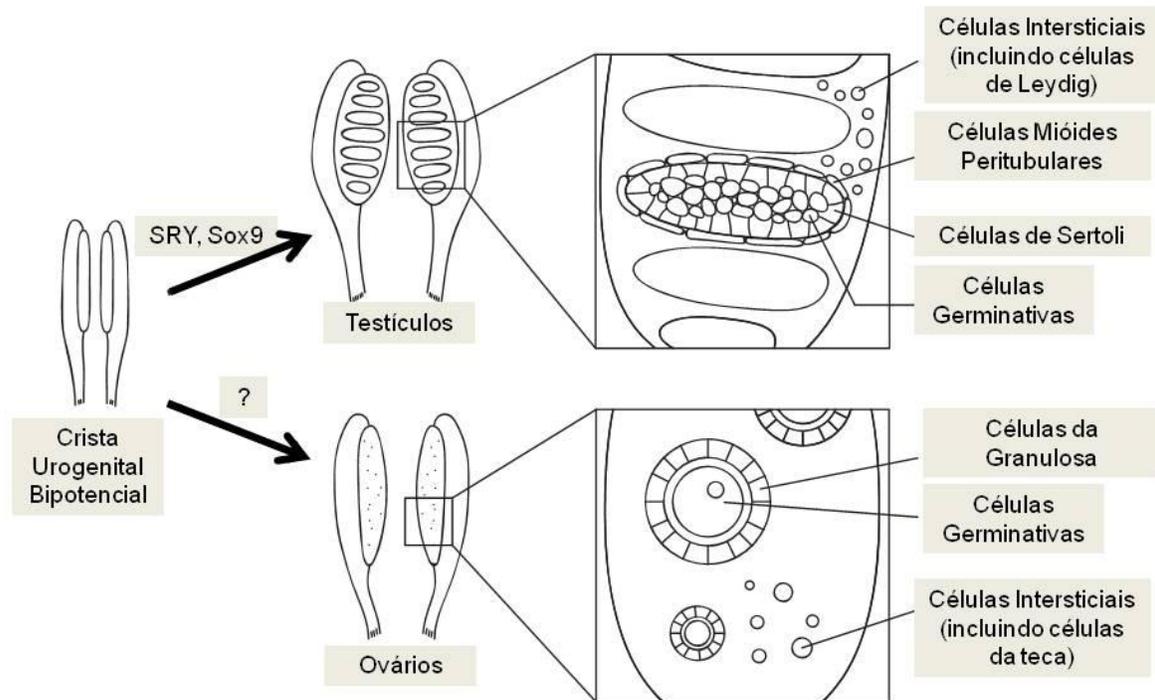


Figura 1. Visão geral da diferenciação gonadal. As gônadas se desenvolvem à partir de estruturas embrionárias denominadas cristas urogenitais. Sob a influência de *SRY*, as cristas urogenitais masculinas se diferenciam em testículos, que contém cordões transversais constituídos por diferentes tipos celulares, incluindo as células de Sertoli, células germinativas e células mióides peritubulares. Entre esses cordões, no interstício, outros tipos celulares, como as células de Leydig, são encontrados. Se o *SRY* não está presente, ou não atua corretamente, as cristas urogenitais começam a se diferenciar em ovários, nos quais as células germinativas são rodeadas por células da granulosa para formar os folículos, que são rodeados por células intersticiais, como as células da teca. Modificado de Koopman, 2009.

As células de Sertoli produzem o hormônio anti-mulleriano (HAM), que induz a regressão dos dutos de Muller (dutos femininos). Por sua vez, as células de Leydig (que aparecem após uma semana do início da determinação) produzem a testosterona, que induz

a estabilização dos dutos de Wolff (dutos masculinos), que dão origem à maior parte da genitália masculina interna (epidídimo, canal deferente, vesícula seminal e duto ejaculatório) (*Figura 2*).

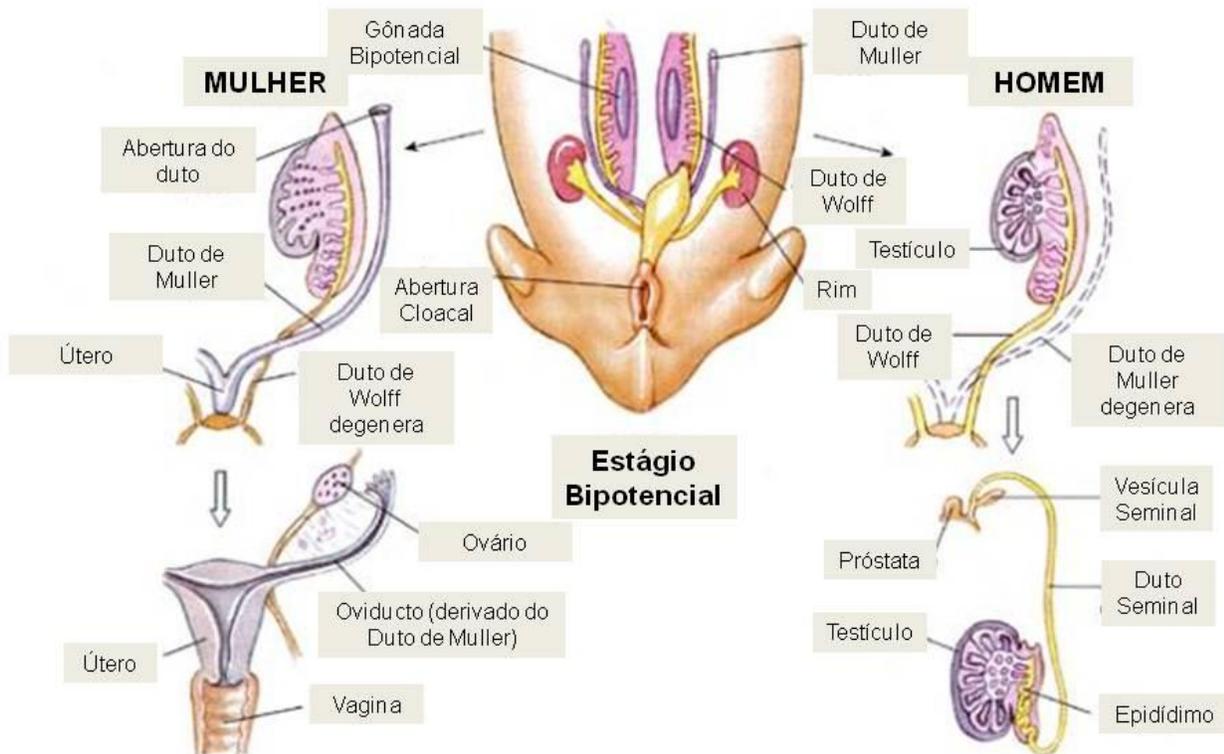


Figura 2. Formação dos genitais internos, à partir da diferenciação gonadal. Modificado do site www.uh.edu/~tgill2

A testosterona é subsequentemente convertida em diidrotestosterona, forma mais potente que viriliza os genitais externos (pênis e bolsa escrotal) (*Figura 3*).

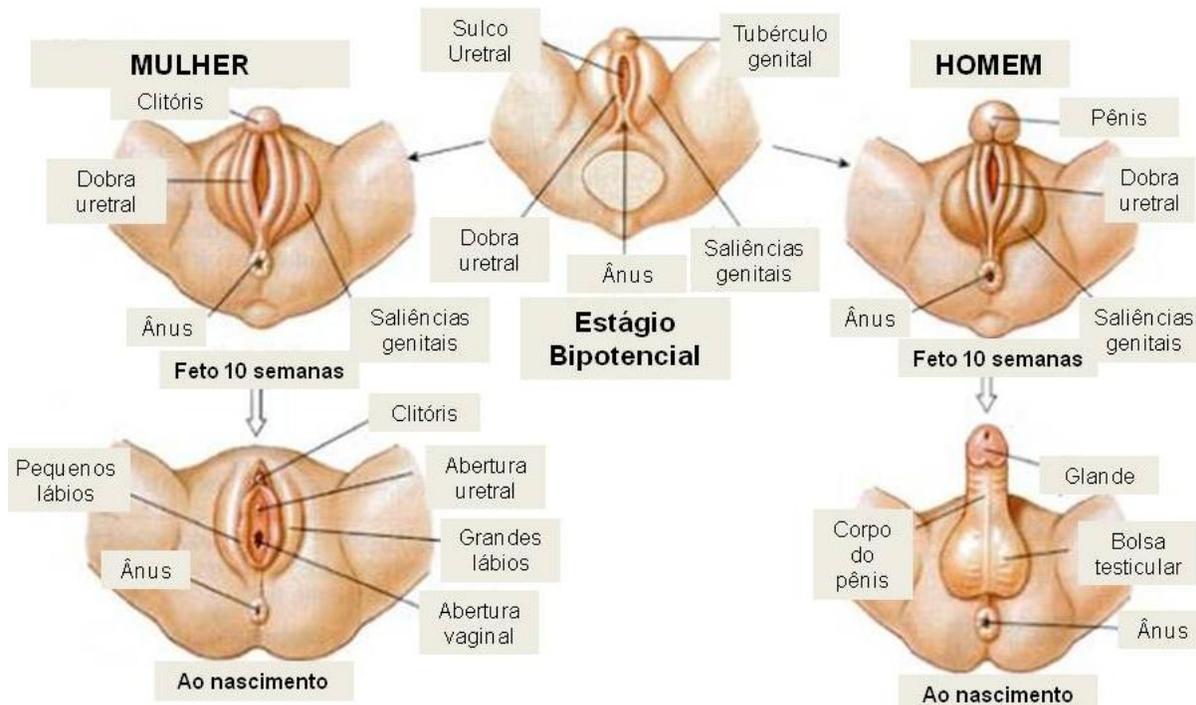


Figura 3. Formação dos genitais externos, à partir da diferenciação gonadal. Modificado do site www.uh.edu/~tgill2

Portanto, a diferenciação sexual masculina propriamente dita, isto é, a masculinização dos primórdios dos genitais internos e externos, tem início a partir da produção de hormônios androgênicos pelas células de Leydig entre a oitava e a nona semana de gestação (*Figura 4*); segundo este modelo, na ausência dos hormônios testiculares desenvolve-se o fenótipo feminino (Moore, 1978; Grumbach, 1960; Josso, 1992).



Figura 4. Quadro síntese da diferenciação sexual masculina, desencadeada pelos hormônios testiculares.

Atualmente vêm sendo propostos novos modelos para a determinação e diferenciação sexual. Num modelo proposto por Blecher & Erickson (2007), há vários pontos divergentes do modelo original. Inicialmente, eles afirmam que o dimorfismo sexual ocorre antes do que o previamente estipulado, e precede o desenvolvimento das gônadas. Esse dado é apoiado por diversos trabalhos, que encontraram padrões de expressão gênica muito diferentes entre gônadas ainda indiferenciadas de embriões de camundongos machos e fêmeas (Beverdam & Coopman 2005). Além disso, é refutado o conceito de que os fatores de determinação sexual estão envolvidos somente no destino da gônada, sendo proposta uma influência sobre a diferenciação sexual secundária, inclusive em órgãos não-sexuais (Blecher & Erickson, 2007).

O principal ponto de divergência entre o modelo original de Jost e o novo modelo proposto por Blecher & Erickson, é que o modelo atual refuta o conceito do

desenvolvimento feminino ocorrer *by default*, e afirma que devem haver mecanismos masculinos (ligados ao cromossomo Y) e femininos (ligados aos dois cromossomo X) de determinação sexual. Cederroth e colaboradores (2007) afirmam que é evidente que o desenvolvimento ovariano é um processo ativo, que envolve a interação de múltiplas cascatas de sinalização. Foram identificados alguns genes ligados ao desenvolvimento dos ovários, como o *Wnt4* e o *Foxl2*, mas ainda há divergências sobre qual seria o determinante feminino. A inativação dos genes *Wnt4* e *Foxl2* produz diferenciação testicular em camundongos XX, o que sugere que esses genes são requeridos para iniciar ou manter os aspectos principais da diferenciação sexual feminina (Ottolenghi *et al.*, 2007). Desse modo, eles constituem fortes candidatos a fatores da determinação sexual feminina, assim como o *SRY* é o fator preponderante da masculina.

2. O GENE E A PROTEÍNA SRY

O gene *SRY*, localizado no braço curto do cromossomo Y (Vergnaud *et al.*, 1986; Berta *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991), é o responsável pelo desencadeamento do desenvolvimento testicular (Berta *et al.*, 1990). A proteína codificada pelo *SRY* exibe alta similaridade com a proteína Mc, necessária para a fissão de leveduras, e com proteínas nucleares não histônicas HMG1 e HMG2 (*High Mobility Group* 1 e 2) que, ligando-se ao DNA, atuam como fatores de regulação da transcrição (Sinclair *et al.*, 1990). O gene consiste de um único éxon e codifica uma proteína de 204 aminoácidos, sendo que 79 resíduos formam o domínio altamente conservado *HMG-Box*, que caracteriza a proteína *SRY* como um fator de transcrição, com capacidade de ligação (*Figura 5*) ao DNA (Behlke *et al.*, 1993; Giese *et al.*, 1994; Harley *et al.*, 1992; Su & Lau, 1993).

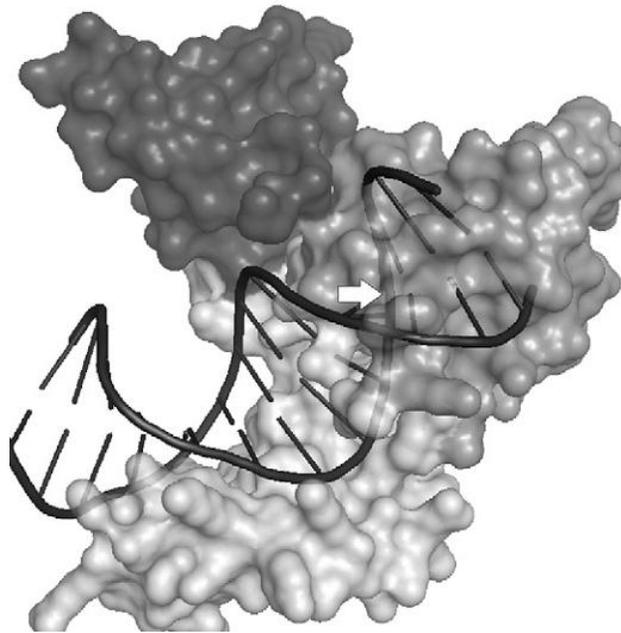


Figura 5. Abordagem computacional da proteína SRY ligada ao DNA. As regiões amino-terminal (cinza escuro), *HMG-Box* (cinza claro) e carboxi-terminal (cinza médio) são observadas. As regiões carboxi-terminal e *HMG-Box* interagem com a estrutura de uma molécula de DNA (seta branca) (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009)

Um estudo recente propõe uma hipótese para a origem do gene *SRY* humano. Segundo esta hipótese, o *SRY* seria um gene híbrido, gerado pela inserção de uma parte do gene *DGCR8 upstream* ao *HMG-Box* do gene *SOX3*. Essa sequência inserida teria constituído um elemento regulador e também complementado a sequência codificante, formando assim o gene *SRY* humano. A evolução e especialização do gene *SRY* humano como gene da determinação sexual foi dessa forma alcançada por um ganho de função, desenvolvido pela mudança das sequências-alvo e da afinidade de ligação ao DNA da proteína SRY (Sato *et al.*, 2009).

Algumas mutações dentro do domínio *HMG-Box* estão associadas com reversão do sexo fenotípico em indivíduos 46,XY e diminuem a capacidade de ligação da proteína SRY ao DNA (Harley *et al.*, 1992; Assumpção *et al.*, 2002). Com a intensificação dos estudos,

descobriu-se que este domínio não somente permite a ligação ao DNA, mas também induz neste um dobramento (Ferrari *et al.*, 1992; Giese *et al.*, 1992) (*Figura 6*). Isto sugere que esta proteína possa atuar influenciando a estrutura da cromatina e regulando a expressão gênica através da justaposição de sítios distantes na hélice de DNA. A importância desse dobramento para a função da SRY foi comprovada pelo achado de mutações que não afetam a capacidade de ligação da proteína ao DNA, mas alteram o ângulo de dobramento que ela induz (Pontiggia *et al.*, 1994).

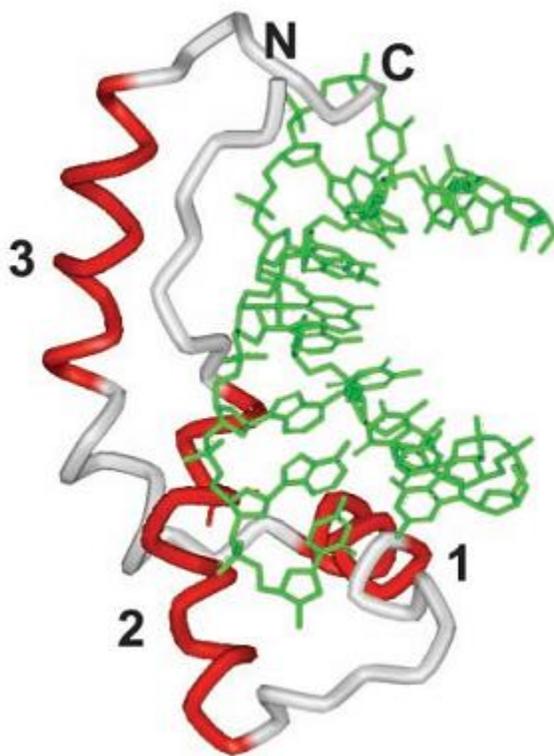


Figura 6. Modelo da estrutura resolvida por RMN da *HMG-Box* de SRY ligada ao DNA. A estrutura mostra as 3 α -hélices do domínio HMG e sua conformação em L, se ligando ao sulco menor do DNA, causando dobramento e relaxamento da cadeia. (Harley *et al.*, 2003)

É mais provável que os eventos de ligação e dobramento do DNA ocorram em duas etapas separadas. A deformação do DNA parece ter também um papel importante na especificidade da ligação da proteína SRY ao DNA alvo, já que a deformação que ocorre

no DNA nos primeiros estágios da aproximação da proteína é uma maneira ideal de indiretamente testar a sequência de bases da sequência-alvo no DNA (Bouvier & Lavery, 2009).

Além das sequências de ligação há dois sítios de sinalização nuclear independentes nas extremidades do *HMG-Box* (Poulat *et al.*, 1995; Sudbeck & Scherer, 1997). Mutações na porção C-terminal do domínio HMG comprovadamente afetam a localização nuclear da proteína SRY, apesar de não alterarem sua capacidade de se ligar ao DNA e/ou dobrá-lo (Li *et al.*, 2001). Entretanto, foi afirmado por Sánchez-Moreno e colaboradores (2008) que a proteína SRY inteira é necessária para a ligação completa ao DNA e, que os domínios N e C-terminal são essenciais, sendo que, inclusive, apresentam capacidade de ligação ao DNA mesmo sem o domínio *HMG-Box*. Em recente trabalho (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009), o mesmo grupo de pesquisa demonstra, através de análises funcionais e *in silico* de uma mutação no domínio C-terminal na proteína SRY, que a região carboxi-terminal da proteína é importante para a atividade de ligação e também interage com o DNA.

As modificações pós-traducionais são importantes para a função da proteína SRY, já que a fosforilação dos fatores de transcrição em geral pode afetar sua localização nuclear, sua capacidade de ligação ao DNA ou sua capacidade de trans-ativação. Na porção N-terminal da proteína SRY estão localizados resíduos de serina que são fosforilados por quinases dependentes de c-AMP e, esse processo aumenta a atividade de ligação da proteína ao DNA (Desclozeaux *et al.*, 1998b). Um estudo recente utilizando inibidores de metiltransferases indica que a metilação do DNA é necessária para a formação das células de Sertoli (Mikuzami *et al.*, 2008). A acetilação é outro exemplo de modificação para regular a atividade gênica. A proteína SRY interage com a p300 acetilase tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta interação leva à acetilação de uma Lisina (K136), o que modifica a sublocalização nuclear da proteína (Thevenet *et al.*, 2004).

O balanço fino entre importação e exportação nuclear determina os níveis de *SRY* transcricionalmente ativo no núcleo; recentemente, evidenciou-se que modificações pós-traducionais na proteína SRY interferem na sua capacidade de transporte nuclear, o que leva a crer que muitas mutações nesse gene em pacientes com desordens do desenvolvimento sexual podem estar afetando sítios desconhecidos de ubiquitinação,

acetilação, metilação, fosforilação e outras modificações essenciais para o transporte e função da proteína (Sim *et al.*, 2008). Uma mutação que levou à uma troca de aminoácidos no sítio de localização nuclear da proteína SRY foi encontrada em uma paciente com disgenesia gonadal completa 46,XY. Estudos funcionais revelaram que a mutação reduziu em 50% a quantidade de proteína SRY no núcleo das células (Hersmus *et al.*, 2009).

Sugere-se que a SRY, como qualquer proteína do tipo HMG, deva regular a expressão através de efeitos na arquitetura do DNA, favorecendo a formação de complexos regulatórios e propiciando a manutenção da estabilidade cinética de tais complexos (Pontiggia *et al.*, 1994; Ukiyama *et al.*, 2001).

Além dessa função principal na determinação sexual, vários outros papéis estão sendo propostos para a proteína SRY. Há muitas evidências que mostram que a expressão da proteína SRY ocorre no cérebro, rim e glândula adrenal de camundongos e ratos machos adultos, o que sugere uma atuação da proteína no sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina que controla a pressão arterial, regulação dos receptores de andrógenos e fisiologia da próstata (Ely *et al.*, 2008).

3. SRY E A COMPLEXIDADE DA DETERMINAÇÃO SEXUAL

Apesar do gene *SRY* ser desencadeador de todo o processo de determinação sexual, a sua expressão individual não consegue determinar a formação de gônadas masculinas normais, como é mostrado em trabalho recente (Ishii *et al.*, 2007). Há um grande grupo de evidências que indica que a determinação e a diferenciação sexual são processos muito mais complexos, e que deve haver um número ainda indefinido de genes autossômicos ou ligados aos cromossomos sexuais que atuam antes (*upstream genes*) e depois (*downstream genes*) da determinação testicular, formando uma verdadeira cascata de transcrição (MacLaughlin & Donahoe, 2004).

Antes da determinação sexual mediada pelo *SRY*, em embriões humanos com 4 semanas de gestação se inicia a formação das gônadas bipotentes, mediada principalmente pelo fator de transcrição WT1 (*Wilms Tumor suppressor locus – gene1*), essencial para o desenvolvimento renal e gonadal em mamíferos (Pritchard-Jones *et al.*, 1990) e pelo

receptor nuclear SF-1 (*Steroidogenic Factor – 1*), essencial para o desenvolvimento adrenal e gonadal (Luo *et al.*, 1994). O fator SF-1 parece ter papel tanto na diferenciação testicular como na ovariana (Combes *et al.*, 2009).

Além desse importante papel primordial, essas duas proteínas codificadas por genes autossômicos ainda estão diretamente envolvidas na transativação da expressão do gene *SRY* (de Santa Barbara *et al.*, 2001 ; Hossain & Saunders, 2001; Schumacher *et al.*, 2008; Bradford *et al.*, 2009). O co-fator de transcrição CITED2 interage com o fator WT1 para estimular a expressão de SF-1, e todos atuam na gônada para aumentar a expressão de *SRY* a fim de atingir o limiar para iniciar a determinação testicular. A redução das dosagens de WT1 e SF-1 em gônadas mutantes para o gene CITED2 foi suficiente para produzir reversão sexual parcial; dessa forma, uma correlação direta pode ser feita entre reversão sexual e níveis reduzidos de WT1 e SF-1, indicando que o gene *SRY* é um alvo *downstream* da via regulatória CITED2/WT1/SF1 (Buaas *et al.*, 2009).

Após esses eventos *upstream*, com a transcrição do gene e a consequente produção da proteína SRY numa janela temporal restrita, na sexta semana de gestação se inicia a determinação sexual masculina. Possivelmente a proteína SRY interage com proteínas acessórias para modular a expressão de seus genes alvo e desencadear a determinação testicular, como é demonstrado por Polanco e colaboradores (2009), que através de análise funcional chegaram à conclusão que a proteína KRAB-O (*Kruppel Associated Box Only*) pode mediar a função de SRY.

Durante muito tempo não ficou clara qual era a forma de atuação, os alvos e os genes *downstream* à expressão de *SRY* na cascata de transcrição, e como era promovida a diferenciação das células de Sertoli. Recentemente, uma análise bioinformática e experimental (Jin *et al.*, 2007) identificou regiões promotoras alvo potenciais da proteína SRY, mostrando também uma forte correlação dessas regiões com sítios alvo do fator de transcrição OCT4; esse dado sugere uma possível atuação conjunta na regulação da transcrição gênica.

Por outro lado, o gene *SOX9* (*SRY-related high-mobility group HMG-Box 9*) é atualmente reconhecido como o principal alvo da ação de SRY e principal efetor *dowstream* desta cascata, promovendo a formação das células de Sertoli, que através do

hormônio anti-mulleriano causam a regressão dos dutos de Muller e assim possibilitam a diferenciação masculina. O fator SOX9 se mostrou capaz de induzir diferenciação masculina quando expresso em gônadas XX de camundongos transgênicos mesmo na ausência de *SRY* (Vidal *et al.*, 2001). Outro exemplo da ação efetora de *SOX9* é a expressão aumentada desse gene encontrada em homens XX e *SRY*-negativos (Kojima *et al.*, 2008).

Se o *SRY* está ausente ou é expresso fora da janela temporal específica, o gene *SOX9* é silenciado e o desenvolvimento ovariano prevalece (Sekido & Lovell-Badge, 2008a). O modelo mais recente proposto afirma que a expressão de *SOX9* depende da ação sinérgica das proteínas *SRY* e *SF1* em um *enhancer* de expressão do gene *SOX9*. Quando a expressão de *SRY* cessa, o fator *SOX9* juntamente com o fator *SF1* se liga ao *enhancer* ajudando a manter sua própria expressão, numa via de *feedback* positivo (Sekido & Lovell-Badge, 2008b).

Uma revisão dos últimos dados da literatura (Koopman, 2009), propõe a seguinte série de eventos. A partir da expressão de *SRY* nas células precursoras, a expressão de *SOX9* é ativada. Através de um mecanismo de auto-regulação de *feedback* positivo, o *SOX9* é capaz de estimular e manter a sua própria expressão, além de ativar a transcrição do gene *PGDS*, resultando na secreção de prostaglandina D2. Essa proteína é capaz de promover a expressão de *SOX9*, mesmo nas células em que a expressão do gene *SRY* foi baixa ou inexistente. Esse é só um dos exemplos dos diversos mecanismos de sinalização celular que participam do desenvolvimento gonadal, revisados em diversos trabalhos (Cool & Capel, 2009).

A proteína *SOX9*, além de principal efetor da determinação testicular, possui aparentemente também o papel de antagonista do desenvolvimento ovariano, suprimindo ativamente a expressão do gene *FOXL2*. Em um estudo com imunofluorescência em ovotestis (gônadas mistas) em desenvolvimento, foi observado que células individuais precursoras das gônadas podem expressar *SOX9* ou *FOXL2*, mas não os dois juntos, configurando assim um antagonismo (Wilhelm *et al.*, 2009).

A proteína *SRY* só desencadeia a determinação das gônadas em testículo sob condições específicas. Primeiramente, a ação dessa proteína é dosagem dependente, ou seja, um limiar de proteína no local de atuação é necessário para que ela comece a exercer

sua função (Assumpção *et al.*, 2005); dessa forma, a produção de níveis suficientes e a importação adequada dessa proteína e de outros fatores de transcrição para o núcleo são essenciais para manter os níveis funcionais adequados desses fatores. Hanover e colaboradores (2009) afirmam que defeitos na importação nuclear mediada por calmodulina dos fatores de transcrição SRY e SOX9 levam a distúrbios de reversão sexual e desenvolvimento testicular anormal. Outro fator preponderante é a expressão do gene *SRY* durante a janela temporal correta do desenvolvimento, uma vez que esse espaço de tempo é muito restrito, consistindo de aproximadamente 6 horas em camundongos; se a expressão de *SRY* atrasa em apenas 1 hora, a ativação do gene *SOX9* não é mantida, resultando em desenvolvimento de ovário (Hiramatsu *et al.*, 2009). Dessa forma, a expressão em quantidades suficientes da proteína SRY, durante a janela temporal oportuna, é fundamental para a diferenciação testicular normal, e qualquer anomalia nessa expressão é suficiente para causar uma reversão sexual (Wilhelm *et al.*, 2009). Possivelmente muitos pacientes com disgenesia gonadal 46,XY idiopática, com a sequência do gene *SRY* normal, possuem mutações ainda não descritas que afetam o *timing* ou então os níveis de expressão de SRY, deixando a estrutura da proteína intacta mas prejudicando sua atuação. As condições nutricionais em que ocorre o desenvolvimento constituem outro fator que pode influenciar na determinação testicular. Foi demonstrado que a manutenção da expressão de *SOX9* só ocorre sob condições nutricionais adequadas, com altos níveis de glicose (Matoba *et al.*, 2008).

Após esses eventos iniciais da determinação sexual, com a expressão de *SRY* e *SOX9*, ocorre a ativação e repressão de muitos outros genes, em uma intrincada rede gênica, que vem sendo desvendada gradativamente, principalmente por estudos de expressão gênica utilizando técnicas de *microarray* (Beverdam & Coopman 2006; Cory *et al.*, 2007; Bouma *et al.*, 2007). Muitos eventos durante o desenvolvimento envolvem não só o controle da transcrição, mas também alterações pós-transcricionais, como o controle da tradução e degradação do mRNA codificador da proteína SRY (Bernard & Harley, 2007).

Utilizando uma abordagem proteômica e transcriptômica, Sato e colaboradores (2009) compararam os níveis de síntese protéica e padrões de expressão gênica em linhagens de células NT2-D1 (derivadas de carcinoma testicular de embriões humanos)

com níveis de expressão do gene *SRY* aumentados. A análise proteômica revelou que a super-expressão da proteína *SRY* aumentou a expressão de proteínas como a ERp19, de ligação à laminina, e a α -enolase. Essas proteínas estão envolvidas na formação de microtúbulos e na utilização de energia por células em divisão, tendo um papel importante na diferenciação e proliferação das células de Sertoli. Por outro lado, a super-expressão de *SRY* diminuiu a expressão de proteínas da classe das chaperonas, envolvidas em modificações pós-traducionais como a formação de pontes dissulfeto e o dobramento de proteínas. A análise transcriptômica revelou que a proteína *SRY* super-expressa causou um aumento na expressão de genes relacionados a proteínas *zinc-finger*, com função de fatores de transcrição. Possivelmente esses fatores são alvos da proteína *SRY*, que atua regulando a divisão e diferenciação celulares através da interação com esses fatores.

Em um levantamento proteômico global realizado com gônadas de camundongos exatamente durante a determinação sexual, 1037 produtos gênicos foram identificados a partir de 620 peptídeos. A classificação funcional e a construção da rede biológica de interações sugerem que a maioria das proteínas identificadas atuam nas modificações pós-transcricionais e transporte do RNA, síntese protéica, dobramento e outras modificações pós-traducionais. Foram revelados novos reguladores potenciais do desenvolvimento e determinação gonadal, além de 60 proteínas com potencial relação com distúrbios do desenvolvimento sexual no homem. Essa forma de comparação em larga escala da expressão de proteínas entre gônadas de ambos os sexos, ou entre gônadas em estágios diferentes do desenvolvimento constitui uma forma importante de identificar novas proteínas e genes envolvidos em eventos sexo ou estágio-específicos da diferenciação gonadal (Ewen *et al.*, 2009).

Enfim, esse e outros trabalhos ilustram que muitos fatores podem influenciar na determinação e diferenciação sexual, que para ocorrer de forma correta depende de um equilíbrio preciso entre expressão e repressão de uma intrincada rede gênica (*Figura 7*). Existe uma janela de vulnerabilidade que envolve principalmente os eventos anteriores à determinação gonadal, sendo que até fatores ambientais podem exercer influência nesses processos (Koopman, 2009).

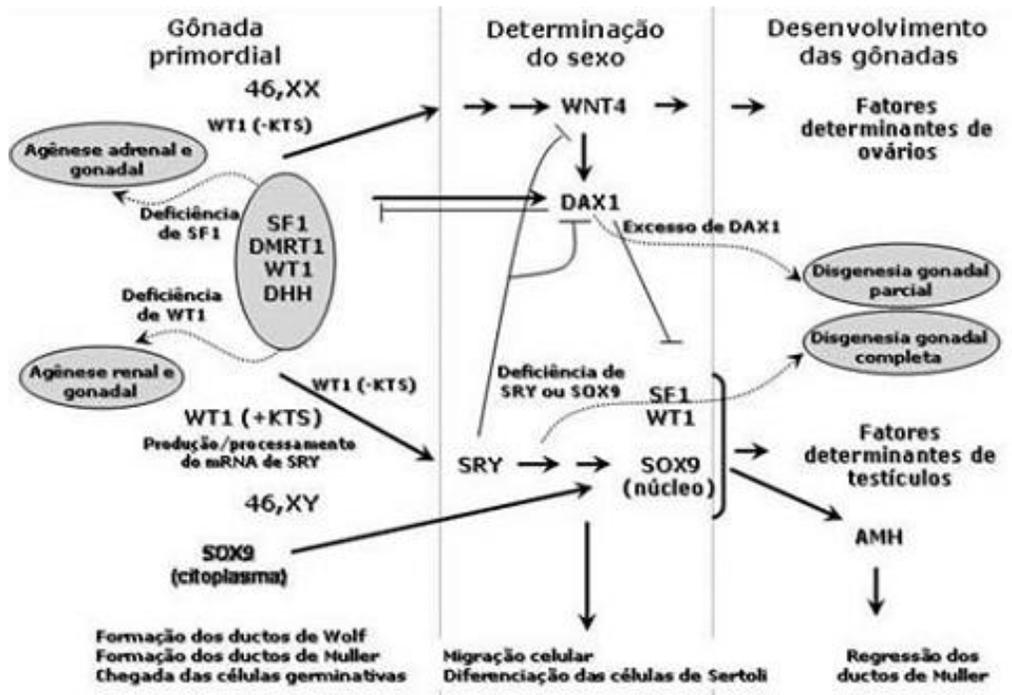


Figura 7. Modelo simplificado da “cascata” de genes envolvidos na determinação do sexo, e patologias decorrentes de distúrbios no processo de determinação e diferenciação gonadal (de Mello *et al.*, 2005).

4. DISGENESIA GONADAL 46,XY E SRY

Como todos os genes, o gene *SRY* está sujeito à mutações, mas como está localizado no cromossomo Y, não dispõe dos mecanismos de reparo de genes autossômicos, que possuem uma outra cópia no cromossomo homólogo. Diversas mutações no *SRY* já foram identificadas em humanos, em casos de disgenesia gonadal 46,XY e reversão sexual. Essas mutações afetam tipicamente a estrutura da proteína *SRY* e sua capacidade de determinar o desenvolvimento testicular (Koopman, 2009).

A denominação “disgenesia gonadal 46,XY” refere-se a um grupo de anomalias nas quais existe um defeito na determinação testicular. A DG Pura 46,XY caracteriza-se por um

fenótipo feminino e ausência de tecido testicular. Os pacientes apresentam gônadas em forma de fita, constituídas de tecido fibroso, e estão presentes o útero, as tubas uterinas e a vagina, sendo que a genitália externa é feminina. Em geral o diagnóstico é feito na época da puberdade devido à amenorréia primária e à falta de aparecimento dos caracteres sexuais secundários. Na ausência de determinação testicular as gônadas de mulheres 46,XY chegam a se desenvolver em ovários, mas sofrem degeneração devido à falta de um segundo cromossomo X, em processo semelhante ao que ocorre nas pacientes com síndrome de Turner (45,X) (Berkovitz *et al.*, 1991).

Considerando os casos de disgenesia gonadal 46,XY em geral, as mutações no gene *SRY* são responsáveis por cerca 20% dos casos; além disso, o *SRY* está presente em cerca de 20% dos homens com cariótipo 46,XX. Até o momento, foram descritas 68 mutações (Cooper *et al.*, 2007) na ORF do *SRY* (Shahid *et al.*, 2004; Kellermayer *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). A grande maioria delas foi encontrada em pacientes 46,XY com diagnóstico de DG pura, mas há relatos de mutações em pacientes com DG parcial XY, hermafroditismo verdadeiro e reversão sexual com função ovariana parcial (revisado em Assumpção *et al.*, 2002).

Continuamente, novas mutações são descobertas, e ilustram a importância do rastreamento de novas mutações no gene *SRY* em pacientes com disgenesia gonadal e ambiguidade genital. Recentemente duas irmãs 46,XY com reversão sexual total e caracteres femininos normais tiveram mutações na *HMG-Box* do gene *SRY* detectadas, em ambos os casos prejudicando a capacidade de *binding* da proteína ao DNA (Shahid *et al.*, 2008). Nosso grupo de pesquisa identificou uma mutação na região codificante do gene *SRY*, também no domínio *HMG-Box*, em uma paciente com disgenesia gonadal pura 46,XY. Em outro caso recente que ilustra a variedade fenotípica do efeito das mutações no gene *SRY*, uma menina 46,XY com disgenesia gonadal e desenvolvimento puberal parciais teve uma mutação na *HMG-Box* do gene detectada (Paris *et al.*, 2007), o que contrasta com outros casos de disgenesia gonadal parcial.

Mutações fora da *HMG-Box* são mais raras, mas também podem causar reversão sexual total, como no caso de uma mulher 46,XY portadora de uma inserção de um único nucleotídeo na ORF do gene *SRY*, causando um *frameshift* e truncamento da proteína

(Marchina *et al.*, 2008). Em outro exemplo, um estudo de nosso grupo encontrou uma mutação herdada localizada em um sítio de fosforilação do gene *SRY* em uma paciente com disgenesia gonadal completa, em seu pai e irmãos normais e em dois irmãos com disgenesia gonadal parcial (Assumpção *et al.*, 2002). Uma inserção na região *upstream* ao domínio *HMG-Box*, levando à formação de um *stop codon* e uma proteína *SRY* truncada, foi encontrada em uma paciente com disgenesia gonadal 46,XY e amenorréia primária (Marchina *et al.*, 2009).

Geralmente, devido ao comprometimento da capacidade reprodutiva do indivíduo, as mutações em *SRY* são eventos *de novo*, ou seja, não herdados e afetando somente um indivíduo da família. Entretanto, em outro caso incomum, foi encontrada uma mutação familiar (também na *HMG-Box* do *SRY*), presente em uma garota 46,XY e em seu pai, com fenótipo normal (Plaseska-Karanfilska *et al.*, 2007). Mais um caso recente foi reportado (Gimelli *et al.*, 2007), novamente uma mutação familiar compartilhada entre pai e filha 46,XY, mas dessa vez fora da região da *HMG-Box*. Essa grande variedade fenotípica no efeito das mutações no gene *SRY* muitas vezes dificulta a correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes.

5. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *SRY*

Considerando a região promotora do gene *SRY*, os mecanismos pelos quais a expressão do *SRY* é regulada *in vivo* ainda permanecem obscuros. A região promotora não apresenta nenhuma sequência do tipo “TATA” ou “CCAAT box” (Su & Lau, 1993); no entanto, encontram-se várias sequências conservadas na porção 5', que podem estar relacionadas com o controle da expressão (Vilain *et al.*, 1992; Su & Lau, 1993; Veitia *et al.*, 1997). Pelo menos três fatores de transcrição que se ligam a essa porção estão aparentemente envolvidos na trans-ativação do *SRY*: Sp1, SF-1 e WT1 (Desclozeaux *et al.*, 1998a; De Santa Barbara *et al.*, 2001; Hossain & Saunders, 2001). O fator de transcrição CP2 também apresentou alta atividade de ligação ao promotor do gene *SRY*, e em análise funcional mostrou ser essencial para a modulação da expressão de *SRY* (Sato *et al.*, 2009).

Dentro de um segmento de cerca de 150 pb próximo ao ATG de início da tradução estão localizados dois sítios Sp1 intercalados por um sítio WT1.

Bradford e colaboradores (2009) encontraram níveis baixos da proteína SRY em células de gônadas de camundongos mutantes para a isoforma +KTS do fator WT1, além de a diferenciação das células de Sertoli ter sido bloqueada nessas gônadas. Esses dados sugerem que as isoformas +KTS do fator de transcrição WT1 estão envolvidas na regulação da expressão do gene *SRY*, que por sua vez influencia a proliferação e diferenciação das células de Sertoli. Pacientes com disgenesia gonadal e reversão sexual completa portadores de mutações no gene codificante do fator WT1 possivelmente tiveram falhas na diferenciação e proliferação das células de Sertoli, que em número insuficiente não puderam desencadear o desenvolvimento testicular.

Mutações na região 5' promotora do gene são pouco frequentes. Há um relato de uma grande deleção (30-60 kb) localizada a 1,8 kb de distância do início do quadro de leitura do gene *SRY* (McElreavey *et al.*, 1992) em uma paciente com disgenesia gonadal completa, indicando a presença de fatores *cis* de regulação que devem ser importantes para a transcrição do gene *SRY*. Uma análise comparativa desta região revelou sítios consenso de ligação para vários fatores de transcrição (Veitia *et al.*, 1997; Margarit *et al.*, 1998). Outras três variações de sequência foram descritas na região 5' não-traduzida (Kwok *et al.*, 1996; Poulat *et al.*, 1998). Um estudo de genômica comparativa (Ross *et al.*, 2008) identificou 4 regiões *upstream* ao gene *SRY* que mostram altas taxas de conservação entre humanos, bovinos, suínos e caprinos. A região A, mais distante, localiza-se a uma distância de 9 kb do gene. Nesse estudo também foram encontrados cerca de 200 sítios altamente conservados de ligação a fatores de transcrição, o que representa a imensa complexidade que pode estar por trás da expressão do gene *SRY*.

Estudos de nosso grupo de pesquisa encontraram uma deleção de 3 pb herdada e localizada exatamente em um dos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 em uma paciente com disgenesia gonadal completa (Assumpção *et al.*, 2005). Estes dois sítios foram descritos como Sp1A e Sp1B, e o fator Sp1 já demonstrou envolvimento na ativação da expressão do gene *SRY* (Desclozeaux *et al.*, 1998a). Intercalada entre estes dois sítios há

uma sequência consenso de ligação do fator WT1, cuja atividade ativadora *in vitro* foi comprovada por Hossain & Saunders (2001).

6. O FATOR DE TRANSCRIÇÃO SPI

O fator de transcrição Sp1, foi originalmente isolado de células da linhagem HeLa, identificado como uma proteína de ligação ao DNA que interage com sítios ricos em GC localizados em um elemento repetitivo de 21 pb do promotor SV40 (Dyanan & Tjian, 1983; Gidoni *et al.*, 1984). É um dos fatores de transcrição mais abundantes que ativam a transcrição formando um complexo com a enzima RNA polimerase II (Bucher, 1990).

A proteína Sp1 regula a atividade de um grande número de promotores. A expressão de Sp1 em vários tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário de camundongos sugere que tenha um papel fundamental nos primeiros processos do desenvolvimento (Saffer *et al.*, 1991; Marin *et al.*, 1997). Seu domínio de ligação ao DNA consiste de 3 motivos *zinc finger* do tipo C2H2 (Figuras 8 e 9), localizados na região C-terminal da proteína (Kadonaga *et al.*, 1987; Briggs *et al.*, 1986), que reconhecem a sequência consenso “GGGGCGGGGC” e sequências intimamente relacionadas, denominadas “GC Boxes” (Courey & Tjian, 1988).

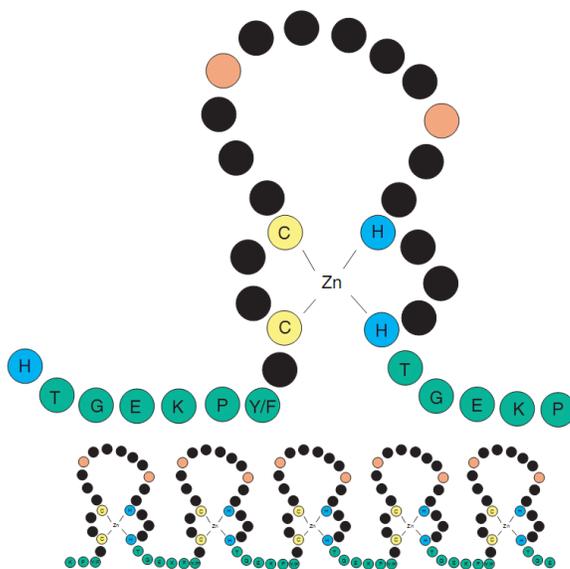


Figura 8. Diagrama esquemático de um *zinc-finger* do tipo C2H2. Os pares de cisteínas (C)

e histidinas (H) que se ligam ao íon de zinco são mostrados em amarelo e azul, respectivamente. A sequência consenso de aminoácidos de ligação, mostrada em verde, frequentemente encontra *zinc-fingers* adjacentes, dispostos em *tandem*. Dois resíduos hidrofóbicos grandes, importantes para manter a estrutura do domínio, são mostrados em laranja. Os resíduos em preto não são importantes estruturalmente, mas incluem aqueles responsáveis por entrar em contato com o DNA de forma sequência-específica, sendo que seu número pode variar de acordo com o fator de transcrição (Knight & Shimeld, 2001).

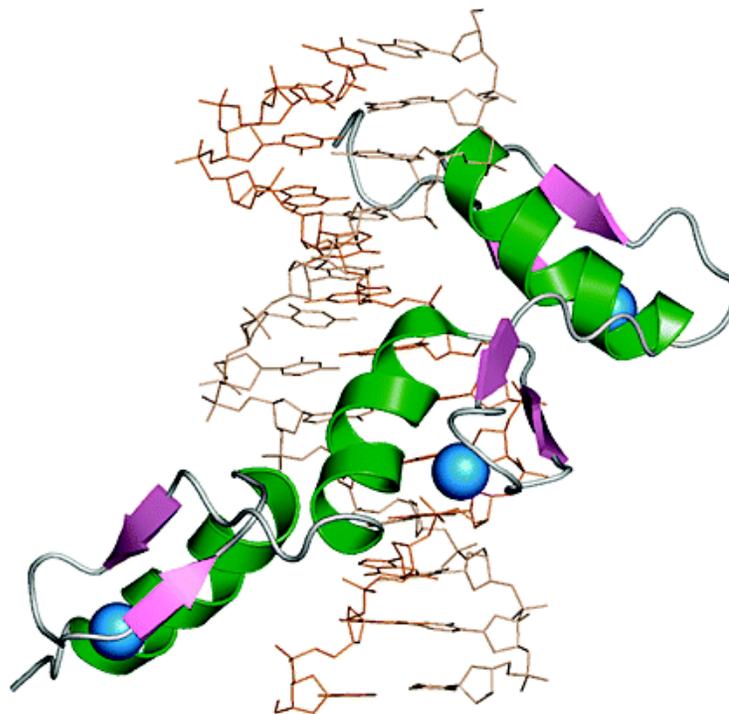


Figura 9. Representação de um complexo entre o fator Sp1 e o DNA, contendo os 3 domínios zinc-finger. O fator Sp1 é mostrado em verde, os íons de zinco em azul e o DNA em laranja (Oka *et al.*, 2004).

Além disso, o fator possui dois domínios de transativação ricos em glutamina, A e B, e o domínio C-terminal D (Bouwman & Philipsen, 2002), também importantes para a ativação da transcrição, devido a sua importância na multimerização do fator, que parece

ser essencial para a superativação e ação sinérgica de outras moléculas de Sp1 ou outros fatores de transcrição (Pascal & Tjian, 1991). Tetrâmeros de Sp1 se mostraram envolvidos na ativação da transcrição mesmo quando atuando em sítios distantes das regiões codificantes (Mastrangelo *et al.*, 1991), e Su e colaboradores (1991) concluíram que fatores Sp1 ligados ao DNA exercem seu sinergismo transcricional por uma associação proteína-proteína que, através da formação de *loops*, aproximam segmentos distantes milhares de pares de base no DNA.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GERAIS

Investigar como a deleção de 3 pb no sítio SP1A na região promotora do gene SRY altera a capacidade de ligação do fator SP1 na presença do sítio SP1B.

Investigar se há diferenças na capacidade dos promotores de SRY com a sequência normal e mutante de ativar a expressão de um gene repórter.

Investigar o efeito da mutação E89K na capacidade de ligação ao DNA da proteína SRY.

Continuar o rastreamento de mutações no gene SRY e sua região promotora em novos pacientes com disgenesia gonadal.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

A paciente 1, uma mulher com atualmente 33 anos, encaminhada ao serviço médico aos 16 anos devido à amenorréia primária. Não havia sinais de dimorfismos, sendo que portava genitália externa feminina normal, porém sem os caracteres sexuais secundários típicos da puberdade. Exames de ultrassom revelaram hipoplasia do útero e ausência das gônadas. Seu cariótipo foi 46,XY, e ela foi diagnosticada como apresentando disgenesia gonadal pura 46,XY.

A paciente possui uma irmã mais velha com menstruação e caracteres sexuais normais, e um irmão mais velho morto em acidente. A investigação da família (*Figura 10*) revelou que o pai, embora fértil, quando criança foi submetido à 18 cirurgias na região genital, devido a uma grave hipospádia (posição anormal do canal da uretra no pênis). Estudos moleculares demonstraram que o pai e a paciente possuem a mutação 5' del3-pb na região promotora do gene *SRY*, que consiste em uma deleção de 3 pares de base em um dos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 presentes no promotor (*Figura 11*).

Na história familiar há relatos de 4 membros da família com ambiguidade genital, mas infelizmente não foi possível a análise molecular devido à não concordância dos indivíduos em realizar o estudo.

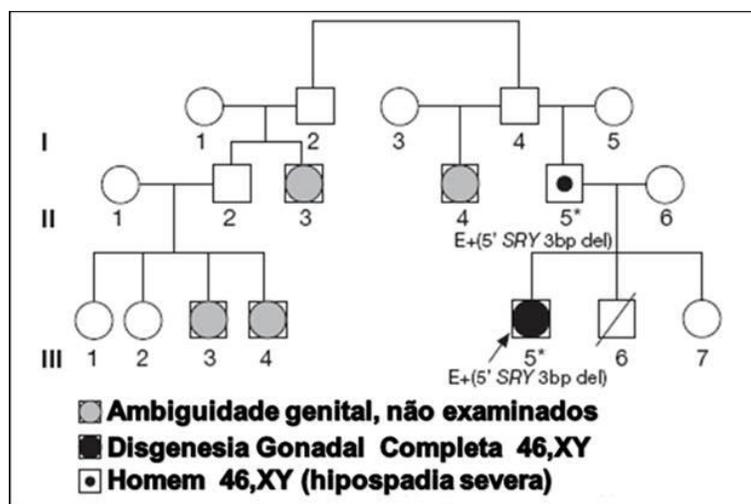


Figura 10. Heredograma da paciente com disgenesia gonadal completa 46,XY (destacada pela seta).

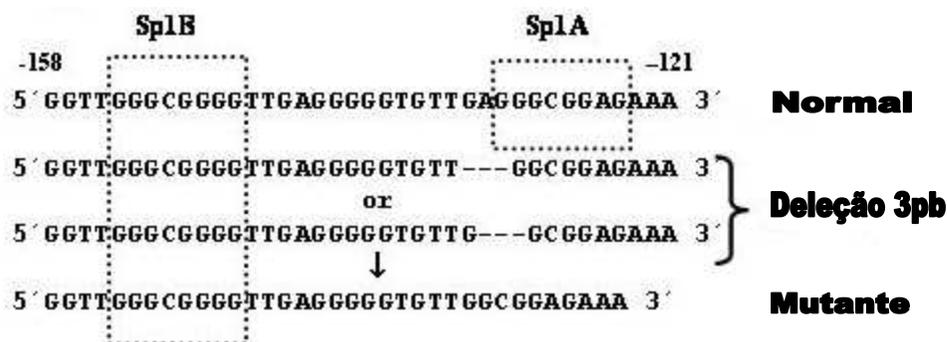


Figura 11. Alinhamento da região promotora do gene *SRY*. Os retângulos pontilhados destacam os 2 sítios de ligação do fator Sp1 (Sp1A e Sp1B). As duas possibilidades da deleção e a sequência mutante resultante são exibidas na última linha.

A paciente 2, uma mulher com atualmente 22 anos, chegou ao ambulatório com 16 anos devido ao hipogonadismo e amenorréia primária. Ela nasceu normalmente, de um casamento não-consanguíneo, e seu peso ao nascer era desconhecido. Ela foi a primeira criança de uma irmandade de 8 (seis irmãs e um irmão), em uma família com histórico normal. Ao exame físico, pesou 42,4 kg e apresentou 158 cm de altura. Observou-se genitália externa feminina, com desenvolvimento puberal no estágio de Tanner M1P2, sem quadro dismórfico.

Seu cariótipo foi 46,XY. O exame de ultrassonografia não revelou útero nem gônadas femininas na cavidade abdominal. Ambas as gônadas disgenéticas foram removidas, devido ao alto risco de formação de gonadoblastoma, sendo que um pequeno tumor (2x2 mm) foi encontrado na gônada disgenética direita.

Dessa forma, a paciente foi diagnosticada com disgenesia gonadal pura 46,XY. Análises moleculares (*Figura 12*) revelaram que ela possui a mutação E89K no gene *SRY*, que foi produzida pela troca de uma base G por A dentro do *HMG-Box* (no códon determinante do aminoácido 89), que acarreta na tradução do aminoácido Lisina (AAG) ao invés de Ácido Glutâmico (GAG).

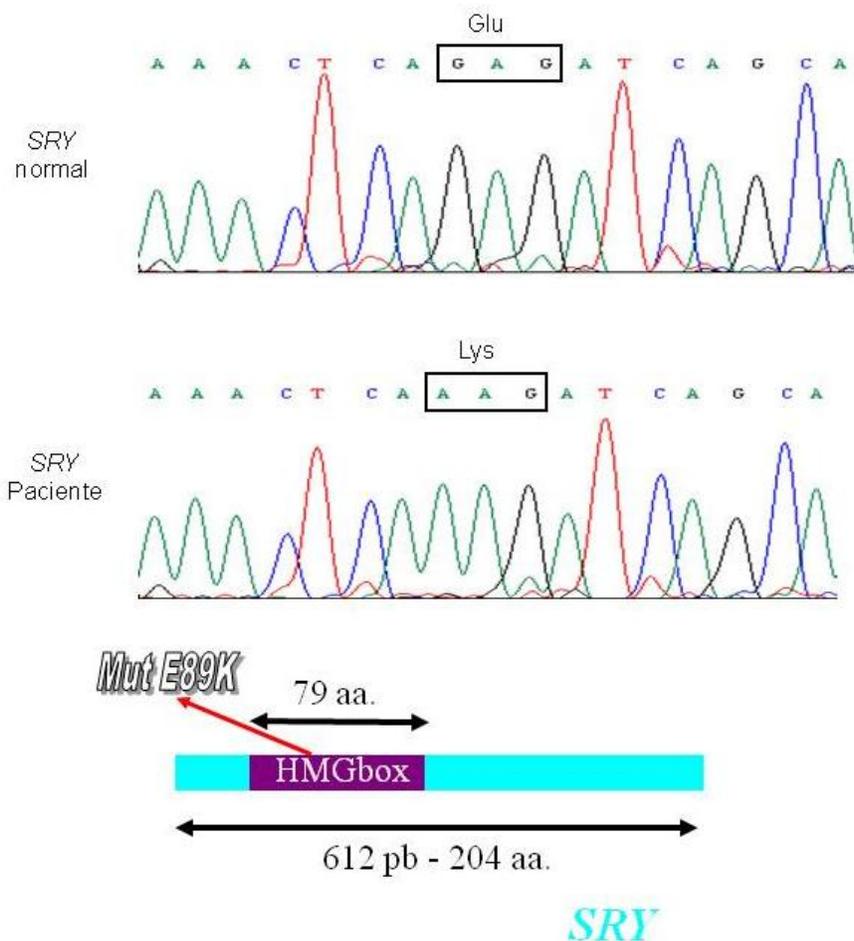


Figura 12. Ilustração do sequenciamento automático evidenciando a mutação e a troca de aminoácidos, assim como a localização da mutação na proteína SRY.

O rastreamento de novas mutações no gene *SRY* foi realizado com o sequenciamento de 4 pacientes com quadro de disgenesia gonadal 46,XY e 2 familiares da paciente portadora da mutação Glu89Lys na região codificante do gene *SRY*. A *Tabela 1* reúne a descrição de todos os indivíduos analisados no projeto.

Tabela 1. Descrição clínica dos indivíduos analisados no projeto

Paciente	Idade do diagnóstico	Dados Clínicos	Diagnóstico
1	16 anos	Amenorréia, útero reduzido, ovários não visualizados	Disgenesia gonadal pura 46,XY
2	16 anos	Ausência de desenvolvimento de mama, amenorréia. Útero e ovário não visualizados.	Disgenesia gonadal pura 46,XY
3	17 anos	Ausência de desenvolvimento de mama, amenorréia. Útero e ovário não visualizados. Ambiguidade genital: genitália com Prader V, sem gônadas palpáveis nas saliências lábio-escrotais.	Disgenesia gonadal parcial 46,XY
4	14 anos	Amenorréia, puberdade de evolução lenta. Reduzido volume uterino e gônadas não visualizadas.	Disgenesia gonadal pura 46,XY
5	17 anos	Amenorréia, útero atrófico, ovário ou gônadas não visualizadas.	Disgenesia gonadal pura 46,XY
6	Não disponível	Não disponível	Disgenesia gonadal pura 46,XY
7		Irmão da paciente 2	Normal
8		Pai da paciente 2	Normal

2. MÉTODOS

2.1 SEQUENCIAMENTO DO GENE SRY

Novos pacientes com disgenesia gonadal tiveram o gene *SRY* e sua região promotora sequenciados, a fim de rastrear mutações determinantes da etiologia. As amostras de DNA destes pacientes foram obtidas por extração com fenol-clorofórmio de sangue periférico (10-20 mL de sangue colhido em EDTA 10%), segundo o método proteinase K padronizado no laboratório de Genética Humana (De Araujo *et al.*, 1996).

2.1.1 Reação de Sequenciamento

Os fragmentos amplificados do gene *SRY* (778 pb) e sua região promotora (331 pb) foram submetidos à reação de sequenciamento, utilizando os seguintes *primers*:

Gene SRY

XES 10 (sense): 5' GAG CTC GAG AAT TCG GTG TTG AGG GCG AGA AAT GC 3'

XES 11 (antisense): 5' GAG CTC GAG AAT TCG TAG CCA ATG TTA CCC GAT TGT
C 3'

Região 5' promotora SRY

SRY 5' 1s (sense): 5' GCG AAG CTT TGT TTT TTT AAA GAT AAC ATA CAC 3'

SRY 5' 1a (antisense): 5' CCG GAC CAG ATT CTT TGT TAC GTT AAC 3'

Reação

H₂O _____ 4 µL

5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems) _____ 2 µL

Primer _____ 1 μ L
Big Dye v3.1 (Applied Biosystems) _____ 2 μ L
Produto da PCR _____ 1 μ L

As condições de amplificação utilizadas no termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*) foram as seguintes: 96°C (2 minutos) de desnaturação; 30 ciclos nas seguintes condições: 96°C (10 segundos), 57°C (5 segundos); 60°C (4 minutos); armazenamento a 4°C.

2.1.2 Purificação da reação de sequenciamento

- Foram adicionados 80 μ L de isopropanol 75% (Merck) a cada reação, e a mistura foi agitada por vortex. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 15 minutos.
- Centrifugou-se a 13.000 rpm por 30 minutos.
- Os tubos foram invertidos e o sobrenadante foi descartado, a fim de remover todo o isopropanol.
- Foram adicionados 150 μ L de etanol 70% (Merck), e realizada nova centrifugação, por 10 minutos a 13.000 rpm.
- Os tubos foram invertidos e o sobrenadante foi descartado (a fim de remover todo o etanol), e permaneceram em temperatura ambiente, protegidos da luz, durante 2 horas e em seguida foram estocados a -20° C.

2.1.3 Sequenciamento da reação purificada

- Para ressuspender, foram adicionados 17 μ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) a cada reação, procedimento seguido de uma vigorosa agitação por vortex (cada amostra foi agitada por no mínimo 30 segundos).
- Transferiu-se as amostras para os tubos de 600 μ L do sequenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems).
- Para desnaturar, as amostras foram incubadas a 95°C por 2 minutos e 30 segundos e imediatamente colocadas no gelo.

- As amostras foram sequenciadas no aparelho ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

2.2 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA SRY MUTANTE E VERIFICAÇÃO DE SUA INTERAÇÃO COM DNA POR ENSAIO DE EMSA

2.2.1 Amplificação e purificação dos genes SRY controle e mutante

Os fragmentos de DNA correspondentes ao gene *SRY* normal e mutante foram amplificados a partir dos DNAs controle e mutante através de PCR com um par de *primers* desenhado de forma a criar sítios de restrição para as enzimas *Bam* HI e *Nde* I (nas extremidades 3' e 5', respectivamente) no fragmento de 629 pb amplificado.

Primers

SRYs *Nde*I (5'- TGCATATGCAATCGTATGCTTC – 3')

SRYa *Bam*HI (5' – GTTACCCGAGGATCCTACAGC – 3')

Ciclo de Amplificação

94°C por 5 minutos;

Ciclo 35X - 94°C por 45 segundos; 55°C por 45 segundos; 68°C por 1 minuto;

68°C por 10 minutos;

15°C - ∞

Reação da PCR

H₂O MilliQ _____ 33,5 µL

10X High fidelity PCR Buffer (Invitrogen) _____ 5 µL

dNTP (2 mM) _____ 7,5 µL

Primer *Nde*I (20pMol/µL) _____ 1 µL

Primer *Bam*HI (20pMol/ μ L) _____ 1 μ L
Pfx 50 DNA Polymerase (Invitrogen) _____ 1 μ L
DNA _____ 1 μ L
Volume final 50 μ L

Como a enzima de atividade exonucleásica *Pfx50* não deixa nos fragmentos amplificados extremidades com o nucleotídeo A, extremidades necessárias para clonagem no vetor *pGEM-T Easy* (Promega), o produto da PCR foi incubado com a enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) comum durante 45 minutos a 72 °C.

O produto da PCR após a incubação foi purificado por extração de banda, utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

2.2.2 Clonagem *pGEM-T Easy*

Os fragmentos purificados foram clonados utilizando o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), na seguinte reação de ligação, incubada *overnight* a 8°C:

2x *Rapid ligation buffer* _____ 5 μ L
Vetor *pGEM-T Easy* (50ng/ μ L) _____ 1 μ L
Fragmento purificado (~100ng) _____ 3 μ L
T4 DNA Ligase (10u/ μ L) _____ 1 μ L
Volume Final: 10 μ L

2.2.3 Preparo de células competentes *DH5a* para transformação química (PEG)

Soluções e meios

Para o preparo das células competentes foram utilizados 300 mL de meio TYM, 150 mL de TBF1 e 15 mL de TBF2.

TYM (300 mL) – Autoclavado

Peptona_____6 g
Extrato de Levedura_____1,5 g
NaCl_____1,74 g
MgSO₄ (7H₂O)_____0,75 g

TBF1 (150 mL) – Esterilizado por filtração

KOAc_____0,44 g
MnCl₂ (4H₂O)_____1,48 g (L2 51)
KCl_____1,11 g
CaCl₂ (2H₂O)_____0,22 g (L2 148)
Glicerol 15%_____25,86 mL de glicerol 87%

TBF2 (15 mL) – Esterilizado por filtração

MOPS (pH7 – 0,01M)___0,03 g
CaCl₂ (2H₂O)_____0,16 g (L2 148)
KCl_____0,01 g (L2 66)
Glicerol 15%_____2,58 mL de glicerol 87%

Procedimento

OBS: Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar

- Uma placa de meio LB agar sem antibiótico foi inoculada com uma cultura permanente de células DH5α para obtenção de uma colônia isolada,
- Uma colônia isolada foi selecionada com um bastão estéril, inoculada em 5 mL de meio TYM e incubada *overnight* a 37°C e 300 rpm;

- 500 μ L do pré-inóculo foram aplicados em 50 mL de meio TYM e a cultura foi incubada a 37°C e 300 rpm até atingir a densidade ótica de aproximadamente $OD_{600} = 0,6$;
- Essa cultura foi vertida em um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio TYM, e a cultura foi incubada a 37°C e 300 rpm até atingir absorvância de $OD_{600} = 0,6$;
- Atingido o estágio de crescimento desejado, a cultura foi colocada em gelo para resfriar por 5 minutos, e depois vertida em 2 frascos para centrífuga já esterilizados e resfriados (125 mL em cada);
- Os frascos foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias ressuspendido em 100 mL de TBF1 gelado;
- As células ressuspendidas foram vertidas em 2 tubos Falcon já resfriados (50 mL/tubo) e centrifugadas por 8 min a 3000 rpm e a 4°C;
- O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 10 mL de TBF2 gelado (5 mL/tubo);
- Foram feitas alíquotas de 100 μ L da suspensão de células já competentes em tubos Eppendorf de 1,5 mL, que foram prontamente congelados em nitrogênio líquido;
- As alíquotas congeladas foram armazenadas a -70°C.

2.2.4 Transformação da Ligação *Inserto + pGEM-T Easy*

A ligação foi transformada em células competentes DH5 α através do método químico, utilizando PEG (Polietilenoglicol), com o seguinte procedimento, todo realizado em fluxo laminar:

- A ligação (10 μ L) foi misturada em um tubo Eppendorf com 40 μ L de tampão TT de transformação (10% KCM 10X, 15% PEG6000-10%, 75% H₂O MilliQ)
- Uma alíquota de 100 μ L de células competentes foi descongelada vagarosamente no gelo;
- A ligação foi adicionada às células competentes e misturou-se suavemente;
- A mistura foi mantida no gelo por 15-30 minutos e em seguida deixada à temperatura ambiente por 10 minutos;

- 500 μ L de Meio LB sem antibiótico foram adicionados e incubou-se a 37°C por 1 hora a 300 rpm;
- As bactérias transformadas foram espalhadas com alça de vidro em placas com LB agar contendo ampicilina (50 μ g/mL) e 60 μ L de X-Gal (20 mg/mL).
- As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

2.2.5 Isolamento das colônias recombinantes e confirmação da clonagem dos insertos

A ampicilina é um marcador para seleção de colônias resistentes que foram transformadas com êxito e que contém o plasmídio, podendo ser recombinantes ou não. Neste caso, o vetor *pGEM-T Easy* possui, além da marca de seleção para a ampicilina, o gene da β -galactosidase, que permite selecionar além das colônias transformadas, aquelas em que o plasmídio possui o fragmento de interesse. O X-Gal é um substrato da β -galactosidase, utilizado em meio sólido, não difusível no meio, incolor, mas cromogênico quando hidrolisado por esta enzima, libertando um composto azul, o indigo-5-bromo-4-cloro. As bactérias que expressam a enzima β -galactosidase formam colônias azuis. Já as colônias recombinantes, cujo gene da β -galactosidase foi interrompido, são selecionadas por manterem a cor branca.

Dessa forma, as colônias brancas foram coletadas com um palito de dente estéril e inoculadas em 5 mL de meio LB + Ampicilina (50 μ g/mL). Esse pré-inóculo foi incubado *overnight* a 37°C no *shaker* com agitação de 200 rpm.

Após a incubação, 450 μ L de cada pré-inóculo foram transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e centrifugados por 1 minuto a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuspensionado em 100 μ L de TE. As amostras foram desnaturadas por 5 minutos em água fervendo, e em seguida armazenadas a -20°C.

Foram utilizados 2 μ L de cada uma dessas amostras em uma PCR para confirmação da clonagem correta dos insertos no vetor *pGEM-T Easy*. Foram utilizados *primers* específicos do vetor (SP6 e T7), que flanqueiam a região *polylinker* do vetor.

2.2.6 Minipreparação dos plasmídios *pGEM-T Easy* recombinantes

As amostras que confirmaram por PCR a inserção do fragmento do gene *SRY* tiveram seus plasmídios *pGEM-T Easy* recombinantes extraídos através de minipreparação de DNA:

Soluções

P1 (Armazenada à 4° C após adição de RNase)

- Tris-HCl (pH 8,0) (50 mM) => 1,25 mL
- EDTA (pH 8,0) (10 mM) ==> 1 mL
- RNase – 100 µg/mL =====> 10 µL por 1 mL (colocada só na hora)

Volume final 50 mL

P2 (Feita na hora de usar)

- NaOH (200 mM) => 50 µL de NaOH 10M
- SDS 1% =====> 125 µL de SDS 20%
- Completar até 2,5 mL com H₂O destilada e autoclavada

P3 (Armazenada a 4°C)

- Acetato de Potássio 3M
- pH ajustado para pH 5,5 com ácido acético glacial

Procedimento

- Primeiramente, foi feita cultura permanente a partir dos pré-inóculos (450 µL de cultura bem misturados com 50 µL de glicerol 87% e armazenados a -70°C).
- O restante dos pré-inóculos foram colocados em tubos Eppendorf de 1,5 mL e centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto;
- O *pellet* de bactérias foi ressuspensionado em 300 µL de solução P1 utilizando o vortex;

- 300 μL de solução P2 foram adicionados e os tubos agitados por inversão suave (5 vezes) e incubados por 5 min a temperatura ambiente;
- 300 μL de solução P3 foram adicionados e os tubos foram agitados por inversão suavemente (por 10 vezes);
- Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C;
- O sobrenadante foi coletado com cuidado e transferido para outro tubo;
- Foram adicionados 400 μL de isopropanol e os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente;
- O sobrenadante foi descartado com cuidado e foram adicionados 700 μL de etanol 70%;
- O tubos foram invertidos com cuidado algumas vezes e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos.
- Todo o sobrenadante foi removido, e o *pellet* foi secado e solubilizado em 20 μL de H₂O livre de nucleases;
- Amostras das minipreparações foram aplicadas em gel de agarose 1%, a fim de testar o sucesso da extração plasmidial.

2.2.7 Sequenciamento dos plasmídios extraídos

Para confirmar se os insertos estavam com a sequência correta e com os sítios de restrição intactos, foi realizado o sequenciamento dos plasmídios extraídos, da seguinte forma:

Reação de Sequenciamento

H ₂ O _____	4 μL
5x Sequencing Buffer (Applied)_____	2 μL
Primer Sense ou Antisense (5 pM)_____	1 μL
Big Dye v3.1 (Applied Biosystems)_____	2 μL
Miniprep (plasmídio)_____	1 μL
Volume Final	10 μL

Ciclo de amplificação

96°C por 2 minutos;

Ciclo 36X: 96°C por 30 segundos; 58°C por 20 segundos ; 60°C por 4 minutos;

4°C ∞

A reação de sequenciamento foi purificada e sequenciada no equipamento ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

2.2.8 Digestão e subclonagem no vetor *pET28a*

Os plasmídios recombinantes *pGEM-T Easy* com a sequência do inserto confirmada por sequenciamento foram selecionados para a subclonagem no vetor de expressão *pET28a* (Novagen). A subclonagem do fragmento do gene *SRY* no vetor *pET28a* foi iniciada após a digestão do vetor *pGEM-T Easy* para extração do fragmento a ser subclonado.

Digestão pGEM-T Easy

Tampão OPA (One-Phor-All) (Pharmacia)_____ 5 µL

Enzima BamHI (10 U/µL) (Fermentas)_____ 5 µL

Enzima NdeI (10 U/µL)(NEB)_____ 5 µL

Miniprep (1 µg/µL)_____ 10 µL

H₂O_____ 25 µL

Volume Final. 50 µL

Após 3 horas de incubação a 37°C, foi retirada uma amostra de 3 µL e aplicada em gel de agarose 1%, para verificar se digestão total ou parcial. Com a digestão total confirmada, foi realizada a inativação das enzimas, incubando a digestão por 15 minutos a 85°C. Após a digestão, foi feita a purificação da banda corresponde ao fragmento liberado

pelo *pGEM-T Easy* em gel, utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Maxiprep pET28a

Anteriormente à digestão, para obter uma boa quantidade do vetor *pET28a* para esta e posteriores clonagens foi realizada uma maxipreparação do vetor utilizando o kit *Plasmid Midi Kit* (Qiagen).

Digestão pET28a

Tampão OPA (One-Phor-All) (Pharmacia) _____ 5 μ L
Enzima BamHI (10 U/ μ L) (Fermentas) _____ 5 μ L
Enzima NdeI (10 U/ μ L) (NEB) _____ 5 μ L
Maxiprep *pET28a* (1 μ g/ μ L) _____ 10 μ L
H₂O _____ 25 μ L
Volume Final 50 μ L

Após a confirmação da linearização do vetor e inativação das enzimas, foi realizada a purificação da banda do vetor em gel da mesma forma descrita anteriormente.

Ligação fragmento SRY + pET28a

2x *Rapid ligation buffer* _____ 5 μ L
Vetor *pET28a* (Novagen) _____ 1 μ L
Fragmento *SRY* _____ 3 μ L
T4 DNA Ligase (10u/ μ L) _____ 1 μ L
Volume Final: 10 μ L

A reação de ligação foi incubada a 4°C durante 2 dias.

2.2.9 Transformação da ligação fragmento SRY+ pET28a

Realizada da mesma forma que na clonagem em *pGEM-T Easy*, só que nesse caso o marcador de seleção é a resistência ao antibiótico kanamicina conferida pelo plasmídeo *pET28a*. Esse antibiótico é utilizado na mesma concentração que a ampicilina (50 µg/mL).

2.2.10 Isolamento das colônias recombinantes e confirmação da clonagem dos insertos

Procedimentos realizados da mesma forma que na clonagem anterior, só sendo modificados os *primers* utilizados para confirmação por PCR da presença do inserto no vetor *pET28a*. Esses *primers*, específicos para esse vetor, são os *primers* T7 Promoter e T7 Terminator, sintetizados segundo manual do *pET28a*.

2.2.11 Minipreparação dos plasmídios pET28a recombinantes e sequenciamento dos plasmídios extraídos

A minipreparação seguiu o protocolo descrito no item 2.2.6. Para certificar que a proteína SRY será expressa no *frame* correto, a inserção correta do fragmento no vetor *pET28a* foi conferida por sequenciamento.

2.2.12 Transformação vetor pET28a recombinante na linhagem BL21DE3

Com a sequência e o *frame* de expressão dos insertos no vetor *pET28a* confirmados, foi iniciada a transformação dos vetores recombinantes na linhagem BL21DE3 (uma linhagem de *E. coli* utilizada especificamente para a expressão de proteínas recombinantes), utilizando a técnica de transformação química já descrita anteriormente (item 2.2.4). A única modificação foi a quantidade de miniprep utilizada, foram aplicados 10 µL de uma diluição 1:20 da miniprep.

2.2.13 Isolamento das colônias recombinantes e confirmação dos insertos

Procedimento realizado da mesma forma anterior, todas as colônias selecionadas possuíam o fragmento *SRY*, sendo assim já estavam prontas para a indução da expressão da proteína.

2.2.14 Teste de expressão em pequena escala

A fim de estabelecer as condições ideais de expressão da proteína *SRY* pelo vetor *pET28a*, foi realizado primeiramente um teste em pequena escala:

- 10 μ L das culturas permanentes correspondentes às colônias transformadas de BL21DE3 foram inoculadas em 5 mL de meio LB+Kanamicina (50 μ g/ μ L), esse pré-inóculo foi incubado à temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) e 200 rpm;
- 100 μ L desse pré-inóculo foram adicionados em 10 mL de meio LB+Kanamicina (50 μ g/ μ L), incubação à temperatura ambiente e 200 rpm, até atingir a $OD_{600} > 0,6$;
- Com a OD alvo ideal alcançada, foram retiradas alíquotas de 500 μ L (0 horas, sem indução das culturas) e feita a indução, acrescentando 12 μ L de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 0,8 M, numa concentração final de aproximadamente 1 mM de IPTG;
- Após a indução, foram retiradas alíquotas com 1, 3 e 5 horas de indução;
- Todas as alíquotas foram centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm, tiveram o sobrenadante descartado e foram armazenadas a -20°C.

2.2.15 Preparo das amostras e eletroforese SDS-PAGE

- Os *pellets* de bactéria foram solubilizados em 30 μ L de H₂O e 15 μ L de Tampão de amostra (100 mM Tris HCl pH 6.8; SDS 4%; azul de bromofenol 0.1%; glicerol 20%; 100 mM DTT); as amostras foram vortexadas, desnaturadas por 5 minutos a 100°C e armazenadas a -20°C até o momento da aplicação;

- Foi preparado um gel desnaturante de poliacrilamida segundo o sistema de tampões descontínuos (Sambrook & Russel, 2001). A concentração do gel de resolução utilizada foi de 13,5%;
- Após a polimerização completa, o gel foi colocado em cuba vertical contendo tampão Tris-Glicina (Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1%). O pente foi retirado cuidadosamente e então foram aplicados 10 µL de cada amostra e também do marcador de peso molecular (Protein Marker Broad Range, NEB);
- Foi configurada uma voltagem máxima de 150 V, e uma miliamperagem máxima de 20 mA; a eletroforese durou 3 horas, até o azul de bromofenol começar a sair no tampão da cuba inferior;
- O gel foi imerso durante 30 minutos na solução corante (54% Metanol, 13,5% Ácido Acético Glacial, 0,27% Coomassie Blue R250). Para retirar o excesso de corante e evidenciar as bandas de proteína, foi imerso durante 1 hora na solução descorante I (30% Metanol, 10% Ácido Acético Glacial) e, durante toda a noite na solução descorante II (5% Metanol, 7% Ácido Acético Glacial).

2.2.16 Teste de solubilidade da proteína SRY

Após a realização de vários testes de indução, foram estabelecidas as condições ideais de expressão da proteína SRY. Nessas condições, todo o crescimento anterior e a indução da expressão devem ser feitas à temperatura ambiente, não ultrapassando 30°C, e com agitação de 200 rpm. Além disso, a indução deve ser feita com IPTG numa concentração final de 0.05 mM, e o tempo de indução deve ser de 3 h.

Nessas condições, o metabolismo bacteriano é reduzido, o que favorece a expressão da proteína plasmidial e possibilita o melhor envelopamento e tratamento pós-traducional da proteína SRY, o que melhora sua solubilidade e reduz o seu englobamento em corpúsculos de inclusão. A menor quantidade de IPTG favorece uma expressão mais lenta e assim colabora para a melhor solubilidade final da proteína exógena.

Desse modo, a fim de determinar se nessas condições a proteína SRY é expressa com boa solubilidade, foram realizados testes de solubilidade em pequena escala:

- Após induzir a expressão conforme as condições acima, toda a cultura foi alíquotada em tubos Eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C; o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de bactéria congelados a -20°C.

- Os *pellets* de bactéria foram ressuscitados por agitação em 500 µL de tampão de lise (Tris HCl 20 mM pH 7; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM). A suspensão (sempre mantida em gelo) foi então sonicada utilizando ponteira fina (5 pulsos, amplitude 35%, 10 segundos de duração cada).

- Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro de 0,45 µm e separado em outro tubo; 20 µL de sobrenadante foram misturados com 20 µL de Tampão de Amostra. Já os *pellets* foram solubilizados em 100 µL de H₂O MilliQ e misturados com 20 µL de Tampão de Amostra. As amostras foram então armazenadas a -20°C, para posterior aplicação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

2.2.17 Extração da proteína SRY em larga escala

Após estabelecer as condições adequadas para a extração da proteína SRY, foi realizada a indução da expressão em um volume maior de cultura, a fim de obter as quantidades de proteína necessárias para os procedimentos posteriores de purificação:

- A expressão foi induzida em 2 L de cultura; após as 3 h de indução a cultura foi transferida para garrafas de centrífuga, que foram centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C; o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de bactéria congelados a -20°C.

- Os *pellets* de bactéria foram ressuscitados por agitação em 60 mL de tampão de lise (Tris HCl 20 mM pH 7; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM). A suspensão (sempre

mantida em gelo) foi transferida para tubos de centrifuga e então sonicada utilizando ponteira fina (10 pulsos, amplitude 40%, 15 segundos de duração cada).

- Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi coletado, filtrado em 0,45 µm e separado em outro tubo; uma alíquota de 20 µL de sobrenadante foi retirada e misturada com 20 µL de Tampão de Amostra. Já uma fração dos *pellets* foi solubilizada em 100 µL de H₂O MilliQ e misturada com 20 µL de Tampão de Amostra. As amostras foram então armazenadas a -20°C, para posterior aplicação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE;

- O restante do sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e armazenado a 4°C.

2.2.18 Purificação proteína SRY

- Após homogeneizar lentamente a resina Ni-Nta Agarose (Qiagen), foram aplicados 2 mL da resina em uma coluna plástica descartável fechada; foi aguardada a sedimentação da resina, e a coluna foi aberta para a liberação do etanol presente sobre a resina; permaneceu na coluna aproximadamente 1 mL da resina;

- Após o escoamento completo do etanol, foram aplicados 10 mL de água MilliQ para lavagem da resina; com o escoamento completo, foram aplicados 5 mL do tampão para equilíbrio da resina, com a mesma composição do tampão de lise (Tris HCl 20 mM pH 7; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM);

- Terminado o escoamento completo do tampão de equilíbrio, o sobrenadante foi sendo transferido para a coluna, e o *flowthrough* proveniente da coluna coletado em tubo falcon de 50 mL;

- Assim que terminou o escoamento de todo o sobrenadante, foram acrescentados 10 mL do tampão de lavagem (Tris HCl 20 mM pH 7; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM), sendo coletado todo o produto em tubo falcon de 15 mL;

- Terminada a lavagem, foram acrescentados 10 mL do primeiro tampão de eluição (Tris HCl 20 mM pH 7; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM), sendo coletado todo o produto em tubo falcon de 15 mL;

- Após a primeira eluição, foram acrescentados 2 mL do segundo tampão de eluição (Tris HCl 20 mM pH 7; NaCl 300 mM; Imidazol 50 mM), e coletado todo o produto. O mesmo procedimento foi realizado utilizando tampões de eluição com concentrações crescentes de imidazol (100, 250 e 500 mM).

- Terminada a última eluição, as amostras foram armazenadas a -20°C. Foi retirada uma alíquota de 20 µL de todas as amostras, para análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e determinação de qual fração da eluição que possui a maior quantidade da proteína SRY purificada.

2.2.19 Ensaio de EMSA

Síntese dos oligonucleotídeos

Foi sintetizado o oligonucleotídeo contendo a sequência alvo consenso AACAAAT, descrito em Assumpção *et al.* (2002).

Oligonucleotídeos A

A-F : 5' - CCGGGTTAACAGAAACAATGGGTCTGGT - 3'

A-R : 3' - ACCAGACCCATTGTTCTGTTAACCCGG - 5'

Ligação dos Oligonucleotídeos

Para formar sondas de fita dupla, primeiramente foram adicionados volumes iguais de cada oligonucleotídeo a 200 pM. Essa mistura do par de oligos foi agitada brevemente

em vórtex, e incubada a 65°C por 5 minutos, seguido de incubação a 37°C; após essa etapa, os tubos foram deixados à temperatura ambiente até estabilização da temperatura e então armazenados a -20°C. Para verificar o sucesso da ligação, as sondas dupla-fita foram aplicadas em gel de agarose 2% (50% agarose 1000 / 50% comum).

Marcação das Sondas

A marcação das sondas com a base C marcada radioativamente (Redivue™ α -³²P-dCTP) (Amersham) foi realizada através da reação Klenow *fill-in* (Sambrook & Russel, 2001):

1 μ L _____ oligos dupla-fita (0,1 μ g/ μ L)

4 μ L _____ 10x fill-in buffer (100 mM MgCl₂; 500 mM NaCl; 500 mM Tris HCl pH8)

3 μ L _____ alfa-³²P dCTP (Amersham)

1 μ L _____ enzima Klenow (Invitrogen)

31 μ L _____ H₂O MilliQ

Volume Final 40 μ L

Essa reação foi incubada por 1 hora e 30 minutos a 25°C, em seguida interrompida com a adição de 1 μ L de EDTA 0,5 M pH 8,0.

Purificação das sondas

Para purificação das sondas foi utilizado o QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após purificação as sondas foram ressuspensas em 100 μ L de H₂O MilliQ, ficando com a concentração final de 1,5 ng/ μ L.

Preparação do gel

Foi preparado um gel não-desnaturante de poliacrilamida 6%, proporção acrilamida/bis-acrilamida 30:0,8. O gel (espessura 1,5 mm) polimerizou durante 1 h, e foi submetido a uma pré-eletroforese durante 1h30, à 150V. O tampão de eletroforese utilizado foi TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,25x e o sistema de eletroforese utilizado foi vertical.

Reação de Ligação (Reação Shift)

Foi realizado um gradiente de concentração da proteína SRY, começando com 0,5 até 5 µg na reação *shift*. A proteína estava com uma concentração inicial de 1 µg/µL.

Sondas Livres

18 µL _____ Tampão *Shift* (10 mM TrisHCl pH7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 5mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,05U poly DI-DC; glicerol 5%)
2 µL _____ sonda A marcada (3 ng)
Volume Final 20 µL

Sondas + Proteína SRY

18 - 13µL _____ Tampão *Shift* (10 mM TrisHCl pH7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 5mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,05U poly DI-DC; glicerol 5%)
0,5 – 5 µL _____ proteína SRY normal ou mutante (0,5 à 5 µg)
2 µL _____ sonda A marcada (3 ng)
Volume Final 20 µL

Todo o preparo das reações foi realizado no gelo. O tampão *shift* e a proteína SRY foram misturados e incubados por 15 minutos no gelo. A sonda A marcada foi então adicionada à reação, que foi incubada por mais 15 minutos (que temperatura??).

Eletroforese

As amostras foram aplicadas no gel sem o *Loading Buffer*, para não interferir na migração dos fragmentos. Para controle da migração no gel, foi aplicado o *Loading Buffer* separadamente.

O tempo de eletroforese foi de aproximadamente 2 h, à 120V (miliamperagem máxima configurada em 20 mA, estabilizada em 10 mA). Durante o procedimento, a cuba foi colocada em geladeira a 4°C, a fim de manter a temperatura do tampão e o do gel abaixo dos 30°C, o que é fundamental para a estabilidade dos complexos DNA/proteína.

Pós-eletroforese

O gel foi seco no aparelho Hoefer Drygel Sr por 1 h, a 75°C, sob vácuo, e em seguida, colocado em um cassete com intensificador a -70°C, para exposição por 24 h ao filme de raio-X (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences).

2.3 ESTUDO IN SILICO DA PROTEÍNA SRY MUTANTE E89K

Foi solicitada a modelagem da estrutura da proteína normal e mutante E89K no software on-line Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>, acesso livre) para fins comparativos de estrutura. As sequências normais e mutantes foram geradas a partir do arquivo fasta obtido no UniProt ([http://www.uniprot.org/blast/?about=Q05066\[1-204\]](http://www.uniprot.org/blast/?about=Q05066[1-204])) para a proteína SRY humana. A sequência normal foi modelada utilizando a mesma sequência do acesso Q05066 no Uniprot. A sequência mutante, foi modelada utilizando a mesma sequência do acesso Q05066 alterando o aminoácido 89 de E (ácido glutâmico) para K (lisina), gerado de acordo com a mutação observada na paciente estudada com disgenesia gonadal. Para a realização da modelagem, as sequências em formato fasta foram enviadas para o Swiss-Model no modo Automático. A partir dos arquivos no formato PDB enviados pelo Swiss-Model, a visualização e a manipulação das estruturas foram realizadas através da interface gráfica gerada pelo programa de acesso

livre *STING Millennium* (suíte *BlueStar STING*, www.cnptia.embrapa.br) (Neshich *et al.* 2003).

2.4 ENSAIO DE EMSA COM FATOR DE TRANSCRIÇÃO SPI

Para a caracterização das interações da proteína Sp1 aos sítios Sp1A e Sp1B, bem como com o sítio Sp1Amut (Sp1A mutante, com a deleção de 3pb), foram realizados ensaios de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

2.4.1 Síntese dos oligonucleotídeos

Foram sintetizados oligonucleotídeos correspondentes aos sítios individuais Sp1A, Sp1Amut (com a deleção de 3 pb correspondente à mutação da paciente) e Sp1B. Além disso, utilizou-se também sondas com os dois sítios de ligação de Sp1 adjacentes (Sp1A+B e Sp1Amut+B), tal qual estão no promotor do gene *SRY*.

a) Sp1A normal:

Sp1A-F : 5' - GGGTGTTGAGGGCGGGAGAAATG - 3'
Sp1A-R : 3' - *CCACAACTCCCGCCTCCTTTAC - 5'

b) Sp1A mut

Sp1Amut-F : 5' - GGTGGTGTTGGCGGGAGAAATGCA - 3'
Sp1Amut-R : 3' - *CACCACAACCGCCTCCTTTACGT - 5'

c) Sp1B normal:

Sp1B-F : 5' - GGGTAGGCTGGTTGGGCGGGTTGAG - 3'
Sp1B-R : 3' - *CCATCCGACCAACCGCCCCCAACTC - 5'

d) Sp1A+Sp1B normal:

Sp1A+B-F : 5' - GGGTAGGCTGGTTGGGCGGGTTGAGGGGGTGTTGAGGGCGGGAGAAATG-3'
Sp1A+B-R : 3' - *CCATCCGACCAACCGCCCCCAACTCCCCACAACTCCCGCCTCCTTTAC-5'

e) Sp1Amut+Sp1B:

Sp1Amut+B-F 5' - GGGTAGGCTGGTT GGGCGGGGTTGAGGGGGTGGTTGGCGGAGAAATGCAA- 3'

Sp1Amut+B-R 3' - *CCATCCGACCAACCCGCCCAACTCCCCCACAACCGCCTCTTTACGTT - 5'

2.4.2 Ligação das Sondas

Para formar sondas de fita dupla, primeiramente foram adicionados 20 µL de cada oligonucleotídeo a 100 pM. Essa mistura do par de oligos foi agitada brevemente por vórtex, e incubada a 90°C por 3 minutos, seguido de 10 minutos a 70°C; após essa etapa, os tubos foram deixados à temperatura ambiente até estabilização da temperatura e então armazenados a -20°C. Para verificar o sucesso da ligação, as sondas dupla-fita foram aplicadas em gel de agarose 2% (50% agarose 1000 / 50% comum).

2.4.3 Marcação das Sondas

A marcação das sondas com a base C marcada radioativamente (Redivue™ α-³²P-dCTP) (Amersham) foi realizada através da reação Klenow *fill-in* (Sambrook & Russel, 2001):

3 µL _____ oligos dupla-fita (10 pM)

4 µL _____ 10x fill-in buffer (100 mM MgCl₂; 500 mM NaCl; 500 mM Tris HCl pH8)

3 µL _____ alfa-³²P-dCTP (Amersham)

1 µL _____ enzima Klenow (Invitrogen)

29 µL _____ H₂O MilliQ

Volume Final 40 µL

Essa reação foi incubada por 1 hora e 30 minutos a 25°C, em seguida interrompida com a adição de 1 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0.

2.4.4 Purificação das sondas

Para purificação das sondas foi utilizado o QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após purificação as sondas foram ressuspensas em 50 μL de H_2O MilliQ, ficando com a concentração final de 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

2.4.5 Preparação do gel

Foi preparado um gel não-desnaturante de poliacrilamida 6%, proporção acrilamida/bis-acrilamida 30:0,8. O gel (espessura 1,5 mm) polimerizou durante 1 h, e foi submetido à pré-eletroforese durante 1 h, à 350 V. O tampão de eletroforese utilizado foi TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x e o sistema de eletroforese utilizado foi vertical.

2.4.6 Reação de Ligação (Reação Shift)

Foi realizado um gradiente de concentração da proteína SP1 (Promega), variando de 17 a 170 ng na reação *shift*. A proteína estava com uma concentração inicial de 0,170 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Sondas Livres

7 μL _____ H_2O MilliQ

1 μL _____ sonda marcada

2 μL _____ Tampão *Shift* (5 mM MgCl_2 ; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 250 mM NaCl;

50 mM Tris HCl pH7.5; 150 ng poly dI-dC; 20% glicerol)

Volume Final 10 μL

Sondas + Proteína SP1

5 μL _____ H_2O MilliQ

1 μL _____ sonda marcada (3 ng)

0,1 - 1 μ L_____ proteína SP1 (17 à 170 ng)
2 μ L_____ Tampão *Shift* (5 mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 250 mM NaCl;
50 mM Tris HCl pH7.5; 150 ng poly dI-dC; 20% glicerol)
Volume Final 10 μ L

Todo o preparo das reações foi realizado no gelo. As reações foram incubadas por 25 minutos à 20° C.

2.4.7 Eletroforese

As amostras foram aplicadas no gel sem o *Loading Buffer*, para não interferir na migração dos fragmentos. Para controle da migração no gel, foi aplicado o *Loading Buffer* separadamente.

O tempo de eletroforese foi de aproximadamente 1 h, à 350 V (miliamperagem máxima configurada em 20 mA, estabilizada em 10 mA). Durante o procedimento, a cuba foi colocada em geladeira a 4°C, a fim de manter a temperatura do tampão e o do gel abaixo dos 30°C, o que é fundamental para a estabilidade dos complexos DNA/proteína.

2.4.8 Pós-eletroforese

O gel foi seco no aparelho Hoefer Drygel Sr por 1 h, a 75°C, sob vácuo, e em seguida, colocado em um cassete com intensificador a -70°C, para exposição por 24 h ao filme de raio-X (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences).

2.5 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO COM GENE REPÓRTER - REGIÃO PROMOTORA SRY

Para se quantificar a ativação dos promotores normal e mutante do gene *SRY* pela proteína Sp1, foram conduzidos experimentos de transfecção e expressão com o gene repórter da Luciferase (Desclozeaux *et al.*, 1998a). Foram preparados plasmídios construídos através da inserção dos fragmentos do promotor contendo os sítios Sp1 normais e mutado no vetor de expressão de gene repórter *pGL3* (Promega). Essas construções foram transfectadas em células da linhagem HeLa, que foram cotransfectadas com os vetores controle pRLTK, para normalização do experimento.

2.5.1 Amplificação do promotor do gene SRY

Para a amplificação da região promotora do gene *SRY* contendo os sítios consenso Sp1A e Sp1B foram utilizados os *primers* e as condições de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) descritas por Shmitt-Ney *et al.* (1995). As sequências normal e mutante foram obtidas através da amplificação de um DNA controle, no caso da sequência normal, e a mutante foi oriunda do próprio paciente com a deleção de 3 pb no sítio Sp1A. Os fragmentos de aproximadamente 360 pb foram submetidos a um *nested-PCR*, com *primers* desenhados de forma a criar sítios de restrição para as enzimas *Kpn* I e *Xho* I (Grupo I) e *Kpn* I e *Nco* I (Grupo II). A finalidade da síntese de fragmentos de 2 grupos de sítios de restrição distintos é para uma posterior ligação em regiões diferentes do vetor de expressão *pGL3*.

Primers

SRY5' *Kpn* I-s (5' - AGGTACCATGTTTTGCTTGAGAAT - 3')

SRY5' *Xho* I-as (5' - GCTCGAGACTTATTTTACTATCCAA - 3')

SRY5' *Nco* I-as (5' - CCATGGTCAAAAACAAGGAGAG - 3')

Ciclo de amplificação

95°C por 5 minutos;

Ciclo 30X: 95°C por 30 segundos; 54°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto;

72°C por 5 minutos;

15°C ∞.

Reação

H ₂ O MilliQ _____	39,2 μL
10X High PCR Buffer (Pharmacia) _____	5 μL
dNTP (2 mM) _____	2,5 μL
Primer <i>Kpn</i> I (20 pMol/μL) _____	1 μL
Primer <i>Xho</i> I ou <i>Nco</i> I (20 pMol/μL) _____	1 μL
Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) _____	1 μL
Diluição 1:100 PCR <i>SRY</i> _____	1 μL

2.5.2 Clonagem no vetor *pGEM-T Easy*

Os fragmentos foram purificados em gel utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e foram clonados utilizando o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), na seguinte reação de ligação, incubada *overnight* a 8°C:

2x <i>Rapid ligation buffer</i> _____	3 μL
Vetor <i>pGEM-T Easy</i> (50 ng/μL) _____	1 μL
Fragmento purificado _____	5 μL
T4 DNA Ligase (10 U/μL) _____	1 μL
Volume Final: 10 μL	

As etapas de clonagem no *pGEM-Teasy*, de transformação, seleção das colônias recombinantes, extração dos plasmídios e confirmação da sequência dos insertos seguiram os mesmos procedimentos dos itens 2.2.2 a 2.2.7.

2.5.3 Digestão e sub-clonagem nos vetores de expressão pGL3

Digestão pGEM-T Easy + promotor SRY

Tampão Tango 10X (Fermentas)	5 µL
Enzima <i>Kpn</i> I (10 U/µL) (Fermentas)	5 µL
Enzima <i>Nco</i> I ou <i>Xho</i> I (10 U/µL) (Fermentas)	5 µL
Miniprep (1 µg/µL)	10 µL
H ₂ O	25 µL
Volume Final	50 µL

Linearização vetores pGL3

Tampão Tango 10X (Fermentas)	1 µL
Enzima <i>Kpn</i> I (10 U/µL) (Fermentas)	1 µL
Enzima <i>Nco</i> I ou <i>Xho</i> I (10 U/µL) (Fermentas)	1 µL
Vetor (1 µg/µL)	1,5 µL
H ₂ O	5,5 µL
Volume Final	10 µL

Após 3 horas de incubação a 37°C, foi retirada uma amostra de 3 µL e aplicada em gel de agarose 1%. Com a digestão total confirmada, foi realizada a inativação das enzimas, incubando a digestão por 15 minutos a 85°C. Após a digestão, foi feita a purificação em gel da banda corresponde ao fragmento liberado pelo *pGEM-T Easy*, assim como dos vetores linearizados, utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Os fragmentos foram ligados nos vetores *pGL3* (que expressam a enzima *Firefly Luciferase*), seguindo as seguintes construções (*Figuras 13 e 14*):

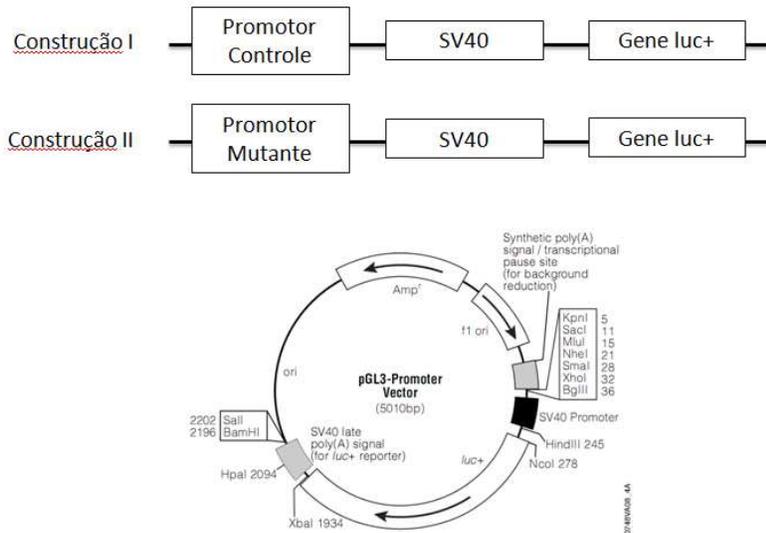


Figura 13. Construções I e II. Os fragmentos do promotor do gene *SRY* foram inseridos no *polylinker* do plasmídio, antes do promotor, para desse modo ter avaliada sua atividade moduladora da expressão do gene *luc+*.

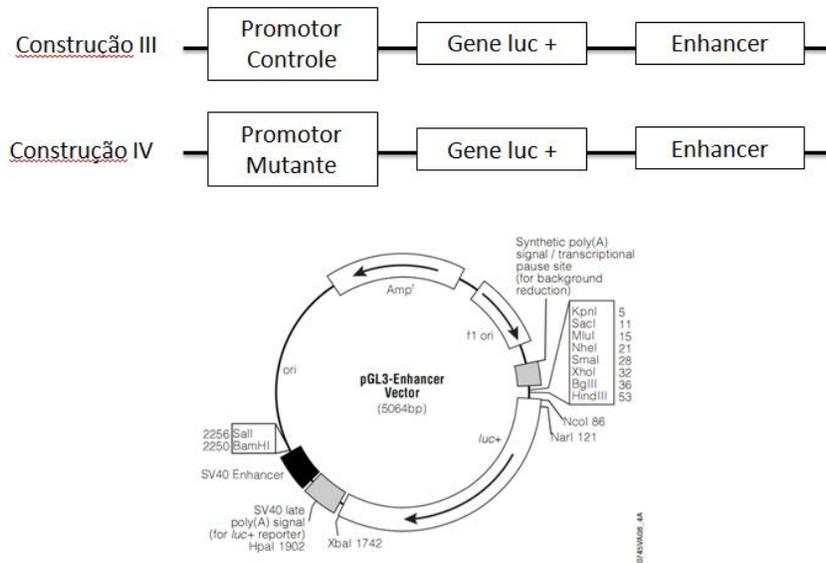


Figura 14. Construções III e IV. Os fragmentos do promotor do gene *SRY* foram inseridos exatamente no início do gene *luc+*, para dessa forma ter sua atividade atuando como um promotor avaliada.

As reações de ligação foram realizadas da seguinte forma:

2x *Rapid ligation buffer* (Promega) _____ 5 μ L

Vetor *pGL3* digerido _____ 1 μ L

Fragmento purificado _____ 3 μ L

T4 DNA Ligase (10 U/ μ L) (Promega) _____ 1 μ L

Volume Final: 10 μ L

As etapas subsequentes de transformação, seleção das colônias recombinantes, extração dos plasmídios e confirmação da sequência dos insertos seguiram os mesmos procedimentos dos itens 2.2.4 a 2.2.7.

2.5.4 Obtenção das construções para transfecção

Confirmada a sequência e o posicionamento dos insertos nos vetores, foi realizada maxiprep de todas as construções, utilizando o kit *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), a fim de obter uma maior quantidade das construções com bons níveis de pureza, necessários para os procedimentos posteriores de transfecção.

2.5.5 Cultivo Celular e Transfecção das células HeLa

As construções gênicas foram transfectadas em células da linhagem HeLa, derivadas de carcinoma cervical e que possuem uma alta capacidade de transfecção. As células foram crescidas a 37°C, 5% de CO₂, em meio F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas numa densidade de 200.000 células por poço, em uma placa com 6 poços, aproximadamente 18 h antes da transfecção.

As células foram transfectadas com 1 μ g de cada uma das construções ou então dos controles positivo (*pGL3 Control* – *Figura 15*) e negativo (*pGL3 Basic* – *Figura 16*) da expressão da luciferase. O vetor *pRL-TK* (*Figura 17*) foi co-transfectado (100 ng) junto com todas as construções e controles, para controle interno do experimento de transfecção. Normalizando a atividade do vetor experimental com a atividade do vetor controle interno,

é minimizada a variabilidade experimental causada por diferenças na viabilidade celular ou na eficiência da transfecção.

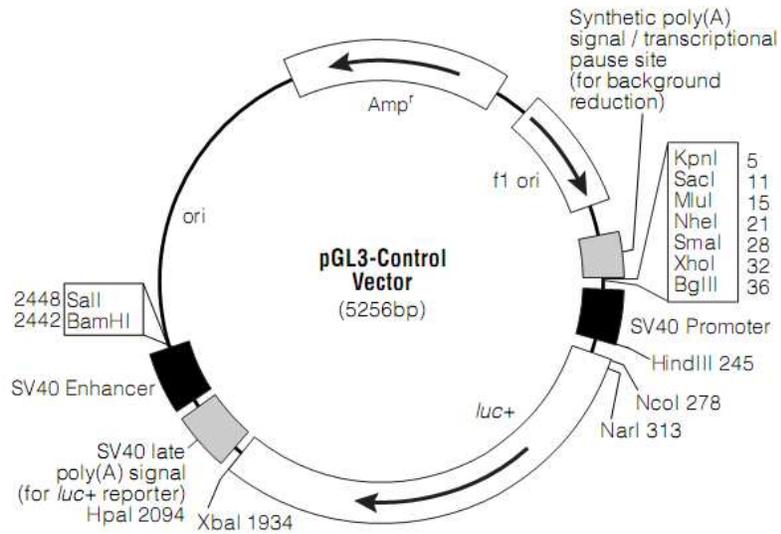


Figura 15. Vetor de expressão pGL3-Control, utilizado como controle positivo.

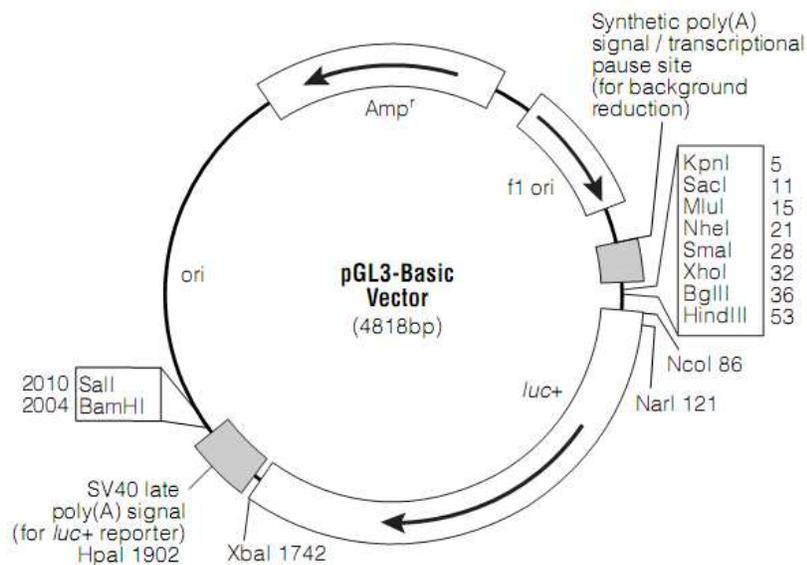


Figura 16. Vetor de expressão pGL3-Basic, utilizado como controle negativo.

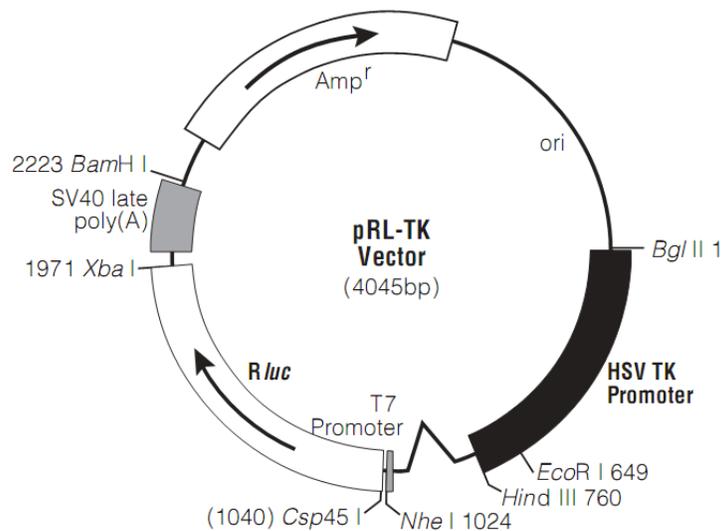


Figura 17. Vetor de expressão RL-TK, utilizado como controle interno do experimento de transfecção. Os dados das leituras com os vetores experimentais pGL3 (que expressam a *Firefly Luciferase*) foram normalizados com os dados do vetor pRL-TK, que expressa a *Renilla Luciferase*.

A transfecção transiente foi realizada utilizando o kit *FuGENE® HD Transfection Reagent* (Roche Applied Science), segundo as especificações do fabricante.

2.5.6 Quantificação da expressão e atividade da luciferase

Após aproximadamente 48 horas de transfecção, foram iniciados os procedimentos para quantificação da atividade da luciferase, utilizando o kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega). As células HeLa foram lisadas e o extrato celular utilizado para a leitura da luminescência da *Firefly* luciferase, seguida da leitura da luminescência da *Renilla* luciferase. As leituras da luminescência foram realizadas no aparelho *Triathler Multilabel Tester* (Hidex). Os valores obtidos com os vetores experimentais foram normalizados pelos valores obtidos com o vetor controle interno pRL-TK, através da relação *Firefly/Renilla*.

Os experimentos de transfecção e quantificação da atividade da luciferase foram realizados em triplicata, para reduzir a influência das variáveis experimentais no resultado.

RESULTADOS

1. SEQUENCIAMENTO DO GENE *SRY* EM NOVOS PACIENTES COM DISGENESIA GONADAL

No sequenciamento automático das amostras de novos pacientes com disgenesia gonadal, não foram encontradas mutações no gene *SRY*, nem em sua região promotora. Foram sequenciados sete indivíduos (*Tabela 2*), inclusive o pai e o irmão da paciente portadora da mutação Glu89Lys, mas não foram encontradas alterações (*Figura 18*). Esse dado confirma a mutação Glu89Lys como um evento *de novo*, não herdado.

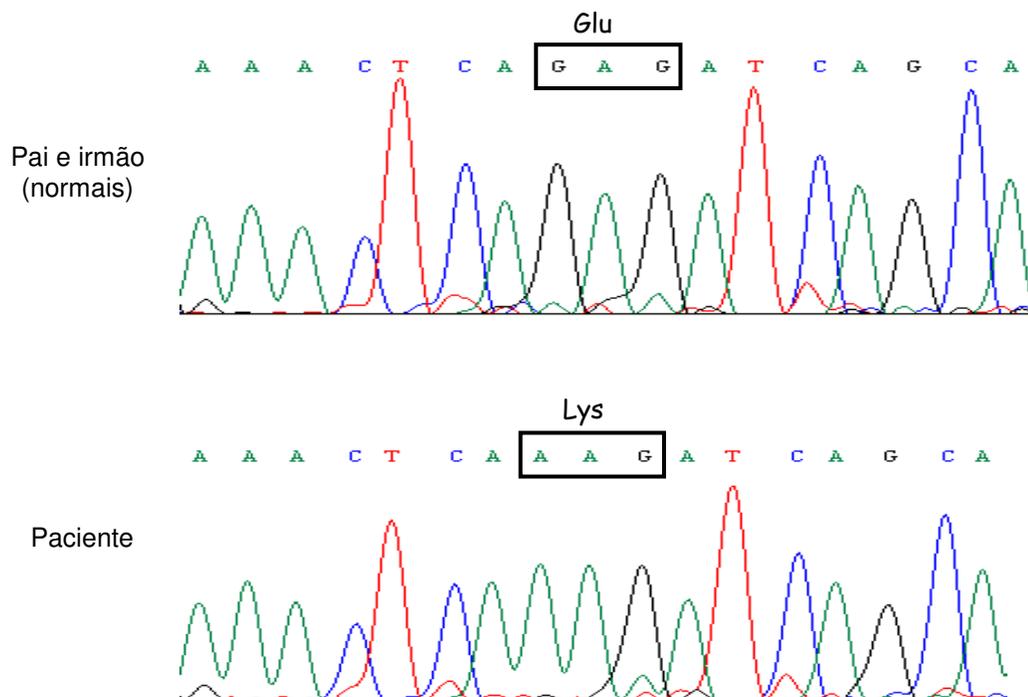


Figura 18. Comparação da sequência com a mutação Glu89Lys com a sequência normal presente nos familiares e nos pacientes analisados. Em destaque está assinalada a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon 89 e a troca de um aminoácido ácido (ácido glutâmico) por um básico (lisina).

Tabela 2. Resumo dos diagnósticos clínicos e dos achados moleculares no gene *SRY*

Paciente	Diagnóstico	Cariótipo	Gene <i>SRY</i>	
			Região codificante	5' não traduzida
1	DG pura	46, XY	Normal	Del 5' 3pb
2	DG pura	46, XY	<i>HMG-Box</i> E89K	Normal
3	DG parcial	46, XY	Normal	Normal
4	DG pura	46, XY	Normal	Normal
5	DG pura	46, XY	Normal	Normal
6	DG pura	46, XY	Normal	Normal
7	Normal (pai paciente 2 portadora da mutação E89K)	46, XY	Normal	Normal
8	Normal (irmão paciente 2 portadora da mutação E89K)	46,XY	Normal	Normal

2. EXPRESSÃO DE PROTEÍNA SRY^{E89K} MUTANTE E VERIFICAÇÃO DE SUA INTERAÇÃO COM DNA POR ENSAIO DE EMSA

Com a clonagem dos fragmentos normal e mutante do gene *SRY* no vetor *pGEM-T Easy*, e posterior sub-clonagem no vetor de expressão *pET28a*, foi realizada a transformação desses vetores recombinantes na linhagem de *E. coli* BL21DE3. Após triagem por PCR das colônias recombinantes portadoras do *pET28a* contendo o fragmento do gene *SRY*, foram iniciadas as tentativas de expressão da proteína *SRY*.

2.1 Expressão e purificação da proteína SRY normal e mutante

Foi necessária uma padronização prévia das condições de expressão, como o tempo de indução, a concentração de IPTG e a densidade ótica no momento de indução, a fim de garantir a produção da proteína SRY em quantidades suficientes e em boas condições de solubilidade. O primeiro parâmetro a ser fixado foi o tempo de indução (*Figura 19*), e depois a concentração mínima de IPTG necessária para induzir a expressão da proteína (*Figura 20*).

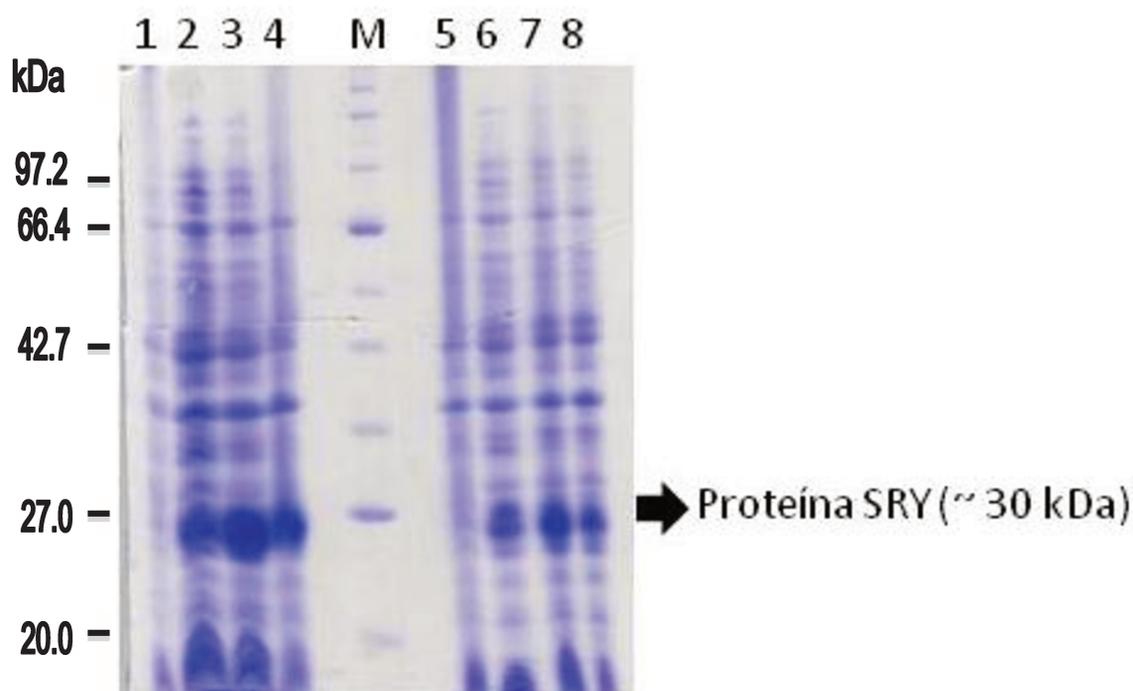


Figura 19. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células *E. coli* BL21DE3 transformadas com o vetor de expressão pET28a. As linhas de 1 a 4 correspondem às amostras mutantes sem indução (0h), e com 1, 3 e 5h após indução com IPTG, respectivamente. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular (*New England Biolabs*), e as linhas de 5 a 8 correspondem às amostras normais controle sem indução (0h), e com 1, 3 e 5h após indução com IPTG, respectivamente.

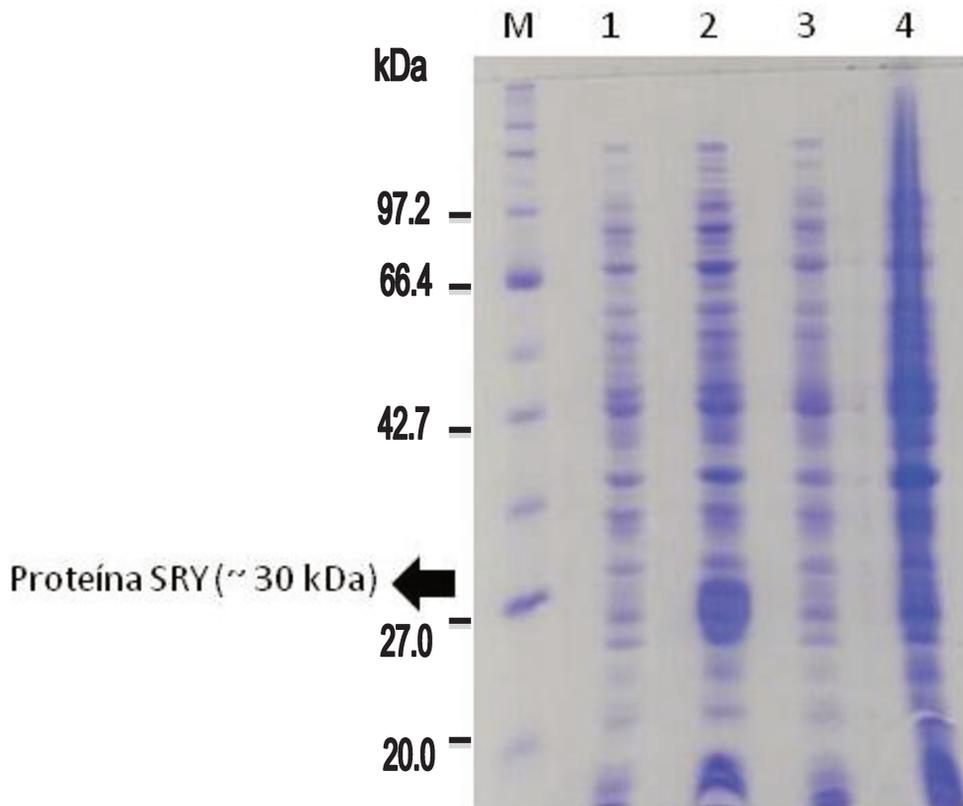


Figura 20. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células *E. coli* BL21DE3 transformadas com o vetor de expressão pET28a. As linhas 1 e 2 correspondem às amostras mutantes sem indução (0 h) e com 3 h após indução com IPTG na concentração final de 0,1 mM, respectivamente. As linhas 3 e 4 correspondem às amostras mutantes sem indução (0 h) e com 3 h após indução com IPTG na concentração final de 0,01 mM, respectivamente. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular (*New England Biolabs*).

Fixados estes parâmetros, foi realizada a primeira tentativa de extração da proteína SRY das bactérias (*Figura 21*), verificando assim sua presença na fração insolúvel (*pellet*) ou solúvel (*sobrenadante*). Neste teste foi feita ainda mais uma tentativa de diminuir a concentração de IPTG, a fim de proporcionar melhores condições de solubilidade à proteína.

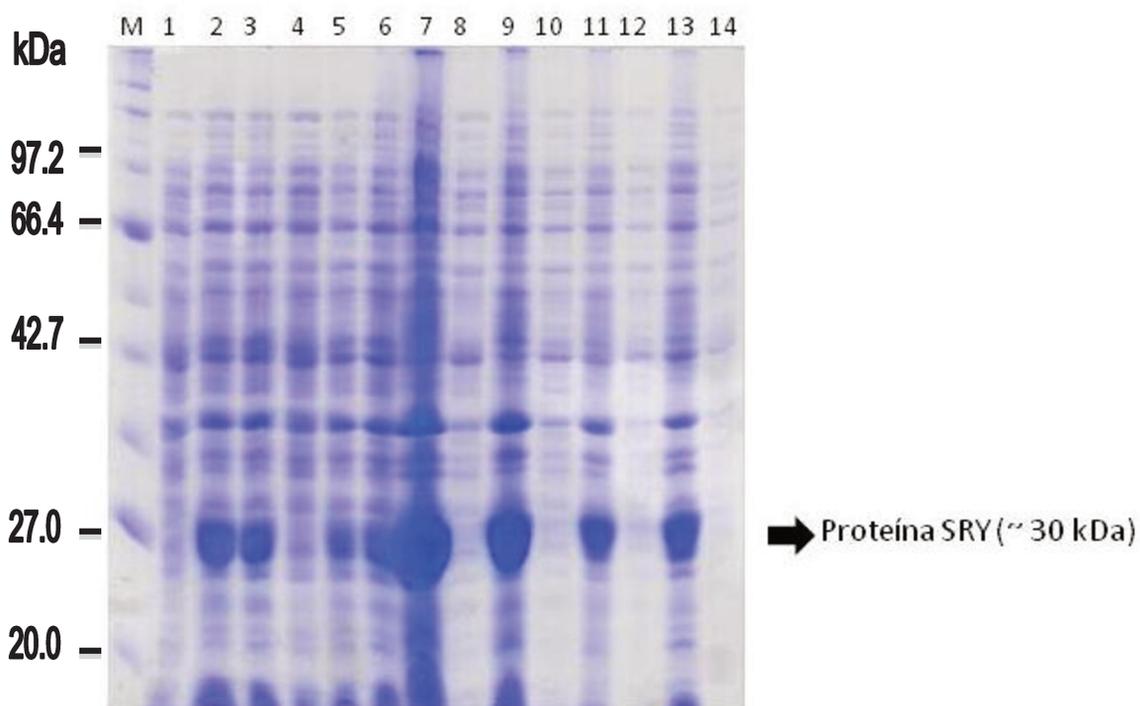


Figura 21. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células *E. coli* BL21DE3 transformadas com o vetor de expressão pET28a. As linhas de 1 a 3 correspondem às amostras mutantes sem indução (0 h), e com 3 h após indução com IPTG na concentração de 0,1 e 0,05 mM, respectivamente. As linhas de 4 a 6 correspondem às amostras normais controle sem indução (0 h), e com 3 h após indução com IPTG na concentração de 0,1 e 0,05 mM, respectivamente. As linhas 7, 9, 11 e 13 correspondem às amostras mutantes e normais da fração insolúvel (*pellet*) obtida após a extração, enquanto que as linhas 8, 10, 12 e 14 correspondem às amostras mutantes e normais da fração solúvel (sobrenadante) obtida após a extração. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular (*New England Biolabs*),

Nesse teste de expressão foi possível observar que a maioria da proteína SRY ficou na fração insolúvel após a extração; entretanto há na fração solúvel proteínas com o mesmo peso molecular da proteína SRY.

Desse modo foi realizado um teste para verificar a possibilidade de purificação da proteína à partir da fração solúvel nessas condições de extração. Após a indução em um volume maior de cultura, a extração realizada nas mesmas condições e o sobrenadante filtrado foi purificado na coluna de níquel (*Figura 22*). Pode-se observar que juntamente com a proteína SRY foi eluída da coluna uma proteína contaminante.

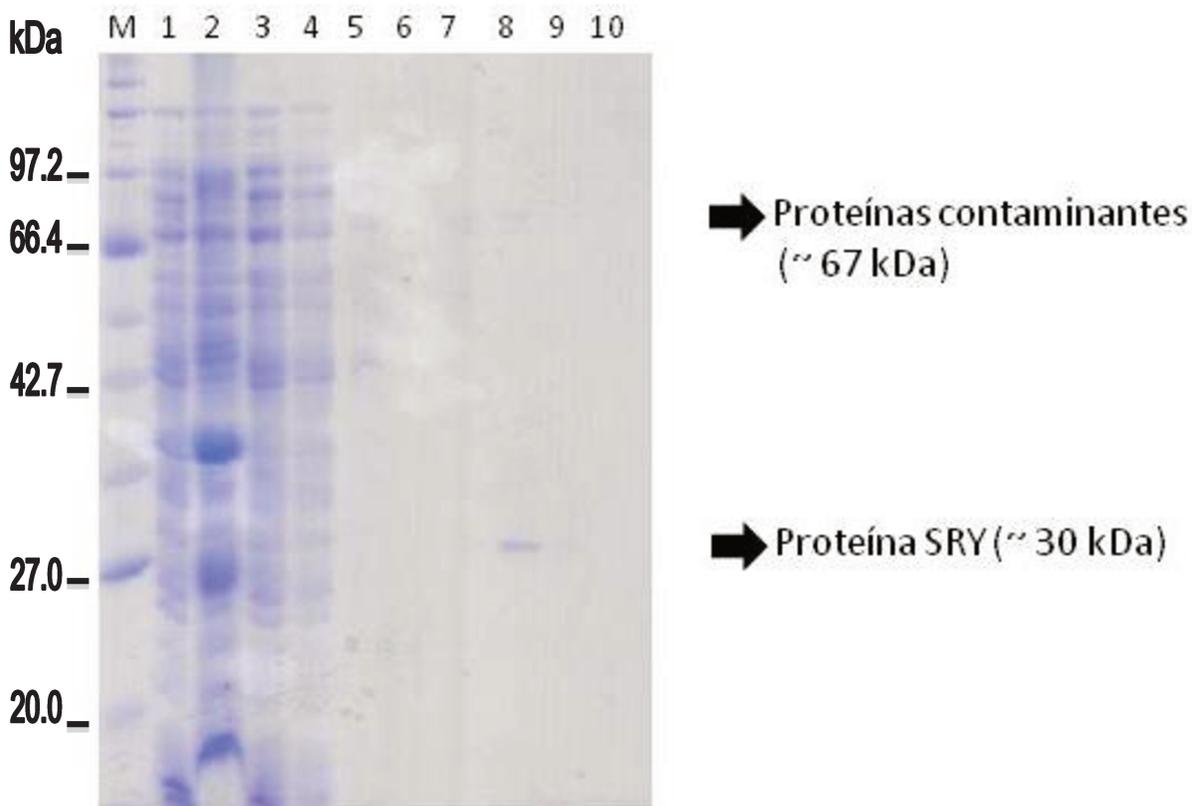


Figura 22. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células *E. coli BL21DE3* transformadas com o vetor de expressão pET28a. As linhas e 1e 2 correspondem às amostras mutantes sem indução (0 h), e com 3 h após indução com IPTG na 0,05 mM, respectivamente. A linha 3 corresponde ao sobrenadante obtido após a extração. As linhas 4 e 5 correspondem ao *flowthrough* e à lavagem da coluna de purificação, e as linhas de 6 a 10 correspondem à eluição da proteína da coluna em concentrações crescentes de Imidazol (20, 50, 100, 250 e 500 mM, respectivamente). A linha M corresponde ao marcador de peso molecular (*New England Biolabs*).

Foi realizada então uma purificação partindo de um maior volume de cultura induzida, com o objetivo de obter a quantidade necessária da proteína SRY suficiente para os procedimentos posteriores. Entretanto, não se obteve uma diferença significativa entre a quantidade de proteína obtida em relação à purificação teste realizada em menor escala, (Figura 23), possivelmente devido à menor eficiência da lise das bactérias durante a extração, já que o volume de cultura induzida utilizado foi muito maior. Pode-se observar que a proteína SRY foi eluída com maior intensidade pelo tampão de eluição contendo 250 mM de imidazol, enquanto que a fração eluída com tampão 100 mM contém somente a proteína contaminante. Como o ensaio de EMSA apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, decidiu-se utilizar esses extratos purificados das proteínas normal e mutante para realizar os ensaios de EMSA.

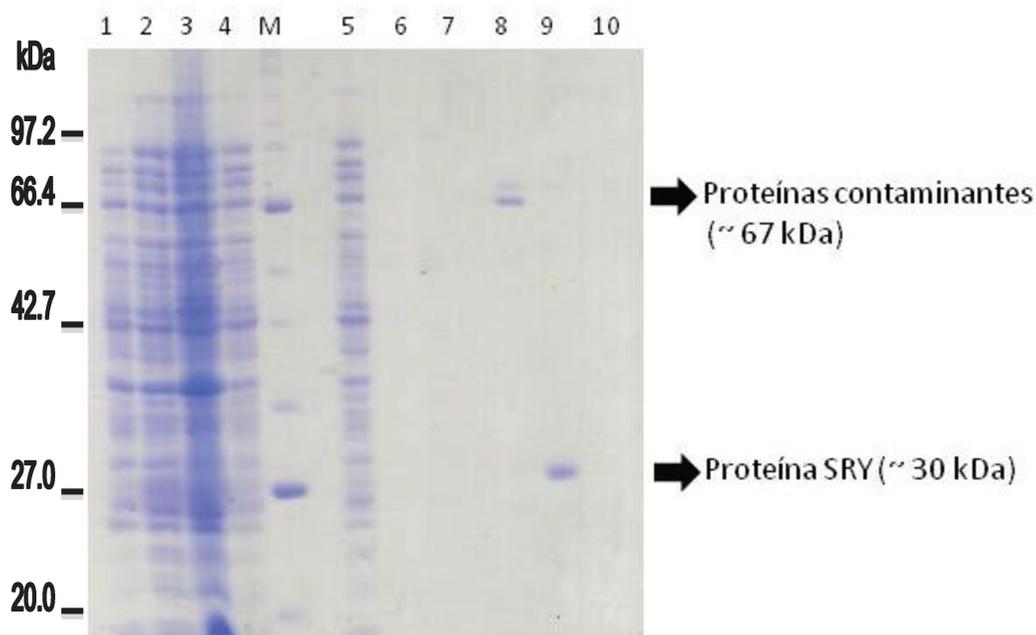


Figura 23. Gel de acrilamida 13,5% contendo amostras de proteína expressas por células *E. coli BL21DE3* transformadas com o vetor de expressão pET28a. As linhas e 1e 2 correspondem às amostras mutantes sem indução (0h), e com 3h após indução com IPTG na 0,05 mM, respectivamente. As linhas 3 e 4 correspondem ao *pellet* e ao sobrenadante obtidos após a extração,

respectivamente. As linhas 5 e 6 correspondem ao *flowthrough* e à lavagem da coluna de purificação, e as linhas de 7 a 10 correspondem à eluição da proteína da coluna em concentrações crescentes de Imidazol (50, 100, 250 e 500 mM, respectivamente). A linha M corresponde ao marcador de peso molecular (*New England Biolabs*).

2.2 Ensaio de EMSA com as proteínas SRY normal e mutante

Após várias tentativas e alterações nas condições do gel e da reação de ligação, foi obtido um gel com boa definição das bandas (*Figura 24*), onde foi confirmado o resultado que indica que a mutação E89K na *HMG-Box* do gene *SRY* diminui muito a capacidade de ligação da proteína ao DNA-alvo. Pode-se observar que a partir da quantidade de 1µg a proteína selvagem mostra uma capacidade de ligação maior, formando complexos de DNA-proteína bem definidos, ao contrário da proteína mutante, que começa a formar complexos DNA-proteína, de forma fraca, só nas quantidades maiores de proteína (5 µg).

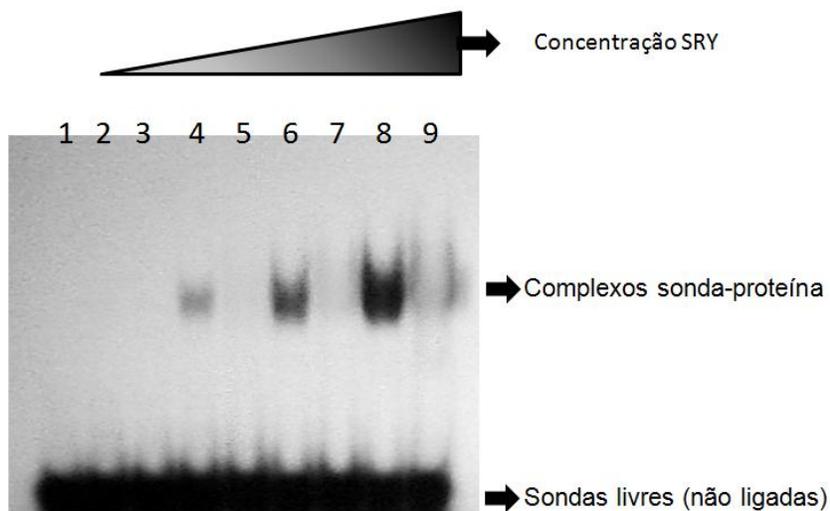


Figura 24. Ensaio de EMSA, testando a capacidade de ligação das proteínas SRY selvagem e mutante ao DNA. A linha 1 corresponde à sonda livre A. As linhas 2, 4, 6 e 8 correspondem às reações constituídas por sonda + proteína SRY selvagem em concentrações crescentes (0,5 µg; 1µg; 2,5µg; 5µg, respectivamente), podendo ser observada a formação de complexos DNA-

proteína. As linhas 3, 5, 7 e 9 correspondem às reações constituídas por sonda + proteína SRY mutante em concentrações crescentes (0,5 µg; 1µg; 2,5µg; 5µg, respectivamente), podendo ser observado que a formação dos complexos DNA-proteína é bem menor em relação à proteína selvagem.

3. ANÁLISE IN SILICO DA PROTEÍNA SRY MUTANTE E89K

A análise estrutural por homologia da variante E89K foi realizada com a intenção de compreender os efeitos da troca de aminoácidos na proteína SRY. Foi utilizado como modelo uma estrutura previamente publicada, PDB-ID 1j46 (Murphy *et al.*, 2001), que é resultado da resolução por RMN de um complexo em solução entre a *HMG-Box* selvagem de SRY e um oligonucleotídeo contendo a sequência-alvo de ligação. Segundo o modelo, a *HMG-Box* de SRY possui um formato de L, que consiste das duas regiões C e N-terminal em forma de fita e de 3 α -hélices (*Figura 25*). Vale ressaltar que a estrutura pdb utilizada para modelagem não apresenta a sequência completa da proteína SRY, apenas a *HMG-Box* é analisada, apresentando porém alto grau de similaridade.

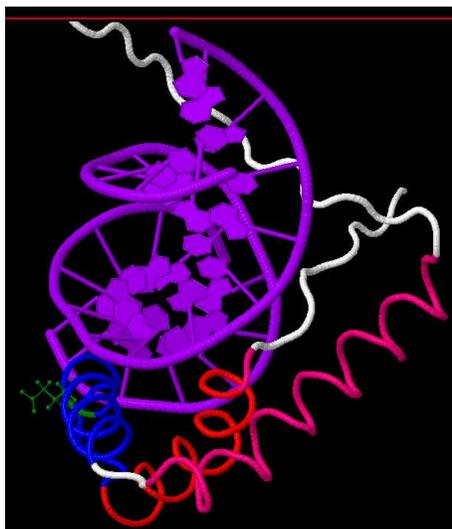


Figura 25. Modelo da *HMG-Box* de SRY complexada com o DNA (roxo). Destacadas na estrutura as α -hélices 1 (vermelho), 2 (azul) e 3 (rosa), além do resíduo E89 (verde) na α -hélice 2.

A estrutura da proteína homóloga 1j46.pdb – cadeia A, apresentou cerca de 98% de similaridade com a proteína SRY mutante E89K, sendo que a similaridade com a sequência normal da *HMG-Box* de SRY foi de praticamente 100%, diferindo apenas em aminoácidos utilizados para clonagem e expressão da proteína recombinante no modelo estrutural.

A proteína SRY mutante E89K, modelada pelo Swiss-Model, foi alinhada com a proteína disponível no PDB, 1J46.pdb – cadeia A, representando o domínio *HMG-Box* da proteína SRY selvagem e a partir da qual a mutante foi modelada. No alinhamento, somente a porção correspondente ao domínio *HMG-Box* foi alinhada, sendo que os outros resíduos da proteína, solicitados na modelagem foram excluídos. As estruturas ficaram praticamente idênticas mesmo com a mutação E89K (*Figura 26*), diferindo apenas na estrutura individual dos dois aminoácidos. Segundo o modelo, o aminoácido ácido glutâmico não faz ligação com o DNA na *HMG-Box* da proteína SRY selvagem.

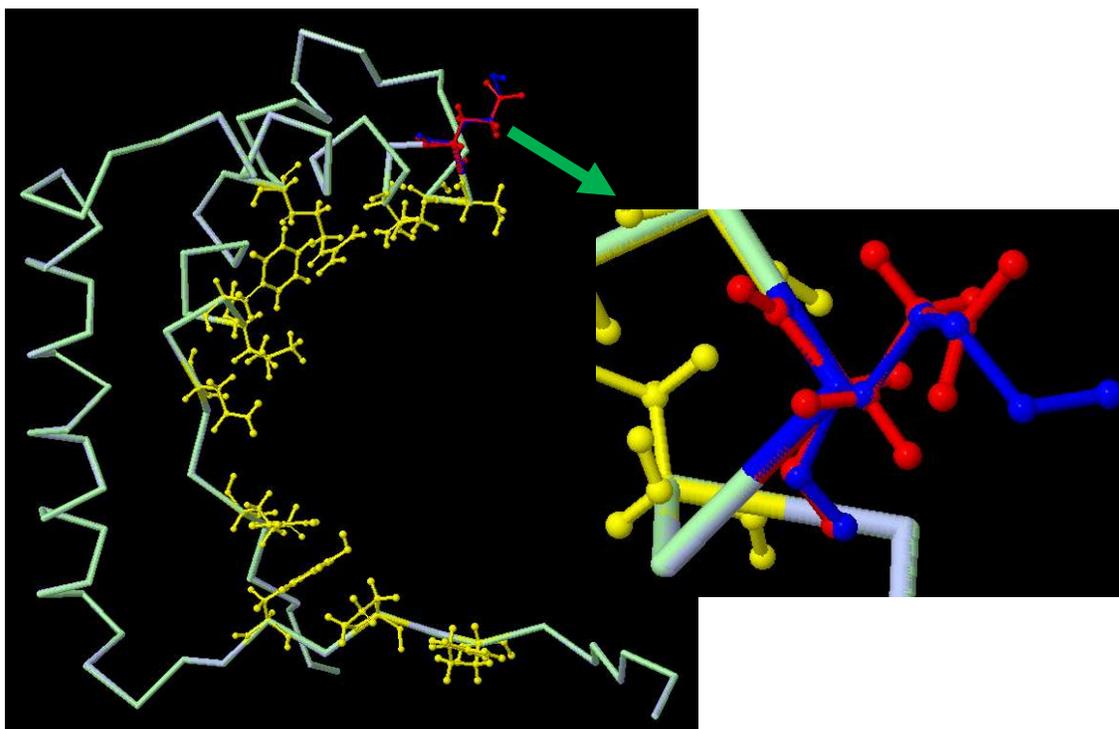


Figura 26. Modelo 1J46.pdb, representando a *HMG-Box* da proteína SRY selvagem, alinhado com a modelo gerado da proteína SRY mutante E89K.. Destacados na

estrutura da proteína os aminoácidos que segundo o modelo interagem com o DNA (em amarelo). Em destaque a sobreposição da resíduo E no modelo normal (em vermelho) ao resíduo K no modelo mutante (em azul), demonstrando a conformação estrutural discrepante entre os resíduos (destaque no quadro).

Os contatos internos realizados pelo resíduo K89 na proteína SRY mutante E89K foram analisados e comparados com os contatos realizados pelo resíduo original E89 no modelo 1j46 (*Figura 27*).

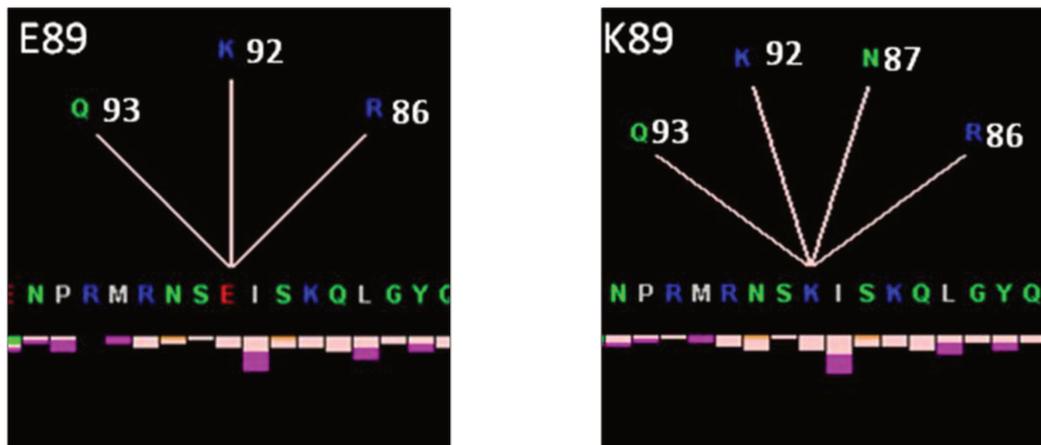


Figura 27. Gráfico de contatos internos perdidos ou estabelecidos pelas trocas de aminoácidos (fornecido pelo programa *STING*). A troca de um ácido glutâmico (E) por uma lisina (K) no aminoácido 89 cria mais uma interação do tipo ponte de hidrogênio, com o aminoácido asparagina (N) na posição 87. Segundo o modelo, o resíduo N87 interage diretamente com o DNA.

Para verificar se essa nova interação do aminoácido lisina na posição 89 com a asparagina na posição 87 afeta as interações também da asparagina, foi realizada a mesma análise de contatos internos entre as proteínas normal e mutante (*Figura 28*).

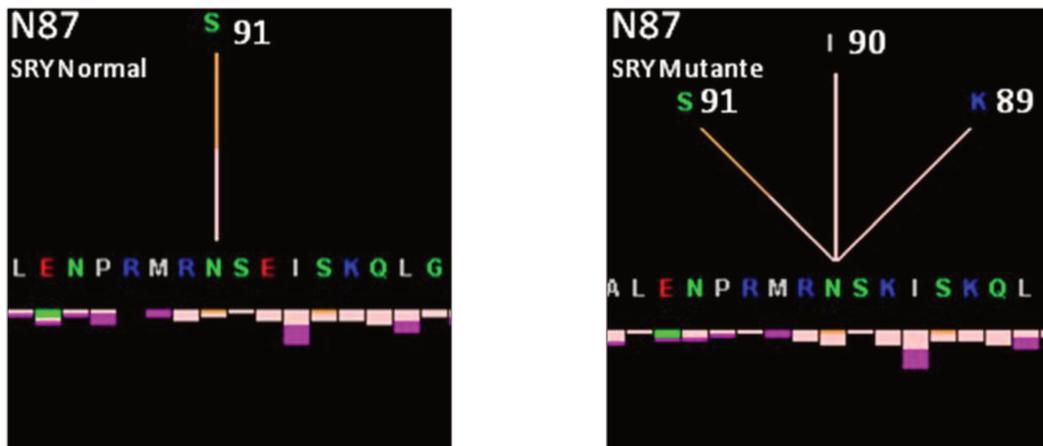


Figura 28. Gráfico de contatos internos (fornecido pelo programa *STING*) verificando o efeito da nova interação estabelecida entre o aminoácido mutante lisina (K) na posição 89 e o aminoácido asparagina (N) na posição 87. Além da nova interação com o resíduo K89, o resíduo N87 estabelece mais uma interação, do tipo ponte de hidrogênio, com o aminoácido isoleucina (I) na posição 90, além de manter a sua interação com o resíduo de serina (S) na posição 91.

A conservação do aminoácido 89 ácido glutâmico foi analisada pelo programa *STING Report* (Figura 29) e verificou-se uma alta conservação (85%) pelo HSSP (que faz uma estimativa de similaridade entre a proteína analisada, as estruturas de proteínas do PDB e as sequências de proteínas no Uniprot), com baixa entropia relativa. A conservação deste e do resíduo K92 com o qual ele interage indicam a importância desses resíduos para a proteína. Os resíduos N87 (que faz nova interação com o resíduo K89 mutante) e S91 interagem diretamente com o DNA segundo o modelo, e se mostraram também altamente conservados. Outro dado observado na análise é que não há descrição de lisina (K) na posição 89, o que indica que esse tipo de alteração no aminoácido da posição não é comum, sendo potencialmente danosa. Nenhum dos outros aminoácidos também observados nessa posição, com porcentagens baixas (V, A, S, Q e N) é de propriedade semelhante ao aminoácido K89 mutante (lisina, um aminoácido básico carregado positivamente). Fora o ácido glutâmico (E), o aminoácido mais abundante na posição 89 é o ácido aspártico (D),

de propriedades semelhantes ao ácido glutâmico (cadeia lateral ácida, carregada negativamente).

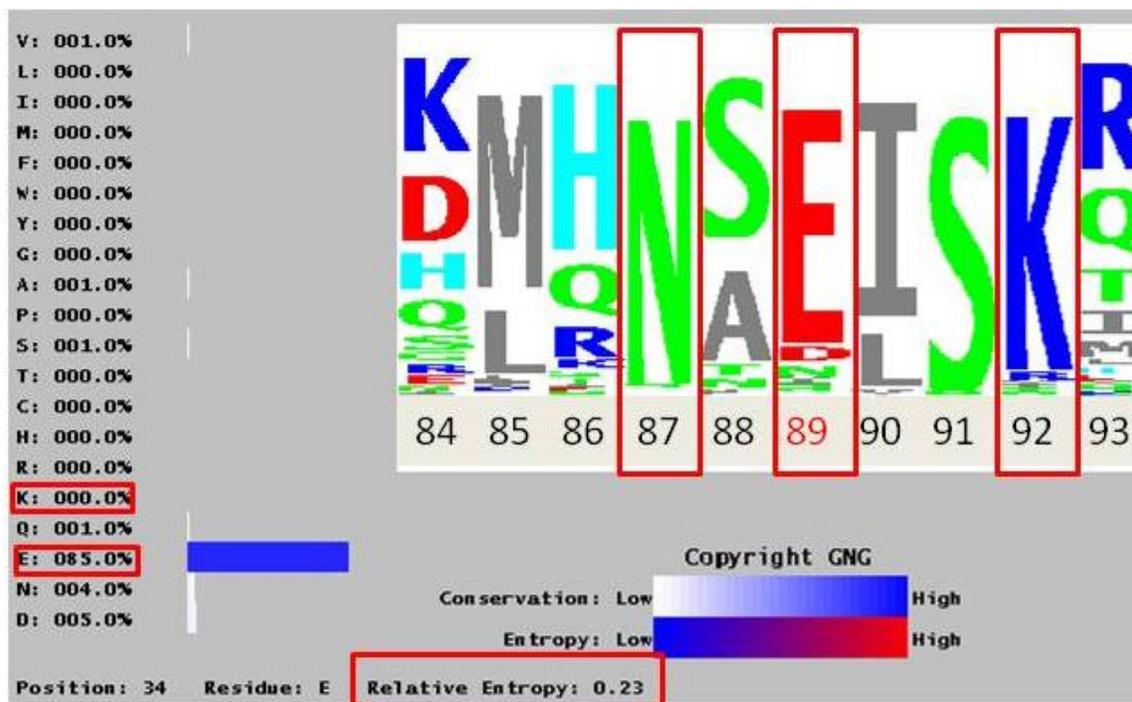


Figura 29. Análise de conservação do aminoácido ácido glutâmico (K) na posição 89 da proteína SRY. Destacados em vermelho os resíduos mais conservados, assim como a porcentagem de conservação de E, ausência de K e valor de entropia relativa.

4. ENSAIO DE EMSA - FATOR SP1

Foram necessárias várias tentativas até se chegar a uma padronização dos parâmetros para os ensaios de EMSA com o fator Sp1. Essa não era uma técnica de rotina no laboratório, e a adaptação dos equipamentos disponíveis para as características específicas desse tipo de ensaio gerou diversas dificuldades no início. Depois de contornadas essas dificuldades materiais, foi necessário também um ajuste fino das condições do gel de poliacrilamida, assim como dos componentes da reação de ligação das

sondas de DNA marcadas à proteína (como a concentração do fator Sp1, das sondas e dos componentes do tampão de ligação), até se chegar a resultados satisfatórios. A *Figura 30* ilustra uma das primeiras tentativas do experimento, onde podem ser observadas as bandas de *shift* entre as sondas e o fator Sp1, mas a falta de definição das bandas dificulta a observação de diferenças de ligação entre as 2 sondas.

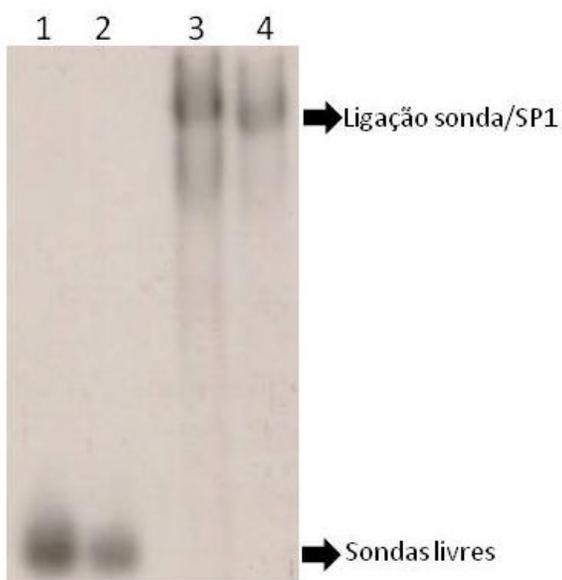


Figura 30. Ensaio de EMSA. As linhas 1 e 2 correspondem às sondas livres Sp1A+Sp1B e Sp1Amut+Sp1B, respectivamente. As linhas 3 e 4 correspondem aos complexos DNA-proteína formados entre o fator Sp1 e as sondas Sp1A+Sp1B e Sp1Amut+Sp1B, respectivamente.

Após várias tentativas e alterações nas condições do gel e da reação de ligação, foi obtido um gel com melhor definição das bandas (*Figura 31*), onde foi confirmado o resultado já descrito na literatura (Assumpção *et al.*, 2005) de que a mutação no sítio Sp1A abole a ligação do fator Sp1, e possivelmente estaria prejudicando a expressão do gene na

paciente com disgenesia gonadal pura 46,XY. Entretanto, quando analisados os dois sítios adjacentes na mesma sonda, tal qual estão no promotor do gene *SRY*, não se pode ainda observar diferenças na ligação entre as sondas normal e mutante.

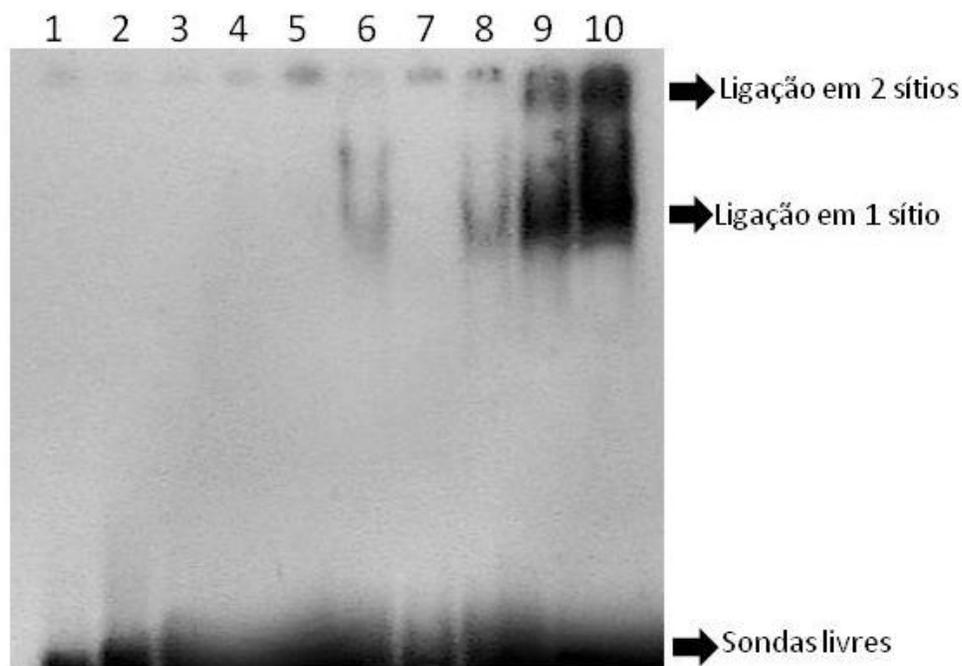


Figura 31. Ensaio de EMSA. As linhas de 1 a 5 correspondem às sondas livres Sp1A, Sp1Amut, Sp1B, Sp1A+Sp1B e Sp1Amut+Sp1B, respectivamente. As linhas de 6 a 10 correspondem aos complexos DNA-proteína formados entre o fator Sp1 e as sondas Sp1A, Sp1Amut, Sp1B, Sp1A+Sp1B e Sp1Amut+Sp1B, respectivamente

Como mais uma confirmação de que a mutação no sítio Sp1A impossibilita a ligação do fator Sp1, realizamos um ensaio de competição com sondas frias (não marcadas). Estas sondas, aplicadas em um excesso de 100 vezes em relação à sonda marcada Sp1A + Sp1B normal, competiram com a sonda marcada pela ligação ao fator Sp1 na reação de ligação. Como pode ser observado na *Figura 32*, apenas a sonda A normal mostrou-se capaz de competir e inibiu a ligação de Sp1 à sonda marcada; já com a sonda A

mutante competindo, podemos observar as bandas de *shift*, já que a sonda marcada não encontrou competição para se ligar e formar o complexo DNA-proteína com o fator de transcrição.

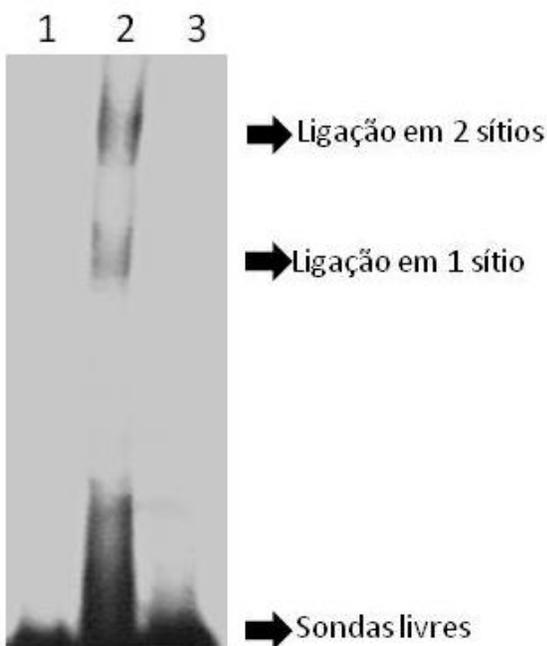


Figura 32. Ensaio de EMSA. A linha 1 corresponde à sonda livre Sp1A+Sp1B. A linha 2 corresponde ao complexo DNA-proteína formado entre o fator Sp1 e a sonda Sp1A+Sp1B, mesmo com a competição da sonda fria Sp1Amut. A linha 3 corresponde à reação contendo o fator Sp1 e a sonda Sp1A+Sp1B, sendo que a sonda fria Sp1A normal inibe a formação do complexo DNA-proteína.

A fim de analisar se estaria sendo utilizado um excesso do fator Sp1, o qual poderia impedir a observação de diferenças na ligação entre as sondas normal e mutante, foi feito um gradiente de concentração do fator Sp1 na reação de ligação, e assim puderam ser observadas diferenças significativas na ligação. Com a redução em dez vezes da quantidade do fator Sp1 na reação foi resolvido o problema estequiométrico de excesso de proteína na

reação, e ficou claro que a mutação no sítio Sp1A inibe a ligação do fator Sp1 mesmo com o sítio Sp1B adjacente, que por sua vez mantém sua capacidade de ligação (*Figura 33*).

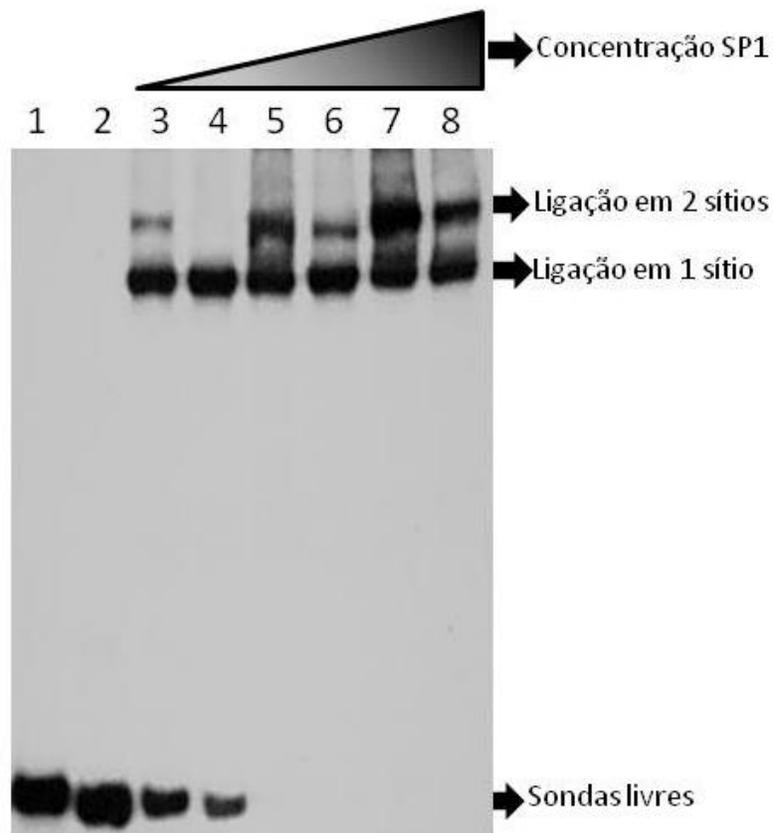


Figura 33. Ensaio de EMSA. As linhas 1 e 2 correspondem às sondas livres Sp1A+Sp1B e Sp1Amut+Sp1B, respectivamente. As linhas 3, 5 e 7 correspondem aos complexos DNA-proteína formados entre o fator Sp1 e a sonda Sp1A+Sp1B, com quantidades crescentes de Sp1 aplicadas na reação de ligação (17, 85 e 170 ng, respectivamente). As linhas 4, 6 e 8 correspondem aos complexos DNA-proteína formados entre o fator Sp1 e a sonda Sp1Amut+Sp1B, com quantidades crescentes de Sp1 aplicadas na reação de ligação (17, 85 e 170 ng, respectivamente).

As bandas de menor peso molecular correspondem aos complexos do fator Sp1 ligado a somente um dos sítios (Sp1A ou Sp1 B), enquanto que a banda de maior peso

molecular corresponde à ligação de Sp1 nos 2 sítios. Essa ligação dupla não é observada na sonda Sp1Amut + Sp1B, já que a mutação no sítio Sp1A praticamente abole a ligação do fator Sp1 ao sítio (*Figura 33*).

5. ENSAIO DE EXPRESSÃO COM GENE REPÓRTER

Com as sequências da região promotora normal e mutante do gene *SRY* clonadas nos vetores *pGL3*, foi realizada a extração em larga escala (maxiprep) das construções, necessária para obter um número elevado de plasmídios com boa qualidade, para a posterior transfecção das linhagens celulares.

Os resultados dos experimentos de transfecção transiente, expressos em unidades relativas de luz (ULR), estão apresentados na *Tabela 3*, representando as médias obtidas a partir dos valores dos 3 experimentos de transfecção realizado com cada construção.

Tabela 3. Resultados das médias dos experimentos de transfecção transiente em células HeLa.

Vetores/Construções	Atividade da Luciferase (ULR)
Control (+)	15.406.007
Basic (-)	10.860
I	2.878.644
II	2.955.502
III	1.296.085
IV	661.904
Células Vazias	377
DNA Nú	312
Fugene	602
Branco	99

Os resultados estão representados graficamente na *Figura 34*. As construções I e II (promotor de *SRY* clonado antes do promotor SV40, para verificar modulação), apresentaram valores próximos entre si. As construções III e IV (promotor de *SRY* clonado em vetor pGL3 sem promotor, para verificar capacidade de promoção da expressão da luciferase) foram capazes de induzir a expressão da luciferase e apresentaram diferença maior entre si, sendo que a construção III (promotor normal) apresentou aproximadamente o dobro de atividade que a construção IV (promotor mutante).

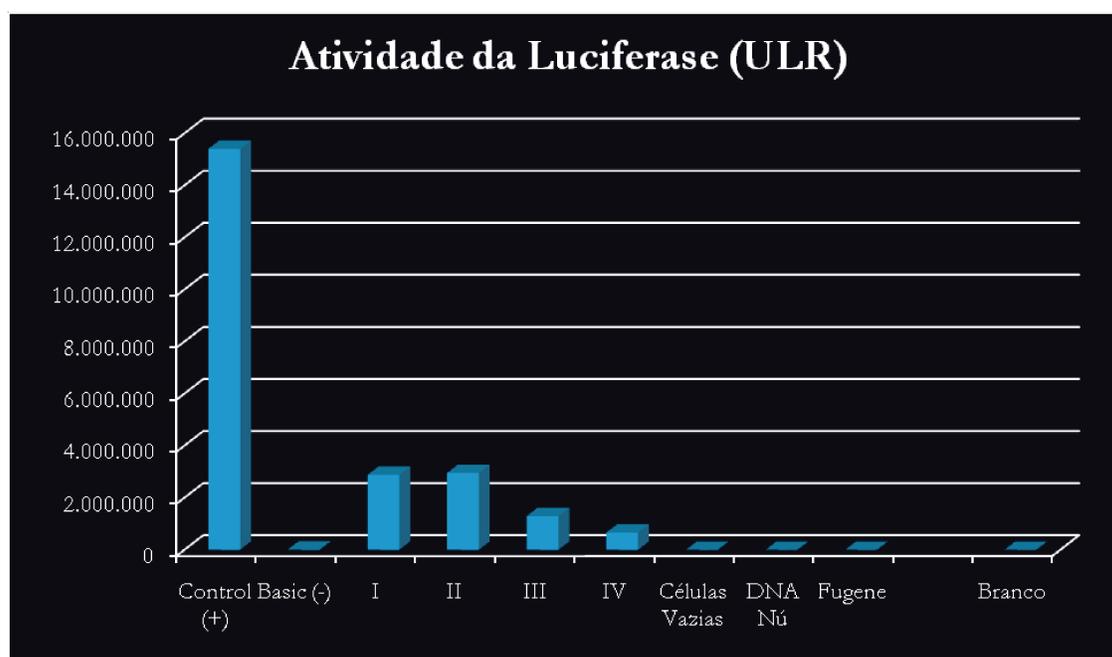


Figura 34. Atividade da luciferase apresentada pelas construções gênicas e controles em células HeLa. Resultados representam média dos valores em ULR (Unidades Relativas de Luz) obtidos em 3 experimentos de transfecção.

Uma vez que a atividade da enzima luciferase corresponde à expressão do seu gene, a atividade do vetor Control (controle positivo) foi definida como tendo 100% de atividade, e os valores dos demais controles e construções foram expressos como porcentagem da atividade do vetor Control. Essa atividade relativa da luciferase (*Figura 35*), indica que as construções I e II não diferiram muito no nível de expressão da luciferase (18,6% e 19,1%,

respectivamente). A construção III, com 8,4%, apresentou o dobro do nível de expressão da construção IV (4,2%).

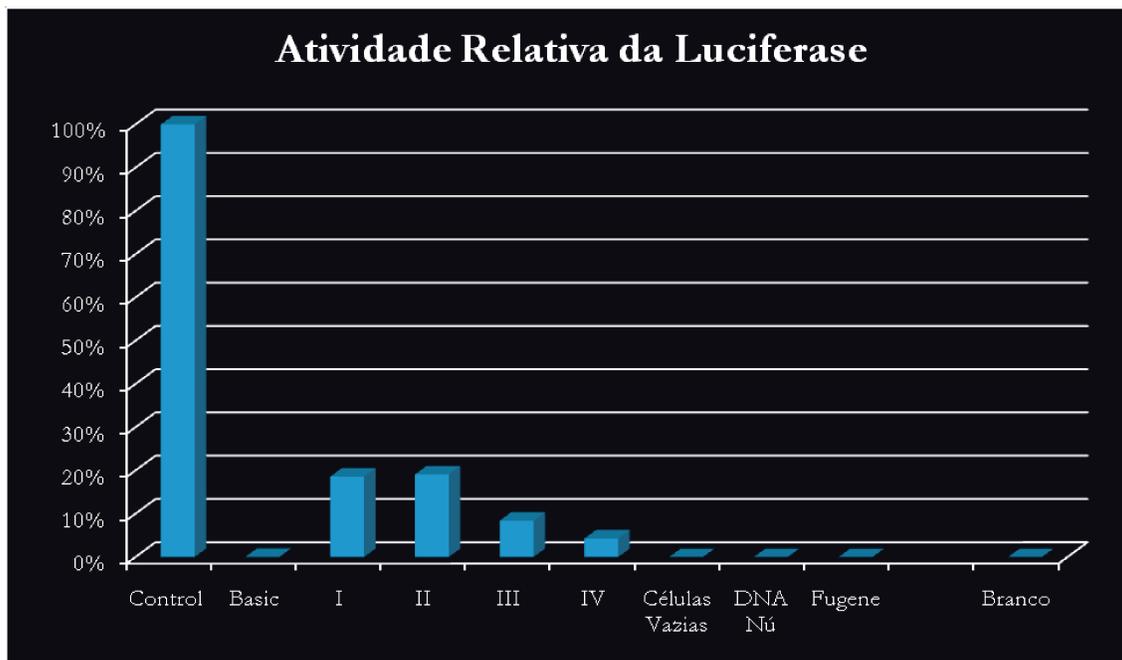


Figura 35. Atividade relativa da luciferase apresentada pelas construções gênicas e controles em células HeLa. A atividade da luciferase das construções gênicas e controles em células HeLa. As médias de atividade da luciferase das diferentes construções e controles são expressas como porcentagem da atividade do vetor controle pGL3 Control, definido como 100% de atividade.

Com a normalização dos dados obtidos com os vetores experimentais pGL3 com os dados apresentados pelo vetor controle pRL-TK, foi obtida a relação Firefly/Renilla das construções (Figura 36). Novamente as construções I e II apresentaram um resultado muito semelhante entre si (0,39 e 0,41, respectivamente). Já a construção III apresentou uma relação de 0,69, aproximadamente duas vezes maior que a relação da construção IV (0,32).

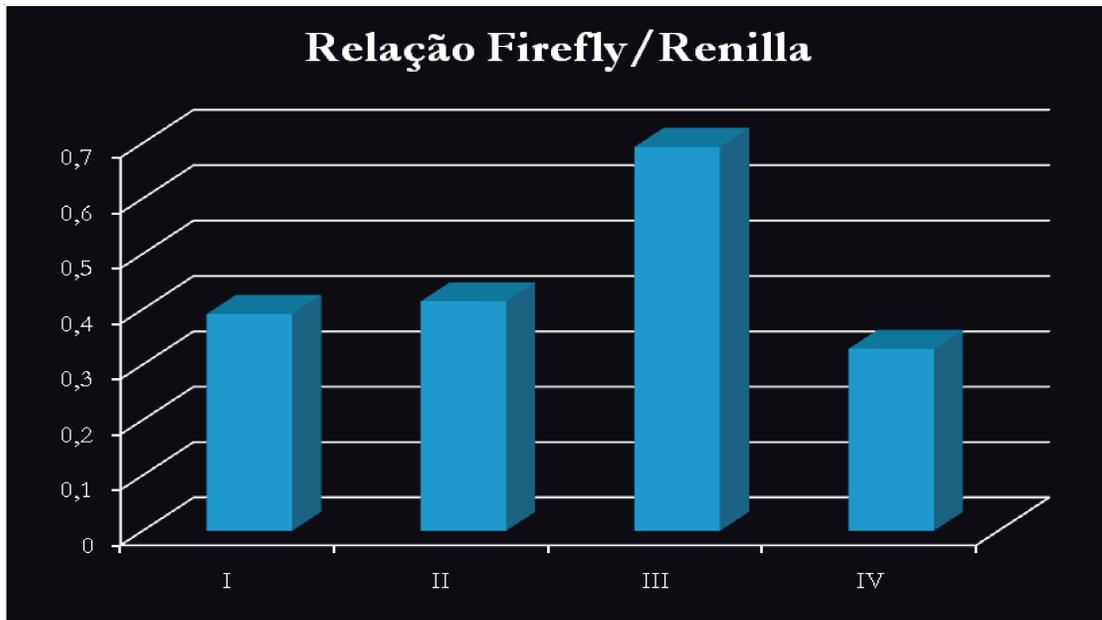


Figura 36. Relação Firefly/Renilla, normalizando a média dos dados obtidos com os vetores experimentais pGL3 com a média dos dados obtidos com vetor controle pRL-TK, que foi co-transfectado com todas as construções.

DISCUSSÃO

1. SEQUENCIAMENTO DO GENE SRY EM NOVOS PACIENTES COM DISGENESIA GONADAL

Não foram encontradas mutações no gene *SRY* entre os pacientes com disgenesia gonadal 46,XY. Possivelmente muitos pacientes com disgenesia gonadal 46,XY idiopática, com a sequência do gene *SRY* normal, possuem mutações ainda não descritas afetando o *timing* ou então os níveis de expressão de SRY, deixando a estrutura da proteína intacta mas prejudicando sua atuação (Wilhelm *et al.*, 2009). Os parentes da paciente portadora da mutação E89K possuem a sequência do gene *SRY* normal. Esse dado configura essa mutação como um evento *de novo*. Geralmente, devido ao comprometimento da capacidade reprodutiva do indivíduo, as mutações em *SRY* não são herdadas, afetando somente um indivíduo da família. Entretanto, em casos incomuns, são encontradas mutações familiares (Plaseska-Karanfilska *et al.*, 2007; Gimelli *et al.*, 2007; Assumpção *et al.*, 2002). Essa grande variedade fenotípica no efeito das mutações no gene *SRY* muitas vezes dificulta a correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes.

2. EXPRESSÃO DE PROTEÍNA SRY^{E89K} MUTANTE E VERIFICAÇÃO DE SUA INTERAÇÃO COM DNA POR ENSAIO DE EMSA

A maioria das mutações reportadas no gene *SRY* em pacientes com distúrbios da diferenciação sexual tem sido descritas no domínio *HMG-Box* (Harley *et al.*, 2003). Harley e colaboradores (1992) descrevem 5 casos de disgenesia gonadal com reversão sexual completa, nos quais foram encontradas mutações na região codificante do domínio *HMG-Box*. Em 4 desses casos a atividade de ligação da proteína SRY mutante ao DNA foi nula, sendo que no outro caso a atividade de ligação foi reduzida.

A mutação E89K, associada com disgenesia gonadal pura 46,XY, reduziu em alto nível a atividade de ligação *in vitro* da proteína SRY mutante ao DNA, possivelmente devido à troca do aminoácido Ácido Glutâmico (de cadeia lateral com grupo negativo

ácido) pelo aminoácido Lisina (de cadeia lateral com grupo positivo básico). Essa troca de aminoácidos com características físico-químicas diferentes possivelmente afeta a interação entre a proteína SRY e o DNA, ou então a própria conformação da proteína mutante, que pode exibir um domínio *HMG-Box* com afinidade menor para ligação ao DNA. Em um estudo de conservação da sequência dos aminoácidos do gene *SRY*, comparando diversas espécies de mamíferos (Shahid *et al.*, 2008), o aminoácido Ácido Glutâmico, na posição 89, se mostra conservado em todas as espécies; quando a *HMG-Box* do gene *SOX* é analisada, apenas uma alteração é observada, com uma troca para o aminoácido Asparagina (polar de carga neutra).

Mutações na mesma região da proteína SRY, que é altamente conservada (alfa-hélice II), envolvendo os aminoácidos 90, 91, 94 e 95 também causaram redução, mas não aboliram a atividade de ligação *in vitro* da proteína SRY ao DNA (Pontiggia *et al.*, 1994; Schmitt-Ney *et al.*, 1995; Mitchell & Harley, 2002). Os efeitos das mutações no gene *SRY* são variáveis; alguns mutantes possuem atividade de ligação ao DNA abolida ou reduzida (Harley *et al.*, 1992; Pontiggia *et al.*, 1994; Poulat *et al.*, 1994; Mitchell & Harley, 2002); outros apresentam atividade de ligação moderada (Harley *et al.*, 1992; Pontiggia *et al.*, 1994; Mitchell & Harley, 2002), enquanto outros exibem a mesma atividade de ligação ao DNA que as proteínas selvagens (Schmitt-Ney *et al.*, 1995; Mitchell & Harley, 2002). Nesse casos, possivelmente uma outra propriedade da proteína SRY está sendo afetada, como a fosforilação (Assumpção *et al.*, 2002) ou a importação nuclear da proteína (Hersmus *et al.*, 2009).

Uma inserção de uma adenina na região codificante do códon 89 já foi descrita, numa paciente com disgenesia gonadal completa 46,XY. Essa mutação leva a um *frameshift* e à formação de um stop codón no aminoácido 103 da proteína (Salehi *et al.*, 2006).

Há uma alta correlação entre resultados *in vitro* e *in vivo* em análises envolvendo mutantes da proteína SRY. Mutações com efeitos mais severos *in vivo* em geral são aquelas com os maiores efeitos *in vitro* sobre as atividades de ligação e dobramento do DNA exercidas pela proteína SRY. Além disso, foi observado que mutações *de novo* (como é o caso da mutação E89K, sem casos na família) em geral causam uma redução muito maior

na atividade de ligação da proteína SRY ao DNA do que quando considerados os casos de mutações familiares (Mitchell & Harley, 2002).

Provavelmente, um nível mínimo de atividade ou expressão da proteína SRY deve ser atingido para que a determinação testicular ocorra normalmente. A redução em alto nível da atividade de ligação *in vitro* ao DNA mostrada pela proteína SRY mutante E89K é um forte indício de que atividade reduzida da proteína não foi suficiente para desencadear o processo de determinação testicular, desencadeando então o quadro de disgenesia gonadal 46,XY apresentado pela paciente.

3. ANÁLISE IN SILICO DA PROTEÍNA SRY MUTANTE E89K

A análise estrutural da variante E89K foi realizado por homologia com o modelo de uma estrutura previamente publicada, PDB-ID 1j46 (Murphy *et al.*, 2001). Esse modelo, de acordo com o gráfico de Ramachandran, pode ser considerado um modelo de boa qualidade, já que possui 96,05% de seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis, incluindo o resíduo E89. Esse resíduo se encontra na α -hélice 2 da *HMG-Box*, e não possui interação direta com o DNA. A partir desse modelo, foi gerado por homologia, através da ferramenta online Swiss-Model, um modelo, contendo a troca de aminoácido E pelo K na posição 89 da *HMG-Box* de SRY. Os dados do gráfico de Ramachadran para esse modelo mutante gerado por homologia também se mostraram favoráveis, com 93,42% dos aminoácidos contidos em regiões favoráveis, incluindo o aminoácido K na posição 89.

Se a princípio não traz mudanças estruturais significantes, a troca do aminoácido E pelo K causada pela mutação provavelmente então interfere na rede de interações entre os aminoácidos. A análise dos contatos internos realizados pelo resíduo K89 na proteína SRY mutante E89K revela a formação de novas interações com outros resíduos importantes. O resíduo N87 se liga diretamente ao DNA, através da ligação de ponte de hidrogênio entre seu grupo carboxiamida ao átomo N-3 do nucleotídeo A-10 do DNA. O resíduo S91 forma ponte de hidrogênio através de seu grupo hidroxila com o átomo O2 do nucleotídeo T19 do DNA. O resíduo I90, que interage com o resíduo N87 somente na

proteína mutante, forma um complexo responsável por estabilizar a orientação das α -hélices 1 e 2 (Murphy *et al.*, 2001) (Figura 37).

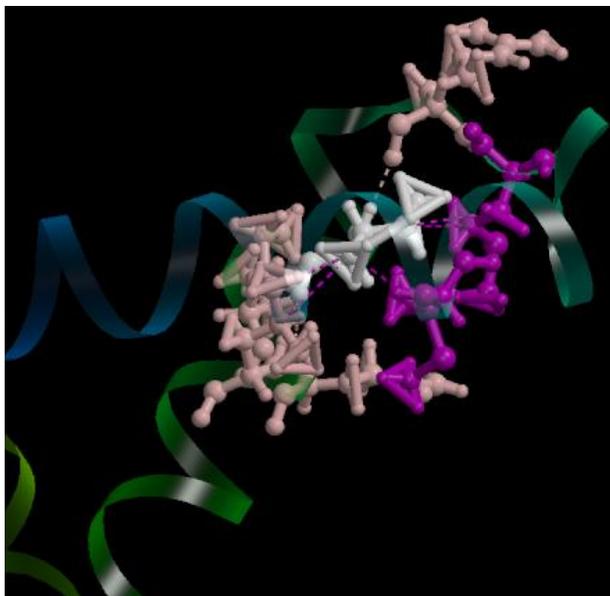


Figura 37. Resíduo de isoleucina (branco) na posição 90, formando complexo na junção das α -hélices 1 e 2. Esse conjunto de interações entre os aminoácidos tem função de estabilizar a orientação das α -hélices. O resíduo I90 forma uma nova interação de ponte de hidrogênio com o resíduo K89 mutante.

Dessa forma, a interação do aminoácido K na posição 89 com o resíduo N87, de ligação direta ao DNA, pode interferir na capacidade desse resíduo interagir com a base adenina do DNA. Além disso, o resíduo N87 ainda estabelece nova interação com o resíduo I90, integrante de um complexo responsável pela estabilização da estrutura secundária da proteína. Pode-se inferir então que a mutação E89K, mesmo não afetando um aminoácido de ligação direta ao DNA, pode estar interferindo indiretamente com a capacidade de ligação ao DNA do aminoácido N87 pela nova interação estabelecida. Além disso, pode também estar afetando a estabilidade da estrutura secundária da *HMG-Box* da proteína SRY, pela interferência indireta com o aminoácido I90, mesmo que no alinhamento dos modelos não tenham sido verificadas alterações estruturais visíveis. Há que se considerar também o fato que o resíduo K89 mutante é vizinho ao resíduo I90, podendo interferir

estruturalmente no complexo de estabilização das α -hélices 1 e 2.

A análise de conservação revelou um alto índice de conservação do aminoácido ácido glutâmico na posição 89 (85%). O resíduo K92, com o qual ele interage, apresentou índices ainda maiores, o que indica a importância dos resíduos dessa região da α -hélice 2 para a função da proteína SRY. Os resíduos N87 (que faz nova interação com o resíduo K89 mutante) e S91 interagem diretamente com o DNA, e se mostraram também altamente conservados, o que também reforça a sua importância na função de *binding* ao DNA. A presença do aminoácido lisina na posição 89 também se mostrou altamente discrepante pela análise de conservação, não tendo sido documentada anteriormente nessa posição da proteína, tampouco a presença de outros aminoácidos básicos (carregados positivamente).

4. ENSAIO DE EMSA - FATOR SP1

Com a redução em dez vezes da quantidade do fator Sp1 na reação foi resolvido o problema estequiométrico de excesso de proteína, e ficou claro que a mutação no sítio Sp1A inibe a ligação do fator Sp1 mesmo com o sítio Sp1B adjacente, que por sua vez mantém sua capacidade de ligação. Esse dado é condizente com a literatura, onde foi verificado que a ligação do fator Sp1 a 2 sítios adjacentes é feita de forma independente (Pascal & Tjian, 1991).

Segundo Pascal & Tjian (1991), o fator Sp1 é capaz de formar dímeros, trímeros, tetrâmeros e complexos ainda maiores quando ligado ao DNA, mesmo que em sítio único, sendo que a formação desses complexos é dependente da concentração da proteína na reação. Além disso, demonstraram que o fator Sp1 se liga como uma única molécula em condições onde há um excedente de sondas, ou seja, quando não há moléculas de Sp1 suficientes para se ligar em todos os sítios das sondas presentes na reação. Quando ocorre um aumento da concentração de Sp1, o quadro se inverte e começa a haver um excesso de proteína em relação aos sítios de ligação, não sobram sondas mas sim proteínas não ligadas, que começam a interagir com as moléculas de Sp1 já ligadas às sondas, formando então complexos de maior peso molecular.

Considerando os excessos de reagentes, provavelmente era o efeito dessa estequiometria que ocorreu nos primeiros ensaios de EMSA e impedia a visualização de diferenças entre as sondas normal e mutante, já que era utilizada uma concentração fixa de Sp1 (170 ng na reação de ligação), sugerida pelo fabricante. Com esse excesso de proteína, nas sondas normais eram observadas 2 bandas, correspondentes à ligação do fator aos 2 sítios ativos de ligação presentes; entretanto, nas sondas mutantes, mesmo com o sítio A inativo, eram observadas também 2 bandas, mas neste caso provavelmente a banda de maior peso molecular representaria a formação de um complexo entre o fator Sp1 ligado ao sítio B e outra molécula da proteína interagindo com o fator ligado, aumentando assim o peso molecular do complexo e a altura da banda no gel, mascarando assim a ausência de ligação ao sítio A mutado.

Nesse quadro, a banda de menor peso molecular corresponde aos complexos do fator Sp1 ligado a somente um dos sítios (Sp1A ou Sp1 B), enquanto que a banda de maior peso molecular corresponde à ligação de Sp1 nos 2 sítios. Essa ligação dupla não é observada na sonda Sp1Amut + Sp1B, já que a mutação no sítio Sp1A praticamente abole a ligação do fator Sp1 ao sítio (Assumpção *et al.*, 2005).

Observa-se também a ausência de sondas livres com maiores quantidades de proteína (80 e 170 ng), o que indica que havia mais moléculas de Sp1 do que sítios disponíveis nas sondas, demonstrando que há um excedente de proteína, possivelmente interagindo e complexando com os fatores já ligados às sondas. Pelo contrário, na menor quantidade de proteína (17 ng), há sobra de sondas livres, o que indica que havia mais sítios do que moléculas de proteína disponíveis, e assim todas as moléculas do fator Sp1 disponíveis na reação estão ligadas às sondas, de forma monomérica. Esse efeito da quantidade de proteína na quantidade final de sondas livres é semelhante ao encontrado por Pascal & Tjian (1991).

Embora o sítio Sp1A exiba menor afinidade de ligação com o fator Sp1 e aparentemente não seja crucial para a ativação por Sp1 da transcrição do gene *SRY* (Desclozeaux *et al.*, 1998a), ele possivelmente possui um papel de cooperação junto com o sítio Sp1B. Su e colaboradores (1991) demonstraram por análises de microscopia eletrônica a interação entre fatores Sp1 ligados ao promotor SV40, que possui 6 sítios de ligação ao

fator Sp1 (*Gc Boxes*) adjacentes, numa arquitetura semelhante a do promotor do gene *SRY*. Possivelmente para a ativação da transcrição de *SRY* ocorre a formação de um complexo transcricional entre fatores Sp1 ligados aos 2 sítios e o fator WT1 ligado ao sítio que intercala os 2 sítios de ligação a Sp1 no promotor, e qualquer mutação em algum desses sítios pode afetar a expressão de *SRY* em diferentes níveis. É conhecido que os níveis da proteína *SRY* devem atingir um limiar para induzir a diferenciação testicular; sendo assim, mutações na região regulatória podem ter um efeito variável, podendo ser associadas com um homem normal ou com um fenótipo feminino de reversão sexual, dependendo do quanto os níveis de *SRY* ficaram próximos ou distantes do limiar necessário (Assumpção *et al.*, 2005).

A ocorrência de diversos fenótipos em indivíduos portadores da mesma mutação no sítio Sp1A na família objeto de nosso estudo suporta essa hipótese da variabilidade fenotípica produzida por mutações em regiões promotoras, que podem ter efeitos diversos devido à complexidade das interações necessárias para a ativação da transcrição gênica.

5. ENSAIO DE EXPRESSÃO COM GENE REPÓRTER

Já foi demonstrado experimentalmente a capacidade do fator Sp1 induzir a expressão de gene repórter mediante ligação ao promotor do gene *SRY* (Desclozeaux *et al.*, 1998). As construções I e II, clonadas anteriormente ao promotor SV40, demonstraram reduzida diferença entre si na ativação da expressão da luciferase. Possivelmente a atividade forte do promotor SV40 encobriu alguma diferença entre a capacidade de ativação das construções.

As construções III e IV se mostraram capazes de induzir a expressão da luciferase, mesmo na ausência de um promotor. A construção III se mostrou em média 2 vezes mais eficiente nessa ativação, permitindo inferir que o promotor normal se mostrou em média duas vezes mais eficiente na ativação da expressão da luciferase que o promotor mutante. Entretanto, mais experimentos são necessários para confirmar esse dado, até porque nas

células da linhagem HeLa não se tem detectado a expressão da maioria dos genes específicos do sexo masculino (De Santa Barbara *et al.*, 1998).

A transfecção de outras linhagens celulares com perfil de expressão mais adequado ao estudo de atividade transcricional de *SRY*, como a linhagem de células pluripotentes de teratocarcinoma testicular de embrião humano, NT2-D1 (N-Tera2, clone D1), que expressam a maioria dos genes relacionados com a determinação sexual masculina (De Santa Barbara *et al.*, 1998), seria necessária. Para confirmar se realmente é a mutação no sítio de ligação do fator Sp1A que está causando essa diferença na função do promotor do gene *SRY*, seria necessário ativar e desativar a expressão da proteína Sp1. As células de *Drosophila* SL2 não expressam os fatores de transcrição da família Sp1 (Schneider, 1972), e dessa forma poderiam ser co-transfectadas com algum plasmídeo que expresse o fator Sp1, a fim de confirmar se realmente é a atuação desse fator que está sendo prejudicada pela deleção de três pares de base no sítio de ligação.

CONCLUSÕES

- Seis pacientes com disgenesia gonadal 46,XY possuem a sequência codificante e promotora do gene *SRY* normal. Possivelmente alguma mutação na região codificante ou promotora de outro gene envolvido na cascata da diferenciação sexual possa ter desencadeado a falha na determinação testicular e a reversão sexual.
- A mutação E89K constitui um evento *de novo*, uma vez que não foi encontrada nos parentes da paciente com disgenesia gonadal 46,XY.
- A mutação E89K, associada com disgenesia gonadal pura 46,XY, reduziu significativamente a atividade de ligação *in vitro* da proteína SRY mutante ao DNA, o que indica que a atividade reduzida da proteína mutante não foi suficiente para desencadear o processo de determinação testicular, produzindo então o quadro de disgenesia gonadal 46,XY apresentado pela paciente. Reforçando os dados *in vitro*, a análise *in silico* permitiu inferir que o aminoácido K89 mutante, que não está diretamente envolvido com a ligação ao DNA, modifica realmente as interações com aminoácidos importantes para esta atividade de *binding* e com a organização estrutural da proteína SRY. Esses resultados foram reunidos no artigo: “THE NOVEL p.E89K MUTATION IN *SRY* GENE IMPAIRS DNA-BINDING AND CAUSES XY GONADAL DYSGENESIS” que está submetido para publicação.
- Foi possível concluir através dos ensaios de EMSA com o fator Sp1 que a deleção de 3 pb no sítio Sp1A da região promotora do gene *SRY* realmente abole a ligação do fator de transcrição a esse sítio no promotor, enquanto que a ligação ao sítio Sp1B se mantém intacta. Possivelmente a ausência de ligação do fator Sp1 ao sítio Sp1A deve prejudicar a formação de um complexo transcricional entre o fator Sp1 e outros fatores de transcrição, reduzindo assim a expressão do gene *SRY*.
- O promotor do gene *SRY* não apresentou nenhum efeito de modulação na expressão da luciferase mediada pelo promotor SV40. Não houve inclusive diferença entre o promotor normal e mutante.

- O promotor de *SRY* foi capaz de ativar a expressão da luciferase. A construção III (promotor normal), foi aproximadamente duas vezes mais eficiente que a construção IV (promotor mutante) nessa ativação. Entretanto, esse não é um dado definitivo. Experimentos adicionais são necessários para uma melhor normalização dos dados, além de transfecção em outras linhagens celulares que possuam um padrão de expressão gênica mais próximo daquele que desencadeia a diferenciação testicular na fase embrionária.
- Quando proposto, este projeto pretendia englobar metodologias ainda não padronizadas no laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética), como os ensaios de EMSA e a análise de expressão de gene repórter. Estabelecer novas metodologias em um laboratório de pesquisa envolve um processo moroso de tentativas com diferentes estratégias que levam a erros e acertos. Vencidas todas as dificuldades, as técnicas foram bem padronizadas no laboratório e, agora podem ser utilizadas para o desenvolvimento de outros trabalhos, relacionados ou não à disgenesia gonadal XY e ao gene *SRY*.

REFERÊNCIAS

- ASSUMPÇÃO, J.G.; BENEDETTI, C.E.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JR, G; BAPTISTA, M.T.M.; SCOLFARO, M.R.; DE MELLO, M.P. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the *HMG-Box* N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-*HMG-Box* R30I associated with variable phenotypes. *Journal of Molecular Medicine*, 80: 782-790, 2002.
- ASSUMPÇÃO, J.G.; FERRAZ, L.F.; BENEDETTI, C.E.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JR, G; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; BAPTISTA, M.T.M.; DE MELLO, M.P. A naturally occurring deletion in the *SRY* promoter region affecting the Sp1 binding site is associated with sex reversal. *Journal of Endocrinological Investigation*, 28: 651-656, 2005.
- BEHLKE, M.A.; BORGAN, J.S.; BEER-ROMERO, P.; PAGE, D.C. Evidence that the *SRY* protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics*, 17(3): 736-739, 1993.
- BERKOVITZ, G.D.; FECHNER, P.Y.; ZACUR, H.W.; ROCK, J.A.; SNYDER, H.M.; MIGEON, C.J.; PERL-MAN, E.J. Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine*, 70: 375-383, 1991.
- BERNARD, P. & HARLEY, V.R. Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39:31-43, 2007.
- BERTA, P.; HAWKINS, J.R.; SINCLAIR, A.H.; TAYLOR, A.; GRIFFITHS, B.L.; GOODFELLOW, P.N.; FELLOUS, M. Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. *Nature*, 348(6300): 448-450, 1990.
- BEVERDAM, A. & KOOPMAN, P. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Human Molecular Genetics*. 15(3): 417-431, 2005.
- BLECHER, S.R. & ERICKSON, R.P. Genetics of sexual development: A new paradigm. *American Journal of Medical Genetics*. 143(24):3054-68, 2007.

- BOUMA, G.J.; AFFOURTIT, J.P.; BULT, C.J.; EICHER, E.M. Transcriptional profile of mouse pre-granulosa and Sertoli cells isolated from early-differentiated fetal gonads. *Gene Expression Patterns*. 7:113-123, 2007.
- BOUVIER, B. & LAVERY, R. A Free Energy Pathway for the Interaction of the SRY Protein with Its Binding Site on DNA from Atomistic Simulations. *J. American Chemical Society*, 131: 29, 2009.
- BOUWMAN, P. & PHILIPSEN, S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 195: 27- 38, 2002.
- BRADFORD, S.T.; WILHELM, D.; BANDIERA, R.; VIDAL, V.; SCHEDL, A.; KOOPMAN, P. A cell-autonomous role for WT1 in regulating *SRY in vivo*. *Human Molecular Genetics*, 18: 3429–3438, 2009.
- BRIGGS, M.R.; KADONAGA, J.T.; BELL, S.P.; TJIAN, R. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*, 234: 47–52, 1986.
- BUAAS, F.W.; VAL, P.; SWAIN, A. The transcription co-factor CITED2 functions during sex determination and early gonad development. *Human Molecular Genetics*, 18: (16) 2989–3001, 2009.
- BUCHER, P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences, *Journal of Molecular Biology*, 212: 563-78, 1990.
- CEDERROTH, C.R.; PITETTI, J-L.; PAPAIOANNOU, M.D.; NEF, S. Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 265:3-9, 2007.
- COMBES, A.N.; SPILLER, C.M.; HARLEY, V.R.; SINCLAIR, A.H.; DUNWOODIE, S.L.; WILHELM, D.; KOOPMAN, P. Gonadal defects in Cited2 -mutant mice indicate a role for SF1 in both testis and ovary differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, [No prelo].
- COOL, J. & CAPEL, B. Mixed signals: development of the testis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1):5-13. 2009.

- COOPER, D.N.; BALL, E.V.; STENSON, P.D. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff (HMGD). URL: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Acessada em Dezembro/2009.
- CORY, A.T.; BOYER, A.; PILON, N.; LUSSIER, J.G.; SILVERSIDES, D.W. Presumptive Pre-Sertoli Cells Express Genes Involved in Cell Proliferation and Cell Signalling During a Critical Window in Early Testis Differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, 74:1491–1504, 2007.
- COUREY, A.J.; TJIAN, R. Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*, 55: 887–898, 1988.
- DE-ARAÚJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA, G.JR.; FARAH, S.B.; DE-MELLO, M.P. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(1):1-13, 1996.
- DE MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G.; HACKEL, C. Determinação e diferenciação sexuais normais: genes envolvidos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 49(1): 14-25, 2005.
- DE SANTA BARBARA, P.; MÉJEAN, C.; MONIOT, B.; MALCLÈS, M-H.; BERTA, P.; BOIZET-BONHOURE, B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human *SRY* gene expression. *Biology of Reproduction*, 64: 775-783, 2001.
- DE SANTA BARBARA, P.; BONNEAUD, N.; BOIZET, B.; DESCLOZEAUX, M.; MONIOT, B.; SUDBECK, P.; SCHERER, G.; POULAT, F.; BERTA, P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Molecular and Cellular Biology*, 18: 6653–6665, 1998.
- DESCLOZEAUX, M.; POULAT, F.; DE SANTA BARBARA, P.; SOULLIER, S.; JAY, P.; BERTA, P.; BOIZET-BONHOURE, B. Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining *SRY* promoter. *Biochimical Biophysical Acta*, 1397: 247-252, 1998a.

- DESCLOZEAUX, M.; POULAT, F.; DE SANTA BARBARA, P.; CAPONY, J.P.; TUROWSKI, P.; JAY, P.; MEJEAN, C.; MONIOT, B.; BOIZET, B.; BERTA, P. Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 7988-7995, 1998b.
- DYNAN, W.S.; TJIAN, R.; The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 35: 79–87, 1983.
- ELY, D.; UNDERWOOD, A.; DUNPHY, G.; BOEHME, S.; TURNER, M.; MILSTED, A. Review of The Y Chromosome, SRY and Hypertension. *Steroids*. 2008.
- EWEN, K.; BAKER, M.; WILHELM, D.; AITKEN, J.; KOOPMAN, P. Global Survey of Protein Expression during Gonadal Sex Determination in Mice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8: 2624–2641, 2009.
- FERRARI, S.; HARLEY, V.R.; PONTIGGIA, A.; GOODFELLOW, P.N.; LOVELL-BADGE, R.; BIANCHI, M.E. SRY like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO Journal*, 11: 4497-4506, 1992.
- GIDONI, D.; DYNAN, W.S.; TJIAN, R. Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature*, 312: 409–413, 1984.
- GIESE, K.; COX, J.; GROSSSCHEDL R. The HMG domain of the lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, 69: 185-195, 1992.
- GIMELLI, G.; GIMELLI, S.; DIMASI, N.; BOCCIARDI, R.; DI BATTISTA, E.; PRAMPARO, T.; ZUFFARDI O. Identification and molecular modelling of a novel familial mutation in the *SRY* gene implicated in the pure gonadal dysgenesis. *European Journal of Human Genetic*, 15: 76–80, 2007
- GOODFELLOW, P.N. & DARLING, S.M. Genetics of sex determination. *Development*, 102: 251-258, 1988.
- GRUMBACH, M.M. & DUCHARME, J.R. The effects of androgens on fetal sexual development: androgen-induced female pseudohermaphroditism. *Fertility and Sterility*, 11: 157-180, 1960.

- HACKEL, C.; DE MELLO, M.P.; GUERRA-JR G. Determinação e diferenciação sexuais normais: genes envolvidos. In: Maciel-Guerra, A.T. & Guerra Júnior, G. - *Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo*. São Paulo: Manole, 2002, pp. 18-26.
- HANOVER, J.A.; LOVE, D.C.; PRINZ, W.A. Calmodulin-driven Nuclear Entry: Trigger for Sex Determination and Terminal Differentiation.. *Journal of Biological Chemistry*, 2009.
- HARLEY, V.R.; JACKSON, D.I.; HEXTALL, P.J.; HAWKINS, J.R.; BERKOVITZ, G.D.; SOCKANATHAN, S.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*, 255: 453-456, 1992.
- HARLEY, V.R.; CLARKSON, M.J.; ARGENTAR, A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrine Reviews*, 24: 466–487, 2003.
- HERSMUS, R.; DE LEEUW, B.H.C.G.M.; STOOP, H.; BERNARD, P.; VAN DOORN, H.C.; BRUGGENWIRTH, H.T.; DROP, S.L.S.; OOSTERHUIS, J.W.; HARLEY, V.R.; LOOIJENGA, L.H.J. A novel *SRY* missense mutation affecting nuclear import in a 46,XY female patient with bilateral gonadoblastoma. *European Journal of Human Genetics*, 1–8, 2009.
- HIRAMATSU, R.; MATOBA, S.; KANAI-AZUMA, M.; TSUNEKAWA, N.; KATOH-FUKUI, Y.; KUROHMARU, M.; MOROHASHI, K.; WILHELM, D.; KOOPMAN, P.; KANAI, Y. A critical time window of SRY action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136: 129-138, 2009.
- HOSSAIN, A. & SAUNDERS, G.F. The human sex-determining gene *SRY* is a direct target of WT1. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 16817-16823, 2001.
- ISHII, M.; TACHIWANA, T.; HOSHINO, A.; TSUNEKAWA, N.; HIRAMATSU, R.; MATOBA, S.; KANAI-AZUMA, M.; KAWAKAMI, H.; KUROHMARU, M.; KANAI, Y. Potency of testicular somatic environment to support spermatogenesis in XX/SRY transgenic male mice. *Development*. 134: 449-454, 2007.

- JIN, V.X.; O'GEEN, H.; IYENGAR, S.; GREEN, R.; FARNHAM, P.J. Identification of an OCT4 and SRY regulatory module using integrated computational and experimental genomics approaches. *Genome Research*, 17:807-817, 2007.
- JOSSO, N. Hormonal regulation of sexual differentiation. *Seminars in Perinatology*, 16: 279-288, 1992.
- JOST, A.; VIGIER, B.; PREPIN, J.; PERCHELLET, J.P. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Progress in Hormone Research*, 29:1-41, 1973.
- KADONAGA, J.T.; CARNER, K.R.; MASIARZ, F.R.; TJIAN, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51: 1079–1090, 1987.
- KELLERMAYER, R.; HALVAX, L.; CZAKO, M.; SHAHID, M.; DHILLON, V.S.; HUSAIN, S.A.; SULE, N.; GOMORI, E.; MA, M.M.E.L.M.; KOSZTOLANYI, G. A novel frame *shift* mutation in the *HMG-Box* of the *SRY* gene in a patient with complete 46,XY pure gonadal dysgenesis. *Diagnostic Molecular Pathology*, 14(3): 159-163, 2005.
- KNIGHT, R.D. & SHIMELD, S.M. Identification of conserved C2H2 zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biology*, 2(5):research0016.1–0016.8, 2001.
- KOJIMA, Y.; HAYASHI, Y.; MIZUNO, K.; SASAKI, S.; FUKUI, Y.; KOOPMAN, P.; MOROHASHI, K.I.; KOHRI, K. Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clinical Endocrinology*, 68: 791–799, 2008.
- KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature*, 351: 117-121, 1991.
- KOOPMAN, P. The delicate balance between male and female sex determining pathways: potential for disruption of early steps in sexual development. *International Journal of Andrology*, 32: 1–7, 2009.
- KWOK, C.; TYLER-SMITH, C.; MENDONCA, B.; HUGHES, I.; BERKOVITZ, G.D.; GOODFELLOW, P.N.; HAWKINS, J.R. Mutation analysis of the 2 kb 5' to *SRY* in

- XY females and XY intersex subjects. *Journal of Medical Genetics*, 33: 465-468, 1996.
- LI, B.; ZHANG, W.; CHAN, G.; JANCOSO-RADECK, A.; LIU, S.; WEISS, M.A. Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 46480-46484, 2001.
- LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K.L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77: 481-90, 1994.
- MACLAUGHLIN, D.T. & DONAHOE, P.K. Mechanisms of disease: Sex determination and differentiation. *The New England Journal of Medicine*, 350: 367-78, 2004.
- MARCHINA, E.; GAMBERA, A.; SPINELLI, E.; CLERICI, P.; SCAGLIOLA, P.; SARTORI, E.; BARLATI, S. Identification of a new mutation in the *SRY* gene in a 46,XY woman with Swyer syndrome. *Fertility and Sterility*, 2008.
- MARGARIT, E.; GUILLÉN, A.; REBORDOSA, C.; VIDAL-TABOADA, J.; SANCHEZ, M.; BALLESTA, F.; OLIVA, R. Identification of conserved potentially regulatory sequences of the *SRY* gene from 10 different species of mammals. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 245: 370-377, 1998.
- MARIN, M.; KARIS, A.; VISSER, P.; GROSVELD, F.; PHILIPSEN, S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, 89: 619-628, 1997.
- MASTRANGELO, I.A.; COUREY, A.J.; WALL, J.S.; JACKSON, S.P.; HOUGH, P.V.C. DNA looping and SpI multimerlinks: A mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proceedings of the National Academy of Science*, 88: 5670-5674, 1991.
- MATOBA, S.; HIRAMATSU, R.; KANAI-AZUMA, M.; TSUNEKAWA, N.; HARIKAE, K.; KAWAKAMI, H.; KUROHMARU, M.; KANAI, Y. Establishment of testis-specific SOX9 activation requires high-glucose metabolism in mouse sex differentiation. *Developmental Biology*, 324: 76-87, 2008.
- MCELREAVEY, K.; VILAIN, E.; ABBAS, N.; COSTA, J.M.; SOULEYREAU, N.; KUCHERIA, K.; BOUCEKKINE, C.; THIBAUD, E.; BRAUNER, R.; FLAMANT, F.; FELLOUS, M. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the *SRY* "HMG-

- Box*" in the testis-determining region. *Proceedings of the National Academy of Science*, 89(22): 11016-11020, 1992.
- MITCHELL, C.L. & HARLEY, V.R. Biochemical defects in eight *SRY* missense mutations causing XY gonadal dysgenesis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 77: 217–225, 2002.
- MIZUKAMI, T.; KANAI, Y.; FUJISAWA, M.; KANAI-AZUMA, M.; KUROHMARU, M.; HAYASHI, Y. Five Azacytidine, a DNA Methyltransferase Inhibitor, Specifically Inhibits Testicular Cord Formation and Sertoli Cell Differentiation In Vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 75: 1002–1010, 2008.
- MOORE, K.L. Editor. *Embriologia Clinica*. Interamericana. Rio de Janeiro, 1978.
- MURPHY, E.C.; ZHURKIN, V.B.; LOUIS, J.M.; CORNILESCU, G.; CLORE, G.M. Structural Basis for *SRY*-dependent 46-X,Y Sex Reversal: Modulation of DNA Bending by a Naturally Occurring Point Mutation. *Journal of Molecular Biology*, 312: 481–499, 2001.
- NESHICH, G.; TOGAWA, R.C.; MANCINI, A.L.; KUSER, P.R.; YAMAGISHI, M.E.; PAPPAS, G. JR. STING Millennium: A web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Research*, 31:3386-3392, 2003.
- OKA, S.; SHIRAIISHI, Y.; YOSHIDA, T.; OHKUBO, T.; SUGIURA, Y.; KOBAYASHI, Y. NMR Structure of Transcription Factor Sp1 DNA Binding Domain. *Biochemistry*, 43: 16027-16035, 2004.
- OTTOLENGHI, C.; PELOSI, E.; TRAN, J.; COLOMBINO, M.; DOUGLASS, E.; NEDOREZOV, T.; CAO, A.; FORABOSCO, A.; SCHLESSINGER, D. Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Human Molecular Genetics*, 16(23): 2795-2804, 2007.
- PARIS, F.; PHILIBERT, P.; LUMBROSO, S.; BALDET, P.; CHARVET, J.P.; GALIFER, R-B.; SULTAN, C. Primary amenorrhea in a 46,XY adolescent girl with partial gonadal dysgenesis: identification of a new *SRY* gene mutation. *Fertility and Sterility*, 88(5): 1437e21-1437e25, 2007.

- PASCAL, E. & TJIAN, R. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes & Development*, 5:1646-1656, 1991.
- PLASESKA-KARANFILSKA, D.; NOVESKI, P.; KUZEVSKA, K.; BASHESKA, N.; KOCOVA, M.; EFREMOV, G.D. A new familial mutation (R133G) in the *SRY* gene. *Clinical Genetics*, 71: 480-482, 2007.
- POLANCO, J.C.; WILHELM, D.; MIZUSAKI, H.; JACKSON, A.; BROWNE, C.; DAVIDSON, T.; HARLEY, V.; SINCLAIR, A.; KOOPMAN, P. Functional analysis of the *SRY*-KRAB interaction in mouse sex determination. *Biology of the Cell*. 101(1):55-67, 2009.
- PONTIGGIA, A.; RIMINI, R.; HARLEY, V.R.; GOODFELLOW, P.N.; LOVELL-BADGE, R.; BIANCHI, M.E. Sex-Reversing Mutations Affect The Architecture Of *SRY*-DNA Complexes. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 13: 6115-6124, 1994.
- POULAT, F.; DESCLOZEAUX, M.; TUFFERY, S.; JAY, P.; BOIZET, B.; BERTA, P. Mutation in the 5' noncoding region of the *SRY* gene in an XY sex-reversed patient. *Human Mutation*, (Suppl 1): S192-194, 1998.
- POULAT, F.; GIRARD, F.; CHEVRON, M.P.; GOZÉ, C.; REBILLARD, X.; CALAS, B.; LAMB, N.; BERTA, P. Nuclear localization of the testis determining gene product *SRY*. *Journal of Cell Biology*, 128: 737-748, 1995.
- POULAT, F.; SOULLIER, S.; GOZE, C.; HEITZ, F.; CALAS, B.; BERTA, P. Description and functional implications of a novel mutations in the sex-determining gene *SRY*. *Human Mutation*, 3: 200–204, 1994.
- PRITCHARD-JONES, K.; FLEMING, S.; DAVIDSON, D.; BICKMORE, W.; PORTEOUS, D.; GOSDEN, C. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, 346: 194-7, 1990.
- ROSS, D.G.F.; BOWLES, J.; KOOPMAN, P.; LEHNERT, S. New insights into *SRY* regulation through identification of 5' conserved sequences. *BMC Molecular Biology*, 9:85, 2008.

- SAFFER, J.D.; JACKSON, S.P.; ANNARELLA, M.B. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 2189–2199, 1991.
- SALEHI, B.; SCARCIOLLA, O.; VANNI, G.F.; NARDONE, A.M.; FRAJESE, G.; NOVELLI, G.; STUPPIA, L. Identification of a novel mutation in the *SRY* gene in a 46, XY female patient. *European Journal of Medical Genetics*, 49: 494–498, 2006.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SÁNCHEZ-MORENO, I.; CORAL-VAZQUEZ, R.; MENDEZ, J.P.; CANTO, P. Full-length *SRY* protein is essential for DNA binding. *Molecular Human Reproduction*, 14:6 325–330, 2008.
- SÁNCHEZ-MORENO, I.; CANTO, P.; MUNGUÍA, P.; DE LEÓN, M.B.; CISNEROS, B.; VILCHIS, F.; REYES, E.; MÉNDEZ, J.P.. DNA binding activity studies and computational approach of mutant *SRY* in patients with 46, XY complete pure gonadal dysgenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299: 212–218, 2009.
- SATO, Y.; SHINKA, T.; CHEN, G.; YAN, H-T.; SAKAMOTO, K.; EWIS, A.A.; ABURATANI, H.; NAKAHORI, Y. Proteomics and transcriptome approaches to investigate the mechanism of human sex determination. *Cell Biology International*, 33: 839-847, 2009.
- SATO, Y.; SHINKA, T.; SAKAMOTO, K.; EWIS, A.A.; NAKAHORI, Y. The male-determining gene *SRY* is a hybrid of *DGCR8* and *SOX3*, and is regulated by the transcription factor *CP2*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, [No prelo] 2009.
- SCHMITT-NEY, M.; THIELE, H.; KALTWASSER, P.; BARDONI, B.; CISTERNINO, M.; SCHERER, G. Two novel *SRY* missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *American Journal of Human Genetics*, 56(4): 862-829, 1995.
- SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 27(2):353-65, 1972.
- SCHUMACHER, V.; GUELER, B.; LOOIJENGA, L.H.J.; BECKER, J.U.; AMANN, K.; ENGERS, R.; DOTSCHE, J.; STOOP, H.; SCHULZ, W.; ROYER-POKORA, B.

- Characteristics of Testicular Dysgenesis Syndrome and Decreased Expression of *SRY* and *SOX9* in Frasier Syndrome. *Molecular Reproduction and Development*, 75: 1484–1494, 2008.
- SEKIDO, R. & LOVELL-BADGE, R. Sex determination and SRY: down to awink and a nudge?. *Trends in Genetics*, 25 (1), 2008.
- SEKIDO, R. & LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox9* enhancer. *Nature*, 453, 2008.
- SHAHID, M.; DHILLON, V.S.; JAIN, N.; HEDAU, S.; DIWAKAR, S.; SACHDEVA, P.; BATRA, S.; DAS, B.C.; HUSAIN, S.A. Two new novel point mutations localized upstream and downstream of the *HMG-Box* region of the *SRY* gene in three Indian 46,XY females with sex reversal and gonadal tumour formation. *Molecular Human Reproduction*, 10: 521-526, 2004.
- SHAHID, M.; DHILLON, V.S.; HUSSAIN, Z.; MASA, J.F.; ASLAM, M.; RAISH, M.; AHMAD, A.; KHAN, N.J.; PRASAD, S.; BATRA, S.; PASHA, S.T.; HUSAIN, S.A. Analysis of the *SRY* gene in two sex-reversed XY sisters identifies two new novel point mutations in the high mobility group box domain. *Fertility and Sterility*, 90:4, 2008.
- SIM, H.; ARGENTARO, A.; HARLEY, V.R. Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19:6, 2008.
- SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, B.L.; SMITH, M.J.; FOSTER, J.W.; FRISCHAUF, A.M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244, 1990.
- SU, H. & LAU, Y.F.C. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (*SRY*) gene, using a reverse genetic approach. *American Journal of Human Genetics*, 52: 24-38, 1993.
- SU, W.; JACKSON, S.; TJIAN, R. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes & Development*, 5: 820-826, 1991.

- SUDBECK, P. & SCHERER, G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 27848-27852, 1997.
- THEVENET, L.; MEJEAN, C.; MONIOT, B.; BONNEAUD, N.; GALEOTTI, N.; ALDRIAN-HERRADA, G.; POULAT, F.; BERTA, P.; BENKIRANE, M.; BOIZET-BONHOURE, B. Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 23(16): 3336-3345, 2004.
- UKIYAMA, E.; JANCOSO-RADEK, A.; LI, B.; MILOS, L.; ZHANG, W.; PHILLIPS, N.B.; MORIKAWA, N.; KING, C.Y.; CHAN, G.; HAQQ, C.M.; RADEK, J.T.; POULAT, F.; DONAHOE, P.K.; WEISS, M.A. SRY and architectural gene regulation: the kinetic stability of a bent protein-DNA complex can regulate its transcriptional potency. *Molecular Endocrinology*, 15(3): 363-377, 2001.
- VEITIA, R.A.; FEELOUS, M.; MCELREAVEY, K. Conservation of Y chromosome-specific sequences immediately 5' to the testis determining gene in primates. *Gene*, 199: 63-70, 1997.
- VERGNAUD, G.; PAGE, D.C.; SIMMLER, M.C.; BROWN, L.; ROYER, F.; NOEL, B.; BOTSTEIN, D.; DE LA CHAPELLE, A.; WEISSENBAACH, J.A. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Journal of Human Genetics*, 38: 109-124, 1986.
- VIDAL, V.P.I.; CHABOISSIER, M.C.; ROOJI, D.G.D.; SCHEDL, A. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics*, 28: 216-217, 2001.
- VILAIN, E.; MCELVERY, K.; JAUBERT, F.; RAYMOND, J.P.; RICHAUD, F.; FELLOUS, M. Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, 50: 1008-1011, 1992.
- VILCHIS, F.; HERNANDEZ, D.; CANTO, P.; MENDEZ, J.P.; CHAVEZ, B. C6don 89 polymorphism of the human 5 alpha-steroid reductase type 2 gene. *Clinical Genetics*, 51: 399-402, 1997.

WILHELM, D.; WASHBURN, L.L.; TRUONG, V.; FELLOUS, M.; EICHER, E.M.;
KOOPMAN, P. Antagonism of the testis and ovary-determining pathways during
ovotestis development in mice. *Mechanisms of Development*, 126: 324 – 336, 2009.

ZHOU, C.; FU, J.J.; LI, L.Y.; LU, G.X. Two novel mutations in *SRY* gene form Chinese
sex reversal XY females. *Yi Chuan Xue Bao*, 32(5):443-449, 2005.



CEP, 10/03/10.
(PARECER CEP: N° 434/2006)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO INTERDISCIPLINAR DOS DISTÚRBIOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gil Guerra Junior

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto “ANÁLISE DE MUTAÇÕES E DE SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO DO GENE *SRY* EM CASOS DE DISGENESIA GONADAL XY”, executado pelo aluno José Luiz Rosenberis da Cunha Júnior e coordenado pela Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Aprovado “ad referendum” em 10 de março de 2010.

A ser homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de março de 2010.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP