

---

Rafaella Maria Pessutti Nascimento

**O gene *UBE2A* (*Ubiquitin conjugating enzyme 2 A*) e a  
deficiência mental: triagem de mutações e estudos  
funcionais.**

Tese apresentada ao Departamento de  
Genética e Biologia Evolutiva do Instituto  
de Biociências da Universidade de São  
Paulo, como requisito para obtenção do  
título de Doutora em Ciências, na área de  
Biologia/Genética

**São Paulo  
2010**

Orientadora: **Angela M. Vianna-Morgante**

NASCIMENTO, RAFAELLA MARIA PESSUTTI

O gene *UBE2A* (*Ubiquitin conjugating enzyme 2 A*) e a deficiência mental:  
triagem de mutações e estudos funcionais.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,  
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Deficiência Mental. 2. Herança ligada ao cromossomo X. 3. Gene *UBE2A*. 4.  
Enzima conjugadora de ubiquitina. 5. Ubiquitinação de proteínas.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de  
Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

---

---

---

---

---

Orientadora

---

Este trabalho foi realizado com os auxílios financeiros da FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo) concedidos à orientadora e à aluna.

---

Aos meus pais, Adalberto e Angela

Ao meu marido Leonardo

## Agradecimentos

---

Esta Tese é resultado da colaboração de várias pessoas. Sinceramente agradeço:

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, na figura de seu Chefe, pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Dra. Angela M. Vianna-Morgante, pela orientação deste projeto e pela confiança depositada em mim por todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pelas valiosas observações e sugestões e por permitir que eu desenvolvesse boa parte de minha pesquisa em seu laboratório.

À Dra. Gisele Monteiro, por tudo que me ensinou, pela contribuição nestes estudos, pelo incentivo e confiança. Ainda, agradeço à amiga Gisele, pelas risadas e o apoio nas horas difíceis. Uma das aquisições mais valiosas deste período.

À Dra. Marilene Demasi e sua equipe, pelo auxílio no processo de produção de anticorpo utilizado nestes estudos.

À Dra Lygia daVeiga Pereira Carramaschi, pelo apoio, sugestões e pelas amostras cedidas.

À Dra. Lea Grinberg, pelas amostras cedidas.

Às Dras Luciana Amaral Haddad e Carla Rosenberg, pelas sugestões e pela amizade.

À Maraisa por todo apoio, pela amizade e pela ajuda na confecção desta tese.

À doutoranda Natássia Vieira pelo auxílio experimental e também pela amizade.

Aos Drs. Anton Grootegoed, Willy Baarends e Joost Gribnau, e aos pós-doutores, alunos e técnicos da Universidade Erasmus, Rotterdam: Cristina, Akiko, Eskeww, Peng, Sam, Stefan, Eveline, Marja, Esther e Jos.

Aos queridos amigos, Fernando, Joana, Lilian, Raquel, Ana Maria e Eriquinha pelas conversas, desabafos, risadas e abraços de todos os dias.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Genética Humana I e II: Silvinha, Adriano, José, Larissa, Ana Carolina, Tales, Fátima, Mara, Lígia, Paulo, Ana Carla,

Teresa, Renata, Rezinha, Daniel, Daniela, Vitor, pela ajuda e pelos muitos momentos de descontração.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Oxidantes e Radicais livres: Simone, Karen, Tati, Bruno, Zé Renato, Alegria, Marcela, Eduardo, Andressa, Aline, Daiane, Tamy e Cynthian, por sempre compartilharem seus conhecimentos técnicos e, principalmente, pelo apoio e carinho.

Aos amigos e colegas dos demais laboratórios: Débora, Juliana, Cris, Lais, Daniel, Marcelo, Erika, Alexandra, Naja, Juliana, Fernanda, Gustavo e Fabiano.

Às amigas Marcella, Renata e Fabíola. Amigas para a vida toda. Mesmo quando estamos longe, sei que posso contar com vocês.

À família dos pacientes, que sempre colaborou prontamente.

À minha família: meus queridíssimos pais, Adalberto e Angela, pelo apoio e confiança, e, principalmente, pelo amor constante; minha irmã Priscilla e meu cunhado Alexandre, que nos presentearam com a coisa mais valiosa: o Nicolas.

Ao meu marido, Leo (Jacaré) pelo apoio, pelo amor, por me ensinar a encarar os problemas de maneira simples e tornar a vida melhor a cada dia.

Finalmente agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse onde estou. Seria impossível citar todas.

## Índice

---

### CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 A deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X.....	2
I.2 O gene <i>UBE2A</i> e a deficiência mental.....	5
I.3 A ubiquitinação de proteínas.....	16
I.4 As enzimas conjugadoras de Ubiquitina - E2.....	23
I.5 A ubiquitinação de proteínas e o sistema nervoso.....	26
Referências Bibliográficas.....	31
Recursos de Internet.....	46

### CAPÍTULO II - O GENE *UBE2A* E A DEFICIÊNCIA MENTAL

II.1 Introdução.....	48
II.2 Objetivos.....	52
II.3 Casuística, Materiais e Métodos.....	53
II.3.1 Triagem de mutações no gene <i>UBE2A</i> .....	53
<i>Casuística</i> .....	53
<i>Sequenciamento direto dos seis éxons e limites íntron-éxon do gene UBE2A...</i>	54
II.3.2 Avaliação da expressão dos transcritos de <i>UBE2A</i> em humanos.....	58
II.3.2.1 Avaliação do efeito da mutação c.382C→T sobre a transcrição de <i>UBE2A</i> : amostras, extração de RNA e síntese de cDNA.....	58
<i>Amostras de sangue periférico</i> .....	58
<i>Estabelecimento de cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene UBE2A</i> .....	59
II.3.2.2 Avaliação da expressão dos transcritos de <i>UBE2A</i> em indivíduos normais: amostras, extração de RNA e síntese de cDNA.....	61
II.3.2.3 Amplificação dos transcritos correspondentes ao gene <i>UBE2A</i> humano.....	61
II.3.2.4 Avaliação da expressão dos alelos do gene <i>UBE2A</i> em portadora obrigatória da mutação c.382C→T.....	63
II.3.3 Investigação da presença de transcritos alternativos de <i>Ube2a</i> em camundongos .....	64
II.3.3.1 Camundongos SWISS: amostras de cDNA de tecidos embrionários e adultos .....	64
II.3.3.2 Camundongos nocautes quanto ao gene <i>Ube2A</i> : amostras, extração de RNA e síntese de cDNA .....	64
II.3.3.3 Amplificação dos transcritos correspondentes ao gene <i>Ube2A</i> .....	65



II.3.4 Avaliação da presença das isoformas correspondentes aos transcritos do gene <i>UBE2A</i> .....	66
<i>Extração de proteínas de células humanas</i> .....	66
<i>Extração de proteínas de tecidos de camundongo</i> .....	66
II.3.5 <i>Western Blotting</i> .....	67
II.3.6 Anticorpos utilizados.....	68
II.4 Resultados.....	69
II.4.1 Triagem de mutações no gene <i>UBE2A</i> .....	69
II.4.2 Avaliação do efeito da mutação c.382C→T na transcrição e na tradução.....	69
II.4.2.1 Expressão dos transcritos em diferentes tecidos humanos.....	69
II.4.2.2 Avaliação da presença das isoformas de <i>UBE2A</i> em amostras de leucócitos e de cultura de células precursoras de tecido adiposo de indivíduo controle e de afetado pela síndrome.....	71
II.4.2.3 Expressão dos alelos do gene <i>UBE2A</i> em portadora obrigatória da mutação c.382C→T .....	75
II.4.3 Expressão dos transcritos de <i>Ube2A</i> em tecidos de camundongos.....	77
<i>Camundongos selvagens - linhagem SWISS</i> .....	77
<i>Camundongos nocautes quanto ao gene Ube2A</i> .....	79
II.5 Discussão.....	83
Referências Bibliográficas.....	95
Recursos de Internet .....	102

## **CAPÍTULO III: ESTUDO FUNCIONAL DAS ISOFORMAS DE UBE2A:**

### **ENSAIOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

III. 1 Introdução.....	104
III. 2 Objetivos.....	109
III. 3 Materiais e Métodos.....	109
III.3.1 Desenvolvimento de modelo para estudo do efeito da mutação c.382C→T do gene <i>UBE2A</i> na formação de neuritos.....	109
<i>Cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene UBE2A</i> .....	109
<i>Citometria de Fluxo</i> .....	109
<i>Avaliação da Multipotencialidade dos Pré-adipócitos</i> .....	110
<i>Diferenciação Neurogênica</i> .....	111
<i>Imunocitoquímica</i> .....	111

III.3.2 Avaliação da complementação funcional da mutação $\Delta rad6$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	112
<i>Linhasgens haplóides selvagem e <math>\Delta rad6</math> de S. cerevisiae</i> .....	112
<i>pYES2.1 TOPO TA Expression Kit (Invitrogen)</i> .....	113
<i>Escherichia coli termocompetentes</i> .....	113
<i>Obtenção dos cDNA correspondentes aos transcritos do gene UBE2A para expressão das proteínas nativas em S. cerevisiae</i> .....	114
<i>Obtenção dos cDNA correspondentes aos transcritos do gene UBE2A para expressão das proteínas em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina em S. cerevisiae</i> .....	115
<i>Ligação dos transcritos de UBE2A ao vetor e transformação em E. coli</i> .....	116
<i>Preparação de leveduras competentes e transformação</i> .....	117
<i>Ensaio de complementação funcional I: estresse por temperatura</i> .....	118
<i>Ensaio de complementação funcional II: resistência à luz ultravioleta-C</i> .....	118
<i>Extração de RNA de levedura</i> .....	119
<i>Obtenção de sonda para Northern blotting</i> .....	119
<i>Northern blotting</i> .....	120
<i>Extração de proteínas e Western Blotting</i> .....	120
III.3.3 Ensaio <i>in vitro</i> : expressão heteróloga das isoformas de UBE2A e ensaio de atividade para avaliação da capacidade de ubiquitinação de histonas H2A.....	121
<i>Vetor de expressão pET15b (Novagen)</i> .....	121
<i>Linhasgens de bactéria</i> .....	121
<i>Construção de vetores para expressão das isoformas de UBE2A</i> .....	123
<i>Superexpressão das proteínas em bactéria</i> .....	124
<i>Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a metais</i> .....	125
<i>Ensaio in vitro para avaliar a capacidade de ubiquitinação de histonas H2A das diferentes isoformas de UBE2A</i> .....	126
<i>Anticorpos utilizados</i> .....	127
III.3.4 Produção de Anticorpo para a detecção das isoformas do gene UBE2A.....	128
III.3.5 Ensaio de inibição do proteassoma em cultura de pré-adipócitos humanos.....	129
III.3.6 Avaliação do efeito de mutações em UBE2A quanto a sua capacidade de autoubiquitinação.....	130
III.4 Resultados.....	131
III.4.1 Ensaio <i>in vivo</i> .....	131
III. 4.1.1 Modelo celular para avaliação do efeito da mutação sobre a formação de neuritos.....	131

<i>Cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene UBE2A</i> .....	131
<i>Plasticidade das células precursoras de tecido adiposo</i> .....	134
Diferenciação em linhagens mesenquimais.....	134
Diferenciação em linhagem neuronal.....	135
III.4.1.2 Ensaio de complementação funcional em linhagem $\Delta rad6$ de <i>S. cerevisiae</i> .....	139
<i>Confirmação das linhagens selvagem e <math>\Delta rad6</math> de <i>S. cerevisiae</i></i> .....	139
<i>Obtenção dos transcritos do gene UBE2A completos</i> .....	140
<i>Identificação das colônias positivas</i> .....	141
<i>Transformação dos vetores ligados aos transcritos humanos de UBE2A na linhagem <math>\Delta rad6</math> de <i>S. cerevisiae</i></i> .....	143
<i>Análise da expressão dos transcritos humanos em levedura: Northern blotting</i> .....	143
<i>Ensaio de complementação funcional</i>	145
- <i>Ensaio I: Resistência à luz ultravioleta-C</i> .....	145
- <i>Ensaio II: Estresse por temperatura</i> .....	148
<i>Análise da presença das isoformas de UBE2A após expressão em linhagem <math>\Delta rad6</math> de <i>S. cerevisiae</i>: Western blotting</i> .....	149
II.4.1.3 Expressão dos transcritos de UBE2A em linhagem selvagem de <i>S. cerevisiae</i> .....	154
II.4.1.4 Ensaio de complementação funcional da mutação $\Delta rad6$ de <i>S. cerevisiae</i> pela expressão das isoformas de UBE2A em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina C-terminal.....	156
III.4.2 Ensaio <i>in vitro</i> .....	159
<i>Expressão heteróloga e purificação das proteínas codificadas pelos transcritos do gene UBE2A</i> .....	159
<i>Avaliação da afinidade dos anticorpos anti-RAD6 e anti-UBE2A/ISO3 pelas isoformas de UBE2A</i> .....	162
<i>Ensaio de atividade para avaliar a capacidade das diferentes isoformas de UBE2A de ubiquitinar histonas in vitro</i> .....	165
<i>Avaliação do efeito de mutações em UBE2A na capacidade de autoubiquitinação</i> .....	173
III.5 Discussão.....	174
Referências Bibliográficas.....	182
Recursos de Internet .....	190
SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	192
ABSTRACT .....	200

## INTRODUÇÃO

## I.1 A deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X

---

A Deficiência Mental (DM) pode ser definida como a incapacidade cognitiva, evidenciada antes dos 18 anos de idade, que resulta em limitações significativas nas funções intelectuais e no comportamento adaptativo do indivíduo, explícitas em suas habilidades conceituais, sociais e práticas (*World Health Organization, 1992; American Psychiatric Association, 1994*). É uma condição clínica complexa e altamente heterogênea. Afeta 2 a 3% da população e resulta de causas genéticas, ambientais ou da combinação de ambas. Convencionalmente, a DM pode ser classificada de acordo com o quociente de inteligência (QI) dos indivíduos afetados em: leve (QI entre 70 e 50); moderada (QI entre 50 e 35); grave (QI entre 35 e 20) e profunda (QI menor que 20). A DM leve é a mais frequente, correspondendo a 80-85% dos casos. Está, em geral, associada a níveis socioeconômicos baixos, sendo a desnutrição a principal causa ambiental. Já a DM moderada a profunda - os restantes 15-20% - apresenta frequência semelhante em todos os níveis sociais, o que evidencia o componente genético importante em sua etiologia. As estimativas da frequência da DM variam entre diferentes estudos epidemiológicos, podendo atingir até 10% em países muito pobres, devido especialmente aos altos índices de desnutrição (*Chiurazzi & Oostra, 2000 e Toniolo, 2000*).

As formas mais graves de DM costumam estar associadas a outras manifestações clínicas (físicas e neurológicas), constituindo síndromes de múltiplas anomalias congênitas e DM. Assim, quanto mais grave a DM, maior a probabilidade de que esteja associada a outras manifestações clínicas e que um diagnóstico preciso seja estabelecido (*Chiurazzi & Oostra, 2000*).

As principais causas genéticas de DM moderada-profunda são as anomalias cromossômicas e as mutações em genes únicos (*Chiurazzi & Oostra, 2000 e Inlow & Restifo, 2004*). As anomalias cromossômicas não equilibradas, evidenciadas por técnicas citogenéticas convencionais, ao causarem diferença de dose de grande número de genes, em geral, resultam

em síndromes de malformações congênitas associadas à DM. São causa de cerca de 15% dos casos de DM, sendo a trissomia do cromossomo 21 ou síndrome de Down a principal causa genética de DM - afeta uma em cada 1000 crianças nascidas vivas. Recentemente, a aplicação da técnica de *array CGH* (*Array-based Comparative Genomic Hybridization* - Híbridação Genômica Comparativa baseada em *Array*) tem evidenciado microdeleções e microduplicações cromossômicas como mecanismo adicional causador de DM. Estima-se em 15% sua contribuição como causa de DM (Ropers, 2008). As mutações em genes únicos, por sua vez, apresentam todos os tipos de padrões de herança - autossômicos e ligados ao cromossomo X, dominantes e recessivos e também herança mitocondrial.

O reconhecimento da importância dos genes do cromossomo X como causa de DM é antigo e deveu-se à constatação de um excesso de 30% de homens afetados por DM em relação às mulheres (Penrose, 1938; Lehrke 1972; Herbst & Miller, 1980; Stevenson, 2000; Chelly & Mandel, 2001) e à ocorrência de numerosas famílias em que a DM segrega de forma compatível com o padrão de herança ligado ao cromossomo X (Stevenson, 2000).

A DM ligada ao cromossomo X é classicamente dividida em dois grupos: (a) DM síndrômica, quando associada a outras características físicas ou neurológicas e (b) DM não síndrômica ou inespecífica, quando a DM é a única característica clínica consistente.

Dentre as síndromes de DM de herança ligada ao cromossomo X, a mais frequente é a síndrome do cromossomo X frágil, que resulta de mutação no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) e afeta um em cada 4000-6000 homens e uma em cada 8000-9000 mulheres (revisão em Crawford e col., 2001). A síndrome recebeu esse nome porque os indivíduos afetados apresentam, na porção distal do braço longo do cromossomo X - Xq27.3, uma falha cromossômica ou sítio frágil (Lubs, 1969), quando suas células são cultivadas em meio deficiente em ácido fólico (Sutherland, 1977). Estima-se que 2 a 3% dos casos de DM em homens e 1% em mulheres são devidos à síndrome do cromossomo X frágil (Chelly & Mandel, 2001), correspondendo

a 25% de toda a DM de herança ligada ao cromossomo X (Ropers & Hamel, 2005).

Atualmente foram caracterizadas cerca de 150 síndromes de DM de herança ligada ao cromossomo X, das quais 35 puderam ser mapeadas em um segmento cromossômico específico, embora o gene responsável não tenha sido identificado. São 72 os genes do cromossomo X identificados como causa de casos de DM síndrômica até o momento, e para alguns deles, mutações diferentes, que comprometem a mesma proteína de maneira distinta, podem causar mais de uma síndrome. Dos 36 genes cujas mutações foram identificadas em casos de DM não síndrômica, 17 são também responsáveis por DM síndrômica. São 52 os casos de DM não síndrômica de herança ligada ao X que foram mapeados em segmentos específicos e aguardam a identificação do gene responsável (GGC, *Greenwood Genetic Center*; última atualização em abril 2010 - <http://www.ggc.org/xlmr.htm>).

O cromossomo X contém aproximadamente 4% dos genes identificados do genoma humano e cerca de 8-12% dos genes conhecidos por causarem DM quando mutados (Ropers, 2008). Já foi sugerida a existência de uma densidade desproporcional de genes relacionados a habilidades cognitivas no cromossomo X (Lehrke, 1972; Turner & Partington 1991), o que pode, entretanto, representar um viés devido ao fato de que mutações em genes do cromossomo X podem ser mapeadas e identificadas mais facilmente, uma vez que os fenótipos relacionados a mutações nesses genes são expostos pela hemizigose do X em homens (Lubs, 1999).

Considerando-se que 25% das famílias de DM ligada ao cromossomo X e 2,5% dos casos isolados de homens afetados esporádicos apresentam síndrome do cromossomo X frágil, estima-se que cerca de 10% da DM no sexo masculino sejam devidos a mutações no cromossomo X, entretanto, aproximadamente 30% seriam necessários para explicar o excesso de DM em homens (Ropers & Hamel, 2005). Além disso, com exceção do gene *FMR1*, mutações nos demais genes do cromossomo X já identificados como causa de DM ocorrem com frequências baixas. Entre os mais frequentemente

alterados, estima-se que o gene *ARX* (*Aristaless related homeobox*), mutado em casos de DM síndrômica e não síndrômica, contribua para cerca de 0,5% dos casos de DM ligada ao X e que mutações nos genes *CUL4B* (*Cullin 4B*), *KDM5C* (*Lysine (K)-specific demethylase 5C*) e *SLC6A8* (*Solute carrier family 6 neurotransmitter transporter creatine, member 8*) contribuam para cerca de 0,2% (Tarpey e col., 2009). Portanto, não se conhecem mutações no cromossomo X em número suficiente para explicar os 10% estimados de casos com herança ligada ao X.

## I.2 O gene *UBE2A* e a deficiência mental

---

Em meu programa de mestrado, realizei estudo visando identificar a causa genética de uma síndrome de DM de herança ligada ao cromossomo X. A síndrome afetava três indivíduos do sexo masculino, aparentados por suas mães fenotipicamente normais (Figura I.1 A e I.1 B). Em conjunto, as características compartilhadas pelos afetados, resumidas na Tabela I.1, não se encaixavam em síndrome previamente descrita. Dentre elas destacam-se a deficiência mental grave com comprometimento significativo da fala, convulsões, hipoplasia genital, e hirsutismo generalizado de tronco e membros (Figura I.1 A). As mães, portadoras obrigatórias, apresentavam desvio total de inativação do cromossomo X em linfócitos, conforme revelado pela análise do padrão de metilação do loco do gene *AR* (*Androgen receptor* - receptor de andrógenos) (Allen e col., 1992). A análise da segregação de 46 marcadores polimórficos do tipo microssatélite nos permitiu excluir a maior parte do cromossomo X, exceto um segmento de 15 Mb flanqueado pelos marcadores DXS8088 e DXS1047, em Xq24-q25 (Tabela I.2). Análises em bancos de dados - *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) e *Genatlas* (<http://www.genatlas.org>) - revelaram que o segmento candidato incluía 86 genes, dos quais 30 eram expressos no cérebro, sendo, dessa



maneira, candidatos para a triagem de mutações. Entretanto, o padrão desviado de inativação do cromossomo X nas portadoras – provável resultado de vantagem proliferativa das células que inativaram o cromossomo X portador da mutação – foi observado em amostra de DNA extraída de linfócitos, indício de que o gene responsável pelo quadro deveria ser também expresso nesse tecido. O gene *UBE2A* (*Ubiquitin conjugating enzyme E2 A*- enzima conjugadora de ubiquitina E2 A) era o único no segmento candidato expresso simultaneamente em cérebro e linfócitos (*Genatlas*). O sequenciamento dos seis éxons codificadores e dos limites íntron-éxon do gene revelou a substituição de uma citosina por uma timina na posição 382 da região codificadora do gene e que segregava com a doença (Figura I.1 C): estava presente nos afetados e em heterozigose em suas mães. A mulher III-1 (Figura I.1 B), irmã de um dos afetados, que havia apresentado padrão não desviado de inativação do cromossomo X, não era portadora da mutação em *UBE2A*.

A mutação c.382C→T gera um códon de parada prematuro UAG (Q128X), eliminando os últimos 25 aminoácidos da proteína *UBE2A*, que originalmente tem 152. A importância desse segmento para a função da proteína fica evidenciada pela conservação nos vertebrados, estendendo-se à *Drosophila* (Figura I.2). Essa foi a primeira descrição de mutação no gene *UBE2A* e a primeira associação de uma enzima conjugadora de ubiquitina a patologia humana - Dissertação apresentada ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (Nascimento, 2005), para obtenção de título de Mestre e artigo publicado no volume 79 do periódico *American Journal of Human Genetics*, em setembro de 2006 (Nascimento e col., 2006).

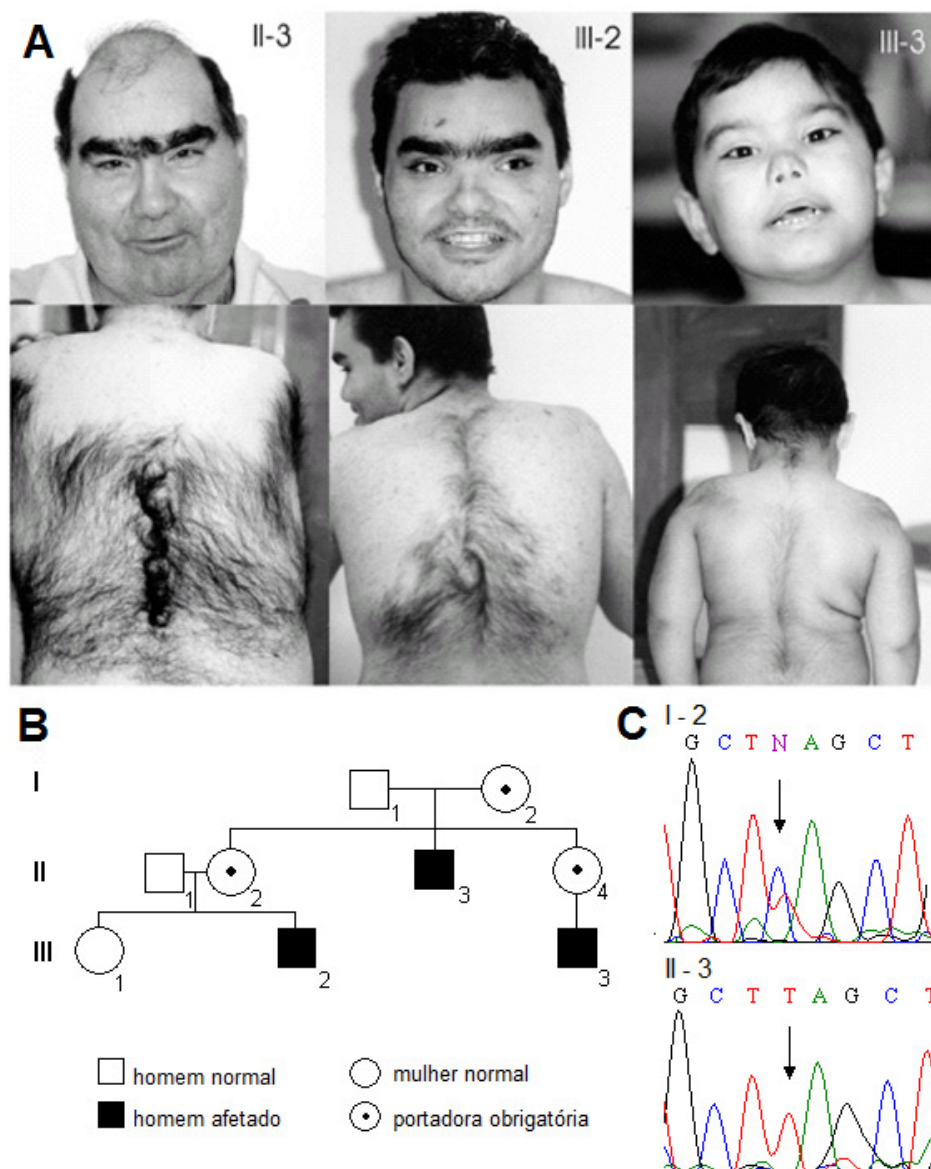


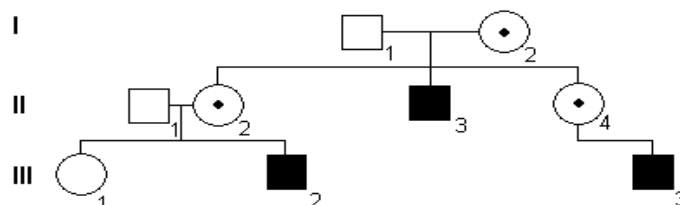
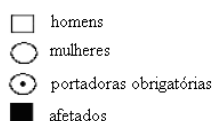
Figura I.1 A, os três homens afetados: II-3 (aos 46 anos e 7 meses); III-2 (aos 19 anos e 11 meses); e III-3 (aos 5 anos e 4 meses). B, genealogia da família onde segrega a síndrome, num padrão compatível com herança ligada ao cromossomo X. C, mutação c.382C→T encontrada no éxon 6 do gene *UBE2A* (modificada de Nascimento e col., *Am J Hum Genet*, 79:545, 2006).

Tabela I.1 Características clínicas associadas à deficiência mental nos três pacientes.

	Paciente II-3	Paciente III-2	Paciente III-3
Idade ao exame (anos)	46 7/12	19 11/12	5 4/12
Peso ao nascer	50º percentil	90º - 97º percentil	> 97º percentil
Estatura	< 3º percentil	10º - 25º percentil	10º percentil
Peso	> 97º percentil	90º percentil	> 97º percentil
Perímetro cefálico	>98º percentil	>98º percentil	50º percentil
Redemoinhos	+	+	+
Face alargada	-	+	+
Hipoplasia do maciço médio da face	-	+	+
Sinófris	+	+	+
Fendas palpebrais voltadas para cima	+	+	+
Hipertelorismo ocular	-	+	-
Ponte nasal baixa	-	+	+
Boca grande e lábios finos com as comissuras voltadas para baixo	+	+	+
Pescoço curto e largo	+	+	+
Implantação baixa de cabelos na nuca	+	+	+
Mamilos espaçados	+	+	+
Pênis pequeno	+	+	+
Pés pequenos, planos, com edema de dorso	+	+	+
Onicodistrofia*	+	+	-
Hirsutismo generalizado	+	+	+
Aparência mixedematóide	+	+	+
Pele seca	+	+	+
Convulsões	+	+	+
Comprometimento grave da fala	+	+ (ausência de fala)	+ (ausência de fala)
Substância branca hipodensa**	não examinado	+	+

\*após a puberdade, \*\*IRM de cérebro

Tabela I.2 Marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados no mapeamento da síndrome no cromossomo X: localização dos marcadores - distância física (Mb) e genética (cM), banda cromossômica, e alelos de cada indivíduo representado na genealogia. O segmento candidato está destacado. Os lócus cujos alelos segregam junto com a síndrome - DXS8053, DXS8081 e DXS8057 - estão sombreados (modificado de Nascimento e col., *Am J Hum Genet*, 79:545, 2006).



Marcador	Mb	Posição		Alelos											
		Mb	cM	III-1	II-1	II-2	III-2	I-1	II-3	I-2	II-4	III-3			
DXS1060	5.2	15,12	Xp22.33	3 1	1	3 1	3	1	2	2 3	2 1	2			
DXS8051	9.3	17,2	Xp22.32	1 2	2	1 3	1	3	1	1 4	4 3	3			
DXS7108	10.0	18,73	Xp22.32	1 1	1	1 1	1	1	2	1 2	2 1	1			
DXS1224	12.9	21,23	Xp22.31	2 3	3	2 1	2	1	2	2 2	2 1	1			
DXS987	14.4	22,18	Xp22.31	2 3	3	1 2	1	2	3	1 3	3 2	2			
DXS999	18.59	23,26	Xp22.13	1 1	1	2 1	1	1	2	1 2	1 1	1			
DXS1226	22.3	27,59	Xp22.13	2 4	4	2 3	2	3	1	1 2	1 3	3			
DXS1214	31.0	33,54	Xp21.3	1 2	2	1 2	1	2	3	1 3	3 2	2			
DXS1237	31.7		Xp21.3	2 2	2	1 2	1	2	2	1 2	2 2	2			
DXS1068	38.6	37,33	Xp21.1	2 3	3	3 2	3	2	1	1 3	1 2	2			
DXS993	40.9	42,21	Xp11.4	3 2	2	1 3	1	3	2	1 2	1 3	3			
DXS8083	44.9	46,24	Xp11.3	1 2	2	1 1	1	1	2	1 2	1 1	1			
DXS1055	46.2	47,08	Xp11.23	1 3	3	1 1	1	1	2	1 2	1 1	1			
DXS991	55.4	52,5	Xp11.22	4 1	1	2 4	2	4	3	2 3	2 4	4			
AR			Xp11-12	2 4	4	3 2	3	2	1	1 3	3 2	2			
DXS986	78.9	57,37	Xp13.3	2 1	1	2 2	2	2	1	1 2	2 2	2			
DXS990	89.9	60,62	Xq21.33	2 1	1	1 2	1	2	1	1 1	1 2	2			
DXS8077	95.1	62,52	Xq21.33	1 1	1	3 1	3	1	2	2 3	3 1	1			
DXS8020	96.4	65,5	Xq22.1	1 1	1	2 1	2	1	2	1 2	2 1	1			
DXS1106	102.5	66,58	Xq22.2	1 2	2	2 1	2	1	2	2 3	2 1	1			
DXS8112	104.7	66,58	Xq22.2	1 2	2	1 2	2	1	2	1 2	1 2	1			
DXS1210	106.1	67,12	Xq22.2	1 3	3	2 1	2	1	2	2 2	2 1	1			
DXS1059	111.1	68,2	Xq23	2 2	2	2 1	1	1	1	1 2	2 1	2			
DXS8088	113.2	68,74	Xq23	1 1	1	2 1	1	1	2	1 2	2 1	2			
DXS1220	114.4	70,91	Xq23	1 1	1	1 1	1	1	1	1 2	1 1	1			
DXS8055	114.5	70,91	Xq23	1 3	3	1 1	1	1	1	1 2	1 1	1			
DXS8053	115.4	70,91	Xq24	2 1	1	1 2	1	2	1	1 2	1 2	1			
DXS8081	116.3	70,91	Xq24	2 2	2	1 2	1	2	1	1 2	1 2	1			
DXS8064	117.0	70,91	Xq24	1 1	1	1 1	1	1	1	1 2	1 1	1			
DXS8067	119.1	75,79	Xq24	1 3	3	2 1	2	1	2	2 2	2 1	2			
DXS1001	119.6	75,79	Xq24	2 3	3	1 2	1	2	1	1 1	1 2	1			
DXS8059	121.9	78,5	Xq24	1 3	3	1 1	1	1	1	1 2	1 1	1			
DXS8098	122.6	78,5	Xq24	1 1	1	2 1	2	1	2	2 2	2 1	2			
DXS8057	123.3	79,19	Xq24	1 1	1	1 2	2	1	2	2 3	1 2	2			
DXS8009	125.9	82,07	Xq25	1 2	2	2 1	2	1	2	2 2	2 1	2			
DXS8044	126.3	82,07	Xq25	1 3	3	2 1	2	1	2	2 2	2 1	2			
DXS1047	128.8	82,84	Xq26.1	2 3	3	2 2	2	2	1	1 2	2 2	2			
DXS1227	140.5	88,33	Xq26.2	1 3	3	1 1	1	1	1	1 2	2 1	2			
DXS1062	141.7	82,84	Xq26.2	1 4	4	3 1	3	1	2	2 3	2 1	2			
DXS8043	143.7	94,22	Xq27.2	2 2	2	1 2	1	2	1	1 3	3 2	3			
FMR1			Xq27.3				1		1			2			
DXS8091	147.3	96,14	Xq28	1 4	4	2 1	2	1	2	2 3	3 1	3			
DXS8069	149.3	98,83	Xq28	1 1	1	1 1	1	1	1	1 1	1 1	1			
DXS8103	149.8	100,73	Xq28	1 1	1	3 1	3	1	3	2 3	3 1	1			
DXS8061	151.7	100,73	Xq28	1 1	1	3 1	3	1	2	2 3	2 1	2			
DXS1073	153.4	102,35	Xq28	1 1	1	1 1	1	1	1	1 1	1 1	1			

O gene *UBE2A* codifica uma conjugase de ubiquitina ou E2, enzima que participa do processo de ubiquitinação de proteínas. Esse processo, detalhado no próximo tópico (I.3), consiste na adição covalente de moléculas de ubiquitina a proteínas específicas em uma reação enzimática que requer a participação de três enzimas principais: (1) enzima ativadora de ubiquitina ou E1 (*Ub-activating enzyme*), (2) enzima conjugadora de ubiquitina ou E2 (*Ub-conjugating enzyme*) e (3) ligase de ubiquitina ou E3 (*Ub-protein ligase*). A ubiquitinação tem funções pleiotrópicas, tais como, direcionamento de proteínas para degradação via proteassoma 26S (revisão em Bochtler e col., 1999), ativação e inativação de fatores de transcrição (Conaway e col., 2002), internalização de receptores (Weissman, 2001) e modificações epigenéticas (Dover e col., 2002).

No momento da identificação da mutação em *UBE2A*, algumas doenças humanas já haviam sido associadas a mutações em genes da via de ubiquitinação e da degradação protéica dependente de ubiquitinação, a via proteassômica (revisão em Jiang e Beaudet, 2004). Mutações em genes que codificam ligases (E3) haviam sido identificadas como causa de síndrome de Angelman [*UBE3A (Ubiquitin protein ligase E3A)*; MIM 105830], síndrome de Johanson-Blizzard [*UBR1 (Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1)*; MIM 243800], síndrome de Optiz GBBB ligada ao X [*MID1 (Midline 1)*; MIM 300000], doença de Parkinson juvenil recessiva [*PARK2 (Parkinson disease autosomal recessive juvenile 2)*; MIM 600116], síndrome de poliendocrinopatia auto-imune tipo 1 [*AIRE (Autoimmune regulator)*; MIM 240300] e doença de Von Hippel-Lindal [*VHL (Von Hippel-Lindau tumor suppressor)*; MIM 193300]. Assim como no caso das mutações nos genes *UBE3A*, *UBR1* e *MID1*, a mutação em *UBE2A* causa uma síndrome que inclui alteração do desenvolvimento neurológico.

*UBE2A* é um dos ortólogos humanos do gene *RAD6/UBC2 (Radiation sensitive 6/Ubiquitin conjugating enzyme 2)* de *Saccharomyces cerevisiae* (Koken e col., 1991 e Koken e col., 1992). A proteína RAD6 é altamente conservada em eucariontes, propriedade que permitiu a clonagem dos dois genes ortólogos humanos: *UBE2A*, localizado no cromossomo X (Xq24), e *UBE2B (Ubiquitin conjugating enzyme 2 B)*, localizado no cromossomo 5 (5q23-31) (Koken e col.,

1992). Essa duplicação parece ser comum aos mamíferos, havendo uma cópia sempre no cromossomo X. Ambos os parálogos humanos codificam proteínas de 152 aminoácidos, que são estrutural e funcionalmente conservadas. Apesar da diferença de tamanho entre os genes *UBE2A* e *UBE2B* – aproximadamente 10 Kb e 21 Kb, respectivamente – as regiões codificadoras de ambos estão divididas em seis éxons que compartilham 80% de identidade de sequência. Codificam proteínas com 96% de identidade de aminoácidos, diferindo em apenas sete resíduos de aminoácidos (Koken e col., 1992). As proteínas *UBE2A* e *UBE2B* humanas compartilham, ainda, 100% de identidade de aminoácidos com suas correspondentes em camundongos, 96-100% de identidade com as proteínas de *zebrafish*, e 85-87% de identidade com a proteína de *Drosophila* (Figura I.2).

*RAD6* recebe esse nome devido ao fenótipo de sensibilidade à radiação ultravioleta apresentado pela linhagem de levedura mutante  $\Delta rad6$  (Cox & Parry, 1968). Tem papel pleiotrópico nesse organismo: a linhagem  $\Delta rad6$  apresenta sensibilidade a fatores que danificam o DNA, diminuição da viabilidade e incapacidade de esporulação (Lawrence, 1994). Sua função de conjugase de ubiquitina foi caracterizada por Jentsch e col. (1987).

*RAD6* codifica uma proteína de 172 aminoácidos, dos quais os primeiros 150 constituem um domínio globular e os 22 restantes formam uma cauda acídica estendida, ausente nas homólogas humanas. Os parálogos humanos, *UBE2A* e *UBE2B*, codificam proteínas muito semelhantes ao domínio globular de *RAD6* e de função conservada, sendo capazes de complementar os fenótipos de sensibilidade à luz UV apresentados pela linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* (Koken e col., 1991). São, entretanto incapazes de corrigir seu defeito de esporulação: observações prévias demonstraram que a capacidade de esporulação está intimamente relacionada com a presença do domínio estendido de *RAD6* (Morrison e col., 1988), ausente nas isoformas humanas. O resíduo de cisteína na posição 88 (C88) é evolutivamente conservado e tem papel na ligação tioéster com a molécula de ubiquitina, sendo, portanto, crucial para a função da enzima (Sung e col., 1990). Sarcevic e col. (2002) demonstraram que a fosforilação do resíduo de serina na

posição 120 (S120) das proteínas RAD6 e UBE2A é evento crítico para a proliferação celular em *S. cerevisiae*.

Sabe-se que RAD6 interage com três ligases de ubiquitina (E3) - UBR1, RAD18 (*Radiation sensitive 18*) e BRE1 (*Brefeldin A sensitivity 1*), mas não simultaneamente: RAD6 utiliza a mesma superfície para interagir com as diferentes E3, de forma que quando o sítio está ocupado por uma delas, não é capaz de interagir com as demais. O complexo RAD6/RAD18 exerce papel central no processo de reparo de DNA. Em resposta a danos ao DNA, esse complexo monoubiquitina o PCNA (*Proliferating cellular nuclear antigen*) promovendo a troca da polimerase de replicação por polimerases do tipo TSL (*translesion*) (Bailly e col., 1997; Hoegge e col., 2002). Ambas as proteínas UBE2A e UBE2B são capazes de interagir com a ortóloga humana de RAD18, que recebe o mesmo nome, em modelo de duplo híbrido de levedura (Xin e col., 2000). Porém, em contraste com o observado em leveduras (Madura e col., 1990), não ocorre aumento na expressão de *UBE2A* e *UBE2B* após a exposição de células Hela a doses variadas de UV (Koken e col., 1996).

O complexo RAD6/UBR1 participa do processo de degradação de proteínas denominado “*N-end rule*” (regra N-terminal), conservado de levedura a mamíferos (Dohmen e col., 1991). Esse processo consiste na adição de moléculas de ubiquitina a proteínas que possuem aminoácidos básicos ou hidrofóbicos provavelmente expostos em sua porção N-terminal, direcionando-as para a degradação no proteossoma. Recebe esse nome, uma vez que é a porção N-terminal da proteína que governa sua susceptibilidade para a proteólise dependente de ubiquitina (Varshavsky, 1995). Recentemente UBR1 foi identificada como ligase de ubiquitina essencial para a degradação de proteínas desdobradas no citoplasma de leveduras (Eisele & Wolf, 2008). No entanto, Koken e col. (1996) não detectaram aumento da expressão de *UBE2A* e *UBE2B* em células Hela após choque térmico, condição que favorece o desdobramento de proteínas. Em humanos, mutações no homólogo de *UBR1* causam a síndrome de Johanson-Blizzard (Zenker e col., 2005), que tem a DM como uma de suas características. Não existem evidências *in vivo* de interações entre *UBE2A* ou *UBE2B* com *UBR1* em humanos.

A interação de RAD6 com BRE1 resulta em alterações epigenéticas: a monoubiquitinação de histonas H2B no resíduo de lisina 123 em leveduras pelo complexo RAD6/BRE1 (Robzyk e col., 2000 e Wood e col., 2002) é sinal necessário para a metilação de histonas H3 nos resíduos de lisina 4 e 79 (Dover e col., 2002 Sun & Allis, 2002) Em humanos, foi demonstrado que a interação das proteínas UBE2A e UBE2B com o complexo de proteínas RNF20/RNF40 (*Ring finger protein 20* e *Ring finger protein 40*), homólogas de BRE1, resulta na ubiquitinação de histonas H2B no resíduo de lisina 120, sendo a interação com UBE2A mais eficiente nesse processo (Kim e col., 2009).

O fato de as proteínas UBE2A e UBE2B serem altamente conservadas traz o questionamento sobre sua especificidade ou redundância funcional. Ambas são ubiquamente expressas, embora em taxas que possam variar em diferentes células e tecidos (Koken e col., 1996). Camundongos duplo-nocautes (fêmeas *Ube2A*<sup>-/-</sup>/*Ube2B*<sup>-/-</sup> e machos *Ube2A*<sup>-Y</sup>/*Ube2B*<sup>-/-</sup>) não são viáveis, indicando que as proteínas são cruciais para o desenvolvimento (Roest e col., 2004). O camundongo nocaut *Ube2A* e o nocaut *Ube2B* são ambos viáveis, mas diferem pelo menos quanto ao aspecto reprodutivo. A esterilidade do camundongo macho nocaut quanto ao gene *Ube2B* (*Ube2B*<sup>-/-</sup>) (Roest e col., 1996) e a infertilidade da fêmea nocaut quanto ao gene *Ube2A* (*Ube2A*<sup>-/-</sup>) (Roest e col., 2004) são os únicos fenótipos evidentes nessas linhagens. A cognição desses animais não foi avaliada.



	1	85
<i>UBE2A (Homo sapiens)</i>	<b>MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPAGVSGAPSENNIMVWNAVIFGPEGTPFEDGTFKLTIEFTEEYPNKPPTVRFVSKMFHPNVYADG</b>	
<i>UBE2B (Homo sapiens)</i>	MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPVGVSGAPSENNIMQWNAVIFGPEGTPFEDGTFKLVIEFSEEYPNKPPTVRFVSKMFHPNVYADG	
<i>Ube2A (Mus musculus)</i>	<b>MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPAGVSGAPSENNIMVWNAVIFGPEGTPFEDGTFKLTIEFTEEYPNKPPTVRFVSKMFHPNVYADG</b>	
<i>Ube2B (Mus musculus)</i>	MSTPARERLMRDFKRLQEDPPVGVSGAPSENNIMQWNAVIFGPEGTPFEDGTFKLVIEFSEEYPNKPPTVRFVSKMFHPNVYADG	
<i>ube2a (Danio rerio)</i>	<b>MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPAGVSGAPSENNIMVWNAVIFGPEGTPFEDGTFKLTIEFTEEYPNKPPTVRFVSKMFHPNVYADG</b>	
<i>ube2b (Danio rerio)</i>	MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPAGVSGAPSENNIMVWNAVIFGPEGTPFEDGTFKLTVEFTEEYPNKPPTVRFVSKMFHPNVYADG	
<i>UbcD6 (Drosophila)</i>	MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPTGVSGAPTDNNIMIWNAVIFGPHDTPFEDGTFKLTIEFTEEYPNKPPTVRFVSKVHFHPNVYADG	

		Número do acesso (GenBank)
	86	152
<i>UBE2A (Homo sapiens)</i>	<b>SICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLDEPNPN<span style="border: 1px solid black;">SPANSQAAQLYQENKREYEKRVSAIVEQSWRDC</span></b>	NP_003327
<i>UBE2B (Homo sapiens)</i>	SICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLDEPNPN <span style="border: 1px solid black;">SPANSQAAQLYQENKREYEKRVSAIVEQSWNDS</span>	NP_003328
<i>Ube2a (Mus musculus)</i>	<b>SICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLDEPNPN<span style="border: 1px solid black;">SPANSQAAQLYQENKREYEKRVSAIVEQSWRDC</span></b>	NP_062642
<i>Ube2a (Mus musculus)</i>	SICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLDEPNPN <span style="border: 1px solid black;">SPANSQAAQLYQENKREYEKRVSAIVEQSWNDS</span>	NP-033484
<i>ube2a (Danio rerio)</i>	<b>SICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLDEPNPN<span style="border: 1px solid black;">SPANSQAAQLYQENKREYEKRVSAIVEQSWRDC</span></b>	NP_958430
<i>ube2b (Danio rerio)</i>	SICLDILQNRWSPTYDVSSILTSIQSLLDEPNPN <span style="border: 1px solid black;">SPANSQAAQLYQENKREYEKRVSAIVEQSWRDS</span>	NP_956013
<i>UbcD6 (Drosophila)</i>	GICLDILQNRWSPTYDVSAILTSIQSLLSDPNPN <span style="border: 1px solid black;">SPANSTAAQLYKENRREYEKRVKACVEQSFID</span>	NP_524230

Figura I.2 O alinhamento das sequências de proteínas E2 mostra que a identidade de aminoácidos é altamente conservada entre as proteínas humanas quando comparadas entre si (96%), com as de camundongo (100%), *zebrafish* (96%-100%) e *Drosophila* (85%-87%). O sítio de ligação com a ubiquitina (resíduo de cisteína na posição 88) e o sítio de fosforilação (resíduo de serina na posição 120) estão sublinhados. Em destaque, o segmento altamente conservado, correspondendo à sequência eliminada pela mutação c.382C→T, que resulta em um códon de parada prematura. As proteínas UBE2A de humanos, camundongos e *zebrafish* (em negrito) são idênticas. As sequências de aminoácidos das proteínas homólogas foram obtidas no banco de dados do NCBI a partir dos números de acesso correspondentes a cada uma delas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

O truncamento da enzima UBE2A em nossos pacientes pode resultar no quadro clínico por um efeito dependente de dose ou porque a proteína tem função específica, não compartilhada por UBE2B. Análises em bancos de dados (*NCBI, Ensembl, Genatlas*) apontam para a existência de três transcritos alternativos para o gene *UBE2A* (Figura I.3). O transcrito 1 é resultado da transcrição dos seis éxons codificadores do gene; o transcrito 2 difere do primeiro pela ausência do éxon 4; o transcrito 3 tem região 5' não traduzida (5'UTR- *Untranslated Region*) alternativa no íntron 3 e corresponde aos três últimos éxons do gene. Os três transcritos de *UBE2A* são classificados como codificadores e contém o sítio da mutação encontrada em nossos pacientes. Apenas uma mensagem parece ser codificada pelo parálogo *UBE2B* em humanos, similar ao transcrito 1 de *UBE2A*.

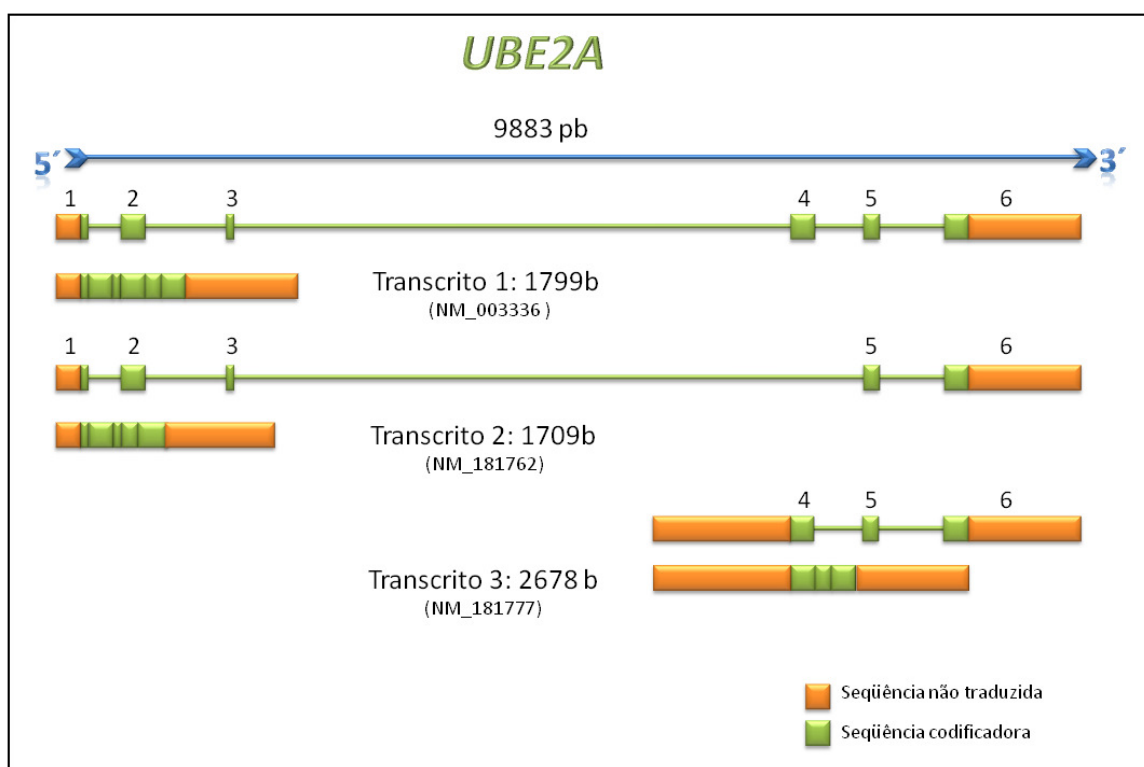


Figura I.3 Transcritos do gene *UBE2A*: Transcrito 1: 1799 b, corresponde aos seis éxons; transcrito 2: 1709 b, ausência do éxon 4; transcrito 3: 2678 b, 5' UTR alternativa no íntron 3 e corresponde apenas aos três últimos éxons. Fonte: *NCBI*.

Mutações no gene *UBE2A* podem ser responsáveis exclusivamente por quadros semelhantes ao de nossos pacientes. No entanto, é possível que outras mutações nesse gene resultem em quadros distintos. São vários os genes do cromossomo X relacionados à DM nos quais diferentes mutações causam síndromes distintas ou DM não sindrômica (Kleefstra & Hamel, 2005). O sequenciamento em larga escala de aproximadamente 700 genes do cromossomo X de cerca de 200 indivíduos com DM de herança ligada ao X revelou duas mutações do tipo *missense* (F72S e Q110E) em *UBE2A* (Tarpey e col., 2009). Entretanto, não foram fornecidas informações referentes ao quadro clínico dos indivíduos portadores dessas alterações e também não foi esclarecido porque apenas a alteração F72S foi considerada pelos autores como possivelmente patogênica. Durante o período de redação desta Tese, dois trabalhos foram publicados associando alterações em *UBE2A* a quadro de DM. Honda e col. (2010) encontraram uma microdeleção, que inclui *UBE2A* entre os nove genes deletados, em paciente com características clínicas também presentes em nossos pacientes. Budny e col. (2010) descreveram mutações *missense* em *UBE2A* (c.67G→A e c.32G→A) em duas famílias em que segregava quadro de DM sindrômica semelhante ao que descrevemos. Em conjunto, os dados sugerem que a perda de função desse gene seja responsável por quadro clínico típico.

### **I.3 A ubiquitinação de proteínas**

---

As modificações pós-traducionais de proteínas são recursos celulares que resultam na geração e na transmissão de sinais em praticamente todas as vias celulares conhecidas. Assim como a fosforilação, extensivamente estudada por alterar funções protéicas nos mais diversos processos celulares, em consequência da adição de um grupo fosfato (PO<sub>4</sub>), a ubiquitinação de proteínas é também um desses mecanismos. Consiste na ligação covalente de uma molécula de ubiquitina a determinadas proteínas, resultando em modificações de localização, atividade, estrutura, estabilidade ou interações moleculares.

A ubiquitina é um polipeptídeo de 76 aminoácidos e aproximadamente 8 kDa, altamente conservado nas células eucariontes - as ortólogas de leveduras e humanos diferem em apenas três resíduos de aminoácidos. Foi identificada pela primeira vez em 1975, por Goldstein e col., como um hormônio do timo e recebeu esse nome devido à sua presença ubíqua, sendo encontrada no citoplasma, no núcleo e na superfície celular, em sua forma livre ou ligada a outras proteínas. Em 1978, foi redescoberta como um fator de proteólise dependente de ATP (*ATP-dependent proteolysis factor* ou APF-1), pelo grupo de Avram Hershko e Aaron Ciechanover: seus estudos revelaram que a ligação covalente de APF-1 era necessária para direcionar proteínas para a degradação (Hershko e col., 1979, Hershko e col., 1980 e Ciechanover e col., 1980). Em 1980, após a cristalização da molécula de ubiquitina, confirmou-se que APF-1 era, de fato, a própria ubiquitina (Wilkinson e col., 1980). Em 2004, Avram Hershko, Aaron Ciechanover e Irwin Rose receberam o Prêmio Nobel de Química, pela descoberta da via de degradação proteossômica mediada por ubiquitina.

A porção C-terminal da ubiquitina pode ser covalentemente ligada ao grupo  $\epsilon$ -amino do resíduo de lisina ou ao grupo  $\alpha$ -amino do aminoácido N-terminal de um determinado substrato. O grupo tiol, presente nos resíduos de cisteína, ou o grupo hidroxila, presente nos resíduos de serina e treonina, servem como aceptores da molécula de ubiquitina; a ligação com o grupo tiol é a mais comumente observada (Cadwell & Coscoy, 2005; Wang e col., 2007; Williams e col., 2007; Tait e col., 2007).

A adição covalente da ubiquitina a proteínas alvo ocorre em três passos enzimáticos (Figura I.4): inicialmente, a ubiquitina é ativada por uma enzima do tipo E1 (*Ub-activating enzyme* - enzima ativadora de ubiquitina), em uma reação dependente de ATP. Esta ativação consiste na formação de uma ligação tioéster entre a porção C-terminal da ubiquitina e o resíduo de cisteína presente no sítio ativo da E1. Durante o processo de ativação da ubiquitina, a enzima E1 liga-se a uma molécula de  $Mg^{2+}$ -ATP e à ubiquitina, permitindo a formação de uma espécie transiente de ubiquitina adenilada. Esse intermediário instável atua como doador de ubiquitina para o resíduo de cisteína do sítio catalítico da E1, por uma reação

intramolecular de transesterificação (Haas & Rose, 1982; Hersko e col., 1983). Após a ativação, a ubiquitina é transferida para uma enzima do tipo E2 (*Ub-conjugating enzyme* – enzima conjugadora de ubiquitina), novamente por meio de uma ligação tioéster com um resíduo de cisteína. A E2, por sua vez, liga a ubiquitina ativada a um resíduo de lisina (K) ou à porção N-terminal da proteína alvo, com a participação direta ou indireta de enzimas do tipo E3 (*Ub-protein ligase* – ligase de ubiquitina). São as E3 que conferem especificidade ao processo de reconhecimento do substrato. Dessa maneira a molécula de ubiquitina é transferida para o resíduo de lisina da proteína alvo, ou para um resíduo de lisina de outra molécula de ubiquitina já ligada ao substrato, originando, assim, cadeias de poliubiquitina.

Devido ao fato de o gene *UBE2A* codificar uma E2, as características dessa classe de enzimas serão detalhadas no próximo tópico (I.4 Enzimas conjugadoras de ubiquitina – E2).

As enzimas do tipo E3 podem ser classificadas em três grupos, com base no domínio catalítico. O primeiro grupo apresenta um domínio conhecido como HECT (*Homologous to E6-associated protein C-terminus*) – originalmente identificado em E6-AP (*E6-associated protein*), proteína celular que participa do processo de associação da proteína E6, do vírus do papiloma humano, com a proteína p53 (Huibregtse e col., 1991). Um resíduo de cisteína presente no domínio HECT forma ligação tioéster com a molécula de ubiquitina, fazendo com que a E3 participe diretamente da ligação da ubiquitina ao substrato. O segundo grupo apresenta um domínio do tipo RING (*Really interesting new gene*) (Freemont e col., 1991) e o terceiro, um domínio U-box (Aravind & Koonin, 2000). Esses dois grupos não se ligam diretamente à molécula de ubiquitina, entretanto, parecem ser essenciais para o posicionamento da E2 em relação ao substrato. Apesar de não haver homologia de sequência de aminoácidos entre os domínios RING e U-box, ambos os grupos apresentam estruturas muito similares, sugerindo um mecanismo comum de ação dessas enzimas (Aravind & Koonin, 2000).

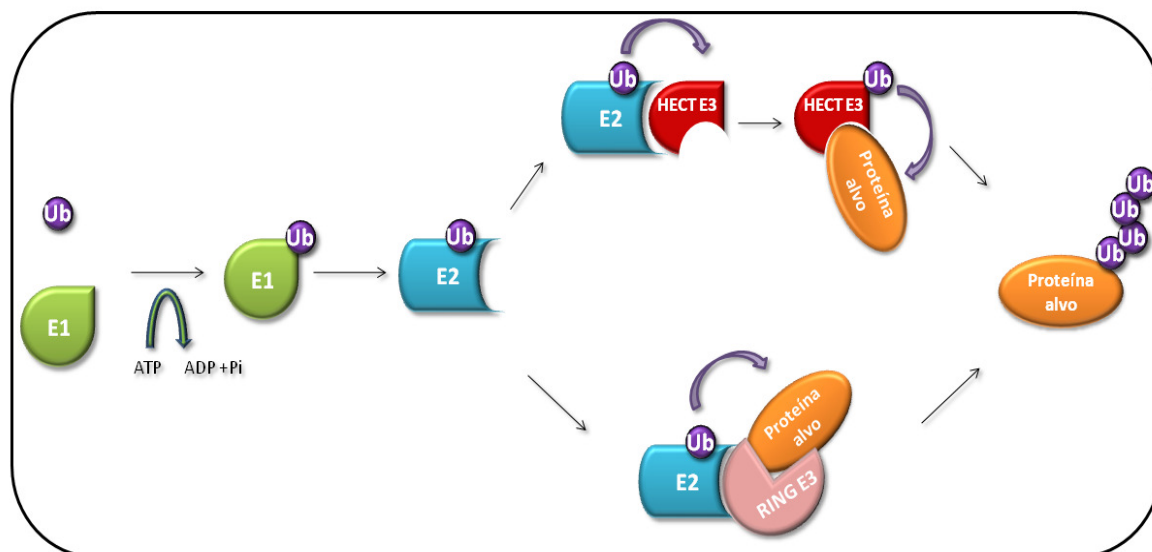


Figura I.4 Sequência de passos enzimáticos que levam à ubiquitinação da proteína alvo. E1, enzima ativadora de ubiquitina (Ub); E2: enzima conjugadora de ubiquitina; RING E3 e HECT E3: ligases de ubiquitina (baseado em Woelk e col., *Cell Div* 2:1, 2007).

A ubiquitinação de proteínas é também um processo reversível: proteases conhecidas como deubiquitinases (DUB) são capazes de remover as moléculas de ubiquitina, reciclando-as. Duas classes de DUB foram caracterizadas: (a) as hidrolases de ubiquitina C-terminal (UCH, *Ubiquitin C-terminal Hydrolases*), que apresentam um domínio catalítico de 230 aminoácidos e parecem interagir com moléculas precursoras de ubiquitina e também com proteínas monoubiquitinadas (Wilkinson, 2000; Osaka e col., 2003); e (b) as proteases específicas de ubiquitina (USP, *Ubiquitin specific proteases*), caracterizadas pela presença de um domínio catalítico de 350 aminoácidos responsável pela separação de cadeias de poliubiquitina (Swaminathan e col., 1999).

Os genomas eucariontes codificam, em geral, uma única ou poucas enzimas do tipo E1 - em humanos, por exemplo, dois genes codificadores de E1 foram identificados (NCBI - novembro/2009). São 13 as enzimas do tipo E2 identificadas em levedura e cerca de 40, em humanos (Pickart, 2001). Análises do genoma humano apontam para a existência de mais de 600 genes codificadores de enzimas do tipo E3, embora a maioria não tenha sido bioquimicamente caracterizada

(Joazeiro & Weissman, 2000 e Li e col., 2008). Análises proteômicas indicam a existência de cerca de 90 DUB em humanos (NCBI - novembro/2009).

Outra característica que confere especificidade ao processo de ubiquitinação de proteínas é a ocorrência de eventos de mono, multi ou poliubiquitinação (Figura I.5 A). A monoubiquitinação consiste na ligação de uma única molécula de ubiquitina a um resíduo de lisina de uma dada proteína, enquanto na multiubiquitinação várias moléculas de ubiquitina ligam-se a uma mesma proteína, cada uma em um diferente resíduo de lisina. A poliubiquitinação, por sua vez, consiste na adição de cadeias de poliubiquitina, estendidas a partir de qualquer um dos sete resíduos de lisina (K) existentes na molécula de ubiquitina - K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63, adquirindo topologias distintas (Figura I.5 B e C; revisão em Adhikari & Chen, 2009). Em uma mesma cadeia, em geral, as ubiquitinas são ligadas pelo mesmo resíduo de lisina.

As diferentes formas de ubiquitinação resultam, em geral, em diferentes destinos para as proteínas. O mais conhecido é a via de degradação proteassômica: proteínas marcadas com cadeias formadas por quatro ou mais moléculas de ubiquitina estendidas a partir do resíduo de lisina 48, são direcionadas ao proteassoma 26S, onde são degradadas (Thrower e col., 2000; Peng e col., 2003).

O proteassoma 26S é um complexo protéico estável formado por dois componentes 19S e um componente 20S (Figura I.6). O componente 20S apresenta a forma de barril, formado por 14 proteínas representadas duas vezes e agrupadas em dois anéis heptaméricos  $\beta$  centrais e dois anéis heptaméricos  $\alpha$ , posicionados externamente aos anéis  $\beta$  (Baumeister e col., 1998; Walz e col., 1998). O componente 19S é formado por uma base de oito subunidades protéicas, coberta por uma tampa ou *cap* de nove subunidades. Um anel de seis ATPases localiza-se na base do componente 19S e é essencial para permitir a entrada e o desdobramento (dependente de ATP) das proteínas no interior do componente 20S (Glickman e col., 1998; Braun e col., 1999; Köhler e col., 2001; Navon & Goldberg, 2001). Estima-se que 80-90% da degradação de proteínas em culturas de células de mamíferos ocorra via proteassoma (Lee & Goldberg, 1998).

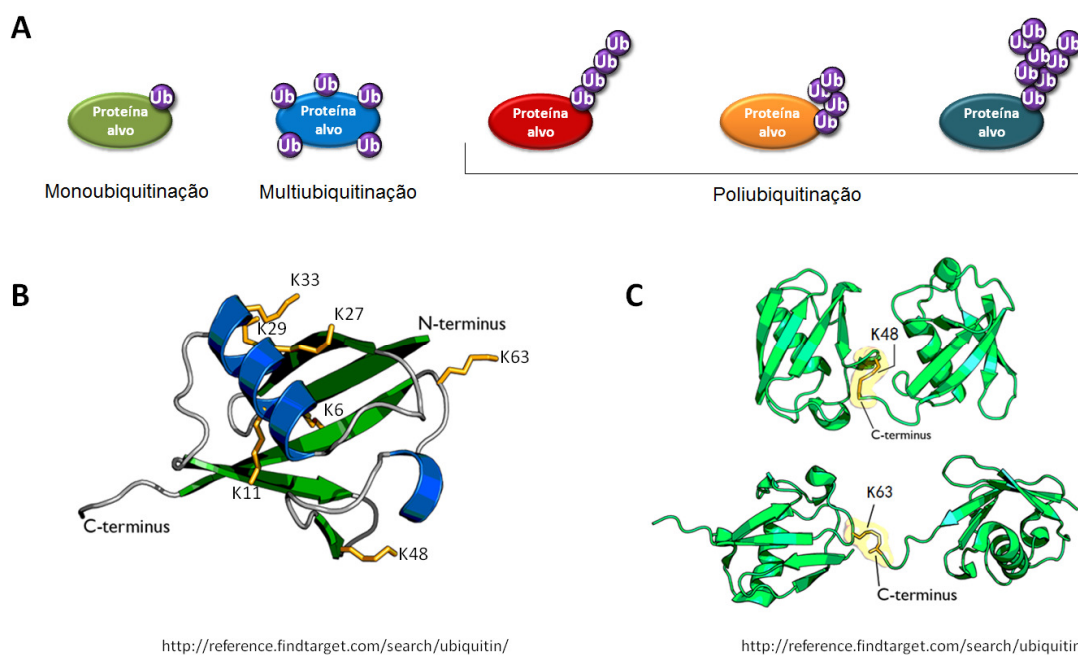
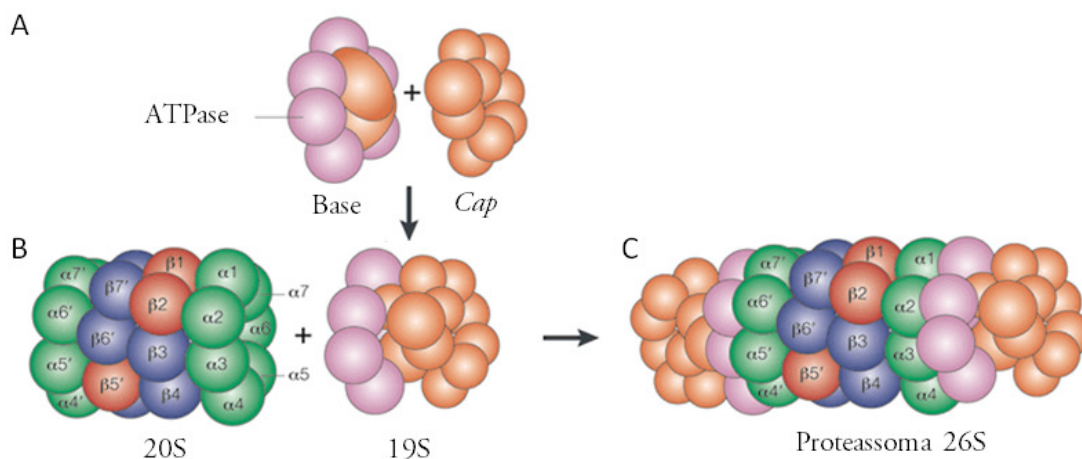


Figura I.5 A, mono, multi e poliubiquitinação (baseado em Woelk e col., *Cell Div* 2:11, 2007). B, representação da molécula de ubiquitina e seus sete resíduos de lisina (K). C, diferentes topologias adquiridas pela ligação de duas moléculas de ubiquitina a partir dos resíduos de lisina 48 e 63. Créditos das imagens representadas em B e C: *Findtarget reference*, <http://reference.findtarget.com/search/ubiquitin>.



Baseado em Kloetzel PM. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:179 (2001)

Figura I.6 Representação do proteassoma. A, a base e o cap que formam o componente 19S. B, o componente 20S, formado por dois anéis heptaméricos  $\beta$  centrais e dois anéis heptaméricos  $\alpha$  externos. C, o proteassoma 26S, formado por dois componentes 19S situados em ambas as extremidades da subunidade 20S. A imagem foi modificada de Kloetzel PM (2001).



A adição de moléculas de ubiquitina também está relacionada a funções regulatórias independentes do proteassoma. Por exemplo, a monoubiquitinação é sinal necessário e suficiente para a internalização de uma série de proteínas de membrana, direcionando-as para a via endocítica (Hicke & Dunn 2003). Algumas proteínas de membrana internalizadas não são diretamente ubiquitinadas, mas interagem com proteínas ubiquitinadas que regularão o seu tráfego na célula (Schnell & Hicke 2003). A ubiquitinação pode também regular a localização de uma proteína – a monoubiquitinação de FANCD2 (*Fanconi anemia, complementation Group D2*), durante a fase S do ciclo celular, estimula a sua localização no núcleo da célula (Gregory e col., 2003). Já foi demonstrado que a atividade de certos fatores de transcrição depende de sua monoubiquitinação no núcleo e sua subsequente poliubiquitinação seria uma maneira rápida de parar a atividade transcricional, quando ela não é mais necessária (Muratani & Tansey, 2003).

Diversos estudos fornecem evidências de que as diferentes cadeias de ubiquitina apresentam funções distintas (revisão em Adhikari & Chen, 2009). Sabe-se que somente as mutações de ponto no resíduo de lisina 48 da molécula de ubiquitina são letais para a levedura (Chau e col., 1989; Spence e col., 1995). Essas mutações interrompem a degradação de proteínas e o progresso do ciclo celular, sugerindo que as cadeias de ubiquitina ligadas por esse resíduo de lisina são o principal sinal para a degradação proteassômica. Há evidências de papel não proteolítico de cadeias estendidas pelo resíduo de lisina 63: análises bioquímicas mostraram que IKK (*IκB Kinase*), uma quinase responsável por regular a transcrição de NF-kappaB (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), pode ser ativada pela adição de cadeias de poliubiquitina estendidas a partir de K63, mesmo na ausência de proteassoma (Chen e col., 1996; Deng e col., 2000). Entretanto, estudos *in vitro* revelaram que proteínas conjugadas a cadeias de ubiquitina estendidas a partir de K63 podem ser degradadas pelo proteassoma (Hofmann & Pickart, 2001). Por espectrometria de massa, Xu e col. (2009) quantificaram as diferentes cadeias de ubiquitina de células de leveduras e detectaram cadeias estendidas a partir de todos os resíduos de lisina da ubiquitina. Seus dados revelaram que as cadeias estendidas a partir de K11 são tão

comuns quanto as que partem de K48, seguidas por aquelas estendidas a partir de K63. Observaram ainda que, após tratamento com inibidores de proteassoma, ocorre acúmulo de proteínas conjugadas a todas as cadeias, exceto às cadeias estendidas a partir de K63, sugerindo, que todas as cadeias de poliubiquitina, exceto as K63, são alvo de degradação proteassômica *in vivo*. Entretanto, esse estudo não exclui a possibilidade de que as demais cadeias apresentem funções não-proteolíticas. De fato, a adição de cadeias K48 ao fator de transcrição de levedura Met4 inibe sua função por mecanismo independente do proteassoma (Flick e col., 2004).

A ubiquitinação de proteínas é, portanto, um processo complexo, dinâmico, específico e reversível, envolvido nas mais diversas vias celulares.

#### **I.4 As enzimas conjugadoras de Ubiquitina - E2**

---

O gene *UBE2A* codifica uma enzima conjugadora de ubiquitina, classe de enzimas que participam do passo intermediário do processo de ubiquitinação de proteínas: recebem a molécula de ubiquitina de enzimas E1 e a transferem para um resíduo de lisina do substrato com ou sem a participação direta de enzimas do tipo E3.

A família das E2 compreende 13 genes em *S. cerevisiae* e pelo menos 38 em humanos. A comparação das sequências codificadoras de E2 revelou que todas apresentam um domínio de aproximadamente 150 aminoácidos e cerca de 16 kDa - domínio UBC (*Ubiquitin conjugating domain* - domínio conjugador de ubiquitina), com pelo menos 35% de identidade de sequência de aminoácidos e um resíduo de cisteína central, sítio de ligação com a molécula de ubiquitina (Sung e col., 1990; Sung e col., 1991; Sullivan e col., 1991). A superposição de seis E2 que tiveram sua estrutura resolvida por cristalografia (Cook e col., 1992; Cook e col., 1993; Cook e col., 1997; Tong e col., 1997; WorthyLake e col., 1998; Jiang & Basavappa, 1999) revelou poucas variações em suas estruturas tridimensionais (Ptak e col., 2001). Todas apresentam um motivo altamente conservado na porção

N-terminal do domínio UBC, rico em resíduos básicos, que parece ser essencial para a interação com a enzima ativadora de ubiquitina (Sullivan & Vierstra, 1991).

As E2 têm como propriedade comum a formação de ligações tioéster com moléculas de ubiquitina em um resíduo de cisteína conservado. Entretanto, a participação de diferentes E2 em vias celulares, muitas vezes não relacionadas, indica sua especificidade. A aquisição dessas funções específicas é provavelmente resultado de variações estruturais toleráveis, que mantiveram sua capacidade de interagir com as enzimas ativadoras de ubiquitina (E1) e também com a molécula de ubiquitina (Jentsch, 1992; Ptak e col., 2001).

De acordo com as variações estruturais, Jentsch (1992) classificou as enzimas conjugadoras de ubiquitina em quatro classes: (I) aquelas constituídas exclusivamente pelo domínio UBC; (II) as que apresentam extensões de comprimentos variados na porção C-terminal do domínio UBC; (III) as que apresentam apenas extensões N-terminais e (IV) aquelas com extensões C- e N-terminais.

A estrutura das enzimas da classe I sugere a necessidade de interações com enzimas do tipo E3 para o reconhecimento do substrato. Porém, pode também ser sugestiva da capacidade de interação com diversas E3. As extensões terminais apresentadas pelos grupos II, III e IV estão provavelmente relacionadas com a especificidade de interações ou com a localização celular da proteína. Por exemplo, a enzima UBC3 (*Ubiquitin conjugating enzyme 3*) de levedura apresenta uma extensão C-terminal acídica que promove sua interação com substratos básicos *in vitro*. Já UBC6 (*Ubiquitin conjugating enzyme 6*) possui uma extensão C-terminal de 95 resíduos de aminoácidos, contendo uma porção hidrofóbica que localiza a proteína no retículo endoplasmático, com o domínio ativo voltado para o citoplasma (High e col., 1991). As extensões terminais são, ao contrário do domínio UBC, hipervariáveis, o que aponta para sua especificidade ou papéis regulatórios.

Ptak e col. (2001) demonstraram que a substituição do resíduo de asparagina por um resíduo de fenilalanina na posição 65 de RAD6 é capaz de gerar uma enzima conjugadora de ubiquitina pluripotente, que exerce as funções

adicionais de resposta ao estresse, realizadas por UBC4 (*Ubiquitin conjugating enzyme 4*) e as funções de manutenção do ciclo celular, realizadas por CDC34 (*Cell division cycle 34*), além de manter suas funções originais de reparo de DNA. Os autores sugerem que duas forças evolutivas parecem ter agido sobre a diversidade das E2: a inércia, que manteve seu domínio catalítico invariável, e a tendência a variações externas, que resultaram em especificidade. Propõem que as E2 evoluíram de um ancestral comum capaz de realizar diversas funções e, após eventos de duplicações gênicas, ocorreram alterações como extensões e inserções, originando-se as diversas E2 hoje conhecidas.

Em uma reação de ubiquitinação, é a E2 que reconhece a E1 correta para receber o modificador adequado: a ubiquitina, e não proteínas similares, como SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*), por exemplo (Haas e col., 1988; Schulman & Harper, 2009). Levando em consideração a existência de aproximadamente 40 genes codificadores de E2 e mais de 600 genes codificadores de E3, pode-se inferir que uma mesma E2 deve ser capaz de interagir com diversas E3. As interações entre E2 e E3 são, entretanto, fracas, com constantes de dissociação na faixa de micro molar (Yin e col., 2009). Essas interações fracas dificultam a caracterização dos pares E2-E3, mas são provavelmente vantajosas para o processo de formação de cadeias de ubiquitina, uma vez que as E2 utilizam superfícies sobrepostas para interação com a E1 e a E3 (Huang e col., 2005; Eletr e col., 2005). As E2 tornam, assim, o processo de formação de cadeias de ubiquitina uma reação altamente dinâmica. As enzimas do tipo E3 são cruciais para o reconhecimento do substrato, mas a escolha de qual resíduo de lisina do substrato (ou da própria ubiquitina) receberá a próxima ubiquitina parece ser papel das E2 (Ye & Rape, 2009). As E2 podem, ainda, sintetizar cadeias de ubiquitina a partir de diferentes resíduos de lisina mesmo na ausência de E3 (Chen & Pickart, 1990; Haas e col., 1991; Hofmann & Pickart, 2001). Algumas E2 transferem a ubiquitina ao substrato para iniciar a formação da cadeia (Kirkpatrick e col., 2006; Alpi e col., 2008), enquanto outras atuam como fatores de alongação (Christensen e col., 2007; Petroski e col., 2007; Windheim e col., 2008; Williamson e col., 2009). Algumas podem realizar ambas as funções (Verma e col., 1997; Rape e col., 2006). As E2 também regulam a

processividade da formação das cadeias, ou seja, o número de moléculas de ubiquitina transferidas para uma cadeia em crescimento por rodada de associação do substrato com a E3 (revisão em Ye & Rape, 2009). São, portanto, as E2 que determinam a topologia das cadeias de ubiquitina, processo que provavelmente resulta da orientação do acceptor de ubiquitina pela E2, de forma que o mesmo resíduo de lisina das consecutivas moléculas de ubiquitina seja exposto para o sítio ativo da E2, o sítio doador de ubiquitina (Eddins e col., 2006; Petroski e col., 2005). Finalmente, algumas E2 possuem capacidade de autoubiquitinação (Banerjee e col., 1993; Gwozd e col., 1995; Liu e col., 1996 Leggett & Candido, 1997, David e col., 2010). A importância fisiológica da autoubiquitinação não está clara, mas especula-se que dessa maneira as E2 possam regular sua atividade ou níveis celulares. De fato, a automonoubiquitinação de UBE2T (*Ubiquitin conjugating enzyme 2T*) abole sua atividade de conjugase de ubiquitina (Machida e col., 2006).

## **I.5 A ubiquitinação de proteínas e o sistema nervoso**

---

Uma das primeiras evidências da importância da ubiquitinação de proteínas no sistema nervoso veio da observação do mutante *bendless* de *Drosophila melanogaster*. Esse mutante foi identificado há mais de vinte anos em estudo que buscava moscas com resposta de escape alterada (Thomas & Wyman, 1984). Os autores demonstraram que o fenótipo *bendless* era devido a um defeito em uma única conexão neuronal: a fibra axonal gigante, essencial para a resposta de escape, não se curvava corretamente e, portanto, não se conectava com o neurônio motor alvo. O gene *bendless* foi identificado nove anos depois e seu produto foi caracterizado como uma conjugase de ubiquitina (E2) (Muralidhar & Thomas, 1993).

Diversos estudos apontam para a participação da via de ubiquitinação de proteínas na regulação das sinapses. Sabe-se que a liberação de neurotransmissores ocorre quando a despolarização induz a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal pré-sináptico via canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem; esse influxo

de  $\text{Ca}^{2+}$  permite a fusão das vesículas contendo neurotransmissores com a membrana celular, resultando na liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica. Chen e col. (2003) demonstraram que a despolarização aguda na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta em diminuição rápida e global de conjugados proteína-ubiquitina, não acompanhada de aumento na degradação proteolítica, sugerindo a participação das DUB nesse processo. Estudos em junções neuromusculares de *Drosophila* demonstraram a presença da maquinaria de ubiquitinação e do proteassoma nos terminais pré-sinápticos, e que a proteólise dependente de ubiquitina atua local e rapidamente, regulando a liberação de neurotransmissores. A inibição do proteassoma resulta em acúmulo da molécula DUNC-13 (*Drosophila unc-13 homolog C. elegans*), conhecida por ser ubiquitinada *in vivo* e por controlar a força sináptica, regulando a liberação de vesículas na fenda sináptica (Speese e col., 2003; Aravamudan & Broadie, 2003). A via de ubiquitinação de proteínas também foi relacionada com a regulação da força sináptica, alterando o número de receptores de neurotransmissores na membrana pós-sináptica, por endocitose mediada por monoubiquitinação (Hicke & Dunn, 2003). Estudos em *Caenorhabditis elegans* demonstraram que receptores de glutamato são ubiquitinados *in vivo* e que mutações que inibem ou promovem sua ubiquitinação resultam, respectivamente, em aumento e diminuição da densidade desses receptores nas sinapses (Burbea e col., 2002). Em mamíferos, o processo de internalização dos receptores AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*) tem participação indireta da ubiquitina, na via de ubiquitinação da proteína de suporte PSD-95 (*Postsynaptic density 95*) pela E3 ligase Mmd2 (*Monocyte to macrophage differentiation-Associated 2*) (Colledge e col., 2003).

A via de ubiquitinação de proteínas já foi relacionada a doenças de neurodesenvolvimento e neurodegeneração. Uma característica comum a muitas doenças neurodegenerativas – como as doenças de Huntington, de Parkinson, de Alzheimer, a esclerose lateral amiotrófica, a ataxia espinocerebelar, entre outras – é a presença, em neurônios, de inclusões ubiquitina-positivas e que contêm proteínas da via de ubiquitinação (Lowe e col., 1988; Shimura e col., 1999). Algumas dessas doenças são causadas por expansões de nucleotídeos CAG, que

resultam na síntese de longas cadeias de poliglutamina que levam a erro de dobramento da proteína. Como resposta, a célula tenta refazer o dobramento dessas proteínas ou promover sua degradação no proteassoma. A falha nessas tentativas leva ao acúmulo das proteínas em agregados, que também incluem outras proteínas, como chaperonas, conjugases de ubiquitina (E2) e proteassomas (Alves-Rodrigues e col., 1998; Zoghbi e col., 2000; Lowe e col., 2001, Howard e col., 2007). Entretanto, os agregados parecem ser resistentes à proteólise (Holmberg e col., 2004). Os mecanismos precisos que levam à formação desses agregados e seu significado na etiologia dessas doenças não são conhecidos.

Os três afetados portadores da mutação no gene *UBE2A* que descrevemos apresentam um distúrbio do desenvolvimento neurológico. A primeira associação da via de ubiquitinação de proteínas com o neurodesenvolvimento em humanos ocorreu quando mutações em *UBE3A*, codificador de uma ligase de ubiquitina (E3), foram descritas como causa da síndrome de Angelman (Kishino e col., 1997; Matsuura e col., 1997). A síndrome de Angelman (MIM 105830) é caracterizada por atraso no desenvolvimento neuropsicomotor/deficiência mental, ausência de fala, ataxia e comportamento peculiar que inclui alta excitabilidade e riso frequente; comumente ocorrem convulsões e, entre os sinais físicos, a microcefalia é frequente. A síndrome decorre da perda de função do alelo materno de *UBE3A*. O gene é “imprintado” no cérebro, de forma que somente o alelo materno é expresso no cerebelo e no hipocampo. Posteriormente os genes *MID1*, *UBR1*, *CUL4B*, e *HUWE1* (*HECT, UBA and WWE domain containing 1*), também codificadores de E3, foram relacionados com quadros que incluem DM. Mutações em *MID1* foram descritas também em 1997 por Quaderi e col., como causa da síndrome de Optiz (MIM 145410), que tem como características clínicas o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, hipertelorismo, fenda labial e palatina, anomalias na laringe, traqueia e esôfago, hipospádia, anus imperfurado e defeitos cardíacos (Optiz e col., 1969). A função de ligase de ubiquitina de *MID1* foi caracterizada em 2001, por Trockenbacher e col. Mutações em *UBR1*, localizado no cromossomo 15, causam a síndrome de Johanson-Blizzard (MIM 243800), de herança autossômica recessiva e que inclui DM, hipotireoidismo, surdez

congenita, aplasia ou hipoplasia das asas nasais, ausência de dentes permanentes e má absorção intestinal (Johanson & Blizzard, 1971; Zenker e col., 2005). O gene *CUL4B*, localizado no cromossomo X, foi encontrado mutado em nove famílias em que segregava quadro de DM ligada ao X associada a agressividade, convulsões, tremor, macrocefalia, obesidade, hipogonadismo e pé cavo (Cabezas e col., 2000; Tarpey e col., 2007, Zou e col., 2007). Microduplicações incluindo o gene *HUWE1* foram associadas a quadros de DM não sindrômica (Froyen e col., 2008). Além disso, variações em número de cópias de genes que codificam ligases de ubiquitina foram relacionadas com susceptibilidade ao autismo (Glessner e col., 2009). Os mecanismos celulares que levam aos fenótipos relacionados a esses genes ainda não estão claros.

Dentre os genes da via de ubiquitinação já relacionados com DM, *UBE2A* é o único que codifica enzima do tipo E2 (Nascimento e col., 2006). Alguns estudos evidenciaram a importância das conjugases de ubiquitina para o desenvolvimento neuronal. Foi observado que o crescimento de neuritos em células de feocromocitoma de ratos (PC12), induzido pelo fator de crescimento neuronal (NGF, *Nerve Growth Factor*), ocorre concomitantemente ao aumento dos níveis de conjugados proteína-ubiquitina e da atividade de enzimas conjugadoras de ubiquitina, embora não se tenha detectado aumento significativo da taxa de proteólise dependente de ubiquitina. O crescimento dos neuritos foi acelerado quando a proteólise dependente de ubiquitina foi bloqueada, mas esse crescimento foi interrompido por dipeptídeos inibidores do processo de ubiquitinação dependente de enzimas do tipo E3. Esses resultados indicam que a ubiquitinação e a proteólise dependente de ubiquitina atuam, respectivamente, como reguladores positivo e negativo do crescimento de neuritos (Obin e col., 1999). Observou-se também que a inibição parcial do mRNA de *UBE2B* resultou na diminuição, em cerca de 25%, do comprimento dos neuritos, após a indução de seu crescimento por NGF em células PC12; a inibição farmacológica da proteólise dependente de ubiquitina reduziu significativamente o comprimento e as ramificações axonais de neurônios sensoriais adultos, *in vitro* (Kavakebi e col., 2005).



A identificação da mutação c.382C→T no gene *UBE2A* como causa de DM abriu caminhos novos de investigação do papel da via de ubiquitinação de proteínas no funcionamento normal do cérebro e na patofisiologia da DM. Este trabalho teve como objetivos investigar a contribuição de mutações em *UBE2A* como causa de DM e avaliar o efeito da mutação c.382C→T nos processos de transcrição e tradução e na função de *UBE2A*, incluindo seus transcritos e isoformas alternativas.

No Capítulo II, apresentamos os dados da triagem de mutações de *UBE2A* em famílias em que a DM segrega de forma compatível com a herança ligada ao cromossomo X e que foi previamente mapeada em intervalos que incluem o gene e em um caso isolado de DM sindrômica, em que ocorriam características clínicas semelhantes às apresentadas pelos portadores da mutação c.382C→T em *UBE2A*. Abordamos o efeito da mutação c.382C→T na transcrição e na tradução em homem afetado e em mulher portadora. Descrevemos também o estudo da expressão dos transcritos do gene *UBE2A* e a presença das isoformas por eles codificadas em diferentes tecidos humanos e de camundongos.

O Capítulo III aborda ensaios *in vivo* de diferenciação de pré-adipócitos humanos e de complementação funcional em linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* e ensaios *in vitro* de ubiquitinação de histonas H2A, para investigação do efeito da mutação c.382C→T e para avaliar se as isoformas alternativas de *UBE2A* compartilham a função de conjugase de ubiquitina, previamente descrita para a isoforma 1.

## Referências Bibliográficas

---

- Adhikari A, Chen ZJ. Diversity of polyubiquitin chains. **Dev Cell** 16:485-6, 2009.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** 51:1229-39, 1992.
- Alpi AF, Pace PE, Babu MM, Patel KJ - Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. **Mol Cell** 32:767-77, 2008.
- Alves-Rodrigues A, Gregori L, Figueiredo-Pereira ME - Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. **Trends Neurosci** 21:516-20, 1998. Revisão.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV (American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994.
- Aravamudan B, Broadie K. - Synaptic Drosophila UNC-13 is regulated by antagonistic G-protein pathways via a proteasome-dependent degradation mechanism. **J Neurobiol** 54: 417-38, 2003.
- Aravind L, Koonin EV - The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. **Curr Biol** 10:R132-4, 2000.
- Bailly V, Prakash S, Prakash L - Domains required for dimerization of yeast RAD6 ubiquitin-conjugating enzyme and RAD18 DNA binding protein. **Mol Cell Biol** 17:4536-43, 1997.
- Banerjee A, Gregori L, Xu Y, Chau V - The bacterially expressed yeast CDC34 gene product can undergo autoubiquitination to form a multiubiquitin chainlinked protein. **J Biol Chem** 268, 5668-75, 1993.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E - The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. **Cell** 92:367-80, 1998.
- Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R - The proteasome. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 28:295-317, 1999.

- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M - The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. **Nat Cell Biol** 1:221-6, 1999.
- Budny B, Badura-Stronka M, Materna-Kiryluk A, Tzschach A, Raynaud M, Latos-Bielenska A, Ropers H - Novel missense mutations in the ubiquitination-related gene *UBE2A* cause a recognizable X-linked mental retardation syndrome. **Clin Genet**, 2010.
- Burbea M, Dreier L, Dittman JS, Grunwald ME, Kaplan JM - Ubiquitin and AP180 regulate the abundance of GLR-1 glutamate receptors at postsynaptic elements in *C. elegans*. **Neuron** 35:107-20, 2002.
- Cabezas DA, Slaugh R, Abidi F, Arena JF, Stevenson RE, Schwartz CE, Lubs HA - A new X linked mental retardation (XLMR) syndrome with short stature, small testes, muscle wasting, and tremor localises to Xq24-q25. **J Med Genet** 37:663-8, 2000.
- Cadwell K, Coscoy L - Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. **Science** 309:127-30, 2005. Erratum: **Science** 311:177, 2006.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A - A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. **Science** 243:1576-83, 1989.
- Chelly J, Mandel JL - Monogenic causes of X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 2:669-80, 2001.
- Chen H, Polo S, Di Fiore PP, De Camilli PV - Rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent decrease of protein ubiquitination at synapses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100:14908-13, 2003.
- Chen Z, Pickart CM - A 25-kilodalton ubiquitin carrier protein (E2) catalyzes multi-ubiquitin chain synthesis via lysine 48 of ubiquitin. **J Biol Chem** 265:21835-42, 1990.
- Chen ZJ, Parent L, Maniatis T - Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. **Cell** 84:853-62, 1996.

- Chiurazzi P, Oostra BA - Genetics of mental retardation. **Curr Opin Pediatr** 12:529-35, 2000.
- Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE - E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. **Nat Struct Mol Biol** 14:941-8, 2007.
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A - ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 77:1365-8, 1980.
- Colledge M, Snyder EM, Crozier RA, Soderling JA, Jin Y, Langeberg LK, Lu H, Bear MF, Scott JD - Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. **Neuron** 40:595-607, 2003.
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW - Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. **Science** 296:1254-8, 2002.
- Cook WJ, Jeffrey LC, Sullivan ML, Vierstra RD - Three-dimensional structure of a ubiquitin-conjugating enzyme (E2). **J Biol Chem** 267:15116-21, 1992.
- Cook WJ, Jeffrey LC, Xu Y, Chau V - Tertiary structures of class I ubiquitin-conjugating enzymes are highly conserved: crystal structure of yeast Ubc4. **Biochemistry** 32:13809-17, 1993.
- Cook WJ, Martin PD, Edwards BF, Yamazaki RK, Chau V - Crystal structure of a class I ubiquitin conjugating enzyme (Ubc7) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.9 angstroms resolution. **Biochemistry** 36:1621-7, 1997.
- Cox BS, Parry JM - The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet light-sensitive mutants in yeast. **Mutat Res** 6:37-55, 1968.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL - *FMR1* and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genet Med** 3:359-71, 2001.
- David Y, Ziv T, Admon A, Navon A - The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. **J Biol Chem** 285:8595-604, 2010.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ - Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric

- ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell** 103:351-61, 2000.
- Dohmen RJ, Madura K, Bartel B, Varshavsky A - The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:7351-5, 1991.
- Dover J, Schneider J, Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A - Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by RAD6. **J Biol Chem** 277:28368-71, 2002.
- Eddins MJ, Carlile CM, Gomez KM, Pickart CM, Wolberger C - Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. **Nat Struct Mol Biol** 13:915-20, 2006.
- Eisele F, Wolf DH - Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1. **FEBS Lett** 582:4143-6, 2008.
- Eletr ZM, Huang DT, Duda DM, Schulman BA, Kuhlman B - E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. **Nat Struct Mol Biol** 12:933-4, 2005.
- Flick K, Ouni I, Wohlschlegel JA, Capati C, McDonald WH, Yates JR, Kaiser P - Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. **Nat Cell Biol** 6:634-41, 2004.
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J - A novel cysteine-rich sequence motif. **Cell** 64:483-84, 1991.
- Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, Sanlaville D, van Bokhoven H, Ropers HH, Laumonier F, Ranieri E, Schwartz CE, Abidi F, Tarpey PS, Futreal PA, Whibley A, Raymond FL, Stratton MR, Fryns JP, Scott R, Peippo M, Sipponen M, Partington M, Mowat D, Field M, Hackett A, Marynen P, Turner G, Gécz J - Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase *HSD17B10* and the E3 ubiquitin ligase *HUWE1* are associated with mental retardation. **Am J Hum Genet** 82:432-43, 2008.

- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PM, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garris M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougale CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JL, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD, Hakonarson H - Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature** 459:569-73, 2009.
- Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D - The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. **Mol Cell Biol** 18:3149-62, 1998.
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA - Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 72:11-5, 1975.
- Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD - Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. **Semin Cancer Biol** 13:77-82, 2003.
- Gwozd CS, Arnason TG, Cook WJ, Chau V, Ellison MJ - The yeast UBC4 ubiquitin conjugating enzyme monoubiquitinates itself *in vivo* : evidence for an E2-E2 homointeraction. **Biochemistry** 34, 6296-02, 1995.
- Haas AL, Rose IA - The mechanism of ubiquitin activating enzyme. Akinetic and equilibrium analysis. **J Biol Chem** 257:10329-37, 1982.
- Herbst DS, Miller JR - Nonspecific X-linked mental retardation II: the frequency in British Columbia. **Am J Med Genet** 7:461-9, 1980.
- Hershko A, Ciechanover A, Rose IA - Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from eukaryotes: a component that interacts with ATP. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76: 3107-10, 1979.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA - Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the

- polypeptide of ATP-dependent proteolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 77:1783-6, 1980.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A - Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **J Biol Chem** 258:8206-14, 1983.
- Hicke L, Dunn R - Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **Annu Rev Cell Dev Biol** 19:141-72, 2003.
- High, S., Flint, N., Dobberstein, B. Requirements for the membrane insertion of signal- anchor type proteins. **J Cell Biol** 113:25-3, 1991.
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S - RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. **Nature** 419:135-41, 2002.
- Hofmann RM, Pickart CM - *In vitro* assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. **J Biol Chem** 276: 27936-43, 2001.
- Holmberg CI, Staniszewski KE, Mensah KN, Matouschek A, Morimoto RI - Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. **EMBO J** 23:4307-18, 2004.
- Honda S, Orii KO, Kobayashi J, Hayashi S, Imamura A, Imoto I, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J - Novel deletion at Xq24 including the *UBE2A* gene in a patient with X-linked mental retardation. **J Hum Genet**, 2010.
- Howard RA, Sharma P, Hajjar C, Caldwell KA, Caldwell GA, du Breuil R, Moore R, Boyd L - Ubiquitin conjugating enzymes participate in polyglutamine protein aggregation. **BMC Cell Biol** 8:32, 2007.
- Huang DT, Paydar A, Zhuang M, Waddell MB, Holton JM, Schulman BA - Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. **Mol Cell** 17:341-50, 2005.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM - A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **EMBO J** 10:4129-35, 1991.
- Inlow JK, Restifo LL - Molecular and comparative genetics of mental retardation. **Genetics** 166:835-81, 2004.

- Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A - The DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. **Nature** 329:131-34, 1987.
- Jentsch S - The ubiquitin-conjugation system. **Annu Rev Genet** 26:179-207, 1992. Revisão.
- Jiang F, Basavappa R - Crystal structure of the cyclin-specific ubiquitin-conjugating enzyme from clam, E2-C, at 2.0 Å resolution. **Biochemistry** 38:6471-8, 1999.
- Jiang YH, Beaudet AL - Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. **Curr Opin Pediatr** 16:419-26, 2004.
- Joazeiro CA, Weissman AM - RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. **Cell** 102:549-52, 2000.
- Johanson AJ, Blizzard RM - A syndrome of congenital aplasia of the alae nasi, deafness, hypothyroidism, dwarfism, absent permanent teeth, and malabsorption. **J Pediatr** 79: 982-987, 1971.
- Kavakebi P, Hausott B, Tomasino A, Ingorokva S, Klimaschewski L - The N-end rule ubiquitin-conjugating enzyme, HR6B, is up-regulated by nerve growth factor and required for neurite outgrowth. **Mol Cell Neurosci** 29:559-68, 2005.
- Kim J, Guermah M, McGinty RK, Lee JS, Tang Z, Milne TA, Shilatifard A, Muir TW, Roeder RG - RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. **Cell** 137:459-71, 2009.
- Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, King RW, Gygi SP - Quantitative analysis of *in vitro* ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. **Nat Cell Biol** 8:700-10, 2006.
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J - *UBE3A/E6-AP* mutations cause Angelman syndrome. **Nat Genet** 15:70-3, 1997. Erratum in: **Nat Genet** 15:411 (1997).
- Kleefstra T, Hamel BC - X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. **Clin Genet** 67:451-67, 2005.
- Kloetzel PM - Antigen processing by the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2:179-87, 2001. Revisão.



- Köhler A, Bajorek M, Groll M, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D - The substrate translocation channel of the proteasome. **Biochimie** 83:325-32, 2001.
- Koken MH, Reynolds P, Jaspers-Dekker I, Prakash L, Prakash S, Bootsma D, Hoeijmakers JH - Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:8865-9, 1991.
- Koken MH, Smit EM, Jaspers-Dekker I, Oostra BA, Hagemmeijer A, Bootsma D, Hoeijmakers JH - Localization of two human homologs, *HHR6A* and *HHR6B*, of the yeast DNA repair gene *RAD6* to chromosomes Xq24-q25 and 5q23-q31. **Genomics** 12:447-53, 1992.
- Koken MH, Hoogerbrugge JW, Jasper-Dekker I, de Wit J, Willemsen R, Roest HP, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH - Expression of the ubiquitin-conjugating DNA repair enzymes *HHR6A* and *B* suggests a role in spermatogenesis and chromatin modification. **Dev Biol** 173:119-32, 1996.
- Lawrence C - The *RAD6* DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? **Bioessays** 16:253-8, 1994.
- Lee DH, Goldberg AL - Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends Cell Biol** 8:397-403, 1998. Revisão.
- Leggett, DS and Candido, PM - Biochemical characterization of *Caenorhabditis elegans* UBC-1: self-association and auto-ubiquitination of a *RAD6*-like ubiquitin-conjugating enzyme *in vitro*. **Biochem J.** 327, 357-61, 1997.
- Lehrke R - Theory of X-linkage of major intellectual traits. **Am J Ment Defic** 76:611-9, 1972.
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CA - Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. **PLoS One** 3:e1487, 2008.
- Liu Z, Haas AL, Diaz LA, Conrad CA and Giudice GJ - Characterization of a novel keratinocyte ubiquitin carrier protein. **J Biol Chem** 271, 2817-22, 1996.

- Lowe J, Mayer J, Landon M, Layfield R - Ubiquitin and the molecular pathology of neurodegenerative diseases. **Adv Exp Med Biol** 487:169-86, 2001.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ - Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. **J Pathol** 155:9-15, 1988.
- Lubs HA - A marker X chromosome. **Am J Hum Genet** 21:231-44, 1969.
- Lubs HA - The other side of the coin: a hypothesis concerning the importance of genes for high intelligence and evolution of the X chromosome. **Am J Med Genet** 85:206-8, 1999.
- Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD, Dutta A - UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. **Mol Cell** 23:589-96, 2006.
- Madura K, Prakash S, Prakash L - Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene *RAD6* that encodes a ubiquitin conjugating enzyme, increases in response to DNA damage and in meiosis but remains constant during the mitotic cell cycle. **Nucleic Acids Res** 18:771-8, 1990.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL - *De novo* truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. **Nat Genet** 15:74-7, 1997.
- Morrison A, Miller EJ, Prakash L - Domain structure and functional analysis of the carboxyl-terminal polyacidic sequence of the RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 8:1179-85, 1988.
- Muralidhar MG, Thomas JB - The *Drosophila bendless* gene encodes a neural protein related to ubiquitin-conjugating enzymes. **Neuron** 11:253-66, 1993.
- Muratani M, Tansey WP - How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4:192-201, 2003.
- Nascimento RMP - Mutação no gene *UBE2A*, codificador de enzima conjugadora de ubiquitina, causa nova síndrome de deficiência mental de herança ligada

- ao cromossomo X. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2005.
- Nascimento RMP, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM - *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet** 79:549-55, 2006.
- Navon A, Goldberg AL - Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. **Mol Cell** 8:1339-49, 2001.
- Obin M, Mesco E, Gong X, Haas AL, Joseph J, Taylor A - Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. **J Biol Chem** 274:11789-95, 1999.
- Opitz JM, Frias, JL, Gutenberger JE, Pellett JR. The G syndrome of multiple congenital anomalies. **Birth Defects Orig Art Ser** 2: 95-101, 1969.
- Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. **Hum Mol Genet** 12:1945-58, 2003.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP - A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. **Nat Biotechnol** 21:921-6, 2003.
- Penrose LS - A clinical and genetic study 1280 cases of mental retardation defect. **Special Report Series, Medical Research Council**, nº 229. Her Majesty's Stationary office, London, 1938.
- Petroski MD, Deshaies RJ - Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34. **Cell** 123:1107-20, 2005.
- Petroski MD, Zhou X, Dong G, Daniel-Issakani S, Payan DG, Huang J - Substratemo­dification with lysine 63-linked ubiquitin chains through the UBC13-UEV1A ubiquitin-conjugating enzyme. **J Biol Chem** 282:29936-45, 2007.

- Pickart CM - Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem** 70:503-33, 2001.
- Ptak C, Gwozd C, Huzil JT, Gwozd TJ, Garen G, Ellison MJ - Creation of a pluripotent ubiquitin-conjugating enzyme. **Mol Cell Biol** 21:6537-48, 2001.
- Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EL, Berger W, FeldmanGJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A - Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. **Nat Genet** 17:285-91, 1997.
- Rape M, Reddy SK, Kirschner MW - The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. **Cell** 124:89-103, 2006.
- Robzyk K, Recht J, Osley MA. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. **Science** 287:501-4, 2000.
- Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MH, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JT, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH - Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. **Cell** 86:799-810, 1996.
- Roest HP, Baarends WM, de Wit J, van Klaveren JW, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, van Cappellen WA, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA - The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. **Mol Cell Biol** 24:5485-95, 2004.
- Ropers HH, Hamel BC - X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 6:46-57, 2005.
- Ropers HH - Genetics of intellectual disability. **Curr Opin Genet Dev** 18:241-50, 2008.
- Sarcevic B, Mawson A, Baker RT, Sutherland RL - Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. **EMBO J** 21:2009-18, 2002.
- Schnell JD, Hicke L - Nontraditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **J Biol Chem** 278:35857-60, 2003.

- Schulman BA, Harper JW - Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol** 10:319-31, 2009. Revisão.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y - Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. **Ann Neurol** 45:668-72, 1999.
- Speese SD, Trotta N, Rodesch CK, Aravamudan B, Broadie K - The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. **Curr Biol** 13:899-910, 2003.
- Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D - A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. **Mol Cell Biol** 15:1265-73, 1995.
- Stevenson RE - Splitting and lumping in the nosology of XLMR. **Am J Med Genet** 97:174-82, 2000.
- Sullivan ML, Vierstra RD - Cloning of a 16-kDa ubiquitin carrier protein from wheat and *Arabidopsis thaliana*. Identification of functional domains by *in vitro* mutagenesis. **J Biol Chem** 266:23878-85, 1991.
- Sun ZW, Allis CD - Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. **Nature** 418:104-8, 2002.
- Sung P, Prakash S, Prakash L - Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. **Proc Natl Acad Sci USA** 87:2695-9, 1990.
- Sung, P, Prakash, L - Stable ester formation between the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein and ubiquitin has no biological activity. **J Mol Biol** 221:745-49, 1991.
- Sutherland GR - Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. **Science** 197:265-6, 1977.
- Swaminathan S, Amerik AY, Hochstrasser M - The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. **Mol Biol Cell** 10:2583-94, 1999.

- Tait SW, de Vries E, Maas C, Keller AM, D'Santos CS, Borst J - Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. **J Cell Biol** 179:1453-66, 2007.
- Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slauch R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M - Mutations in *CUL4B*, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. **Am J Hum Genet** 80:345-52, 2007.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubbridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41:535-43, 2009.

- Thomas JB, Wyman RJ - Mutations altering synaptic connectivity between identified neurons in *Drosophila*. **J Neurosci** 4:530-8, 1984.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM - Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. **EMBO J** 19: 94-102, 2000.
- Tong H, Hateboer G, Perrakis A, Bernards R, Sixma TK - Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. **J Biol Chem** 272:21381-7, 1997.
- Toniolo D - In search of the MRX genes. **Am J Med Genet** 97:221-7, 2000.
- Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S - *MID1*, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. **Nat Genet** 29:287-94, 2001.
- Turner G, Partington MW - Genes for intelligence on the X chromosome. **J Med Genet** 28:429, 1991.
- Varshavsky A - The N-end rule. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 60:461-78, 1995. Revisão.
- Verma R, Chi Y, Deshaies RJ - Cell-free ubiquitination of cell cycle regulators in budding yeast extracts. **Methods Enzymol** 283:366-76, 1997.
- Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W - 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. **J Struct Biol** 121:19-29, 1998.
- Wang X, Guerrero C, Kaiser P, Huang L - Proteomics of proteasome complexes and ubiquitinated proteins. **Expert Rev Proteomics** 4:649-65, 2007.
- Weissman AM - Themes and variations on ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2:169-78, 2001.
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL - Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. **J Biol Chem** 255:7529-32, 1980.
- Williams C, van den Berg M, Sprenger RR, Distel B - A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. **J Biol Chem** 282: 22534-43, 2007.

- Williamson A, Wickliffe KE, Mellone BG, Song L, Karpen GH, Rape M - Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106:18213-8, 2009.
- Windheim M, Peggie M, Cohen P - Two different classes of E2ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. **Biochem J** 409:723-9, 2008.
- Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S - The ubiquitination code: a signaling problem. **Cell Div** 2:11, 2007.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A - Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. **Mol Cell** 11:267-74, 2003.
- World Health Organization. The ICD-10 classification of neonatal and behavioral disorders - World Health Organization, Geneva, 1992.
- Worthylake DK, Prakash S, Prakash L, Hill CP - Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 at 2.6 Å resolution. **J Biol Chem** 273:6271-6, 1998.
- Xin H, Lin W, Sumanasekera W, Zhang Y, Wu X, Wang Z - The human RAD18 gene product interacts with HHR6A and HHR6B. **Nucleic Acids Res** 28:2847-54, 2000.
- Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J - Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. **Cell** 137:133-45, 2009.
- Ye Y, Rape M - Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. **Nat Rev Mol Cell Biol** 10:755-64, 2009. Revisão.
- Yin Q, Lin SC, Lamothe B, Lu M, Lo YC, Hura G, Zheng L, Rich RL, Campos AD, Myszka DG, Lenardo MJ, Darnay BG, Wu H - E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. **Nat Struct Mol Biol** 16:658-66, 2009.



- Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, Beier M, Hülkamp G, Guzman C, Rehder H, Beemer FA, Hamel B, Vanlieferinghen P, Gershoni-Baruch R, Vieira MW, Dumic M, Auslender R, Gil-da-Silva-Lopes VL, Steinlicht S, Rauh M, Shalev SA, Thiel C, Ekici AB, Winterpacht A, Kwon YT, Varshavsky A, Reis A - Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). **Nat Genet** 37:1345-50, 2005.
- Zoghbi HY, Gage FH, Choi DW - Neurobiology of disease. **Curr Opin Neurobiol** 10:655-60, 2000.
- Zou Y, Liu Q, Chen B, Zhang X, Guo C, Zhou H, Li J, Gao G, Guo Y, Yan C, Wei J, Shao C, Gong Y - Mutation in *CUL4B*, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. **Am J Hum Genet** 80:561-6, 2007.

### **Recursos de Internet**

*Ensembl* - <http://www.ensembl.org>

*Genatlas* - <http://www.genatlas.org>

*GGC - Greenwood Genetic Center* - <http://www.ggc.org/xlmr.htm>

*NCBI - National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

*OMIM - Online Mendelian Inheritance in man* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

**O GENE *UBE2A* E A DEFICIÊNCIA MENTAL**

## II.1 Introdução

---

A Deficiência Mental (DM) de herança ligada ao cromossomo X é uma das principais causas de DM herdada e afeta, em sua grande maioria, indivíduos do sexo masculino. As mulheres, com dois cromossomos X, são heterozigotas geralmente assintomáticas ou apresentam quadro de DM brando, cuja manifestação está relacionada com o padrão de inativação do cromossomo X.

São 91 os genes do cromossomo X relacionados à DM (*Greenwood Genetic Center* – <http://www.ggc.org/xlmr.htm>, abril, 2009). Entretanto, as mutações nesses genes explicam uma pequena parcela dos casos familiares de DM de herança ligada ao X e esporádicos, com exceção do gene *FMR1*, mutado em 2 - 2,5% dos casos esporádicos e em 25% dos casos familiares de DM. Estima-se, portanto, que 10% da DM em homens sejam devidos a herança monogênica ligada ao X. Dessa maneira, mutações em genes do cromossomo X explicariam apenas um terço do excesso de 30% de homens afetados por DM em relação às mulheres (Ropers & Hamel, 2005). A identificação de novos genes no cromossomo X responsáveis por quadros de DM e a caracterização de sua contribuição como causa de DM é, portanto, de grande importância.

Utilizando a técnica de mapeamento por exclusão, detectamos uma mutação *nonsense* no gene *UBE2A* (**Ubiquitin conjugating enzyme E2 A**) em uma família em que segregava uma nova síndrome de deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X (Nascimento e col., 2006). Dentre as características apresentadas pelos afetados, resumidas na Tabela II.1, destacam-se a DM grave com comprometimento significativo da fala, convulsões, hipoplasia genital, e hirsutismo generalizado de tronco e membros. As mães dos afetados, assintomáticas e portadoras obrigatórias, apresentavam desvio total de inativação do cromossomo X em linfócitos. A análise de 46 loci de microssatélites nos permitiu mapear a síndrome em um intervalo de 15 Mb em Xq24-25. A busca de genes candidatos nesse segmento revelou apenas o gene *UBE2A* como gene expresso simultaneamente em cérebro e linfócitos – o que explicaria o quadro de DM e também o desvio de inativação do cromossomo X nos linfócitos das mães

dos afetados. O sequenciamento da região codificadora de *UBE2A* revelou a mutação c.382C→T segregando com a doença. Essa mutação leva a um códon de parada prematura que elimina os últimos 25 aminoácidos da proteína UBE2A, que originalmente tem 152 (Q128X). Esta foi a primeira descrição de mutação no gene *UBE2A* e a primeira associação de uma enzima conjugadora de ubiquitina com patologia humana.

A ubiquitinação de proteínas é um processo de modificação pós-tradução que tem importante papel nos mais diversos processos celulares. A ligação covalente de uma ou mais moléculas de ubiquitina a determinadas proteínas resulta em modificações de localização, atividade, estrutura, estabilidade ou interações. Esse processo, detalhado no Capítulo I, requer a participação de pelo menos três tipos enzimas que recebem a denominação de E1, E2 e E3 (Figura I.2 - Cap. I). Resumidamente, a enzima do tipo E1 (enzima ativadora de ubiquitina) ativa a molécula de ubiquitina em uma reação dependente de ATP e em seguida a transfere para uma enzima do tipo E2 (enzima conjugadora de ubiquitina). Esta, por sua vez, com ou sem a participação direta de enzima do tipo E3 (ligase de ubiquitina), transfere a ubiquitina para um substrato específico. O destino mais conhecido de proteínas ubiquitinadas é a via de degradação proteossômica, embora a ubiquitinação também tenha funções independentes do proteassoma (revisão em Chen & Sun, 2009). Em humanos, apenas dois genes codificadores de E1 foram identificados (NCBI - *Nacional Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - novembro/2009) e se conhecem cerca de 40 enzimas do tipo E2 (Pickart, 2001). Análises do genoma humano apontam para a existência de mais de 600 genes codificadores de enzimas do tipo E3, a maioria não caracterizada bioquimicamente (Joazeiro & Weissman, 2000 e Li e col., 2008).

A identificação de mutações em genes da via de ubiquitinação como causa de síndromes de deficiência mental torna evidente sua importância para o neurodesenvolvimento. Mutações no gene *UBE3A*, codificador de uma ligase de ubiquitina (E3), foram descritas em 1997 como causa da síndrome de Angelman (Kishino e col., 1997; Matsuura e col., 1997). Posteriormente os genes *MID1*, *UBR1*, *UBE2A*, *CUL4B* e *HUWE1* foram também relacionados a quadros de DM (Quaderi

e col., 1997, Trockenbacher e col. 2001; Zenker e col., 2005, Nascimento e col., 2006, Tarpey e col., 2007, Zou e col., 2007 e Froyen e col., 2008). Ainda, variações em número de cópias de genes que codificam ligases de ubiquitina foram relacionadas com susceptibilidade ao autismo (Glessner e col., 2009).

Dentre esses genes, todos, exceto *UBE2A*, codificam ligases de ubiquitina (E3). *UBE2A*, por sua vez, codifica uma conjugase de ubiquitina, da classe de enzimas intermediárias no processo de ubiquitinação (Koken e col., 1991). As E2 têm como propriedade comum a formação de ligações tioéster com moléculas de ubiquitina, em um resíduo de cisteína conservado. Seu papel é reconhecer a E1, receber dela a ubiquitina ativada e com auxílio ou não de enzimas do tipo E3, transferi-la para substrato específico (revisão em Jenstch, 1987). São responsáveis pela escolha de qual resíduo de lisina do substrato receberá a ubiquitina ou qual resíduo de lisina da própria ubiquitina receberá a molécula de ubiquitina seguinte, determinando a topologia das cadeias de ubiquitina e a processividade da reação (revisão em Ye & Rape, 2009).

*UBE2A* é um dos homólogos humanos do gene *RAD6* de *Saccharomyces cerevisiae*. A elevada conservação dos ortólogos de *RAD6* permitiu a clonagem de dois homólogos humanos: *UBE2A* localizado no cromossomo X e *UBE2B*, localizado no cromossomo 5 (Koken e col., 1992). Essa duplicação parece comum aos mamíferos, havendo uma cópia sempre no cromossomo X. Os genes humanos *UBE2A* e *UBE2B* apresentam 80% de identidade de sequência entre as regiões codificadoras e codificam proteínas com 96% de identidade de aminoácidos.

Camundongos duplo-nocautes quanto aos genes *Ube2A* e *Ube2B* (fêmeas *Ube2A<sup>-/-</sup>/Ube2B<sup>-/-</sup>* e machos *Ube2A<sup>-Y</sup>/Ube2B<sup>-/-</sup>*) não são viáveis, indicando que as proteínas são cruciais para o desenvolvimento (Roest e col., 2004) e a presença de pelo menos um alelo ativo é imprescindível para a viabilidade dos camundongos: camundongos nocautes *Ube2A* ou nocautes *Ube2B* são viáveis, mas diferem pelo menos quanto ao aspecto reprodutivo. A esterilidade do camundongo macho é característica dos nocautes quanto ao gene *Ube2B* (*Ube2B<sup>-/-</sup>*) (Roest e col., 1996), mas os machos nocautes *Ube2A* (*Ube2A<sup>-Y</sup>*) são férteis (Roest e col., 2004). Em contraste, enquanto fêmeas nocautes quanto ao gene *Ube2B* são férteis (Roest e

col., 1996), aquelas nocautes quanto ao gene *Ube2A* (*Ube2A*<sup>-/-</sup>) não são capazes de gerar prole, embora seu processo de ovulação seja normal: a ausência da proteína UBE2A nos ovócitos parece impedir que o embrião se desenvolva além do estágio de duas células (Roest e col., 2004). Considerando que em espermátides os níveis de UBE2B são superiores aos níveis de UBE2A (Koken e col., 1996) e o oposto é observado em ovócitos (Roest e col., 2004), os fenótipos de infertilidade podem resultar de um efeito dependente de dose na linhagem germinativa. Entretanto, existem algumas evidências de diferenças funcionais entre UBE2A e UBE2B: apenas UBE2B é necessária para a poliubiquitinação da ciclofilina CYC4/hCyP-60 (Hatakeyama e col., 2001) e UBE2A, mas não UBE2B, interage com Rfp14 (*Ret finger protein-like 14*) em duplo-híbrido de leveduras (Suzumori e col., 2003). Como, no momento da publicação dos trabalhos que avaliaram os camundongos nocautes quanto aos genes *Ube2A* e *Ube2B*, não havia associação do gene *UBE2A* humano com a DM, a cognição dos animais não foi avaliada.

Informações obtidas em bancos de dados (NCBI, Ensembl - <http://www.ensembl.org>, Genatlas - <http://www.genatlas.org>) apontam para a existência de três transcritos alternativos para o gene *UBE2A* humano e apenas um, para *UBE2B*. Embora os três transcritos de *UBE2A* sejam classificados como codificadores, não há trabalho científico publicado sobre seus padrões de expressão nem sobre as proteínas codificadas pelos transcritos 2 e 3. O transcrito 1 de *UBE2A* codifica isoforma de 152 aminoácidos, altamente conservada cuja função de conjugase de ubiquitina já foi caracterizada (Koken e col., 1991). O transcrito 2 difere do transcrito 1 pela ausência de sequência correspondente ao éxon 4 do gene e codificaria uma proteína de 122 aminoácidos. O transcrito 3 tem início em uma 5' UTR (*Untranslated region*) alternativa localizada no íntron 3 do gene, correspondendo apenas aos éxons 4, 5 e 6 do gene. Codificaria uma proteína de 77 aminoácidos. A mutação que identificamos em *UBE2A* afeta os três transcritos. Em camundongos, apenas uma mensagem seria codificada por ambos os parálogos.

Mutações no gene *UBE2A* podem causar exclusivamente a síndrome por nós descrita (Nascimento e col., 2006). Entretanto, o quadro clínico pode estar

relacionado especificamente à mutação encontrada, podendo outras mutações nesse gene resultar em quadros distintos. Essa situação, em que diferentes mutações em um mesmo gene podem causar síndromes distintas ou DM não-sindrômica, é comum a vários genes relacionados a DM (Kleefstra & Hamel, 2004). As mutações no gene *ARX*, que codifica uma polimerase de DNA, ilustram bem essa situação. O gene está mutado em vários quadros síndrômicos: síndromes de West (MIM 308350) e de Partington (MIM 309510), epilepsia mioclônica ligada ao X (MIM 300432), lissencefalia associada a genitália ambígua (MIM 300215) e na síndrome de Proud (MIM 300004); também foi encontrado mutado em oito famílias com afetados por DM não-sindrômica (*Greenwood Genetic Center*, abril de 2010). Ainda, a ocorrência de quadro síndrômico associado à mutação que descrevemos em *UBE2A* pode decorrer (i) da não realização de funções exclusivas de *UBE2A* ou de suas isoformas; (ii) da insuficiência de dose das parálogas decorrente da ausência de *UBE2A*, de forma que *UBE2B* não conseguiria, sozinha, exercer funções comuns às parálogas ou (iii) por efeito tóxico decorrente da presença da(s) isoforma(s) mutada(s) de *UBE2A*.

Dessa maneira, a identificação de mutação no gene *UBE2A* como causa de DM requer investigação sobre a contribuição de suas mutações para a DM, bem como sobre o padrão de expressão dos seus transcritos alternativos e isoformas correspondentes e sobre o efeito da mutação nos processos de transcrição e tradução.

## II.2 Objetivos

---

Com o objetivo de determinar a importância de mutações de *UBE2A* como causa de DM, inicialmente (I) triamos mutações na região codificadora de *UBE2A* em famílias em que a DM de herança ligada ao cromossomo X fora previamente mapeada em intervalos que incluíam o gene *UBE2A* e em um caso isolado de DM síndrômica, em que ocorriam características clínicas semelhantes às aquelas apresentadas pelos portadores da mutação c.382C→T em *UBE2A*; (II) avaliamos o efeito da mutação c.382C→T na transcrição e na tradução em homem afetado e em

mulher portadora, (III) avaliamos a expressão dos transcritos do gene *UBE2A* humano e de camundongo e a presença das isoformas por eles codificadas em diferentes tecidos.

## II.3 Casuística, Materiais e Métodos

---

### II.3.1 Triagem de mutações no gene *UBE2A*

#### *Casuística*

Foram investigados, quanto a mutações no gene *UBE2A*, 24 indivíduos afetados por DM. Desses, 23 apresentavam DM familiar de herança ligada ao cromossomo X previamente mapeada em intervalos que incluíam o gene *UBE2A*. Uma dessas famílias foi averiguada no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo (LGH-IB/USP), coordenado pelo Dr. Paulo A. Otto e pela Dra. Angela M. Vianna-Morgante. A DM apresentada por membros dessa família era do tipo não síndrômica e foi mapeada em intervalo que incluía Xq24 pela Mestre Sarita Ascenço Reis, durante seu programa de mestrado, sob orientação da Dra. Angela M. Vianna-Morgante. As demais 22 famílias pertencem ao banco de amostras do Consórcio Europeu de Deficiência Mental (*European Mental Retardation Consortium - EURO-MRX*). Em quatro delas os afetados apresentavam quadro de deficiência mental síndrômica (*MRXS - Mental Retardation, X-linked, Syndromic*), em 17 famílias a DM era não síndrômica (*MRX - Mental Retardation, X-linked*) (Tabela II.1) e de uma delas, não tivemos informação quanto ao tipo de DM. Amostras de cerca de 50 µL de DNA de indivíduos afetados, em concentrações aproximadas de 50-100 ng/µL, nos foram enviadas pelo curador do banco, Dr. Arjan P. M. de Brouwer, do Departamento de Genética Humana do Centro Médico da Universidade de Radboud, em Nijmegen, Holanda.



O 24º indivíduo analisado era um caso isolado de DM proveniente da Espanha e faz parte da casuística do Dr. Neus Baena do Hospital Parc Touli, em Barcelona. A amostra de DNA nos foi enviada para triagem de mutação em *UBE2A*, pois a avaliação clínica revelou que o paciente compartilhava algumas características clínicas com os pacientes em que identificamos a mutação c.382C→T em *UBE2A* (Tabela II.2).

### ***Sequenciamento direto dos seis éxons e limites íntron-éxon do gene UBE2A***

Os seis éxons codificadores do gene *UBE2A*, assim como os limites íntron-éxon e as regiões 5' e 3' não traduzidas (5' e 3' UTR) foram analisados por sequenciamento direto (MegaBACE™ 1000; Amersham Bioscience, GE Healthcare) dos segmentos amplificados por PCR (*Polimerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase), a partir de iniciadores desenhados por nós, utilizando o programa *PRIMER3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). A especificidade dos oligonucleotídeos foi avaliada utilizando o programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região codificadora do gene *UBE2A* e o tamanho dos segmentos amplificados estão na Tabela II.3.

As reações de PCR foram realizadas a partir de cerca de 100 ng de DNA genômico, em volume final de reação de 25 µL, na presença de Tris 30 mM (pH 8,5), HEPES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM dos iniciadores *forward* e *reverse* e 1 unidade (U) de *Taq* polimerase. Para a amplificação dos fragmentos a partir dos pares de iniciadores *UBE2A-1* e *UBE2A-2*, foi acrescentado DMSO (10%) à reação e o programa consistiu em uma desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de 30 ciclos em que a temperatura inicial foi de 94° C por 1 min para a desnaturação, 60° C por 30 s para a hibridação dos iniciadores e 72° C por 1 min, para a extensão, seguida de extensão final a 72° C, por 10 min. Para os demais pares de iniciadores, o programa do termociclador, do tipo *touch-down*, consistiu em um período de 5 min de desnaturação inicial a 95°

C, seguido de uma primeira etapa em que o primeiro ciclo tinha como temperatura inicial 94° C por 1 min para a desnaturação, 69° C por 30 s para a hibridação dos iniciadores e 72° C por 1 min para a extensão, seguido de 13 ciclos em que a temperatura de hibridação diminuía 0,5° C por ciclo, até atingir a temperatura de 62° C. A segunda etapa consistiu de 16 ciclos com temperatura de desnaturação de 94° C, hibridação a 62° C e extensão a 72° C, seguidos de extensão final a 72° C por 10 min.

A amplificação dos segmentos de interesse foi verificada após eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (Tris-base 68 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0), utilizando o *Low DNA mass ladder (Invitrogen)*, como marcador de massa molecular.

Os produtos de amplificação foram purificados, utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band purification*, de acordo com o protocolo do fabricante (*Amersham Bioscience, GE Healthcare*).

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o protocolo do fabricante do sequenciador *MegaBACE™ 1000 (Amersham Bioscience, GE Healthcare)*, em volume final de reação de 10 µL, utilizando 30 ng do produto de PCR, 0,5 µM do iniciador correspondente e 4 µL de *DYEnamic™ET terminator sequencing premix (Amersham Bioscience, GE Healthcare)*. Para análise das sequências, utilizamos o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.2 (Hall, 1999).

Tabela II.1 Famílias do Consórcio Europeu de Deficiência Mental (*EURO-MRX Consortium*), cuja DM fora previamente mapeada em Xq24.

Família	Fenótipo	Características adicionais	Lod score máximo	Marcaadores delimitantes	Refs.
D004	MRX		1.20	DXS993-DXS8043	
D013	<b>MRX</b>		2.53	DXS1001-DXS1062	
L022	<b>MRX</b>		2.41	DXS178-HPRT	Gu e col., 1996
L025	MRX		1.50	DXS424-Xqter	Claes e col., 1996
L037	MRX		2.10	DXS8063-DXS1047	Claes e col., 1999
L048	MRX		1.30	DXS991-DXS1047	
N005	MRX		1.03	DXS424-DXS292	
N043	MRX		1.14	DXS8076-DXS1108	
N108	MRX		1.51	DXS1169-DXS8067	
P003	MRX		1.51	DSX1220-DXS1047	
P004	MRX		0.68	DXS1217-DXS1062	
T011	MRX		3.51	DXS135-DXS737	Raynaud e col., 2000
T013	MRX		2.23	DXS458-DXS737	Raynaud e col., 2000
T014	MRX		1.20	MAOB-DXS425	
T025	MRX		1.00	DXS1214-DXS1212	
T048	MRX		0.60	DXS993-DXS737	
T052	MRX		2.20	DXS990-DXS8057	
L056	MRXS	Paraplegia espástica, macrocefalia, hipotonia, atraso de desenvolvimento	2.18	DXS8054-DXS1001	
N032	MRXS	Hipotonia, ataxia e areflexia	6.97	DXS1231-DXS1001	
P014	MRXS	Microcefalia, epilepsia e atraso de desenvolvimento	0.60	DXS986-DXS1047	
T019	MRXS	Baixa estatura, microcefalia e dismorfismos faciais	2.96	DXS178-DXS292	Raynaud e col., 2000

Obs: Todas as famílias apresentam indivíduos do sexo masculino portadores de DM em pelo menos duas gerações;

MRXS e MRX correspondem, respectivamente, à DM síndrômica e não síndrômica.

Tabela II.2 Características clínicas associadas à DM nos pacientes portadores da mutação c.382C→T em *UBE2A* e no paciente espanhol da casuística do Dr. Neus Baena.

	Nascimento e col., 2006			Neus Baena e col., comunicação pessoal
	Paciente II-3	Paciente III-2	Paciente III-3	Paciente espanhol
Idade ao exame (anos)	46 7/12	19 11/12	5 4/12	24 8/12
Peso ao nascer (percentil)	50º	90º - 97º	> 97º	50º
Estatura (percentil)	< 3º	10º - 25º	10º	50º
Peso (percentil)	> 97º	90º	> 97º	50º
Perímetro cefálico (percentil)	>98º	>98º	50º	>98º
Redemoinhos	+	+	+	+
Face alargada	-	+	+	-
Hipoplasia do maciço médio da face	-	+	+	+
Sinófris	+	+	+	+
Fendas palpebrais voltadas para cima	+	+	+	-
Hipertelorismo ocular	-	+	-	-
Ponte nasal baixa	-	+	+	+
Pescoço curto e largo	+	+	+	-
Boca grande e lábios finos e comissuras voltadas para baixo	+	+	+	-
Implantação baixa de cabelos na nuca	+	+	+	-
Mamilos espaçados	+	+	+	+
Pênis pequeno	+	+	+	-
Pés pequenos, planos, com edema de dorso	+	+	+	+
Onicodistrofia*	+	+	-	-
Aparência mixedematóide	+	+	+	-
Hirsutismo generalizado	+	+	+	+
Pele seca	+	+	+	-
Convulsões	+	+	+	+
Comprometimento grave da fala	+	+ (ausência de fala)	+ (ausência de fala)	+ (ausência de fala)
Substância branca hipodensa**	não examinado	+	+	não examinado

\*após a puberdade, \*\*IRM de cérebro

Tabela II.3 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação do gene *UBE2A*: nome, sequência de bases, temperatura de hibridação e tamanho do segmento amplificado

Pares de Iniciadores	Sequência de bases 5'→3'	Temperatura de hibridação	Tamanho do segmento amplificado	Região correspondente
UBE2A 1-F	CGTGGGGCTTTAATGACATA	58,5°C	482pb	5'UTR e éxon 1
UBE2A 1-R	AACCTTCGGGAAGACAGACA	59,7°C		
UBE2A 2-F	CATGCGGGACTTCAAGAGGT	62,5°C	337pb	éxon 2
UBE2A 2-R	CCAAACATTTTCCCCTACCC	60,4°C		
UBE2A 3-F	CCGGGACATCCATTGTAGT	59,7°C	264pb	éxon 3
UBE2A 3-R	CAGAGGCAGGTCCTAAGCA	60,5°C		
UBE2A 4-F	CCTCTCTACCCTGTATCTTTGCA	60,0°C	280pb	éxon 4
UBE2A 4-R	GGCACCACAAAATACACAGGA	60,8°C		
UBE2A 5-F	TGGGAAGCAACATAGGAATCTT	60,0°C	392pb	éxon 5
UBE2A 5-R	AGGTGTGAGCGACTGTACCC	60,2°C		
UBE2A 6-F	TGTTTTGCATTAAGGAACTGACA	59,7°C	238pb	éxon 6 e parte da 3' UTR
UBE2A 6-R	GGGAGGTGACAAACACATCA	59,4°C		
UBE2A 7-F	TGTTTTGCATTAAGGAACTGACA	59,7 °C	567pb	parte da 3'UTR
UBE2A 7-R	CCAGCCAGGATGAAACACTT	60,1 °C		
UBE2A 8-F	CCTACCCCTTCTACCCTCTCC	60,3 °C	596pb	parte da 3'UTR
UBE2A 8-R	TCACGATTGTTCCATTCTC	59,9 °C		
UBE2A 9-F	CTCTCTTTGCAAGCTGCTGA	59,6°C	621pb	parte da 3'UTR
UBE2A 9-R	TGAGATCCCAATAAGAAACCAA	58,6°C		

### II.3.2 Avaliação da expressão dos transcritos de *UBE2A* em humanos

#### II.3.2.1 Avaliação do efeito da mutação c.382C→T sobre a transcrição de *UBE2A*: amostras, extração de RNA e síntese de cDNA

##### *Amostras de sangue periférico*

Para avaliação do efeito da mutação c.382C→T do gene *UBE2A* em sua transcrição, foram coletadas, em tubo contendo EDTA, amostras de sangue periférico de um indivíduo afetado (III-2; Figura II.1) e de sua mãe (II-2), portadores da mutação do gene *UBE2A*. Amostras de cDNA foram obtidas após extração do RNA total de leucócitos, utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen*), conforme protocolo do fabricante, seguida por reação de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction - SuperScript II reverse transcriptase - Invitrogen*). Os termos de consentimento livre e esclarecido referente à utilização das amostras de II-2 e III-2 foram assinados por II-2, mãe e responsável legal por

III-2. O projeto tem autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 047/2006).

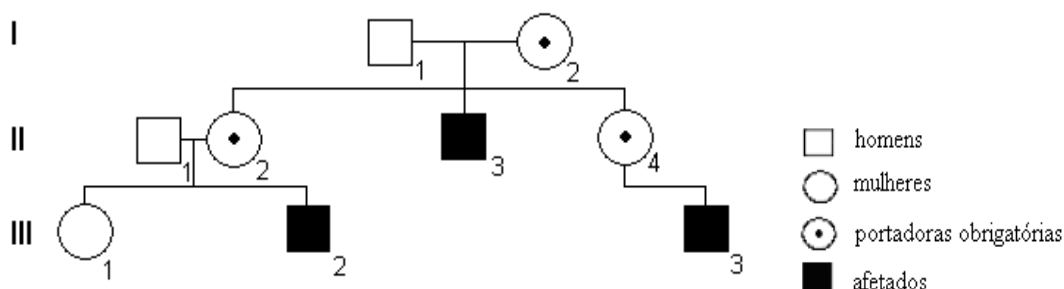


Figura II.1 Genealogia da família em que segrega a mutação c.382C→T no gene *UBE2A*

#### *Estabelecimento de cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene UBE2A*

Amostra de tecido adiposo do indivíduo afetado III-2, portador da mutação c.382C→T no gene *UBE2A*, foi coletada durante cirurgia para retirada de vesícula. A mãe do paciente nos informou a data e hora da cirurgia e a Dra. Luciana Amaral Haddad, médica e docente do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva- IB-USP, foi até o local da cirurgia para receber e transportar a amostra. Os experimentos com pré-adipócitos tiveram a colaboração da Doutoranda Natássia Vieira, aluna de pós-graduação do IB-USP, sob orientação da Profa Dra Mayana Zatz, que investiga a capacidade de diferenciação de células multipotentes derivadas de amostras de tecido adiposo humano e de animais em células musculares.

A amostra controle faz parte da casuística da doutoranda Natássia Vieira e consiste de tecido adiposo de indivíduo do sexo masculino submetido a cirurgia de lipoaspiração, que concordou em fornecer a amostra, assinando termo de consentimento esclarecido para a realização das pesquisas. O projeto é

desenvolvido de acordo com parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências - USP (Processo nº 040/2005).

A amostra de tecido adiposo de III-2 foi processada conforme descrito por Zuk e col. (2001). Cerca de 30 mg de tecido adiposo foram lavados repetidas vezes com PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline solution*) para a remoção de células vermelhas do sangue. Em seguida a matriz extracelular foi digerida com solução de colagenase 0,075%, por 30 min a 37° C. A enzima foi, então, inativada com 10% de soro fetal bovino e as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em meio de cultura completo: DMEM -*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco BRL); soro bovino fetal (10%) e penicilina/estreptomicina (1%) . As células foram semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37° C em atmosfera com 5% de dióxido de carbono. Após 48 h, a monocamada de células foi lavada com PBS 1X e as células não aderentes foram descartadas. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Ao atingirem confluência quase total, procedeu-se a sub-cultura: as células foram descoladas das garrafas por digestão com tripsina (*TripLE Express - Invitrogen*), ressemeadas na concentração 5000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas a 37° C em atmosfera com 5% de dióxido de carbono. A cada passagem, parte das células foi congelada em meio contendo DMSO (10%), soro fetal bovino (80%) e DMEM (10%).

Amostras de cDNA foram obtidas das células de pré-adipócitos do indivíduo III-2 e de indivíduo controle: as células (passagem 1) foram semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM (Gibco BRL) - acrescido de soro bovino fetal (10%) e penicilina/estreptomicina (1%) e incubadas a 37° C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono e cultivadas até atingirem confluência quase total. Após digestão com tripsina (*TripLE Express - Invitrogen*) por 5 min a 37° C, e neutralização da ação da tripsina pela adição de 1 mL do meio de cultura completo, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, lavadas com PBS 1X e novamente centrifugadas. O *pellet* de células foi processado para extração do RNA total, utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen*), conforme protocolo do fabricante, seguida por reação de RT-PCR (*SuperScript II reverse transcriptase - Invitrogen*).

### **II.3.2.2 Avaliação da expressão dos transcritos de *UBE2A* em indivíduos normais: amostras, extração de RNA e síntese de cDNA**

Amostras de leucócitos foram obtidas após coleta de 4 mL de sangue periférico, em tubo com EDTA, de quatro indivíduos voluntários, sendo dois homens e duas mulheres. A extração de RNA e a obtenção de cDNA seguiram os protocolos acima descritos.

Amostras de cDNA de placenta humana foram gentilmente cedidas pela Dra Lygia da Veiga Pereira Carramaschi, docente do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva- IB/USP. A extração de RNA e a síntese de cDNA foram realizadas pela pós-graduanda Joana Mello, como descrito em sua Dissertação de Mestrado (Mello, 2010). A utilização dessas amostras tem autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP (Protocolo 039/2006).

Amostras de cDNA de córtex frontal e hipocampo de cérebro humano nos foram cedidas pela Dra Lea Grinberg, coordenadora do Banco de Cérebros da Faculdade de Medicina da USP.

### **II.3.2.3 Amplificação dos transcritos correspondentes ao gene *UBE2A* humano**

A amplificação dos transcritos do gene *UBE2A* foi realizada por PCR a partir de iniciadores específicos desenhados por nós, utilizando o programa *PRIMER3*. São capazes de amplificar segmentos do cDNA correspondentes aos transcritos de *UBE2A* (Tabela II.4). A partir do cDNA correspondente ao transcrito 1 do gene *UBE2A* (NCBI: NM\_003336), o par de iniciadores *UBE2A*-cDNA1,2-F e *UBE2A*-cDNA-R amplifica um fragmento de 399 pb. O mesmo par de iniciadores, na presença do cDNA correspondente ao transcrito 2 (NM\_181762) permite amplificar um fragmento de 309pb. Para a amplificação do cDNA correspondente ao transcrito 3 (NM\_181777), que compreende apenas os éxons 4, 5 e 6 do gene, foi utilizado um iniciador específico, complementar ao íntron 3 do gene *UBE2A*, 5'



UTR alternativa usada por esse transcrito (par de iniciadores UBE2A-cDNA 3 F e UBE2A-cDNA R). Na presença do cDNA correspondente ao transcrito 3, é amplificado um fragmento de 499 pb. As características dos três transcritos estão resumidas na Figura II.2.

As reações de amplificação por PCR partiram de 40 ng de cDNA em volume final de reação de 25  $\mu$ L, na presença de Tris 30 mM (pH 8,5), KCl 10 mM, HEPES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de iniciadores *forward* e *reverse* e 1 U de *Taq* polimerase. O programa do termociclador consistiu em uma *PCR* do tipo *touch-down*: desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de uma primeira etapa em que o primeiro ciclo tinha temperatura inicial de 94° C por 1 min para desnaturação, 67° C por 30 s para a hibridação dos iniciadores e 72° C para a extensão, seguido de 13 ciclos em que a temperatura de hibridação diminuía 0,5° C por ciclo, até atingir a temperatura de 60° C. A segunda etapa consistiu em 16 ciclos, com temperatura de desnaturação de 94° C, hibridação a 60° C e extensão a 72° C, seguidos de extensão final a 72° C por 10 min. Para análise dos resultados, os produtos de *PCR* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e sequenciamento direto, para a confirmação dos resultados.

Tabela II.4 Pares de iniciadores utilizados para amplificação de parte dos transcritos do gene *UBE2A*.

Transcritos De <i>UBE2A</i>	Pares de iniciadores	Sequência de bases 5' → 3'	Segmento de cDNA amplificado
1 e 2	UBE2A-cDNA1e2-F UBE2A-cDNA-R	AACCCGAGACCCAGTCTAT GGATTGGGTTTCATCCAACAG	399pb e 309pb
3	UBE2A-cDNA3-F UBE2A-cDNA-R	GGCCCAGTTTCTTAAGGATGTT GGATTGGGTTTCATCCAACAG	499pb

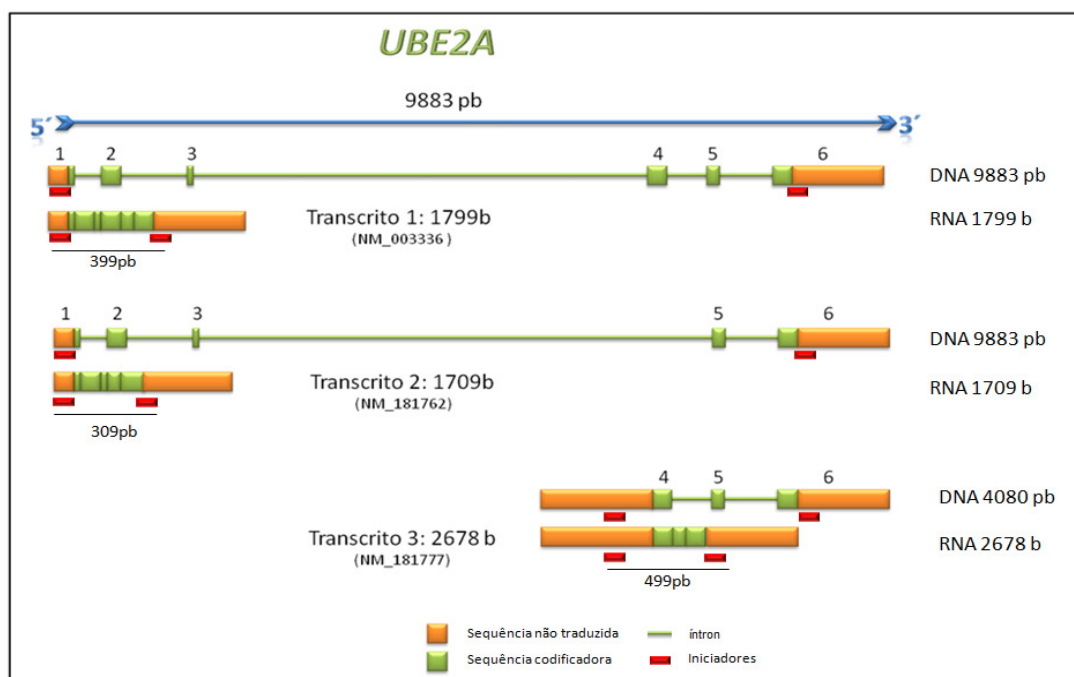


Figura II.2 Representação das características dos três transcritos do gene *UBE2A* (modificada de *NCBI*) e dos segmentos amplificados a partir dos iniciadores mostrados na Tabela II.4.

#### II.3.2.4 Avaliação da expressão dos alelos do gene *UBE2A* em portadora obrigatória da mutação c.382C→T

As mulheres portadoras da mutação c.382C→T em *UBE2A* apresentaram desvio total de inativação do cromossomo X, como demonstramos anteriormente (Nascimento e col., 2006) com base na metilação dos alelos do gene *AR* (Allen e col., 2002). Para verificar qual alelo de *UBE2A* está sendo expresso, utilizamos amostras de cDNA de uma das portadoras e de um dos afetados. As regiões codificadoras completas dos transcritos 1 e 2 foram amplificadas simultaneamente utilizando os iniciadores *UBE2A*-cDNA-F (5'-AACCCGAGACCCAGTCTAT-3') e *UBE2A*-6R (5'-GGGAGGTGACAAACACATCA-3'). Os fragmentos resultantes tinham, respectivamente, 570 pb e 480 pb. Os produtos da *PCR* foram separados por eletroforese em agarose *low melting* 2% e extraídos do gel, utilizando o *GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (Amersham Bioscience, GE Healthcare). Os fragmentos

correspondentes ao transcrito 1 das amostras foram, então, digeridos com a enzima de restrição *PvuII* (Biolabs) de acordo com protocolo do fabricante. A mutação c.382C→T elimina o sítio de restrição dessa enzima.

### **II.3.3 Investigação da presença de transcritos alternativos de *Ube2a* em camundongos**

#### **II.3.3.1 Camundongos SWISS: amostras de cDNA de tecidos embrionários e adultos**

As amostras de cDNA de tecidos embrionários e adultos de camundongo da linhagem SWISS nos foram cedidas pela Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi. A extração de RNA e síntese de cDNA foram realizadas pela pós-graduanda Ana Maria Fraga (Fraga, 2008). A utilização dessas amostras tem autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Biociências da USP (protocolo CEA/IBUSP 020/2004).

#### **II.3.3.2 Camundongos nocautes quanto ao gene *Ube2A*: amostras, extração de RNA e síntese de cDNA**

Em visita ao Laboratório de Ubiquitinação e Modificações Epigenéticas, do Departamento de Reprodução e Desenvolvimento do Centro Médico da Universidade Erasmus, em Rotterdam, Holanda (*Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands*) e em colaboração com a Dra. Willy Baarends, responsável pela linhagem de camundongos nocautes quanto ao gene *Ube2A*, pude coletar amostras de tecidos de dois camundongos machos e duas fêmeas selvagens, dois machos e duas fêmeas nocautes quanto ao gene *Ube2A* e três fêmeas heterozigotas. Os tecidos coletados foram: cérebro, rim, pulmão, baço, fígado, coração, ovários e testículos. O cDNA foi obtido após extração do RNA total, utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen*), conforme protocolo do fabricante, seguida de RT-PCR (*SuperScript II reverse transcriptase - Invitrogen*).

### II.3.3.3 Amplificação dos transcritos correspondentes ao gene *Ube2A*

Para a amplificação dos transcritos correspondentes ao gene *Ube2A* de camundongos, elaboramos experimento semelhante ao realizado para a detecção dos diferentes transcritos de humanos. Iniciadores específicos para o gene *Ube2A* (MouseUbe2A-V1-F e MouseUbe2A-R; Tabela II.5) foram desenhados para a amplificação do transcrito 1 (NM\_019668.3) e simultaneamente, do transcrito correspondente ao transcrito 2 humano, se presente, resultando, respectivamente, em fragmentos de 528 pb e 438 pb . Para a amplificação de transcrito correspondente ao transcrito 3 humano, também não descrito em murinos, foi utilizado iniciador *forward* complementar ao íntron 3 do gene e o mesmo iniciador *reverse* da reação anterior (MouseUbe2A-V3-F e MouseUbe2A-V-R;Tabela II.5). A reação de *PCR* e o programa utilizado no termociclador foram os mesmos utilizados para a amplificação dos transcritos humanos (II.3.2.3). Os produtos das reações de *PCR* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e também sequenciados, para a validação dos resultados.

Tabela II.5 Pares de iniciadores utilizados para amplificação de parte dos transcritos do gene *Ube2a* de camundongos

Transcritos de <i>UBE2A</i>	Pares de Iniciadores	Sequência de bases 5'→3'	Segmento de cDNA amplificado
1 e 2	MouseUbe2A-V1-F MouseUbe2A-R	CTGGTATATGCCCCGACTGCT TTATGGCCAGCCTCTTCTTC	528pb e 438pb
3	MouseUbe2A-V3-F: MouseUbe2A-R:	TTCTCCCCTTCTTACCTCCA TTATGGCCAGCCTCTTCTTC	363pb

### II.3.4 Avaliação da presença das isoformas correspondentes aos transcritos do gene *UBE2A*

#### *Extração de proteínas células humanas*

Leucócitos de sangue periférico foram isolados após duas centrifugações. A primeira delas a 1000 rpm por 10 min, para sedimentação das hemácias e separação do soro. O soro foi transferido para novo tubo e centrifugado a 2000 rpm também por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos foi processado em seguida para a extração de proteína ou congelado (-20° C).

Células de pré-adipócitos do indivíduo III-2 e de indivíduo controle foram semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> nas condições acima descritas (II.3.2). Após digestão com tripsina (*TripLE Express - Invitrogen*) por 5 min a 37° C e neutralização da ação da tripsina pela adição de 1 mL do meio de cultura completo, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, lavadas com PBS 1X e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos foi processado em seguida para a extração de proteína ou congelado.

Para obtenção do extrato protéico, o *pellet* de células (de leucócitos ou pré adipócitos) foi ressuscitado em 400 µl de tampão de lise (HEPES 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 0,5% e PMSF 1 mM), mantendo-se a temperatura ambiente por 5 min. A lise das células foi auxiliada mecanicamente, utilizando-se seringa de insulina. As amostras foram mantidas em gelo por 20 min e em seguida centrifugadas a 13000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e congelado (-80°C).

#### *Extração de proteínas de tecidos de camundongo*

A extração de proteínas de testículo, coração, baço, rim e fígado seguiu protocolo estabelecido no Laboratório de Ubiquitinação e Modificações Epigenéticas, do Departamento de Reprodução e Desenvolvimento do Centro Médico da Universidade Erasmus, em Rotterdam, Holanda. Em resumo, um

fragmento de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> do tecido foi imerso em 1 mL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH7,4, NaCl 100 mM, Nonidet P-40 0,5%, PMSF 1 mM). Para extrato protéico de tecido cerebral, um hemisfério foi imerso em 3 mL de tampão de extração. As amostras foram, então, maceradas mecanicamente dez vezes e sonicadas (velocidade baixa) por 30 s em câmara fria, seguindo-se 30 min de centrifugação a 13000 rpm a 4°C. O sobrenadante contendo o extrato protéico foi transferido para novo tubo e congelado a -80°C

### II.3.5 Western Blotting

Os extratos protéicos foram quantificados em espectrofotômetro (OD<sub>595nm</sub>), utilizando curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA (*bovine serum albumin*) em Bradford (*Biorad*) para o cálculo das concentrações. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 min na presença de agente redutor (DTT 10 mM) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 14% (SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-acrylamide gel electrophoresis*), a 140 volts por 1 h. As amostras foram, então, transferidas para membrana de nitrocelulose nas seguintes condições: 30 Volts por 1 h 30 min, em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 30 mM, pH 9.4 e metanol 20% (v/v). A transferência das proteínas para a membrana foi confirmada por coloração com *Ponceau Red*. A membrana foi incubada por uma hora em tampão de bloqueio [TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) 1X, 0,1% Tween-20 com 5% peso/volume de leite em pó desnatado]. Após três lavagens de 15 min com TBS/T (TBS1X, Tween-20 0,1%), a membrana foi incubada com o anticorpo primário na diluição indicada pelo fabricante do anticorpo, por 16 h a 4°C. No dia seguinte, após três lavagens de 15 min com TBS/T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário por 1 h e a detecção foi realizada de acordo com protocolo do kit utilizado (*Amersham ECL™ Western Blotting System, Amersham Bioscience, GE Healthcare*). As membranas foram escaneadas, utilizando o scanner STORM™ (*GE Healthcare*), para a visualização da fluorescência.

### **II.3.6 Anticorpos utilizados**

#### ***Anti-RAD6 (Abcam)***

Anti-RAD6 é um anticorpo policlonal obtido após imunização de coelhos com peptídeo sintético conjugado a KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*), derivado dos resíduos de aminoácidos 1 a 100 da proteína humana ortóloga de RAD6. A empresa não informa de qual das parálogas humanas se trata (UBE2A ou UBE2B).

#### ***Anti-RAD6 (Erasmus MC lab)***

Anti-RAD6 foi produzido no Centro Médico da Universidade Erasmus em Rotterdam, Holanda. É um anticorpo policlonal obtido após imunização de coelhos com a porção N-terminal de Ube2A murina.

#### ***Anti-RAD6B específico (Erasmus MC lab)***

Anti-RAD6B específico foi produzido no Centro Médico da Universidade Erasmus em Rotterdam, Holanda. É um anticorpo monoclonal capaz de detectar apenas UBE2B. Foi obtido após imunização de coelhos com a porção C-terminal de Ube2B (EKRVSAIVEQSWNDS).

#### ***Anti-PCNA (Erasmus MC lab)***

Anti-PCNA foi produzido no Centro Médico da Universidade Erasmus em Rotterdam, Holanda. Não foram fornecidas informações sobre o procedimento de imunização e obtenção do anticorpo.

### *Anti- $\beta$ -Actina (Abcam)*

O anticorpo anti- $\beta$ -Actina produzido em camundongos foi utilizado como controle endógeno.

## **II.4 Resultados**

---

### **II.4.1 Triagem de mutações no gene *UBE2A***

A amplificação por *PCR* seguida de sequenciamento dos seis éxons, limites íntron-éxon e das regiões 5'e 3' UTR do gene *UBE2A* não revelou alteração nas amostras analisadas dos 24 pacientes. Dessa maneira concluímos que o gene *UBE2A* não constitui causa frequente de DM, considerando-se que a amostra analisada foi previamente selecionada com base no mapeamento da DM no cromossomo X.

A mutação responsável pelo quadro de DM na família averiguada em nosso laboratório foi, posteriormente, identificada no gene *ACSL4* (*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) (Reis, 2009), localizado em Xq24 e previamente descrito como causa de DM (Piccini e col., 1998; Vitelli e col.,1999; Vitelli e col., 2000; Meloni e col., 2002 e Longo e col., 2003).

### **II.4.2 Avaliação do efeito da mutação c.382C→T na transcrição e na tradução**

#### **II.4.2.1 Expressão dos transcritos em diferentes tecidos humanos**

Os três transcritos correspondentes ao gene *UBE2A* foram amplificados a partir das amostras de cDNA de leucócitos, pré-adipócitos, hipocampo, córtex e placenta (Figura II.3, A). Os produtos de *PCR* foram sequenciados para confirmar que se tratavam dos transcritos de *UBE2A*.



Todos os três transcritos de *UBE2A* foram detectados nas amostras analisadas, inclusive nas células do paciente portador da mutação c.382C→T. Sabe-se que a presença de um códon de parada prematura faz com que mRNA transcrito de genes mutantes seja geralmente degradado pelo mecanismo denominado *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD - decaimento do RNA mensageiro mediado por mutação *nonsense*), impedindo, assim, que proteínas truncadas sejam sintetizadas. Em células de mamíferos esse mecanismo é ativado quando o códon de parada prematura encontra-se a 55 ou mais nucleotídeos acima de uma região de junção entre dois éxons (Maquat, 2002). Essas junções são marcadas por complexos moleculares denominados EJC (*Exon junction complex*). O códon de parada normal da proteína, ou seja, o códon correto, não apresenta uma EJC localizada a seguir, uma vez que se encontra no último éxon do gene (Ishigaki e col., 2001). A presença de uma EJC após um códon de parada, indica que ele está erroneamente posicionado, sendo esse mRNA degradado por NMD (Le Hir e col., 2000). Dessa maneira, mutações no último éxon em geral não resultam em degradação do RNA. A mutação c.382C→T encontrada no gene *UBE2A* encontra-se no último éxon do gene e, portanto, não é seguida de EJC. Confirmada a presença do RNA, espera-se que a proteína mutada seja sintetizada.

Dados de *Northern blotting* de *UBE2A* previamente publicados evidenciaram apenas o transcrito 1, embora a sonda utilizada fosse complementar a todos os transcritos (Koken e col., 1991). Um tempo de exposição prolongado poderia ter revelado a existência dos transcritos alternativos. Entretanto, como no momento da publicação não havia indicações da existência desses transcritos, os autores podem ter interpretado as bandas correspondentes como inespecíficas. Nossos experimentos de RT-PCR indicam que o transcrito 1 parece ser o principal transcrito de *UBE2A*. Sua amplificação é preferencial ao menos em cérebro: ambos os transcritos 1 e 2 são amplificados na mesma reação de PCR, porém podemos observar que após 25 e 30 ciclos, a banda correspondente ao transcrito 2 apresenta intensidade inferior quando comparada com a banda correspondente ao transcrito 1 (Figura II.3 B). Em reações de PCR os alelos menores podem apresentar

amplificação preferencial, entretanto, neste caso, ocorre a amplificação preferencial do maior segmento.

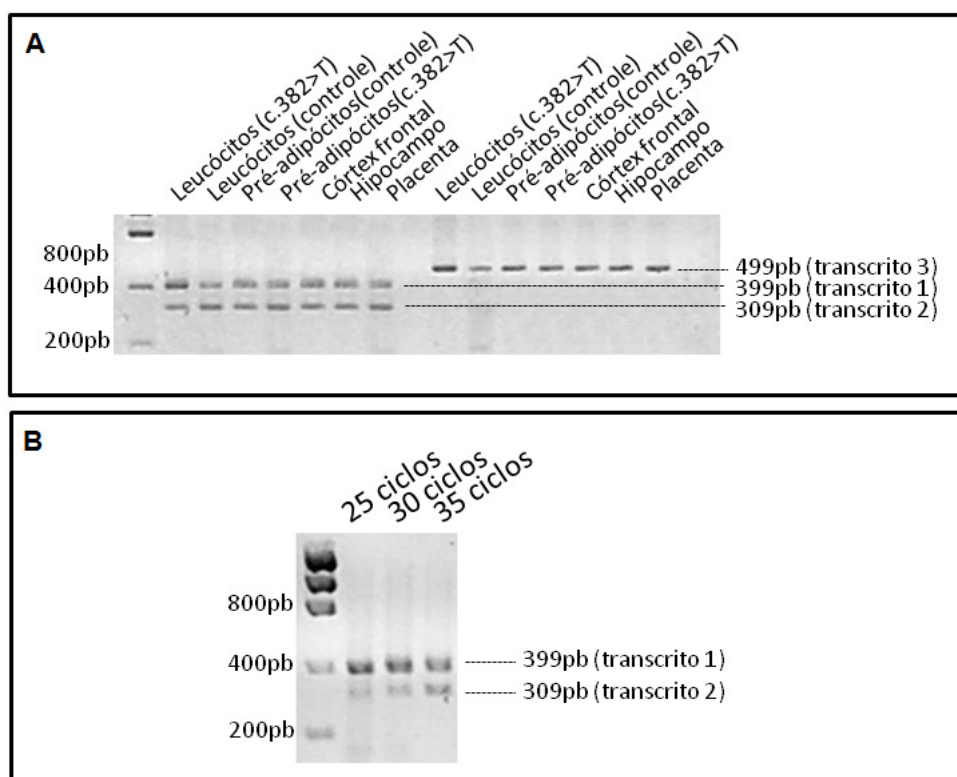


Figura II.3 A, os produtos da amplificação de fragmento correspondentes aos transcritos do gene *UBE2A* a partir de amostras de cDNA de diferentes tecidos humanos. Transcritos 1 e 2, bandas de 399 pb e 309 pb; transcrito 3, banda de 499 pb. B, transcritos 1 e 2 do gene *UBE2A* de córtex cerebral, após 25, 30 e 35 ciclos de amplificação.

#### II.4.2.2 Avaliação da presença das isoformas de *UBE2A* em amostras de leucócitos e de cultura de células precursoras de tecido adiposo de indivíduo controle e de afetado pela síndrome

Após a confirmação da presença dos três transcritos de *UBE2A*, avaliamos a presença das proteínas por eles codificadas em amostra de leucócitos e em cultura de pré-adipócitos do paciente III-2 (Figura II.1) e de indivíduo controle do sexo masculino. Utilizamos a técnica de *Western blotting*, com o anticorpo Anti-RAD6 (*Abcam*). Os resultados estão apresentados na Figura II.4. Na amostra controle, observamos uma banda de 17 kDa correspondente a *UBE2A* e *UBE2B*: a elevada

identidade de aminoácidos (96%) e o mesmo peso molecular tornam as parálogas indistinguíveis. Já na amostra do paciente, seria possível diferenciá-las, já que UBE2A/Q128X tem 15 kDa. Ao comparamos as bandas de 17 kDa da amostra do paciente e do controle, observamos que na amostra controle a banda é mais intensa. Essa diferença de intensidade, mais evidente nos extratos protéicos de leucócitos, é provavelmente consequência da ausência da isoforma normal de UBE2A na amostra do paciente. Entretanto, a banda de 15 kDa correspondente à proteína UBE2A/Q128X não foi visualizada no extrato de leucócitos. No extrato protéico de cultura de pré-adipócitos, a diferença de intensidade entre as bandas de 17 kDa da amostra controle e da amostra do paciente é menos evidente. Porém uma pequena quantidade da proteína de 15 kDa é observada. Variações nos parâmetros de detecção do scanner STORM™ (aumento do tempo de exposição) resultaram em melhor visualização da banda de 15 kDa.

A diferença de intensidade entre as bandas de 15 e 17 kDa observada na amostra do paciente pode ser resultado de um padrão de expressão específico do tecido analisado, em que UBE2B predominaria em quantidade. A amostra controle não nos permite diferenciar a intensidade das bandas referentes à UBE2A e UBE2B por estarem sobrepostas. Entretanto, análises indiretas constantes em bancos de dados de expressão revelam que a quantidade de transcritos de ambas as proteínas é similar em tecido adiposo (cerca de 76 transcritos/milhão para ambas - NCBI) e sangue (UBE2A com 88 transcritos/milhão e UBE2B com 72 transcritos/milhão - NCBI), enquanto para outros tecidos, como cordão umbilical e placenta, a quantidade de transcritos do gene é variável. Os dados disponíveis mostram que em cérebro, a expressão de UBE2A predomina (Tabela II.6).

A observação de que o RNA de *UBE2A* contendo a mutação *nonsense* não é degradado por NMD e que, mesmo assim, a proteína por ele codificada encontra-se em concentração inferior à esperada em células de tecido adiposo e sangue, sugerem que a proteína UBE2A/Q128X seja sintetizada com menor eficiência ou que seja degradada. Entretanto, temos que levar em consideração a possibilidade de esse resultado ser artefato de técnica, ou seja, do anticorpo utilizado apresentar menor afinidade pela proteína mutada.

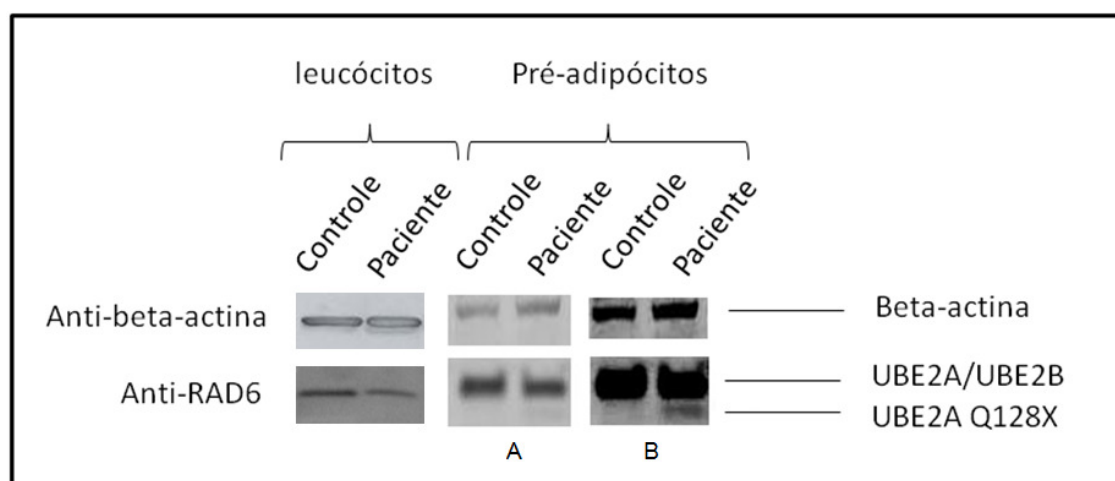


Figura II.4 *Western blotting* anti-RAD6 dos extratos protéicos de leucócitos e de pré-adipócitos cultivados, de indivíduo controle e do paciente portador da mutação c.382C→T de *UBE2A*. A banda mais intensa de 17 kDa corresponde a *UBE2A* e/ou *UBE2B*. A banda de 15 kDa corresponde à proteína *UBE2A/Q128X*; sua visualização só é claramente evidente após aumento da sensibilidade de detecção do scanner STORM™ (mesma membrana em A e B).

Tabela II.6 Quantidade média de transcritos de *UBE2A* e *UBE2B* em diferentes tecidos humanos, segundo NCBI. As estimativas são baseadas em bibliotecas de cDNA depositadas em diversos bancos de dados.

	Transcritos de <i>UBE2A</i> / milhão	Transcritos de <i>UBE2B</i> / milhão
<b>Tecido Adiposo</b>	76	76
<b>Tecido Muscular</b>	64	73
<b>Cérebro</b>	86	54
<b>Osso</b>	139	195
<b>Cordão umbilical</b>	363	0
<b>Placenta</b>	186	84
<b>Sangue</b>	88	72

Não foram observadas as bandas de 14 kDa e 8 kDa correspondentes às proteínas codificadas, respectivamente, pelos transcritos alternativos 2 e 3 de *UBE2A*. A não detecção das isoformas de *UBE2A* pode estar relacionada com o anticorpo utilizado. De acordo com o fabricante, o anticorpo anti-RAD6 (*Abcam*) foi obtido após imunização de coelhos com a sequência correspondente aos 100 aminoácidos da porção N-terminal da isoforma de 152 aminoácidos (codificada

pelo transcrito 1). O anticorpo anti-RAD6 deve, portanto, reconhecer a porção N-terminal da proteína. A isoforma 2 difere da isoforma 1 pela ausência dos resíduos de aminoácidos 51 a 81 e a isoforma 3 tem início no aminoácido correspondente ao aminoácido 75 da isoforma 1 (Figura II.5). Assim, é pouco provável que o anticorpo reconheça a isoforma 3 de UBE2A, uma vez que esta não possui a região N-terminal da isoforma 1. Ainda, se o anticorpo reconhecer a porção ausente na isoforma 2, pode não ser capaz de reconhecer também essa isoforma. Na isoforma mutada Q128X, estão ausentes apenas os últimos 25 resíduos de aminoácidos, de forma que não deveria haver problema no reconhecimento dessa isoforma pelo anticorpo anti-RAD6 em *Western blotting*. A não detecção apóia a hipótese de que a proteína mutada seja degradada.

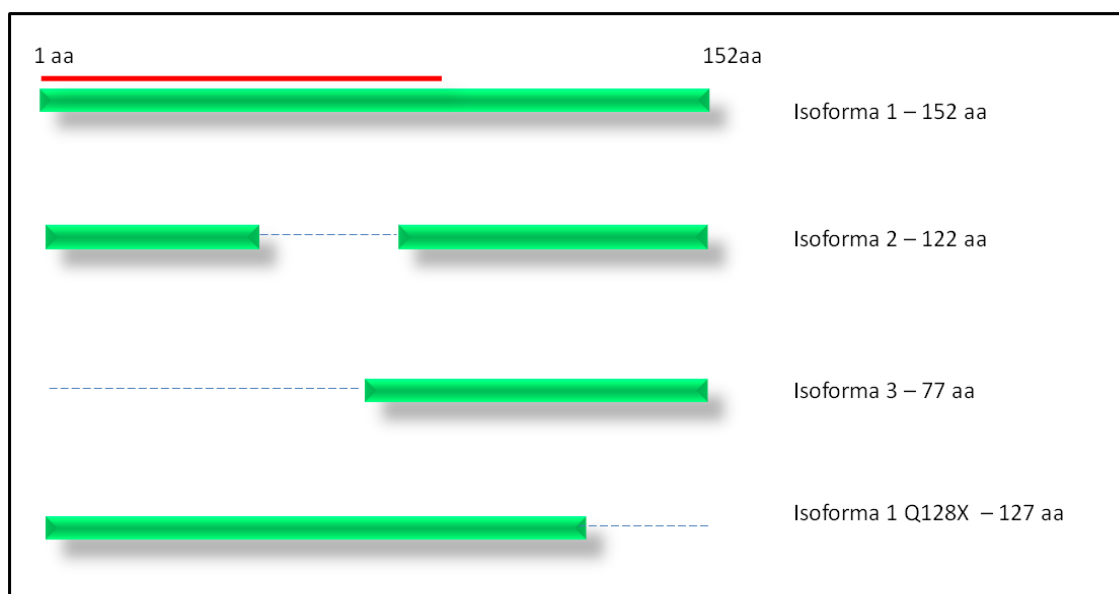


Figura II.5 Esquema das isoformas de UBE2A (barras verdes). A isoforma 1 possui 152 resíduos de aminoácidos. Na isoforma 2, estão ausentes os resíduos de aminoácidos 51 a 81. A isoforma 3 tem início no aminoácido correspondente ao resíduo 75 da isoforma 1. A isoforma mutada Q128X não possui os últimos 25 resíduos de aminoácidos da proteína. A barra vermelha representa a região de UBE2A utilizada para a imunização de coelhos e obtenção do anticorpo anti-RAD6 (*Abcam*). O anticorpo anti-RAD6 deve reconhecer as isoformas 1 e a isoforma mutada, entretanto, pode não reconhecer as isoformas 2 e 3, caso o epítipo esteja contido nos segmentos ausentes nessas isoformas.

### II.4.2.3 Expressão dos alelos do gene *UBE2A* em portadora obrigatória da mutação c.382C→T

Um dos fatores que nos auxiliou na identificação da mutação no gene *UBE2A* como causa de síndrome de deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X foi o desvio completo de inativação do cromossomo X apresentado pelas portadoras obrigatórias da mutação (Nascimento e col., 2006). Acreditávamos que, devido ao fenótipo normal dessas mulheres, o cromossomo X preferencialmente inativo era aquele onde está localizada a mutação c.382C→T e que o desvio seria consequência de desvantagem proliferativa das células que mantiveram o X mutado ativo. Para verificar qual alelo do cromossomo X é expresso, utilizamos amostras de cDNA de uma das portadoras e de um dos afetados para a amplificação do segmento correspondente ao transcrito 1 do gene *UBE2A* (570 pb). O produto foi digerido com a enzima de restrição *PvuII* (Biolabs), cujo sítio de corte é abolido pela mutação c.382C→T.

Conforme podemos verificar na Figura II.7, houve digestão total do fragmento amplificado a partir do cDNA de II-2 (portadora obrigatória), originando um fragmento de 427 pb e outro de 143 pb e confirmando, assim, a expressão apenas do alelo normal do gene *UBE2A*. A enzima *PvuII* não foi capaz de digerir o fragmento amplificado a partir do cDNA do indivíduo III-2 (afetado), portador da mutação c.382C→T. Estes dados apóiam o efeito deletério da mutação detectada em *UBE2A*.

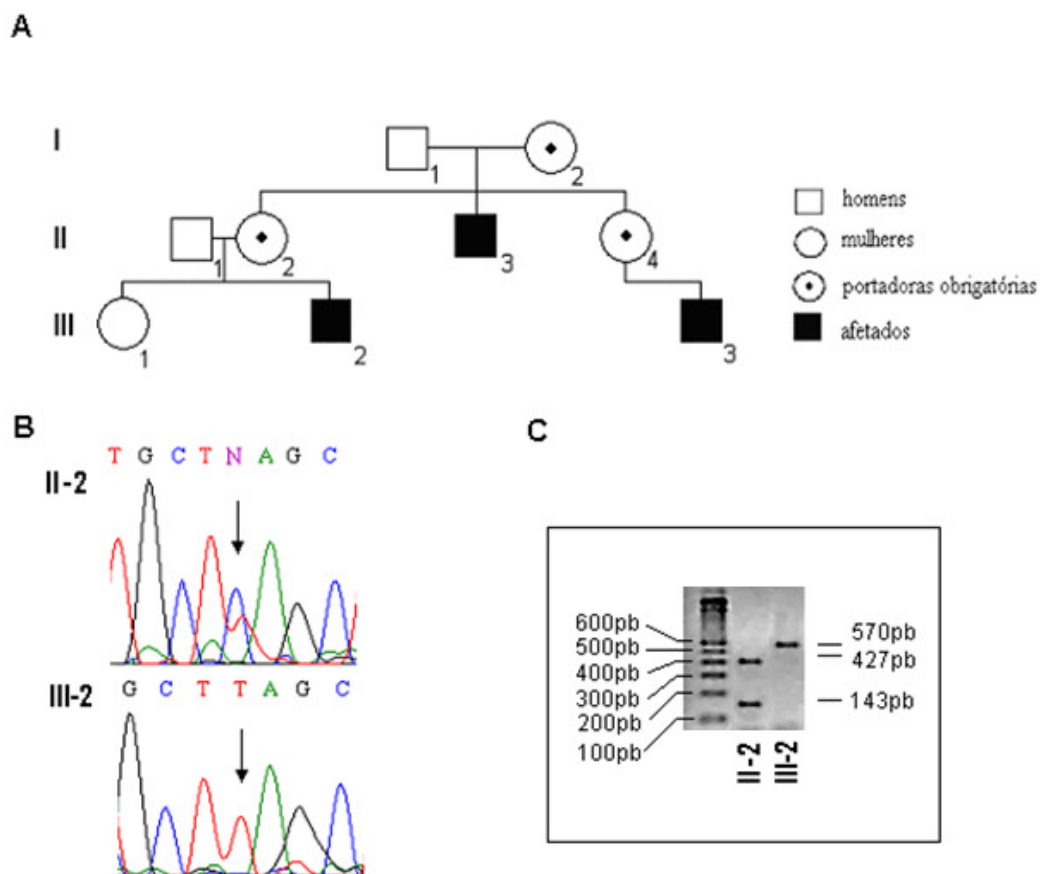


Figura II.7 A, Genealogia da família em que segrega a mutação c.382C→T no gene *UBE2A*. B, Cromatograma de parte da sequência do éxon 6 dos indivíduos II-2 (heterozigota portadora) e III-2 (portador afetado). A seta indica a mutação. C, Produtos de PCR correspondentes ao transcrito 1 do gene *UBE2A* de II-2 e III-2, após digestão com a enzima de restrição *PvuII*. Como a mutação abole o sítio de restrição, o produto não digerido é observado em III-2 (570 pb), homem afetado; em sua mãe, II-2, o produto não digerido não foi detectado, indicando a expressão apenas do alelo normal.

### II.4.3 Expressão dos transcritos de *Ube2A* em tecidos de camundongos

#### *Camundongos selvagens - linhagem SWISS*

A partir de amostras de cDNA de tecidos embrionários de camundongo, obtivemos amplificação de segmentos de dois transcritos do gene *Ube2A*, correspondentes aos transcritos 1 e 3 do ortólogo humano (Figura II.8 A e B). O sequenciamento desses fragmentos confirmou tratar-se de transcritos de *Ube2A*. O fragmento de aproximadamente 300 pb, amplificado a partir de amostra de cDNA de estômago (Figura II.8 A, faixa 5), foi sequenciado e correspondia a transcrito do gene *Wdr22* localizado no cromossomo 12 do camundongo. Não encontramos evidências da presença de transcrito correspondente ao transcrito 2 humano. Assim como observado para os tecidos embrionários de camundongo, apenas segmentos de dois transcritos do gene *Ube2A*, correspondentes aos transcritos 1 e 3 do ortólogo humano, foram amplificados a partir de amostras de cDNA de tecidos de camundongos adultos (Figura II.9).



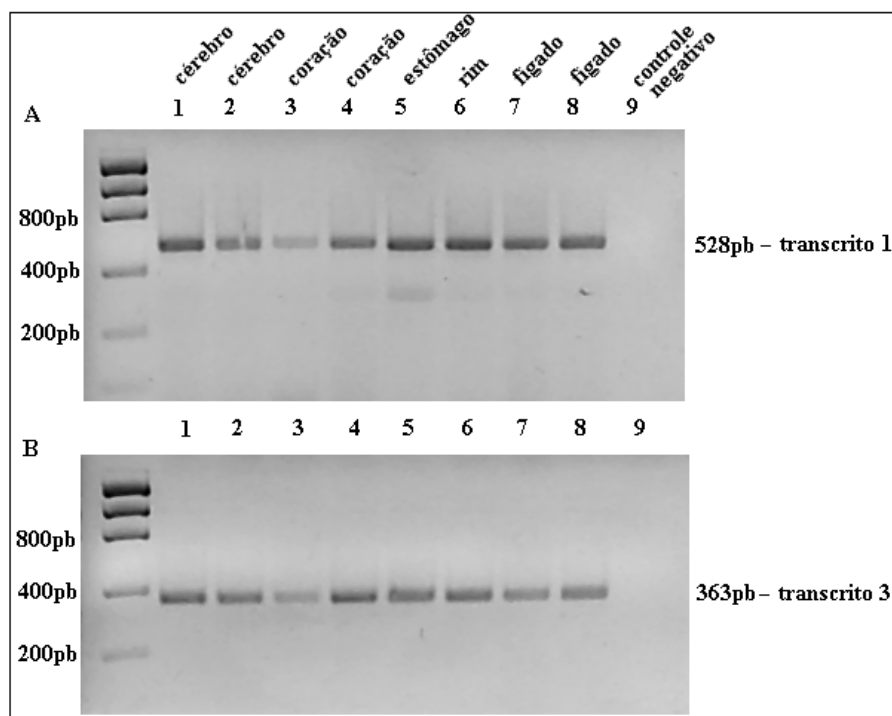


Figura II.8 Produtos da amplificação de parte da região codificadora dos transcritos do gene *Ube2A*, a partir de cDNA de tecidos embrionários de camundongos. A, segmento correspondente ao transcrito 1 de *Ube2A* - bandas de 528 pb. B, segmento do transcrito alternativo de *Ube2A*, correspondente ao transcrito 3 humano - banda de 363 pb.

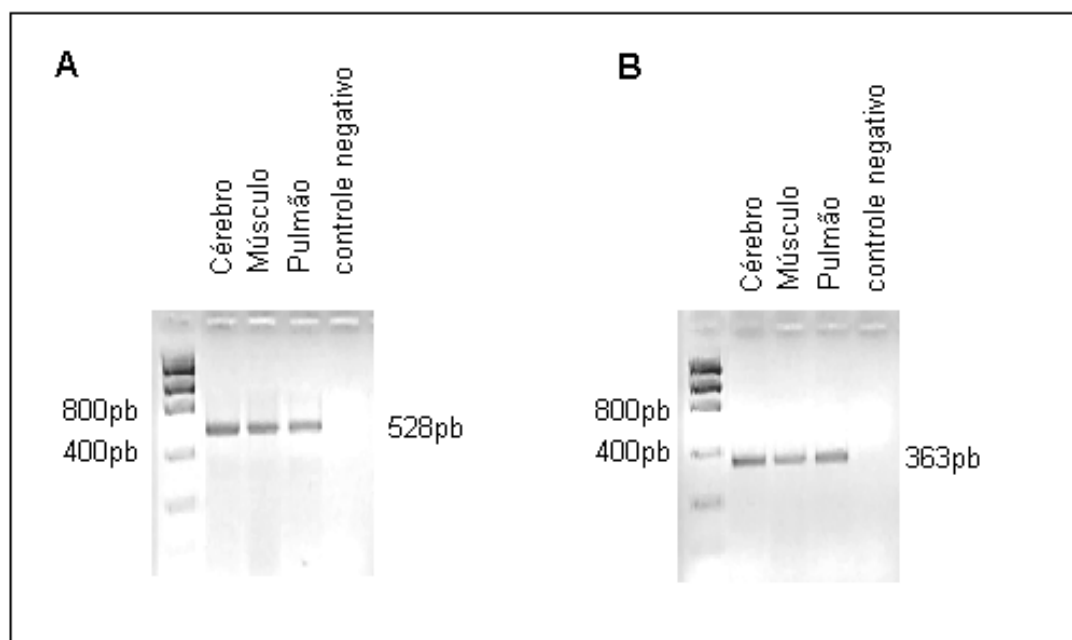


Figura II.9 Produtos da amplificação de parte da região codificadora dos transcritos do gene *Ube2A*, a partir de cDNA de tecidos de camundongos adultos. A, segmento correspondente ao transcrito 1 de *Ube2A* - bandas de 528 pb. B, segmento do transcrito alternativo de *Ube2A*, correspondente ao transcrito 3 humano - banda de 363 pb.

### *Camundongos nocautes quanto ao gene Ube2A*

O processo de geração do camundongo nocaute quanto ao gene *Ube2A* foi realizado por recombinação homóloga em que o cassete de neomicina foi inserido no éxon 1 do gene (Roest e col., 2004; Figura II.10 A). Dessa maneira, essa construção não eliminaria a produção do transcrito correspondente ao transcrito 3 humano, que utiliza uma 5' UTR alternativa localizada no íntron 3 (Figura II.10 B). Para verificar a presença dos transcritos de *Ube2A* nesses camundongos, amplificamos parte da região codificadora dos transcritos do gene *Ube2A* a partir de cDNA obtido de cérebro de camundongos machos e fêmeas, selvagens e nocautes quanto ao gene *Ube2A*. Nos animais selvagens, ambos os transcritos foram amplificados (Figura II.10 C). Nos animais nocautes, apenas o transcrito correspondente ao transcrito 3 humano foi detectado (Figura II.10 C). A presença do cassete de neomicina realmente não eliminou a produção desse transcrito.

Como não há um fenótipo alterado evidente, físico ou comportamental no camundongo nocaute, avaliamos, pela técnica de *Western blotting*, se a ausência da proteína Ube2A seria compensada por uma maior quantidade da paróloga Ube2B nesses animais. Para isso, utilizamos os anticorpos anti-Rad6 e anti-Rad6B específico, ambos produzidos pela equipe do Centro Médico da Universidade Erasmus (Rotterdam, Holanda). Foram comparadas as quantidades das parálogas em cérebro de machos e fêmeas selvagens e nocautes quanto *Ube2A* e de fêmeas heterozigotas (Figura II.11). Comparamos ainda a quantidade das parálogas em testículo, coração, baço, fígado, rim e cérebro de um macho selvagem e um macho nocaute (Figura II.12). Quando utilizamos o anticorpo anti-RAD6, capaz de detectar ambas as parálogas, observamos que a intensidade da banda foi inferior nos animais nocaute (Figura II.11 e II.12), exceto em testículos, tecido em que já foi demonstrado que a expressão de Ube2B é preferencial (Roest e col., 1996; Roest e col., 2004). A utilização do anticorpo específico para Ube2B (anti-Rad6B) evidenciou bandas semelhantes em todos os animais avaliados. Dessa maneira, não há indicação de que a ausência de Ube2A seja compensada por aumento na quantidade da paróloga Ube2b.

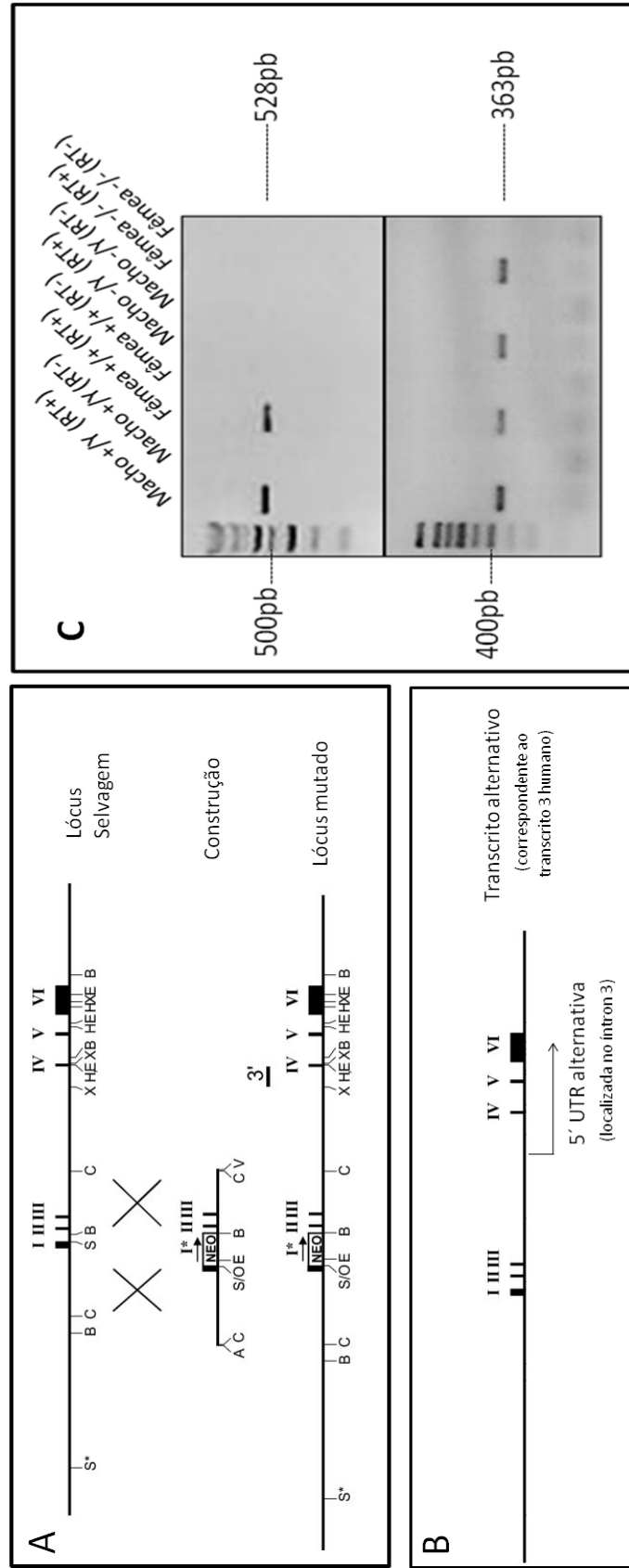


Figura II.10. Em A, esquema da construção utilizada por Roest e col. (2004) para obtenção do camundongo nocaute quanto ao gene *Ube2A*, por recombinação homóloga (imagem modificada de Roest e col., 2004). Em B, representação da região 5'UTR alternativa que daria origem ao transcrito alternativo de *Ube2A* em camundongos. Em C, segmentos correspondentes aos transcritos de *Ube2A*, amplificados a partir de cDNA obtido de cérebro de camundongos macho e fêmea selvagem (+/Y e +/+) e macho e fêmea nocaute (-/Y e -/-) quanto ao gene *Ube2A*. O transcrito alternativo correspondente ao transcritos 3 humano está também presente nos animais nocaute.

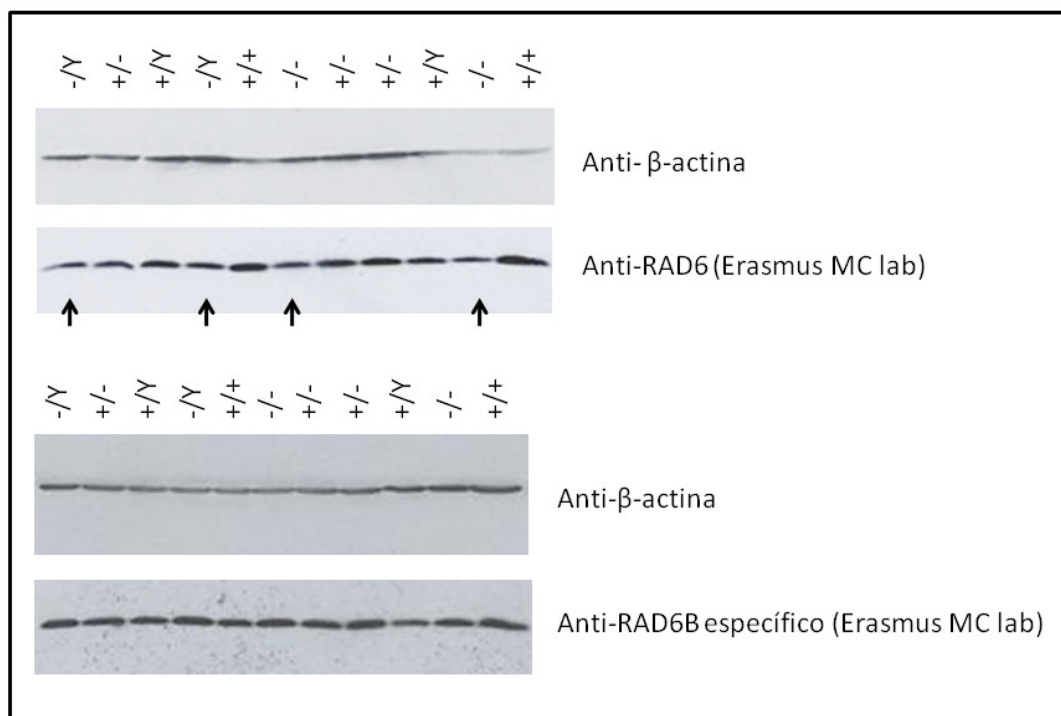


Figura II.11 *Western blotting* anti-RAD6 e anti-RAD6B dos extratos protéicos de cérebro de camundongos machos e fêmeas selvagens ( $+/Y$  ou  $+/+$ ), fêmeas heterozigotas ( $+/-$ ) e machos e fêmeas nocaute ( $-/Y$  e  $-/-$ ) quanto ao gene *Ube2A*. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno. O anti-RAD6, que detecta Ube2A e Ube2B, evidenciou uma banda de menor intensidade nos animais nocautes (indicados pelas setas). O anti-RAD6B, específico para Ube2B, não revelou diferenças de intensidade das bandas entre os animais. Não há, portanto, indicação de que a ausência de Ube2A seja compensada por aumento na quantidade da paróloga Ube2B em cérebro.

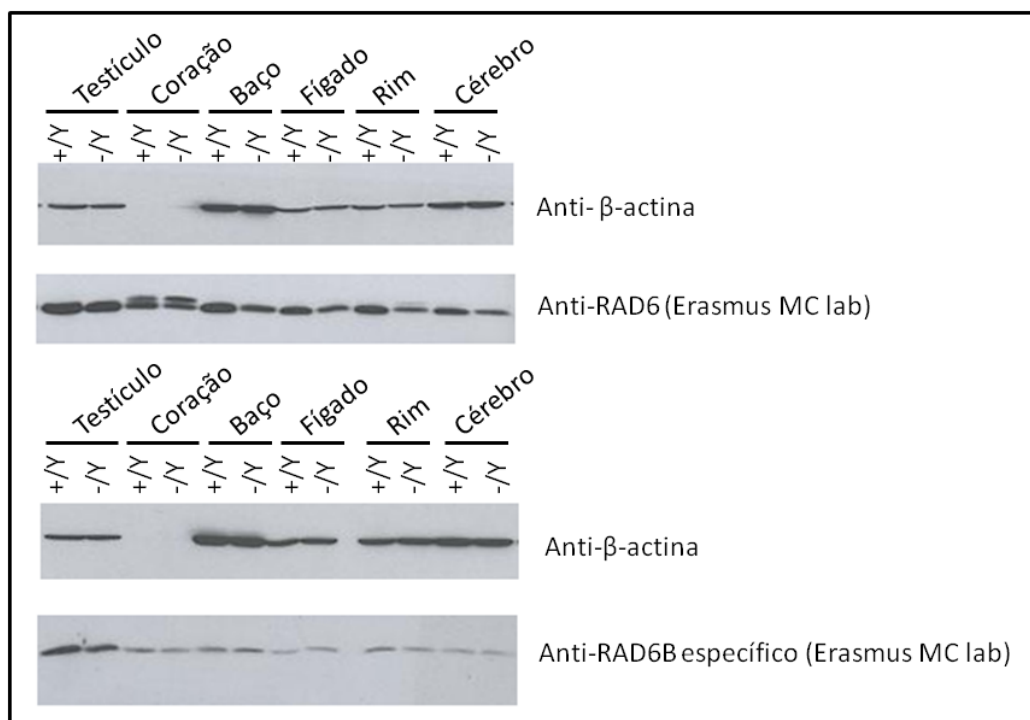


Figura II.12 *Western blotting* anti-RAD6 e anti-RAD6B dos extratos protéicos de testículo, coração, baço, fígado, rim e cérebro de camundongos macho selvagem (+/Y) e macho nocaute (-/Y) quanto ao gene *Ube2A*. A β-actina foi utilizada como controle interno. Como observado em cérebro (Figura II.11), na ausência de *Ube2A* não ocorre aumento na quantidade da paróloga *Ube2B* nesses tecidos.

## II.5 Discussão

---

Como a maioria dos genes do cromossomo X já relacionados com DM, o gene *UBE2A* não parece ser responsável por parcela significativa de casos de DM. Novas mutações em *UBE2A* não foram detectadas na triagem que fizemos em 23 famílias em que a DM já havia sido mapeada em intervalos que continham o gene e em um caso isolado de DM sindrômica que se assemelhava clinicamente aos nossos pacientes portadores da mutação em *UBE2A*. A semelhança clínica desse paciente é sugestiva de que a mutação responsável pelo seu quadro clínico afete a mesma via celular.

O sequenciamento em larga escala de aproximadamente 700 genes do cromossomo X de cerca de 200 indivíduos com DM de herança ligada ao X contribuiu para a identificação de nove novos genes do X relacionados a DM (Tarpey e col., 2009). Cerca de 75% das famílias avaliadas, entretanto, permaneceram sem diagnóstico, sugerindo a importância de regiões regulatórias. Dentre as mutações identificadas, duas foram em *UBE2A*. A primeira dessas alterações consiste na troca de uma citosina por uma timina na posição 215 da região codificadora do gene (c.215C→T) e resulta na troca do códon TTT, que codifica o aminoácido fenilalanina, pelo códon TCT, que codifica serina (F72S). A segunda delas, a substituição de uma citosina por uma guanina na posição 328 da região codificadora (c.328C→G), resulta na troca do códon CAG que codifica glutamina pelo códon GAG, que codifica ácido glutâmico (Q110E). Não foram fornecidas informações referentes ao quadro clínico dos indivíduos portadores dessas alterações e também não foi esclarecido porque apenas a alteração F72S foi considerada como possivelmente patogênica. Ambas nos parecem significativas: os resíduos de aminoácidos F72 e Q110 são altamente conservados, estão localizados próximos aos sítios de ligação com a molécula de ubiquitina (C80: resíduo de cisteína na posição 80) e de fosforilação (S120: resíduo de serina na posição 120), e foram substituídos por aminoácidos de cadeias laterais bioquimicamente distintas. Enquanto a fenilalanina apresenta um radical apolar, a serina apresenta um radical polar neutro. A glutamina, por sua vez, apresenta

cadeia lateral polar neutra e foi substituída pelo ácido glutâmico, aminoácido de cadeia lateral polar, mas carregada negativamente em pH fisiológico. Avaliamos o efeito dessas mutações na função da proteína *in vitro* e ambas parecem prejudicar a atividade da enzima. Os resultados desses ensaios estão apresentados no Capítulo III.

Um dado surpreendente revelado pelo trabalho de Tarpey e col. (2009) foi que, dos 30 genes em que as mutações resultavam em códon de parada prematura, apenas em oito as alterações puderam ser consideradas responsáveis pelo quadro de DM dos portadores: eram genes já relacionados com DM e as mutações segregavam nas famílias com a DM. Nos demais casos, essas variantes *nonsense* não segregavam com o quadro de DM ou foram encontradas também na amostra controle. Os autores concluem que portar variantes *nonsense* de certos genes, mesmo em hemizigose, é compatível com o desenvolvimento intelectual normal em humanos.

Consultas nos bancos de dados do *NCBI* nos permitiram verificar que, dos 22 genes em que mutações *nonsense* não foram relacionadas por Tarpey e col. (2009) ao quadro de DM de seus portadores, dois - *IL9R* e *GTPB6* - estão localizados na região pseudoautosômica, havendo, portanto, uma cópia normal do gene nos homens portadores dessas mutações. Outros dois genes, *MAP7D3* e *RPL9P7*, são classificados como pseudogenes. Sete dos restantes não são expressos no cérebro (*ITIH5L*, *SSX6*, *SYTL5*, *ZCCHC3*, *MAP3K15*, *VSIG4* e *SAGE1*): dos 91 genes do cromossomo X até hoje identificados como causa de DM, incluindo *UBE2A* e os identificados por Tarpey e col. (2009), todos, exceto um, se expressam em cérebro. A exceção é o gene *OTC* que, quando mutado, produz alteração no ciclo da uréia, fazendo com que os portadores apresentem níveis elevados de amônia no sangue e como consequência, ocorrem alterações fisiológicas que afetam, entre outros, o sistema nervoso central. A DM, entretanto, não está presente em todos os portadores de mutações em *OTC* (Rozen e col., 1985; Maddalena e col., 1988a; Maddalena e col., 1988b; Matsuda e col., 1991). Outros três genes, em que foram encontradas mutações *nonsense* por Tarpey e col. (2009), expressam-se em níveis relativamente baixos no cérebro e sua expressão é

predominante em testículo (*ATXN3L*, *FAM47B* e *ARSF*) ou próstata e rim (*ARSF*). Já os genes *UBE2NL*, *MAGEE2*, *BEX4*, *P2RY4* e *ZNF183* e o pseudogene *RPL9P7* apresentam éxons únicos, estrutura que sugere que sejam cópias geradas por retrotransposição; segundo os próprios autores, essas cópias estariam sendo excluídas do genoma humano pela aquisição de mutações que levam a perda de função. O gene *UBE2NL* e o pseudogene *RPL9P7* apresentam cópias com elevada identidade em outras regiões do genoma e não seriam essenciais. No gene *UPS9X*, a mutação *nonsense* detectada em afetado não foi encontrada na população controle, porém a não disponibilidade de amostras para avaliar a segregação da mutação na família faz com que ela permaneça inconclusiva quanto aos efeitos clínicos. Por fim, as mutações *nonsense* nos genes *DPR2* e *SALT1* foram encontradas em apenas um dos membros afetados das famílias e não foram detectadas entre os controles; existe a possibilidade de que essas mutações sejam a causa da DM em seus portadores e outra mutação no cromossomo X constitua a causa da DM dos demais afetados na família.

Os dados de Tarpey e col. (2009) reafirmam a necessidade de estudos funcionais que caracterizem o padrão de expressão dos genes e o efeito de mutações encontradas, inclusive em casos em que a mutação leva à síntese de uma proteína truncada.

A mutação que descrevemos no gene *UBE2A* foi a primeira em uma conjugase de ubiquitina relacionada a uma patologia em humanos. Resulta na síntese de uma proteína truncada, porém o mecanismo celular que leva à síndrome associada não está claro. Diferentemente dos genes identificados por Tarpey e col. (2009), em que mutações que levam a proteínas truncadas não foram consideradas patogênicas, a mutação que identificamos segrega com a síndrome e as mulheres portadoras obrigatórias apresentam desvio total de inativação do cromossomo X. Ainda, a irmã de um dos afetados, que não é portadora da mutação, apresenta padrão aleatório de inativação do cromossomo X. A mutação c.382C→T localiza-se no éxon 6 do gene, comum a todos os transcritos, de forma que, no caso de eles codificarem proteínas funcionais, a mutação comprometeria três proteínas, e não apenas uma. Além disso, a mutação elimina um segmento



altamente conservado da proteína. Em conjunto, esses dados apóiam a hipótese de patogenicidade da mutação.

Demonstramos que os três transcritos de *UBE2A* são expressos em leucócitos, pré-adipócitos, placenta, córtex cerebral e hipocampo humanos. Os três transcritos foram também detectados nas células de sangue e pré-adipócitos do indivíduo III-2, portador da mutação c.382C→T e afetado pela síndrome de DM. Conforme esperado, a mutação *nonsense* no último éxon, não desencadeou o mecanismo de NMD do RNA mutado.

A presença do RNA indica que há síntese da proteína *UBE2A* mutada. Entretanto, ela não foi detectada em amostra de leucócitos do paciente, mas estava presente em pré-adipócitos, porém em quantidade inferior à da paróloga *UBE2B*, quando os bancos de dados apontam para um padrão similar de expressão de ambos os genes, tanto em sangue quanto em tecido adiposo. O resultado não parece ser devido a uma menor afinidade do anticorpo anti-RAD6 (*Abcam*) pela isoforma mutada, pois este foi produzido após imunização de coelhos com a porção N-terminal de *UBE2A*, região não afetada pela presença da mutação. A baixa quantidade da proteína poderia ser devida a alteração no processo de síntese ou à degradação pós-tradução. Alterações na sequência do RNA podem alterar sua estrutura secundária e dessa maneira influenciar o processo de tradução. Já foi demonstrado, em *E.coli*, que alterações da sequência de RNA após o códon de início podem afetar a eficiência de tradução por alterar o acesso do ribossomo (Seo e col., 2009). A degradação de proteínas mal dobradas e não funcionais é processo conhecido que evita a formação de agregados ou interações que possam prejudicar outros componentes celulares (revisão em Goldberg, 2003). Algumas proteínas do tipo chaperonas reconhecem características comuns a polipeptídeos mal dobrados e tentam auxiliar no dobramento correto. A proteína que não for recuperada pode ser degradada via o sistema ubiquitina-proteassoma (revisão em McDounough & Patterson, 2003). Nossos dados não nos permitem decidir por um desses mecanismos. Mas, diante da presença de apenas uma pequena quantidade da isoforma mutada nas células do paciente, podemos concluir que a mutação leva à perda de função de *UBE2A*.

As proteínas codificadas pelos transcritos alternativos não foram detectadas nos extratos protéicos em todas as amostras analisadas. Esse resultado pode ser devido à inespecificidade de anti-RAD6 ou por essas isoformas representarem pequena parcela do *pool* de proteínas da célula. Como as isoformas 2 e 3 não possuem segmentos da porção N-terminal de UBE2A, é possível que o anticorpo não seja capaz de detectá-las. No caso de as proteínas estarem pouco representadas na célula, experimentos de co-imunoprecipitação, atualmente em fase de padronização, auxiliariam na identificação dessas isoformas nos extratos protéicos. Entretanto, para a detecção de todas as isoformas de UBE2A seria necessário anticorpo que reconhecesse a porção C-terminal de UBE2A. A expressão *in vitro* das isoformas permitiria a produção de um anticorpo capaz de detectá-las. Os ensaios de superexpressão e produção do anticorpo estão detalhados no capítulo seguinte.

A expressão de apenas o alelo normal de *UBE2A* em leucócitos de mulher portadora da mutação constitui evidência apontando para o efeito deletério da mutação. O desvio de inativação que observamos resulta de vantagem proliferativa das células que inativaram o alelo mutado. O mecanismo pelo qual a mutação afeta a via de UBE2A permanece interrogado. A reduzida quantidade da proteína mutada nas células do paciente indica que há perda de função de UBE2A. Entretanto não podemos deixar de levar em consideração que a síntese da proteína mutada ocorre e que o processo de degradação dessa proteína pode prejudicar a homeostase celular e contribuir para o estabelecimento do quadro.

Recentemente, foram publicados dois trabalhos associando novas alterações em *UBE2A* a quadro de DM. Honda e col. (2010) descreveram uma microdeleção em Xq24 que inclui *UBE2A* e outros oito genes, em um menino com DM e características também presentes em nossos pacientes (Tabela II.6). Budny e col. (2010) descreveram mutações em *UBE2A* em duas famílias em que segregava quadro de DM síndrômica semelhante ao que descrevemos. A primeira família apresentava cinco indivíduos afetados do sexo masculino, distribuídos em três gerações e aparentados por suas mães fenotipicamente normais. A análise de 59 marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) permitiu definir um

segmento candidato entre Xq23-q26.1. O sequenciamento do gene *UBE2A* revelou a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 67 da região codificadora do gene (c.67G→A), segregando com a doença. Essa mutação resulta na troca da glicina, localizada na posição 23 da proteína, por uma arginina (G23R). As características clínicas de quatro dos afetados portadores da mutação c.67G→A estão descritas na Tabela II.7. O quinto menino foi examinado uma única vez com apenas três semanas de vida. Durante o período gestacional, a presença de rins duplicados à esquerda foi observada em exame de ultrassonografia e confirmada após o nascimento; entretanto, características neurológicas e dismórficas não foram detectadas no período neonatal. Três das cinco portadoras obrigatórias analisadas apresentavam padrão de inativação do X desviado. As outras duas portadoras não eram informativas quanto aos loci *AR* e *FMRI*, o que impediu a avaliação do padrão de inativação do cromossomo X. A segunda família apresentava dois afetados em duas gerações e foi testada quanto a mutações em *UBE2A* dada a semelhança clínica dos afetados com nossos pacientes (Tabela II.7). O sequenciamento de *UBE2A* revelou a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 32 da região codificadora do gene (c.32G→A), que resulta na troca do aminoácido arginina, localizado na posição 11, pelo aminoácido glutamina (R11Q). Por comunicação pessoal de Arjan de Brouwer (Departamento de Genética Humana da Universidade Radboud, Nijmegen, Holanda), soubemos da existência de três outras microdeleções de segmentos do cromossomo X que incluem *UBE2A*, em pacientes do sexo masculino, não aparentados. Fomos informados que, além de *UBE2A*, outros seis genes são comuns a todos os segmentos deletados (*LOC100303728*, *SLC25A43*, *SLC25A5*, *CXorf56*, *NKRF* e *U1*).

Comparamos as características clínicas de nossos pacientes com as dos portadores das microdeleções em Xq24 (Tabela II.6) e com aquelas dos portadores de mutações *missense* em *UBE2A* (Tabela II.7). A DM grave e o comprometimento significativo ou ausência de fala são comuns a todos. Nos nossos dois pacientes e no portador de deleção, em que foi realizado exame de ressonância magnética, observou-se hipodensidade de substância branca. Dentre as características investigadas em pelo menos metade dos pacientes e presentes em 50% ou mais

dos portadores da mutação c.382C→T, dos portadores de microdeleção de Xq24 e dos portadores de mutações *missense* (c.67G→A e c.32G→A) estão: baixa estatura, sinófrisis, boca grande e lábios finos com comissuras voltadas para baixo, pescoço curto e largo, implantação baixa de cabelos na nuca, mamilos espaçados, pênis pequeno, hirsutismo generalizado e a ocorrência de convulsões. A oncodistrofia parece ocorrer após a puberdade.

Algumas características são observadas apenas nos pacientes com microdeleções em Xq24 (microcefalia, defeitos cardíacos, catarata, surdez e criptorquidismo) e podem, portanto, resultar da perda de outros genes localizados no segmento ausente. De fato, um locus em Xq24 já foi associado a catarata (Craig e col., 2008). Enquanto a microcefalia aparece em dois dos três portadores de microdeleções avaliados, a macrocefalia parece predominar no grupo em que ocorrem as mutações de ponto. As diferenças fenotípicas podem também ser consequência do fato de que nos pacientes portadores da mutação *nonsense* (Nascimento e col., 2006) e nos portadores das mutações *missense* (Budny e col., 2010) há síntese da proteína - podendo haver função residual ou ganho de função - enquanto as microdeleções resultam em ausência da proteína.

Defeitos do trato urinário aparecem em um dos portadores de microdeleção (rins duplicados bilaterais) (de Brouwer e col., dados não publicados) e em dois portadores da mutação c.67G→A (rim em ferradura e rim duplicado unilateral) (Budny e col., 2010). Essas observações sugerem que o trato urinário deve ser avaliado em portadores de alterações que envolvam *UBE2A*.

A mutação c.382C→T que descrevemos e as microdeleções que contêm *UBE2A* comprometem os três transcritos de *UBE2A*, enquanto as mutações *missense* descritas por Budny e col., (2010) afetam apenas os transcritos 1 e 2. Nossas análises revelaram, em camundongos, dois transcritos de *Ube2A* e não apenas um, conforme as informações dos bancos de dados pesquisados. O segundo transcrito do gene *Ube2A* de camundongo detectado corresponde ao transcrito 3 humano, fato que sugere a importância do processamento alternativo para a função *UBE2A*, seja no processo de regulação da expressão do gene ou por codificar uma isoforma funcional. A caracterização funcional da proteína

codificada por esse transcrito torna-se importante, já que, no caso de essa isoforma compartilhar funções com a isoforma 1, o animal nocaute precisa ser reavaliado, uma vez que ele sintetiza esse transcrito alternativo. Além da ausência de um fenótipo físico ou comportamental evidente, não foram detectadas alterações de tamanho do cérebro, ou presença de defeitos cardíacos e anomalias do trato urogenital nos camundongos nocautes quanto ao gene *Ube2A* avaliados anteriormente por Roest e col. (2004) (Dr. Willy Baarends, comunicação pessoal), nem tampouco naqueles avaliados por mim, no Centro Médico da Erasmus University. Observamos ainda, que, nesses animais, a ausência da proteína Ube2A não é compensada por aumento na quantidade da paróloga Ube2B.

Fica, portanto, evidente que, em humanos, o comprometimento da função de UBE2A resulta em síndrome de DM. A caracterização do efeito das mutações de ponto na função das isoformas de UBE2A pode ajudar a elucidar os mecanismos que levam ao estabelecimento do quadro e determinar se o camundongo nocaute é um bom modelo para estudo do papel de UBE2A no neurodesenvolvimento.

Parte dos resultados aqui apresentados referentes à triagem de mutações em *UBE2A* foi publicada juntamente com a descrição da síndrome, mapeamento e identificação da mutação no gene *UBE2A* no volume 79 do periódico *American Journal of Human Genetics*, em 2006 (Nascimento e col., 2006).

Tabela II.6 Características clínicas associadas à DM nos pacientes portadores da mutação c.382C→T em *UBE2A* (Nascimento e col., 2006) e em pacientes portadores de microdeleções em *Xq24* que incluem *UBE2A* (Honda e col., 2010 e de Brouwer e col., comunicação pessoal).

	Nascimento e col., 2006 c.382C→T			Freq.	Honda e col., 2010 Microdeleção - Xq24	de Brouwer e col., comunicação pessoal Microdeleções - Xq24			Freq.
	II-3	III-2	III-3		Paciente japonês	Paciente holandês	Paciente americano	Paciente Irlandês	
Idade ao exame (anos)	46 7/12	19 11/12	5 4/12		4 10/12	3	NI	9	
Peso aumentado ao nascer (percentil)	50°	90° – 97°	> 97°	1/3	85°	50°	NI	50°	0/3
Baixa estatura (percentil ≤ 25)	< 3°	10° – 25°	10°	3/3	10°	25°	NI	50°	2/3
Peso aumentado (percentil)	> 97°	90°	> 97°	3/3	10°	50°	NI	50°	0/3
Perímetro cefálico (percentil)	> 98°	> 98°	50°	2/3 >98°	5°	< 3°	NI	50°	2/3 ≤ 3°
Redemoinhos	+	+	+	3/3	+	-	-	-	1/4
Face alargada	-	+	+	2/3	+	-	-	+	2/4
Hipoplasia do maciço médio da face	-	+	+	2/3	+	+	-	+	3/4
Sinófris	+	+	+	3/3	+	+	-	+	3/4
Fendas palpebrais voltadas para cima	+	+	+	3/3	+	-	-	+	2/4
Hipertelorismo ocular	-	+	-	1/3	+	+	+	+	4/4
Ponte nasal baixa	-	+	+	2/3	+	+	+	+	4/4
Pescoço curto e largo	+	+	+	3/3	+	+	-	+	3/4
Boca grande e lábios finos e comissuras voltadas para baixo	+	+	+	3/3	+	+	-	+	3/4
Implantação baixa de cabelos na nuca	+	+	+	3/3	+	NI <sup>3</sup>	-	+	2/3
Mamilos espaçados	+	+	+	3/3	+	+	-	-	2/4
Pênis pequeno	+	+	+	3/3	+	+	-	+	3/4
Pés pequenos, planos, com edema de dorso	+	+	+	3/3	+	-	NI <sup>3</sup>	+	2/3
Onicodistrofia <sup>1</sup>	+	+	-	2/3	-	-	-	-	0/4
Aparência mixedematóide	+	+	+	3/3	+	-	-	-	1/4
Pele seca	+	+	+	3/3	+	+	-	-	2/4

Tabela II.6 Continuação

	Nascimento e col., 2006 c.382C→T			Freq.	Honda e col., 2010 Microdeleção - Xq24	de Brouwer e col., comunicação pessoal Microdeleções - Xq24			Freq.
	II-3	III-2	III-3		Paciente japonês	Paciente holandês	Paciente Americano	Paciente Irlandês	
Hirsutismo generalizado	+	+	+	3/3	+	-	-	+	2/4
Convulsões	+	+	+	3/3	+	+	+	+	4/4
Comprometimento/ ausência de fala	+	+	+	3/3	+	+	+	+	4/4
Substância branca hipodensa <sup>2</sup>	NE <sup>4</sup>	+	+	2/2	+	+	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	2/2
<b>Características adicionais às descritas por Nascimento e col., 2006</b>									
Hipoplasia cerebelar	-	-	-	0/3	-	-	+	-	1/4
Implantação proximal do polegar	-	-	-	0/3	+	NI <sup>3</sup>	NI <sup>3</sup>	NI <sup>3</sup>	1/1
Anomalias de trato urinário	-	-	-	0/3	-	-	+ (Rins duplicados bilateralmente)	-	1/4
Criptorquidia	-	-	-	0/3	-	+	+	-	2/4
Infecções recorrentes	-	-	-	0/3	-	-	+	-	1/4
Catarata	-	-	-	0/3	-	-	+	-	1/4
Surdez	-	-	-	0/3	-	-	+	-	1/4
Defeito cardíaco	-	-	-	0/3	+	+	+	-	3/4
Hipoglicemia	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	?	NI <sup>3</sup>	+	NE <sup>4</sup>	-	1/2
Hipogamaglobulinemia	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	?	NI <sup>3</sup>	-	NE <sup>4</sup>	+	1/2

<sup>1</sup> após a puberdade, <sup>2</sup> IRM de cérebro, <sup>3</sup> NI=não informado, <sup>4</sup> NE = não examinado

Tabela II.7 Características clínicas associadas à DM nos pacientes portadores da mutação c.382C→T em *UBE2A* (Nascimento e col., 2006) e em pacientes portadores de mutações *missense* em *UBE2A* (Budny e col., 2010).

	Nascimento e col., 2006 c.382C→T (Q128X)				Budny e col., 2010						
				Freq.	Família I c.67G→A (G23R)				Família II c.32G→A (R11Q)		Freq.
	II-3	III-2	III-3		V-2	IV-13	III-12	IV-3	II-3		
Idade ao exame (anos)	46 7/12	19 11/12	5 4/12		7 6/12	21	43	29	43 6/12		
Peso aumentado ao nascer (percentil)	50°	90° – 97°	> 97°	1/3	25°-50°	> 97°	NI	25°-50°			
Baixa estatura (percentil ≤ 25)	< 3°	10° – 25°	10°	3/3	10°-25°	<3°	<<3°	<<3°	3°-10°	5/5	
Peso aumentado (percentil)	> 97°	90°	> 97°	3/3	90°-97°	>>97°	75°-90°	25°-50°	75°-90°	4/5	
Perímetro cefálico (percentil)	> 98°	> 98°	50°	2/3 >98°	75°	90°	> 97°	90° - 97°	90°	4/5 ≥ 90°	
Redemoinhos	+	+	+	3/3	-	-	+	+	+	3/5	
Face alargada	-	+	+	2/3	NI	NI	NI	NI	NI	-	
Hipoplasia do maciço médio da face	-	+	+	2/3	NI	NI	NI	NI	NI	-	
Sinófris	+	+	+	3/3	+	+	+	+	+	5/5	
Fendas palpebrais voltadas para cima	+	+	+	3/3	-	-	-	-	-	0/5	
Hipertelorismo ocular	-	+	-	1/3	-	-	-	-	-	0/5	
Ponte nasal baixa	-	+	+	2/3	-	+	-	-	-	1/5	
Pescoço curto e largo	+	+	+	3/3	-	+	+	-	+	3/5	
Boca grande e lábios finos e comissuras voltadas para baixo	+	+	+	3/3	+	+	+	-	+	4/5	
Implantação baixa de cabelos na nuca	+	+	+	3/3	-	+	+	-	+	4/5	
Mamilos espaçados	+	+	+	3/3	+	+	+	-	+	4/5	
Pênis pequeno	+	+	+	3/3	-	+	+	+	+	4/5	
Pés pequenos, planos, com edema de dorso	+	+	+	3/3	-	-	-	-	-	0/5	
Onicodistrofia <sup>1</sup>	+	+	-	2/3	+	-	+	-	-	2/5	
Aparência mixedematóide	+	+	+	3/3	+	+	+	-	+	4/5	



Tabela II.7 continuação

	Nascimento e col., 2006 c.382C→T (Q128X)				Budny e col., 2010					Freq.
					Família I c.67G→A (G23R)				Família II c.32G→A (R11Q)	
	II-3	III-2	III-3	Freq.	V-2	IV-13	III-12	IV-3	II-3	
Pele seca	+	+	+	3/3	-	-	-	-	-	0/5
Hirsutismo	+	+	+	3/3	+	+	+	-	+	4/5
Substância branca hipodensa <sup>2</sup>	NE <sup>4</sup>	+	+		NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	-
Convulsões	+	+	+	3/3	+	+	-	+	-	3/5
Comprometimento da fala	+	+	+	3/3	+	+	+	+	+	5/5
<b>Características adicionais às descritas por Nascimento e col., 2006</b>										
Hipoplasia cerebelar	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	-
Implantação proximal do polegar	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	-
Anomalias de trato urinário	-	-	-	0/3	Rim em ferradura	-	-	-	-	1/5
Criptorquidia	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	0/5
Infecções recorrentes	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	0/5
Catarata	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	0/5
Surdez	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	0/5
Defeito cardíaco	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	0/5
Hipoglicemia	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	?	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	?
Hipogamaglobulinemia	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	?	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	NE <sup>4</sup>	?

<sup>1</sup> após a puberdade, <sup>2</sup> IRM de cérebro, <sup>3</sup> NI=não informado, <sup>4</sup> NE = não examinado

## Referências Bibliográficas

---

- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW - Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** 51:1229-39, 1992.
- Budny B, Badura-Stronka M, Materna-Kiryluk A, Tzschach A, Raynaud M, Latos-Bielenska A, Ropers H - Novel missense mutations in the ubiquitination-related gene *UBE2A* cause a recognizable X-linked mental retardation syndrome. **Clin Genet**. 2010
- Chen ZJ, Sun LJ - Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. **Mol Cell** 33:275-86, 2009. Revisão.
- Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G - XLMR genes: update 2007. **Eur J HumGenet** 16:422-34, 2008. Revisão.
- Claes S, Gu XX, Legius E, Lorenzetti E, Marynen P, Fryns JP, Cassiman JJ, Raeymaekers P - Linkage analysis in three families with nonspecific X-linked mental retardation. **Am J Med Genet** 64:137-146, 1996.
- Claes S, Volcke P, Devriendt K, Holvoet M, Raeymaekers P, Cassiman JJ, Fryns JP - Regional localization of a gene for nonspecific XLMR to Xp11.3-p11. 23 (MRX51) and tentative localization of an MRX gene to Xq23-q26.1. **Am J Med Genet** 85:283-287, 1999.
- Craig JE, Friend KL, Gecz J, Rattray KM, Troski M, Mackey DA, Burdon KP - A novel locus for X-linked congenital cataract on Xq24. **Mol Vis** 14:721-6, 2008.
- Fraga, AM - Estudo de função de HIPK2 durante o desenvolvimento embrionário. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2007.
- Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, Sanlaville D, van Bokhoven H, Ropers HH, Laumonnier F, Ranieri E, Schwartz CE, Abidi F, Tarpey PS, Futreal PA, Whibley A, Raymond FL, Stratton MR, Fryns JP, Scott R, Peippo

- M, Sipponen M, Partington M, Mowat D, Field M, Hackett A, Marynen P, Turner G, Gécz J - Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase *HSD17B10* and the E3 ubiquitin ligase *HUWE1* are associated with mental retardation. **Am J Hum Genet** 82:432-43, 2008.
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PM, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garris M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougle CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JL, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD, Hakonarson H - Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature** 459:569-73, 2009.
- Goldberg AL - Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature** 426:895-9, 2003. Revisão.
- Gu XX, Decorte R, Marynen P, Fryns JP, Cassiman JJ, Raeymaekers P - Localization of a new gene for non-specific mental retardation to Xq22-q26 (MRX35). **J Med Genet** 33:52-5, 1996.
- Hall TA - BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser** 41:95-8, 1999.
- Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI - U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. **J Biol Chem** 276:33111-20, 2001.
- Honda S, Orii KO, Kobayashi J, Hayashi S, Imamura A, Imoto I, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J - Novel deletion at Xq24 including the *UBE2A* gene in a patient with X-linked mental retardation. **J Hum Genet**, 2010.

- Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE - Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. **Cell** 106:607-17, 2001.
- Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. **Annu Rev Genet** 26:179-207, 1992.  
Revisão.
- Joazeiro CA, Weissman AM - RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. **Cell** 102:549-52, 2000.
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J - *UBE3A/E6-AP* mutations cause Angelman syndrome. **Nature Genet** 15: 70-73, 1997.
- Kleefstra T, Hamel BC - X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. **Clin Genet** 67:451-67, 2005.
- Koken MH, Reynolds P, Jaspers-Dekker I, Prakash L, Prakash S, Bootsma D, Hoeijmakers JH - Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:8865-9, 1991.
- Koken MH, Smit EM, Jaspers-Dekker I, Oostra BA, Hagemeyer A, Bootsma D, Hoeijmakers JH - Localization of two human homologs, HHR6A and HHR6B, of the yeast DNA repair gene *RAD6* to chromosomes Xq24-q25 and 5q23-q31. **Genomics** 12:447-53, 1992.
- Koken MH, Hoogerbrugge JW, Jasper-Dekker I, de Wit J, Willemsen R, Roest HP, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH - Expression of the ubiquitin-conjugating DNA repair enzymes HHR6A and B suggests a role in spermatogenesis and chromatin modification. **Dev Biol** 173:119-32, 1996.
- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ - The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO J** 19:6860-9, 2000.
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CA - Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. **PLoS One** 3:e1487, 2008.

- Longo I, Frints SG, Fryns JP, Meloni I, Pescucci C, Ariani F, Borghgraef M, Raynaud M, Marynen P, Schwartz C, Renieri A, Froyen G - A third MRX family (MRX68) is the result of mutation in the long chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4) gene: proposal of a rapid enzymatic assay for screening mentally retarded patients. **J Med Genet** 40:11-7, 2003.
- Maddalena A, Sosnoski DM, Berry GT, Nussbaum RL - Mosaicism for an intragenic deletion in a boy with mild ornithine transcarbamylase deficiency. **New Eng J Med** 319: 999-1003, 1988a.
- Maddalena A, Spence JE, O'Brien WE, Nussbaum RL - Characterization of point mutations in the same arginine codon in three unrelated patients with ornithine transcarbamylase deficiency. **J Clin Invest** 82: 1353-1358, 1988b.
- Maquat LE - Nonsense-mediated mRNA decay. **Curr Biol** 12: R196-7, 2002.
- Matsuda I, Nagata N, Matsuura T, Oyanagi K, Tada K, Narisawa K, Kitagawa T, Sakiyama T, Yamashita F, Yoshino M - Retrospective survey of urea cycle disorders: Part 1. Clinical and laboratory observations of thirty-two Japanese male patients with ornithine transcarbamylase deficiency. **Am J Med Genet** 38: 85-89, 1991.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard R-J, Jiang Y, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL - *De novo* truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. **Nature Genet** 15: 74-77, 1997.
- McDonough H, Patterson C - CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. **Cell Stress Chaperones** 8:303-8, 2003. Revisão.
- Mello, JCM - Estudo do padrão de inativação do cromossomo X em tecido extra-embriônico humano. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2010.
- Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, Bruttini M, Moizard MP, Gomot M, Chelly J, des Portes V, Fryns JP, Ropers HH, Magi B, Bellan C, Volpi N, Yntema HG, Lewis SE, Schaffer JE, Renieri A - *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. **Nat Genet** 30:436-40, 2002.

- Nascimento RMP, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM - *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet** 79:549-55, 2006.
- Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, Villanova M, Zollo M, Borsani G, Ballabio A, Renieri A - *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. **Genomics** 47:350-8, 1998.
- Pickart CM - Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem** 70:503-33, 2001. Revisão.
- Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, FeldmanGJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A - Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. **Nat Genet** 17:285-91, 1997.
- Raynaud M, Moizard MP, Dessay B, Briault S, Toutain A, Gendrot C, Ronce N, Moraine C - Systematic analysis of X-inactivation in 19XLMR families: extremely skewed profiles in carriers in three families. **Eur J Hum Genet** 8:253-8, 2000.
- Reis, SBA - Mutação no gene *ACSL4* (acyl-CoA synthetase long-chain member 4) como causa de deficiência mental de herança ligada ao X. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2009.
- Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MH, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JT, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH - Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. **Cell** 86:799-810, 1996.
- Roest HP, Baarends WM, de Wit J, van Klaveren JW, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, van Cappellen WA, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA - The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. **Mol Cell Biol** 24:5485-95, 2004.

- Rozen R, Fox J, Fenton WA, Horwich AL, Rosenberg LE - Gene deletion and restriction fragment length polymorphisms at the human ornithine transcarbamylase locus. **Nature** 313: 815-817, 1985.
- Seo SW, Yang J, Jung GY - Quantitative correlation between mRNA secondary structure around the region downstream of the initiation codon and translational efficiency in *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng** 104:611-6, 2009.
- Suzumori N, Burns KH, Yan W, Matzuk MM - RFPL4 interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteasome degradation pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:550-5, 2003.
- Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slaugh R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M - Mutations in *CUL4B*, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. **Am J Hum Genet** 80:345-52, 2007.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T,

- Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41:535-43, 2009.
- Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S - *MID1*, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. **Nat Genet** 29:287-94, 2001.
- Vitelli F, Piccini M, Caroli F, Franco B, Malandrini A, Pober B, Jonsson J, Sorrentino V, Renieri A - Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport syndrome (A), mental retardation (M), midface hypoplasia (M), and elliptocytosis (E) contiguous gene deletion syndrome (AMME). **Genomics** 55:335-40, 1999.
- Vitelli F, Meloni I, Fineschi S, Favara F, Tiziana Storlazzi C, Rocchi M, Renieri A - Identification and characterization of mouse orthologs of the *AMMECR1* and *FACL4* genes deleted in AMME syndrome: orthology of Xq22.3 and MmuXF1-F3. **Cytogenet Cell Genet** 88:259-63, 2000.
- Ye Y, Rape M - Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. **Nat Rev Mol Cell Biol** 10:755-64, 2009. Revisão.
- Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, Beier M, Hülskamp G, Guzman C, Rehder H, Beemer FA, Hamel B, Vanlieferinghen P, Gershoni-Baruch R, Vieira MW, Dumic M, Auslender R, Gil-da-Silva-Lopes VL, Steinlicht S, Rauh M, Shalev SA, Thiel C, Ekici AB, Winterpacht A, Kwon YT, Varshavsky A, Reis A - Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). **Nat Genet** 37:1345-50, 2005.
- Zou Y, Liu Q, Chen B, Zhang X, Guo C, Zhou H, Li J, Gao G, Guo Y, Yan C, Wei J, Shao C, Gong Y - Mutation in *CUL4B*, which encodes a member of cullin-



RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. **Am J Hum Genet** 80: 561-566, 2007.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH - Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng** 7:211-28, 2001.

### **Recursos de Internet:**

*BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.*

*Ensembl –<http://www.ensembl.org>*

*Genatlas – <http://www.genatlas.org>*

*GCC – Greenwood Genetic Center – <http://www.ggc.org/xlmr.htm>*

*NCBI – Nacional Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>*

*PRIMER3 – <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>*

**ESTUDO FUNCIONAL DAS ISOFORMAS DE UBE2A:  
ENSAIOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

### III. 1 Introdução

---

A via de ubiquitinação de proteínas é uma rede intrincada de proteínas dedicadas a ubiquitinar proteínas-alvo e dessa maneira controlar diversos processos celulares. Alterações em seus componentes já foram relacionadas com diversas doenças humanas (revisão em Jiang & Beuted, 2004) e evidências apontam para sua importância no sistema nervoso (revisão em Lehman, 2009). A presença de inclusões neuronais ubiquitina-positivas é característica comum em diversas doenças neurodegenerativas (Lowe e col., 1988; Shimura e col., 1999) e mutações em genes da via foram identificadas como causas de quadros que incluem a deficiência mental (DM), indicando sua importância também no neurodesenvolvimento (Kishino e col., 1997; Matsuura e col., 1997, Quaderi e col., 1997, Zenker e col., 2005, Nascimento e col., 2006, Tarpey e col., 2007, Zou e col., 2007). Entretanto, a relação causal entre alterações nessa via e a DM ainda não está clara.

A identificação da mutação c.382C→T em *UBE2A* como causa de síndrome de deficiência mental (Nascimento e col., 2006) abriu novos caminhos de investigação. A mutação gera um códon de parada prematuro UAG (Q128X) que elimina os últimos 25 aminoácidos da proteína *UBE2A*. O segmento ausente é altamente conservado entre proteínas ortólogas. *UBE2A* é um dos ortólogos humanos do gene *RAD6/UBC2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Koken e col., 1991). A função de *RAD6* foi caracterizada nesse organismo: atua como conjugase de ubiquitina ou E2 (Jentsch e col., 1987), enzima que participa do passo intermediário no processo de ubiquitinação de proteínas, detalhado no Capítulo I. A elevada conservação em eucariontes permitiu a clonagem de dois genes ortólogos humanos: *UBE2A*, localizado no cromossomo X (Xq24), e *UBE2B*, localizado no cromossomo 5 (5q23-31) (Koken e col., 1992), duplicação comum aos mamíferos, com uma das cópias sempre no cromossomo X. Ambos os parálogos humanos codificam proteínas de 152 aminoácidos, que são estrutural e funcionalmente conservadas e compartilham 96% de identidade de aminoácidos.

Ambas são capazes de complementar os fenótipos de sensibilidade a ultravioleta apresentado pela linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* (Koken e col., 1991).

Roest e col., (2004) demonstraram que camundongos duplo-nocautes quanto aos genes parálogos *Ube2A* e *Ube2B* (fêmeas *Ube2A*<sup>-/-</sup>/*Ube2B*<sup>-/-</sup> e machos *Ube2A*<sup>-Y</sup>/*Ube2B*<sup>-/-</sup>) não são viáveis, indicando que as proteínas são cruciais para o desenvolvimento. Camundongos machos e fêmeas nocautes quanto a *Ube2A* ou *Ube2B* são ambos viáveis, mas apresentam alterações em seus processos reprodutivos: enquanto as fêmeas nocautes quanto ao gene *Ube2A* são inférteis (Roest e col., 2004), machos nocautes quanto a *Ube2B* são estéreis (Roest e col., 1996). Os autores justificam o fenótipo leve apresentado pelos camundongos nocautes *Ube2A* ou *Ube2B*, em contraste com o fenótipo marcante apresentado pela linhagem de levedura  $\Delta rad6$ , pela presença do gene parálogo. Dados que apresentamos no Capítulo II revelam que, nos animais nocautes, a ausência de *Ube2A* não é compensada por aumento na quantidade de *Ube2B*. Embora a cognição não tenha sido avaliada nos camundongos nocautes, a manifestação de sinais clínicos associados a mutação em *UBE2A* recoloca a questão da redundância funcional entre as parálogas humanas. *UBE2A* representa a maior parcela das homólogas humanas de *RAD6* em células Hela (Kim e col., 2009). O fato de *UBE2A* (mas não *UBE2B*) ter transcritos alternativos em humanos também sugere diferenças funcionais. Análises de expressão, apresentadas no Capítulo II, revelam que, embora o transcrito 1 seja o mais abundante, os três transcritos parecem ser ubiquamente expressos. A mutação c.382C→T, localizada no éxon 6 do gene, afeta os três transcritos de *UBE2A* cujas presenças confirmamos nas células de um dos nossos pacientes. A identificação de transcrito alternativo correspondente ao transcrito 3 humano em camundongos, inclusive nos animais nocautes quanto ao gene *Ube2A*, aponta para a necessidade de estudos funcionais que caracterizem a presença e as funções das proteínas codificadas pelos transcritos alternativos.

O fato de a proteína mutada ser encontrada em baixas quantidades nas células do paciente (dados apresentados no Capítulo II) sugere, num primeiro momento, que o quadro seja devido à perda de função de *UBE2A*. Dessa maneira, a presença da paróloga *UBE2B* não seria suficiente para compensar a ausência de

UBE2A, seja por dependência de dose ou funções específicas das parálogas. Existe, entretanto, a possibilidade de que o processo que leva à degradação da proteína UBE2A mutada resulte em desequilíbrio do funcionamento normal da célula, caracterizando um ganho de função. O quadro clínico poderia, ainda, ser influenciado pela perda de função das proteínas codificadas pelos transcritos alternativos exclusivos de *UBE2A*.

Conforme mostramos no Capítulo II, as proteínas codificadas pelos transcritos alternativos 2 e 3 de *UBE2A* não foram detectadas após *Western blotting* dos extratos protéicos de leucócitos e pré-adipócitos humanos. A menor afinidade dos anticorpos comerciais (produzidos a partir da isoforma 1 ou de parte dela) por essas isoformas pode ser uma explicação. Por outro lado, as isoformas podem ainda representar pequena parcela das proteínas celulares e não terem sido detectadas pela técnica de *Western blotting*.

A complexidade do processo de ubiquitinação de proteínas somada à presença da proteína paróloga dificulta a avaliação dos efeitos da alteração ou ausência de uma das isoformas em modelos de mamíferos. Sabe-se que as conjugases de ubiquitina parecem exercer papel importante no desenvolvimento neuronal. O tratamento de células de feocromocitoma de ratos (PC12) com fator de crescimento neuronal (NGF) resulta no crescimento de neuritos, acompanhado de aumento da atividade de enzimas conjugadoras de ubiquitina e dos níveis de conjugados proteína-ubiquitina. Ainda, o tratamento dessas células com NGF concomitantemente com a inibição parcial do mRNA de *UBE2B* resulta na diminuição, em cerca de 25%, do comprimento dos neuritos (Kavakebi e col., 2005). Essa observação sugere que, de maneira similar, a presença da mutação em *UBE2A* possa afetar o mesmo processo. Assim, o estabelecimento de um modelo que permita avaliar o efeito da mutação é de grande interesse para a caracterização do papel da ubiquitinação de proteínas no neurodesenvolvimento. O estabelecimento de cultura de pré-adipócitos de um dos afetados portador da mutação c.382C→T em *UBE2A*, apresentado no capítulo anterior, poderia auxiliar o esclarecimento de tais questões. Ashjian e col. (2003) demonstraram que era possível diferenciar as células precursoras de tecido adiposo em progenitores

neurônais, após o tratamento das células com isobutilmetilxantina, indometacina e insulina. O tratamento resultava na formação de neuritos em cerca de 20-25% das células. Embora essas células não expressem marcadores neuronais maduros, como MAP (*Microtubule associated protein*) e GFAP (*Glial acidic fibrillary protein*) e não resultem em neurônios funcionais, a formação dos neuritos nos levou a considerar esse modelo para estudo do efeito da mutação em *UBE2A*.

A elevada conservação das ortólogas de humanos e de levedura faz da linhagem *Δrad6* outro modelo a ser considerado para avaliar o efeito da mutação c.382C→T de *UBE2A*, bem como para avaliar se as proteínas codificadas pelos transcritos alternativos 2 e 3 de *UBE2A* compartilham funções de conjugase de ubiquitina, como demonstrado para a isoforma codificada pelo transcrito 1. Sabe-se que a expressão das parálogas humanas *UBE2A* e *UBE2B* é capaz de restituir os fenótipos de sensibilidade à UV da linhagem *Δrad6* (Koken e col., 1991, Sarcevic e col., 2002). Ainda, *S. cerevisiae* constitui um sistema experimental versátil para o estudo de processos biológicos complexos (Botstein & Fink, 1988; Fields & Johnston, 2005; Dolinski & Botstein 2005; Johansson & Brett, 2007). Existe uma série de vantagens em utilizar leveduras como modelo para doenças humanas: diversas vias celulares são muito semelhantes em leveduras e mamíferos; o genoma da levedura é bem caracterizado; existem coleções de leveduras nocautes para todos os seus genes, individualmente; estão disponíveis métodos que permitem rapidamente expressar genes de interesse nesse organismo; são vastas as informações disponíveis sobre interações genéticas, assim como interações e localizações protéicas (revisão em Mager & Winderickx, 2005). É um organismo de simples manipulação e seu ciclo de divisão celular é relativamente curto (duplicação da população em cerca de 2 horas). Embora pareça improvável que estudos em levedura possam elucidar mecanismos que levam a alterações neurológicas, existem evidências de que as leveduras são excelente modelo para tal finalidade (revisões em Gilter, 2008; Ocampo & Barrientos, 2008; Miller-Fleming e col., 2008; Winderickx e col., 2008). Diversos grupos têm usado *S. cerevisiae* como modelo para estudo de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson, Huntington, Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica

(revisão em Gilter, 2008), que, embora diferentes em sua patofisiologia, têm como característica comum a formação de agregados protéicos em células do sistema nervoso. Por exemplo, Outeiro & Lindquist (2003) criaram um modelo de levedura que expressa  $\alpha$ -sinucleína, principal proteína encontrada nos corpos de Lewi, inclusões celulares presentes em neurônios de indivíduos com doença de Parkinson. Observaram que a expressão de  $\alpha$ -sinucleína a partir de uma única cópia do gene não resultava em efeito fenotípico, mas que duas cópias eram suficientes para alterar a localização da  $\alpha$ -sinucleína, da membrana para inclusões citoplasmáticas tóxicas. Em seguida, utilizando biblioteca de genes de levedura, expressaram 3000 genes individualmente na linhagem que produzia  $\alpha$ -sinucleína, em busca de genes que combatessem/agravassem a citotoxicidade das inclusões. Curiosamente, muitos dos genes identificados apresentavam ortólogos em humanos. O gene de levedura Ypt1p foi o melhor candidato para a supressão da formação das inclusões. Os resultados foram então validados, utilizando neurônios de ratos: a expressão simultânea de  $\alpha$ -sinucleína e *Rab1* (ortólogo humano de Ypt1p) foi suficiente para reduzir a perda de neurônios dopaminérgicos induzida por  $\alpha$ -sinucleína (Cooper e col., 2006).

Estudos *in vitro* também podem ajudar a avaliar o efeito da mutação c.382C→T e a função das proteínas codificadas pelas isoformas de UBE2A. Sabe-se que RAD6 de *S. cerevisiae* e suas parálogas UBE2A e UBE2B são capazes de ubiquitinar histonas *in vitro*, na presença de E1, ubiquitina e ATP (Sung e col., 1998, Sarcevic e col., 2002). Embora a ubiquitinação de histonas por RAD6, UBE2A e UBE2B, *in vivo*, pareça necessitar da presença de ligase de ubiquitina, *in vitro* essa reação é possível mesmo na ausência da E3. Assim, consideramos que a expressão heteróloga e a purificação das isoformas de UBE2A permitiriam que avaliássemos se elas compartilham a capacidade de ubiquitinação de histonas *in vitro*.

## III. 2 Objetivos

---

Com o estudo descrito neste capítulo, buscamos desenvolver modelos para estudo do efeito da mutação c.382C→T do gene *UBE2A* e para avaliação da função das isoformas de *UBE2A*. Para isso, planejamos (I) avaliar a formação de neuritos após diferenciação de células precursoras de tecido adiposo de portador da mutação; (II) caracterizar o efeito da mutação sobre a função da isoforma 1 de *UBE2A* e avaliar se suas isoformas 2 e 3 compartilham função de conjugase de ubiquitina, por meio de ensaio de complementação funcional em linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* e (III) verificar a capacidade das isoformas 2 e 3 e da isoforma mutada Q128X de *UBE2A* de ubiquitinar histonas H2A *in vitro*, conforme previamente descrito para a isoforma *UBE2A/1*.

## III. 3 Materiais e Métodos

---

### III.3.1 Desenvolvimento de modelo para estudo do efeito da mutação c.382C→T do gene *UBE2A* na formação de neuritos

#### *Cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene UBE2A*

O estabelecimento e os procedimentos de cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene *UBE2A* e de indivíduo controle do sexo masculino, estão descritos no Capítulo II (II.3.2.1).

#### *Citometria de Fluxo*

As células precursoras de tecido adiposo de paciente portador da mutação c.382C→T do gene *UBE2A* (passagem 2) foram caracterizadas quanto a proteínas de superfície por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte System - Guava Technologies*),



para verificação de contaminação por outros tipos celulares. Após tratadas por 5 min com 0,25% tripsina/EDTA, as células foram ressuspensas em meio de cultura e centrifugadas (1400 rpm por 5 min). O *pellet* foi ressuspensado em PBS 1X, na concentração de  $10^5$  células/mL. Para cada anticorpo primário utilizado (HLA-DR-PE, HLA-ABC-FITC, CD13-PE, CD29-PECy5, CD31-PE, CD34-PerCP, CD44-FITC, CD45-FITC, CD73, CD90-PE, e CD117-PE), 200  $\mu$ L da suspensão de células foram incubados por 45 min com o anticorpo, na diluição indicada pelo fabricante (*Becton Dickinson*). As células foram lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 250 mL de PBS 1X gelado e submetidas à análise em comprimento de onda de 488 nm. A cada análise, cerca de 5000 eventos foram avaliados.

#### *Avaliação da Multipotencialidade dos Pré-adipócitos*

Para avaliar a multipotencialidade das células precursoras de tecido adiposo do paciente portador da mutação c.382C→T no gene *UBE2A* (III-2; Figura I.1, pg. 7), as células (passagem 3) foram induzidas a diferenciar-se em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, conforme descrito por Zuk e col. (2002).

Para promover a diferenciação adipogênica, células sub-confluentes foram cultivadas em meio DMEM acrescido de soro bovino fetal 10%, penicilina/streptomicina 1%, dexametasona 1  $\mu$ M (*SIGMA*), 3-isobutil-1-metil-xantina 500  $\mu$ M (*IBMX, SIGMA*), indometacina 200  $\mu$ M (*SIGMA*) e insulina 10  $\mu$ M (*SIGMA*). O meio foi trocado a cada 3-4 dias. A diferenciação em linhagem adipogênica foi observada após 21 dias, pelo acúmulo intracelular de lipídios. Para a confirmação da diferenciação, as células foram fixadas (formaldeído 4% por 30 min), lavadas com PBS 1X e coradas com *Oil Red O* (*SIGMA*) por 20 min.

Para a diferenciação condrogênica, células subconfluentes foram cultivadas em meio DMEM acrescido de soro bovino fetal 10%, penicilina/streptomicina 1%, 6,25  $\mu$ g/mL de insulina, ácido ascórbico-2 fosfato, 50  $\mu$ M (*SIGMA*), 10 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 (*R&D Systems*) e 1% de ITS-Premix (*Becton Dickinson*). O meio foi trocado a

cada 3-4 dias. Após 21 dias, as células foram fixadas (formaldeído 4% por 30 min), lavadas com PBS 1X, e coradas com azul de toluidina.

Para a diferenciação osteogênica, células subconfluentes foram cultivadas em meio DMEM acrescido de soro bovino fetal 10%, penicilina/streptomicina 1%, ascorbato-2-fosfato 50  $\mu$ M, de glicerolfosfato 10 mM (SIGMA) e dexametasona 0,1  $\mu$ M. O meio foi trocado a cada 3-4 dias. Após 21 dias, as células foram coradas com nitrato de prata 1% por 45 min sob luz ultravioleta, seguindo-se 5 min em solução 3% de tiosulfato de sódio e coloração com corante Von Gieson.

### *Diferenciação Neurogênica*

Para promover a diferenciação neurogênica, células subconfluentes foram cultivadas, conforme descrito por Ashjan e col. (2003): após lavagem com PBS 1X, foi adicionado o meio de indução [DMEM, soro bovino fetal 10%, penicilina/streptomicina 1%, 5  $\mu$ g/mL de insulina, indomethacina 200  $\mu$ M (SIGMA) e isobutilmetilxantina 0,5 mM (SIGMA)]. O meio foi substituído a cada três dias, por duas semanas.

### *Imunocitoquímica*

Os ensaios de imunocitoquímica foram realizados após fixação (formaldeído 4% por 30 min) de células cultivadas, precursoras de tecido adiposo, de um indivíduo controle e de um dos pacientes com a mutação c.382C→T do gene *UBE2A* (III-2; Figura I.1, pg. 7). As células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 16 h com o anticorpo de interesse na diluição indicada pelo fabricante. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por uma hora com anticorpo secundário.

### III.3.2 Avaliação da complementação funcional da mutação $\Delta rad6$ de *Saccharomyces cerevisiae*

#### *Linhagens haplóides selvagem e $\Delta rad6$ de *S. cerevisiae**

As linhagens selvagem e  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* (da coleção *Yeast Knockout Mat a haploid, Invitrogen*) nos foram cedidas pelo Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, docente no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP. A linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* consiste em leveduras nocautes quanto ao gene *RAD6*, ortólogo dos genes humanos *UBE2A* e *UBE2B*. Os experimentos foram planejados com o auxílio do Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto e da Dra. Gisele Monteiro, que realizava pós-doutoramento sob sua supervisão. Dra Gisele Monteiro, atualmente docente no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, continuou nos assessorando nos experimentos.

As linhagens selvagem e nocaute foram validadas após amplificação do locus do gene *RAD6* por PCR. As amostras de DNA genômico das linhagens selvagem e  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* foram extraídas conforme previamente descrito (Ausubel e col., 1994). A sequência de bases correspondente ao gene *RAD6* e regiões flanqueadoras foram obtidas no banco de dados de levedura *Sacharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>). Os iniciadores específicos para amplificação de *RAD6* foram desenhados com auxílio do programa PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) (Tabela III.1). As reações de amplificação por PCR partiram de 40 ng de DNA em volume final de reação de 25  $\mu$ L, na presença de Tris 30 mM pH 8,5, KCl 10 mM, HEPES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de iniciadores *forward* e *reverse* e 1 U de *Taq* polimerase. O programa do termociclador consistiu de 30 ciclos, com temperatura de desnaturação de 94° C por 1 min, hibridação a 60° C por 30 s e extensão a 72° C por 1 min, seguidos de extensão final a 72° C por 10 min. Para análise dos resultados, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e a sequenciamento direto, para a confirmação dos segmentos amplificados.

Tabela III.1 Par de iniciadores utilizado para a amplificação do locus do gene *RAD6* de *S. cerevisiae*

Iniciadores	Sequência de bases 5'→3'	Tamanho do segmento de DNA amplificado
RAD6-F	CCAAAGATTATTTTATAGGCAGACA	600 pb
RAD6-R	GCTCGGCATTCATCATTAAG	

### *pYES2.1 TOPO TA Expression Kit (Invitrogen)*

Utilizamos o *kit pYES2.1 TOPO expression TA (Invitrogen)* para a realização dos experimentos de complementação funcional em *S. cerevisiae*. O vetor *pYES2.1 TOPO* permite a ligação direta de produtos de PCR amplificados por *Taq-polimerase* e regula sua expressão em *S. cerevisiae* pela presença ou ausência de galactose no meio de cultura (promotor *GAL1*). O vetor confere resistência à ampicilina, para pré-seleção em bactérias, e permite a síntese de uracila, para a seleção de leveduras transformantes em meio mínimo sem uracila. Permite também a expressão da proteína de interesse em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina C-terminal, o que pode auxiliar na detecção e purificação das proteínas de interesse. O *kit* inclui, também, iniciadores específicos do vetor para sequenciamento e confirmação das clonagens.

### *Escherichia coli termocompetentes*

A linhagem de bactérias *E. coli* termocompetentes *TOP10F'One Shot Chemically Competent* faz parte do *Kit pYES2.1 Topo TA expression (Invitrogen)* e foi utilizada para a transformação do plasmídeo *pYES2.1 TOPO*, na primeira etapa de clonagem dos diferentes transcritos do gene *UBE2A*, para a posterior transformação e expressão em *S. cerevisiae*.

***Obtenção dos cDNA correspondentes aos transcritos do gene UBE2A para expressão das proteínas nativas em S. cerevisiae***

Os cDNA correspondentes aos três transcritos do gene *UBE2A* e do transcrito 1 contendo a mutação c.382C→T foram obtidos a partir de cDNA de indivíduos normais, após extração do RNA de leucócitos com o reagente Trizol (*Invitrogen*), conforme protocolo do fabricante, seguida de reação de RT-PCR (*SuperScript II reverse transcriptase - Invitrogen*).

As regiões codificadoras completas dos transcritos 1 e 2 foram amplificadas simultaneamente (*UBE2A-cDNA F* e *UBE2A-6R*, Tabela III.2), resultando, respectivamente, em fragmentos de 570 pb e 480 pb. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em agarose *low melting* 2% e extraídos do gel, utilizando o *GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)*.

O transcrito 3 foi amplificado separadamente, em duas etapas. A primeira, resulta em um fragmento de 670 pb, utilizando iniciador *forward* específico do transcrito 3 (*UBE2A-cDNA3-F* e *UBE2A-6R*; Tabela III.2). Em seguida realizamos um *nested-PCR*, utilizando um segundo iniciador *forward* complementar à região que contém o códon de início da tradução do transcrito 3 (*UBE2A-cDNA3etapa2-F* e *UBE2A-6R*; Tabela III.2). O fragmento final tinha 309 pb.

No momento da realização do experimento não tínhamos amostra de RNA de indivíduo portador da mutação c.382C→T. Assim, geramos a mutação no transcrito 1 do gene *UBE2A*, a partir de cDNA normal, utilizando o iniciador *forward* *UBE2A-cDNA1e2-F* e um iniciador *reverse*, contendo a troca de base correspondente à mutação (iniciador *cDNA-mismatch R*, Tabela III.2). O fragmento resultante tinha 449 pb.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando o protocolo de PCR *touch-down* descrito no Capítulo II (II.3.2.1). Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e posteriormente, sequenciados para serem, então, clonados no vetor de expressão pYES2.1 TOPO.

Tabela III.2 Pares de iniciadores utilizados para amplificação dos transcritos do gene *UBE2A* e tamanho dos segmentos amplificados. A troca de base que resulta na mutação c.382C→T está sublinhada.

Transcritos De <i>UBE2A</i>	Iniciadores	Sequência de bases 5' →3'	Tamanho do segmento amplificado
1 e 2	UBE2A-cDNA1e2-F UBE2A-6R	AACCCGAGACCCCAGTCTAT GGGAGGTGACAAACACATCA	570 pb e 480 pb
3 (etapa I)	UBE2A-cDNA3-F UBE2A-6R	GGCCCAGTTTCTTAAGGATGTT GGGAGGTGACAAACACATCA	670 pb
3 (etapa II)	UBE2A-cDNA3etapa2-F UBE2A-6R	TGTCTCTAAGATGTTCCATCCAAA GGGAGGTGACAAACACATCA	309 pb
1/c.382C→T	UBE2A-cDNA1e2-F cDNA-mismatch R	AACCCGAGACCCCAGTCTAT CGTTTGTTCTCCTGGTACAGCTAA	449 pb

*Obtenção dos cDNA correspondentes aos transcritos do gene UBE2A para expressão das proteínas em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina em S. cerevisiae*

Para expressão da proteína de interesse em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina na porção C-terminal da proteína de interesse, utilizando o vetor pYES2.1 TOPO, é necessária a retirada do códon de parada do transcrito a ser inserido no vetor. Tais modificações permitem a detecção das proteínas recombinantes com anticorpo anti-histidina ou anti-V5. Ainda, a cauda de histidina, por apresentar afinidade a metais, facilita a purificação da proteína de interesse e dos complexos dos quais ela faz parte.

Com o intuito de identificar esses complexos, desenhamos iniciadores (TABELA III.3, iniciadores *reverse*) complementares à sequência de 21 bases imediatamente anterior ao códon de parada dos transcritos humanos do gene *UBE2A*. No caso da mutação c.382C→T, o iniciador *reverse* era complementar à sequência de 18 bases imediatamente anterior ao sítio da mutação. Os iniciadores *forward* foram os mesmos utilizados para amplificar os transcritos do gene *UBE2A*.

Como molde, utilizamos os transcritos de *UBE2A*, descritos no tópico anterior, clonados no vetor pYES2.1 TOPO.

Tabela III.3 Iniciadores utilizados para amplificação dos transcritos do gene *Ube2a* sem códon de parada e tamanho dos segmentos amplificados.

Transcritos De <i>UBE2A</i>	Pares de Iniciadores	Sequência de bases 5' → 3'	Tamanho do segmento amplificado
1 e 2	UBE2A-cDNA1e2-F Stop alelo normal Rev	AACCCGAGACCCCAGTCTAT ACAATCACGCCAGCTTTGTTC	502 pb e 412 pb
1/c.382C→T	UBE2A-cDNA1e2-F Stop alelo mutado Rev	AACCCGAGACCCCAGTCTAT AGCAGCCTGGCTGTTTGC	427 pb
3	UBE2A-cDNA3etapa2-F Stop alelo normal Rev	TGTCTCTAAGATGTTCCATCCAAA ACAATCACGCCAGCTTTGTTC	217 pb

#### *Ligação dos transcritos de UBE2A ao vetor e transformação em E. coli*

Os produtos de PCR correspondentes aos transcritos 1, 2 e 3 do gene *UBE2A* e o transcrito 1 mutado, na presença e ausência do códon de parada, foram ligados no vetor pYES2.1 TOPO, segundo protocolo do fabricante: 4 µL do produto de PCR foram incubados com 1 µL do vetor e 1 µL de solução salina (NaCl 1,2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,06 M) por 5 min, totalizando oito ligações. Para posterior controle utilizamos o vetor pYES2.1 TOPO sem inserto (vetor vazio). Por ser o vetor Topo linearizado, fizemos uma dupla digestão com as enzimas *Xba*I e *Spe*I para criar extremidades coesivas compatíveis, seguida de ligação com a enzima T4 ligase (*Invitrogen*), o que permitiu a remoção de toda a região com expressão gênica induzida por galactose e a obtenção do vetor vazio.

Após as reações de ligação, os plasmídeos foram transformados em bactérias termocompetentes, segundo protocolo do fabricante (*TOP10F' One Shot Chemically Competent E. coli* - parte do *pYES2.1 TOPO TA expression Kit- Invitrogen*), que foram plaqueadas em meio LB-ágar (Tryptona 1%, extrato de levedura 0,5%,

NaCl 1%, pH 7.0, adicionado de Agar 2%), contendo ampicilina (100 µg/mL), totalizando nove transformações. Após 16 h em estufa a 37° C, 10 colônias de cada um dos ensaios foram selecionadas e cultivadas em LB líquido com ampicilina, também por 16 h. Os plasmídeos foram extraídos por mini-preparação plasmidial (*Fast Plasmid Mini Kit - Eppendorf*). Por tratar-se de vetor TOPO, os insertos poderiam estar tanto na direção correta, como invertidos. Para identificarmos as colônias que continham os insertos posicionados na direção correta, planejamos digestão enzimática com a enzima *PvuII* (*BioLabs*), para os plasmídeos contendo os insertos correspondentes aos transcritos 1, 2 e 3 completos, e digestão com a enzima *AflIII* (*Biolabs*), para o vetor contendo o transcrito mutado completo, uma vez que a presença da mutação remove o sítio da enzima *PvuII*. As reações de digestão consistiram em 4 µL da suspensão de plasmídeo, 1 µL da enzima de restrição, 1 µL de buffer 10X em volume final de 10 µL, incubadas a 37° C por uma hora. Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para a identificação das colônias positivas. Os plasmídeos correspondentes foram sequenciados (MegaBACE™ 1000 – *Amersham Bioscience, GE Healthcare*), utilizando o iniciador *Gal1F*, para assegurar a fidelidade da sequência.

Os plasmídeos contendo os transcritos de *UBE2A* sem o códon de parada e o plasmídeo vazio foram analisados por sequenciamento direto (a partir dos iniciadores *GAL1F* e *V5R* que fazem parte do *kit* do vetor), após mini preparação plasmidial (*Fast Plasmid Mini Kit - Eppendorf*).

### ***Preparação de leveduras competentes e transformação***

As células foram cultivadas em 50 mL de YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%) até OD<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0,8. Após 15 min em repouso no gelo, as células foram centrifugadas (5000 rpm, 5 min, 4° C). O *pellet* foi lavado, duas vezes com água milliQ-45 estéril e gelada e uma vez com sorbitol 1 M, também estéril e gelado. As células foram ressuspensas em 400 µl de sorbitol 1 M gelado e mantidas em gelo. 60-100 µl da suspensão de células foram misturados



a cerca de 500 ng de DNA (plasmídeo de interesse) e, após 1 min em gelo, procedeu-se à eletroporação (cubeta de 0,2 cm, voltagem de 1,25 kV, capacitância de 25  $\mu$ F, resistência 200  $\Omega$  e tempo de eletroporação entre 4 e 5 mseg). Para seleção das transformantes, as células foram plaqueadas em meio mínimo sem uracila (SD-URA<sup>-</sup>: *Yeast Nitrogen Base - AA/AS (Difco)* 0,17%, sulfato de amônia 0,5%, Glicose 2%) (Ausubel e col., 1994), e incubadas em estufa a 30° C por três dias.

#### ***Ensaio de complementação funcional I: estresse por temperatura***

O crescimento das leveduras transformantes foi avaliado a 30° C e 37° C, pois o defeito de proliferação da linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* parece ser mais pronunciado a 37° C (Ellison e col., 1991; McDonough e col., 1995 e Frieberg e col., 2000). As células foram cultivadas a 30° C em SD-URA<sup>-</sup> até a fase estacionária. Cinco microlitros de diluições seriadas de cinco vezes (partindo de OD<sub>600nm</sub> = 0,5) de cultura das linhagens transformantes de *S. cerevisiae* foram semeados em meio SD-URA<sup>-</sup> sólido (YNB-AA/AS (*Difco*) 0,17%, sulfato de amônia 0,5%, agar 2%), contendo glicose 2% ou galactose 2% como fonte de carbono, e incubadas a 30° C ou 37° C por três dias.

#### ***Ensaio de complementação funcional II: resistência à luz ultravioleta (UV-C)***

O crescimento das leveduras transformantes foi avaliado após diferentes tempos (0, 10 s, 30 s e 1 min) de exposição à luz ultravioleta (UV-C), uma vez que a linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* é altamente sensível a agentes que danificam o DNA, como luz ultravioleta e raios  $\gamma$  (Jentsch e col., 1987). Cinco microlitros de diluições seriadas de cinco vezes (partindo de OD<sub>600nm</sub> = 0,5) de cultura em fase estacionária das linhagens transformantes de *S. cerevisiae* foram semeados em meio SD-URA<sup>-</sup> sólido, contendo glicose 2% ou galactose 2% como fonte de carbono, e incubadas a 30° C por três dias.

### *Extração de RNA de levedura*

As leveduras transformantes foram cultivadas a 30° C, com agitação de 250 rpm, por uma noite em meio YPD. No dia seguinte, as culturas foram diluídas em YPD e YPGAL (extrato de levedura 1%, peptona 2%, galactose 2%), a OD<sub>600nm</sub> próxima a 0,2 e novamente cultivadas a 30° C, com agitação de 250 rpm, por uma noite. As células foram coletadas após centrifugação (5000 rpm, 5 min, 4° C), lavadas com água gelada para remoção do meio de cultura e mantidas a -20° C. A extração do RNA foi realizada pelo método do fenol ácido quente (Ausubel e col., 1994): as células foram lisadas com TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5%) na presença de fenol ácido e clorofórmio. Em seguida, o RNA total foi precipitado com etanol absoluto e acetato de sódio 3M (pH 5,3), lavado com etanol 70% e finalmente isolado.

### *Obtenção de sonda para Northern blotting*

A sonda correspondente ao transcrito 1 do gene *UBE2A* foi obtida por marcação radioativa de DNA por oligonucleotídeos iniciadores aleatórios (*Random Primed Synthesis*): foi preparada uma mistura de reação em gelo, contendo desoxirribonucleotídeos exceto ATP, hexanucleotídeos iniciadores (*Boehringer*), o produto de PCR purificado correspondente ao transcrito 1 do gene *UBE2A*, previamente desnaturado a 100° C, enzima *Klenow* (*Invitrogen*), seu respectivo tampão e [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP (*Amersham Bioscience, GE Healthcare*). A reação de polimerização ocorreu a 25° C, por 30 min (Ausubel e col., 1994).

### *Northern blotting*

Cerca de 3 µg de RNA das leveduras transformantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%- formaldeído, por cerca de 1 h 30 min. O RNA foi transferido para membrana de nylon (*Hybond-N, Amersham Bioscience, GE Healthcare*) por capilaridade, utilizando-se solução SSC 20X (cloreto de sódio 3M, citrato de sódio 0,3M). Após secagem por 2 h a 80° C para fixação do RNA, a membrana foi submetida à pré-hibridação, em forno *Hybridiser HB-2D (Techne)* a 40° C, por 6 h, em solução de hibridação contendo SSPE 5X (20X: NaCl 3,6 M, fosfato de sódio 0,2 M, EDTA 0,02 M), solução Denhardt's 5X (100X: BSA 2%, Ficoll 2%, PVP 2%), SDS 0.5%, formamida 50% e DNA de salmão desnaturado. As hibridações foram realizadas com a adição das sondas marcadas, previamente desnaturadas, e incubação a 42° C por no mínimo 12 h. A membrana foi então lavada (soluções com SDS e SSPE, em concentrações decrescentes) e exposta ao filme de raios-X.

### *Extração de proteínas e Western blotting*

As leveduras transformantes foram cultivadas a 30° C, com agitação de 250 rpm, por uma noite em meio YPD. No dia seguinte, as culturas foram diluídas em YPGAL a OD<sub>600nm</sub> próxima de 0,2, e novamente cultivadas a 30° C, com agitação de 250 rpm, por uma noite. Os extratos protéicos de levedura foram obtidos conforme previamente descrito (Ausubel e col., 1994) e os extratos protéicos de células de tecido adiposo, conforme descrito no Capítulo II (II.3.4). A quantificação foi feita em espectrofotômetro (OD<sub>595nm</sub>), utilizando curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA (*bovine serum albumin*) em Bradford (*Biorad*) para o cálculo das concentrações. A técnica de *Western blotting* foi realizada conforme descrito no Capítulo II (II.3.5).

### III.3.3 Ensaio *in vitro*: expressão heteróloga das isoformas de UBE2A e ensaio de atividade para avaliação da capacidade de ubiquitinação de histonas H2A

#### *Vetor de expressão pET15b (Novagen)*

Para expressar e posteriormente purificar maiores quantidades das proteínas de interesse foi utilizado o vetor de expressão pET15b (*Novagen*). O vetor possui três sítios para clonagem do inserto de interesse (*NdeI*, *XhoI* e *BamHI*) e tem sequência para a codificação de cauda de histidina N-terminal, seguida por sítio de clivagem pela protease trombina. Esse vetor possui um promotor viral (T7), que é desreprimido na presença de IPTG (isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo), o que resulta na tradução da sequência de interesse em fusão com cauda de histidina em sua porção N-terminal. A cauda de histidina pode ser posteriormente removida por clivagem com trombina.

#### *Linhagens de bactéria*

##### **DH5- $\alpha$** (*Novagen*)

A linhagem de bactérias DH5- $\alpha$  foi utilizada para transformação com os plasmídeos pET15b ligados aos insertos de interesse, por apresentar altas taxas de transformação e ser bastante eficiente quanto à propagação de plasmídeos.

##### **BL21(DE3)** (*Novagen*)

A linhagem de bactérias BL21(DE3) foi utilizada para a expressão das proteínas de interesse, por apresentar baixos níveis de proteases. Essa linhagem possui o gene lambda DE3, que expressa a RNA polimerase T7 na presença de IPTG. São, portanto, capazes de expressar genes clonados em plasmídeos que contenham o promotor T7.

### **BL21(DE3)-pLysS (*Novagen*)**

A linhagem de bactérias BL21(DE3)-pLysS, além de apresentar baixos níveis de proteases, possui o plasmídeo *pLysS*, que permite a síntese de lisozima induzida pelo mesmo promotor da polimerase, o que resulta na diminuição dos níveis basais da expressão do gene de interesse. É, portanto, ideal para a expressão de produtos gênicos tóxicos.

### **AD494 (*Novagen*)**

A linhagem de bactéria AD494(DE3) apresenta mutação no gene da tiorredoxina-redutase (*trxB*), o que aumenta a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma e conseqüentemente resulta num melhor dobramento das proteínas.

### **C41**

A linhagem de bactéria C41(DE3) foi derivada da linhagem BL21(DE3), conforme descrito por Miroux & Walker (1996). Essa linhagem tem pelo menos uma mutação não caracterizada que evita a morte celular associada à expressão de proteínas recombinantes tóxicas.

### **C43**

A linhagem CD43 foi derivada da linhagem C41, selecionada por apresentar resistência a proteínas tóxicas para C41 (Miroux & Walker, 1996).

### **Origami (*Novagen*)**

Essa linhagem apresenta mutações nos genes da tiorredoxina-redutase (*trxB*) e glutathiona-redutase (*gor*), o que aumenta a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma, e resulta num melhor dobramento das proteínas.

### *Construção de vetores para expressão das isoformas de UBE2A*

Para ligação do inserto ao vetor, utilizamos os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *XhoI*. Os transcritos do gene *UBE2A* foram amplificados a partir do cDNA de uma amostra de indivíduo normal (para a amplificação dos transcritos 1, 2 e 3 do gene) e do cDNA de um dos portadores da mutação c.382C→T, utilizando iniciadores apropriados, nos quais foram inseridos sítios de restrição para as enzimas *NdeI* (iniciador *forward*) e *XhoI* (iniciador *reverse*) (TABELA III.4), conforme protocolo do vetor. As reações de amplificação por PCR partiram de 40 ng de cDNA em volume final de reação de 25 µL, na presença de Tris 30 mM (pH 8,5), KCl 10 mM, HEPES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de iniciadores *forward* e *reverse* e 1 U de *Taq* polimerase. O programa do termociclador consistiu em 35 ciclos, com temperatura de desnaturação de 95° C por 1 min, hibridação a 62° C por 30 s e extensão a 72° C por 1 min, seguidos de extensão final a 72° C por 10 min. Os produtos foram purificados com *GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (Amersham Bioscience, GE Healthcare) e digeridos simultaneamente com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, de acordo com o protocolo do fabricante (*Biolabs*), em volume final de 50 µL. O plasmídeo pET15b foi digerido nas mesmas condições. Tanto os insertos, como o plasmídeo digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose *low melting* 2% e extraídos do gel com *GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). As reações de ligação e as transformações de bactérias DH5-α foram feitas seguindo procedimentos convencionais. Dez colônias das bactérias transformadas eram escolhidas ao acaso para a realização de mini-preparações de plasmídeos. Reações de PCR seguidas de sequenciamento automático (MegaBACE™ - Amersham Bioscience, GE Healthcare) foram realizadas, utilizando iniciadores específicos do vetor (*T7 promoter* e *T7 terminator*), para verificar se os insertos estavam corretamente inseridos e checar a fidelidade das sequências clonadas. Os vetores de expressão foram então transformados na linhagem de bactéria BL21(DE3), para expressão das proteínas de interesse.

Tabela III.4 Pares de iniciadores utilizados para amplificação dos transcritos do gene *UBE2A*. Em vermelho, os códons de início e parada da transcrição. Sublinhados, os sítios de restrição das enzimas o *NdeI* e *XhoI*.

Transcritos De <i>UBE2A</i>	Iniciadores	Sequência de bases 5' → 3'	Segmento amplificado
1, 2 e 1/c.382C→T	Expressão F Expressão R	GGAATTC <u>CAT</u> ATGTCACCCCGGCTC CCGCTC <u>GAGTCA</u> ACAATCACGCC	478 pb e 378 pb
3	Expressão 3F Expressão R	GGGAATTC <u>CAT</u> ATGTTCCATCCAAATGTCCATGC CCGCTC <u>GAGTCA</u> ACAATCACGCC	235 pb

### *Superexpressão das proteínas em bactéria*

Para cada um dos transcritos de interesse foi preparado pré-inóculo de bactérias transformadas com o vetor de expressão (pET15b + Transcrito 1, pET15b + Transcrito 2, pET15b + Transcrito 3 ou pET15b + Transcrito 1/c.382C→T), em 50 ml de meio LB/Amp (100 µg/ml), e incubado por 16 h. No dia seguinte, foi inoculado em 1 L de meio LB/Amp, em OD<sub>600nm</sub> inicial de 0,2. A OD<sub>600nm</sub> foi mensurada a intervalos de uma hora até atingir 0,6 - 0,8, quando foi adicionado IPTG, na concentração final de 0,5 mM, seguindo-se incubação a 37° C por 3 h com agitação. O *pellet* de células foi coletado após centrifugação a 4000 rpm por 10 min. Nos casos em que a expressão das proteínas de interesse em BL21(DE3) resultou na formação de agregados protéicos (corpos de inclusão), procedeu-se à transformação de diferentes linhagens de bactéria, que foram cultivadas em concentrações variáveis de IPTG (0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM e 1 mM) a 37° C por 3 h e 20° C por 16 h.

### *Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a metais*

O *pellet* de células, obtido após protocolo de superexpressão, foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M e imidazol 20 mM. O inibidor de protease PMSF (fenilmetilsulfonil fluorídrico) foi adicionado na concentração final de 1 mM. Para cada 1 L de meio LB utilizado na cultura, adicionou-se 30 mL de tampão. A lise das células bacterianas foi realizada em cinco ciclos de 45 s de sonicação, usando a potência 40% (sonicador da *Branson Ultrasonics Corporation*), seguidos de 60 s de descanso. Em seguida, adicionou-se solução de sulfato de estreptomicina na concentração final de 1%, para auxiliar a precipitação do DNA. As células lisadas foram mantidas sob agitação por no mínimo 20 min em gelo. Em seguida o lisado foi centrifugado (15000 rpm, por 40 min a 4<sup>o</sup> C). O sobrenadante foi recolhido e o *pellet*, congelado.

As proteínas UBE2A/1 e UBE2A/Q128X em fusão com uma cauda de histidina foram purificadas a partir da fração solúvel do lisado de bactérias, utilizando coluna cuja resina possui o íon Ni<sup>+2</sup>, ao qual a cauda de histidina se liga. Utilizamos o *Kit HiTrap (GE Healthcare)*, seguindo protocolo descrito pelo fabricante.

Nos casos em que as proteínas de interesse não se encontravam na fração solúvel e sim em agregados protéicos do lisado de bactérias (UBE2A/2 e UBE2A/3), os corpos de inclusão foram purificados da fração insolúvel, segundo protocolo do reagente de extração de proteínas *BugBuster Master mix (Novagen)*. Em seguida, os corpos de inclusão foram ressuspensionados em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM e ureia 6 M. A purificação foi realizada em colunas de níquel, conforme descrito acima, com adição de ureia 6 M a todos os tampões utilizados.

As tentativas de renaturação foram realizadas por gradiente de ureia em diálise em membrana semipermeável ou segundo protocolo do fabricante da coluna *HiTrap (GE Healthcare)*. A isoforma 3 de UBE2A apresentou-se solúvel após diálise em gradiente de ureia, em tampão citrato 20 mM pH 3,8, NaCl 0,1 M; para



a isoforma 2 de UBE2A, a solubilidade foi obtida após diálise em gradiente de uréia em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 5,5, NaCl 0,1 M.

***Ensaio in vitro para avaliar a capacidade de ubiquitinação de histonas H2A das diferentes isoformas de UBE2A***

O ensaio *in vitro* para avaliar a capacidade das isoformas de UBE2A de ubiquitinar histonas H2A foi realizado conforme previamente descrito (Sarcevic e col., 2002): a reação continha cerca de 200 ng de UBE2A (ou de suas isoformas), 1 µg de ubiquitina His-tag (SIGMA), 10 µg de histona H2A bovina (SIGMA) e 500 ng de E1 de coelho (SIGMA), em tampão Tris 20 mM pH 7,5, DTT 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e ATP 1 mM, em volume final de 20 µL. A reação é iniciada pela adição da enzima E1, que deve, portanto, ser o último componente adicionado à reação. As misturas foram incubadas a 37° C por 90 min e finalizadas pela adição de 5 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 200 mM pH6,8; SDS 6%, Glicerol 30%, 2-mercaptoetanol 15%; azul de bromofenol 0,06%) e desnaturação por 2 min a 100° C. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 14%, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo primário, diluído em TBS/Tween 0,1%, por cerca de 16 h. A membrana foi, então, lavada e incubada com o anticorpo secundário por 1 h. A detecção foi realizada de acordo com protocolo do kit utilizado (*ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Reagent and Detection System, GE Healthcare*). As membranas foram escaneadas utilizando o scanner STORM<sup>TM</sup> (*GE Healthcare*) para a visualização da fluorescência.

**Ubiquitina His-Tag (SIGMA)**

A molécula de ubiquitina humana recombinante em fusão com cauda de histidina na porção N-terminal é capaz de substituir a ubiquitina nativa na formação de cadeias de múltiplas ubiquitinas nas proteínas-alvo. A cauda de histidina permite a detecção da ubiquitina por anticorpos anti-histidina. Enquanto

a ubiquitina recombinante tem peso molecular de 10,7 kDa, a ubiquitina nativa tem peso molecular de 8,5 kDa.

### **Histona H2A bovina (SIGMA)**

Histona H2A bovina liofilizada, extraída do timo de bezerros.

### **Enzima ativadora de ubiquitina E1 de coelho (SIGMA)**

Responsável pelo primeiro passo no processo de ubiquitinação de proteínas, a enzima E1 de coelho é uma proteína de aproximadamente 110 kDa que catalisa, em reação dependente de ATP, a ativação do grupo C-terminal da ubiquitina, formando ponte tioéster que permite que a molécula de ubiquitina seja transferida para enzimas do tipo E2. A enzima é fornecida em solução HEPES 50 mM pH 7,6.

### ***Anticorpos utilizados***

#### **Anti-RAD6 (Abcam)**

Anti-RAD6 é um anticorpo policlonal obtido após imunização de coelhos com peptídeo sintético derivado dos resíduos de aminoácidos 1-100 de uma das proteínas ortólogas humanas de RAD6 - UBE2A ou UBE2B, ambas com 152 resíduos de aminoácidos. O fabricante não deixa claro qual das parálogas humanas foi utilizada.

#### **Anti-HR6A/HR6B (Cell Signaling)**

Anti-HR6A/HR6B é um anticorpo policlonal obtido após imunização de coelhos com peptídeo sintético em fusão com KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), derivado dos resíduos da região N-terminal da proteína humana UBE2A. A empresa não especifica exatamente quais são esses resíduos

### **Anti-ubiquitina (SIGMA)**

Anti-ubiquitina é anticorpo monoclonal obtido após imunização de camundongos com ubiquitina bovina em fusão com KLH.

### **Anti-V5 (Invitrogen)**

Anti-V5 é anticorpo que permite a detecção de proteínas recombinantes que contêm o epítipo V5. Este epítipo é encontrado nas proteínas P e V de paramixovírus (Southern e col., 1991). O anticorpo reconhece a sequência aminoácidos GKPIPPLLGLNST.

### **Anti- $\beta$ -actina (Abcam)**

O anticorpo anti- $\beta$ -actina produzido em camundongos foi utilizado como controle endógeno.

### **III.3.4 Produção de Anticorpo para a detecção das isoformas do gene *UBE2A***

A proteína recombinante correspondente à isoforma codificada pelo transcrito 3 do gene *UBE2A*, purificada a partir dos corpos de inclusão de *E. coli*, foi utilizada para imunizar coelhos albinos. A produção do anticorpo, chamado de Anti-*UBE2A*/ISO3, foi realizada por equipe técnica do laboratório da Dra. Marilene Demasi, pesquisadora do Instituto Butantã. A imunização foi realizada conforme protocolo previamente estabelecido naquele laboratório, compreendendo, em linhas gerais, três injeções da proteína de interesse com intervalo de um mês entre elas; a primeira foi injeção intramuscular de 0,5 mg de proteína em adjuvante Freund<sup>€</sup>™ (*SIGMA*), seguida de duas injeções intradérmicas de 0,2 mg. O soro pré-imune foi coletado antes de cada imunização

e o título foi determinado por imunoenensaio de ELISA contra UBE2A/3 recombinante. Testamos a especificidade do anticorpo em nosso laboratório, por *Western blotting*.

### III.3.5 Ensaio de inibição do proteassoma em cultura de pré-adipócitos humanos

Células precursoras de tecido adiposo (passagem 3) do paciente e de indivíduo controle foram cultivadas em meio DMEM /SBF 10% até perto da confluência, quando foi adicionado o inibidor clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona (SIGMA), na concentração final de 20  $\mu$ M. Como controle, adicionamos ao meio o mesmo volume de DMSO (solvente do inibidor). Após seis horas de incubação as células foram tratadas com tripsina e ressuspensas em meio DMEM. As células foram recolhidas após centrifugação (1200 rpm por 5 min), lavadas com PBS 1X e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O *pellet* de células foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A lactacistina e seu derivado *clasto*-lactacistina  $\beta$ -lactona são inibidores específicos do proteassoma, enquanto os peptídeos aldeídos comumente usados (MG115 e MG132), além do proteassoma, inibem proteases lisossômicas e calpaínas. Em solução aquosa, a lactacistina é convertida em sua forma ativa  $\beta$ -lactona (Dick e col., 1996), que apresenta maior capacidade de atravessar membranas celulares. Ela age como pseudossustrato e se liga covalentemente aos grupos hidroxila do resíduo de treonina do sítio ativo das subunidades  $\beta$ , inibindo de maneira irreversível a atividade do proteassoma.

Para avaliação do efeito da inibição do proteassoma sobre o processo de degradação da isoforma mutada de UBE2A (UBE2A/Q128X), as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ l tampão de lise (HEPES 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 0,5% e PMSF 1 mM) e mantidas à temperatura ambiente por 5 min; em seguida, o processo de lise foi auxiliado mecanicamente, utilizando-se seringa de insulina. As amostras foram mantidas em repouso no gelo por 20 min e centrifugadas a 13000 rpm por 30 min. O extrato foi quantificado e

cerca de 50 µg foram desnaturados por 5 min a 95° C, submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 14% e em seguida transferidos para membrana de nitrocelulose, conforme descrito no tópico *Western blotting* em III.3.2. A detecção foi realizada após incubação com anticorpo anti-RAD6 (16 h), seguindo protocolo do *kit* utilizado (*ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Reagent and Detection System, GE Healthcare*).

### III.3.6 Avaliação do efeito de mutações em UBE2A quanto a sua capacidade de autoubiquitinação

Avaliamos o efeito das duas mutações de *UBE2A* descritas por Tarpey e col. (2009) quanto à capacidade de autoubiquitinação da proteína UBE2A. Uma dessas alterações consiste na troca de uma citosina por uma timina na posição 215 da região codificadora do gene (c.215C→T) e resulta na troca do códon TTT, que codifica o aminoácido fenilalanina, pelo códon TCT, que codifica o aminoácido serina (F72S). A segunda delas, a substituição de uma citosina por uma guanina na posição 328 da região codificadora (c.328C→G), resulta na troca do códon CAG, que codifica uma glutamina, pelo códon GAG, que codifica ácido glutâmico (Q110E).

As mutações foram geradas utilizando o *kit QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene)*. Os iniciadores foram desenhados conforme recomendado pelo fabricante do *kit* (Tabela III.5). Como molde, utilizamos o plasmídeo pET15b ligado ao transcrito 1 de *UBE2A* (pET15b + Transcrito 1). A presença das mutações foi confirmada por sequenciamento automático; em seguida procedeu-se à transformação da linhagem de bactéria BL21(DE3) com os plasmídeos. A superexpressão e a purificação das proteínas foram realizadas conforme descrito para a UBE2A/1 (ver tópico *Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a metais* em III.3.3). O ensaio foi realizado de acordo com Sarcevic e col. 2002, porém na ausência de histonas. O tempo de incubação foi de 60 min. Após finalização, pela adição de tampão redutor, e desnaturação por 2 min a 100° C, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 14% e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose. A detecção foi realizada após incubação com

anticorpo anti-RAD6 (16 h) seguindo protocolo do *kit* utilizado (*ECL Plus™ Western Blotting Reagent and Detection System, GE Healthcare*). A avaliação do efeito das mutações sobre a capacidade de ubiquitinação de histonas não foi realizada devido a problema com o lote do anticorpo anti-ubiquitina (*SIGMA*).

Tabela III.5 Pares de iniciadores utilizados para gerar as alterações de aminoácidos F72S e Q110E descritas por Tarpey e col.(2009). Sublinhados, os códons alterados para geração das mutações correspondentes: o códon TCC codifica o aminoácido serina (S) e o códon GAG codifica o ácido glutâmico (E). Os iniciadores F e R são complementares.

Iniciadores	Sequência de bases
F72S- F	5'- CAAATAAACCACCTACAGTTAGAT <u>TCC</u> GTCTCTAAGATGTTCCATCC -3'
F72S- R	5'- GGATGGAACATCTTAGAGAC <u>GGAT</u> CTAACTGTAGGTGGTTTATTG-3'
Q110E -F	5'- CTTCCATTCTAACATCCATAGAG <u>TCT</u> CTCTGTTGGATGAACCAATC-3'
Q 110E- R	5'- GATTGGTTCATCCAACAGAGAC <u>TCT</u> TATGGATGTTAGAATGGAAG-3'

### III.4 Resultados

#### III.4.1 Ensaios *in vivo*

##### III. 4.1.1 Modelo celular para avaliação do efeito da mutação sobre a formação de neuritos

##### *Cultura de pré-adipócitos de portador da mutação c.382C→T do gene UBE2A*

A separação das células multipotentes de tecido adiposo do paciente portador da mutação c.382C→T foi realizada por aderência, conforme previamente descrito (Zuck e col., 2002) e detalhado no Capítulo II (II.3.2.1). A Figura III.1 mostra a aparência das células nas diferentes etapas do processo de

isolamento. Não foram observadas diferenças morfológicas óbvias entre as células do paciente e do controle.

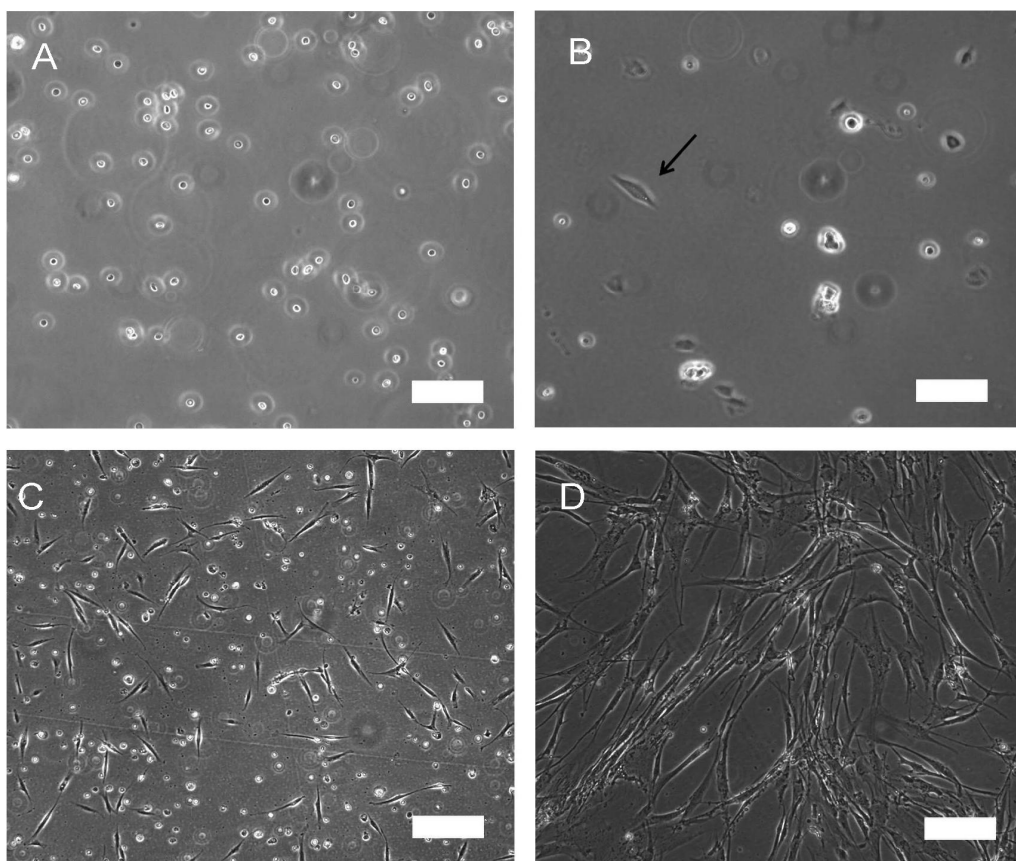


Figura III.1 Aspecto das células isoladas de tecido adiposo. A: em suspensão (barra: 200  $\mu\text{m}$ ). B, 45 min após serem semeadas; a seta indica célula aderida (barra: 100  $\mu\text{m}$ ). C, 48 h após semeadas; as células não aderidas são descartadas (barra: 200  $\mu\text{m}$ ). D: morfologia semelhante à de fibroblastos (barra: 100  $\mu\text{m}$ ). Créditos da imagem: Natássia Vieira.

As células foram caracterizadas por citometria de fluxo quanto a 11 marcadores de superfície celular (HLA-DR, HLA-ABC, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, e CD117) para confirmação de sua origem mesenquimal. As características previamente descritas para células precursoras de tecido adiposo foram confirmadas (Zuk e col., 2002): não expressaram o marcador de células endoteliais (CD31) nem os marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD45 e CD117); expressaram altos níveis de glicoproteínas transmembrana (CD13 e CD44) e de proteínas de adesão (CD29 e CD90). A marcação positiva de

CD73 confirmou tratar-se de células multipotentes mesenquimais. A marcação foi negativa quanto ao marcador HLA-DR (antígeno de classe II do complexo de histocompatibilidade), mas positivas para o marcador HLA-ABC (antígeno de classe I do complexo de histocompatibilidade). Os resultados da análise podem ser visualizados na Figura III.2.

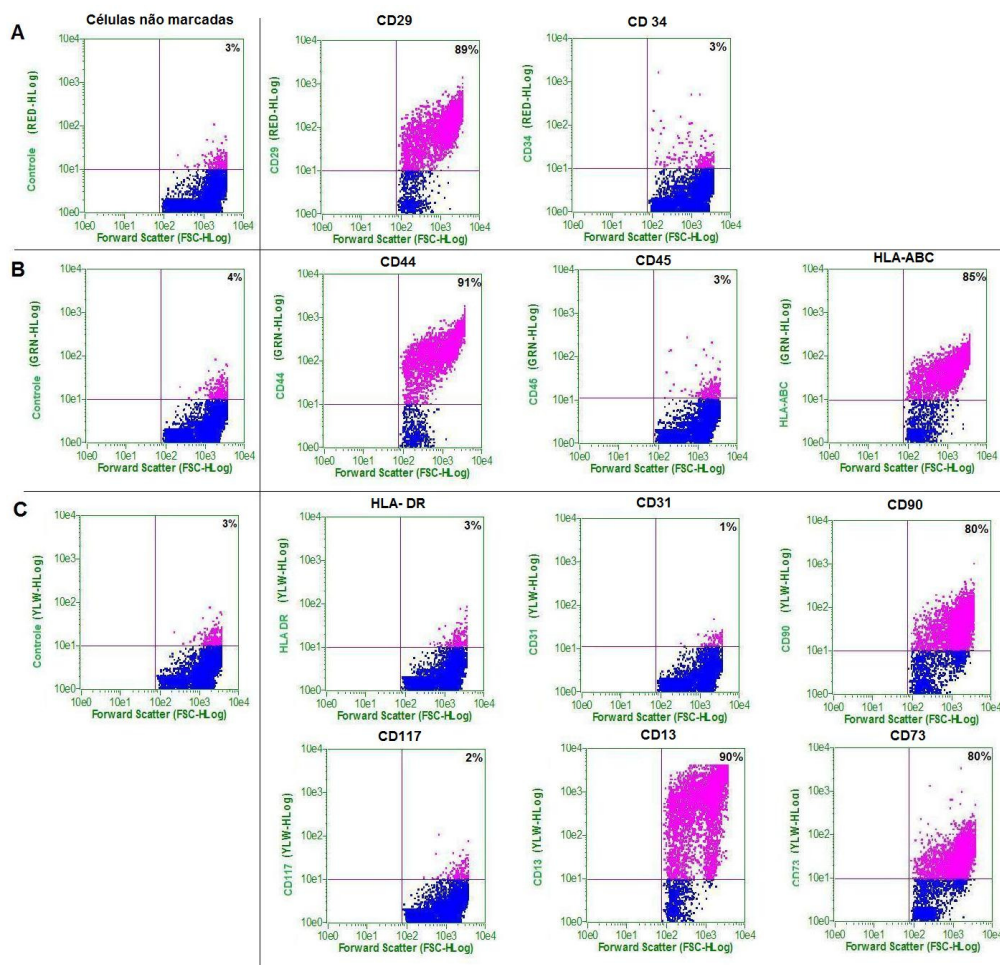


Figura III.2 Caracterização das células precursoras de tecido adiposo por citometria de fluxo (dispersão *versus* intensidade da fluorescência): na coluna à esquerda, os gráficos correspondem às células não marcadas (controles); os demais gráficos mostram a análise de 11 marcadores de superfície celular. O nome do marcador e as porcentagens de células marcadas reativas estão indicados em cada gráfico. As análises nos diferentes comprimentos de onda foram agrupadas em A, vermelho, B, verde e C, amarelo.



## *Plasticidade das células precursoras de tecido adiposo*

### **Diferenciação em linhagens mesenquimais**

A plasticidade das células precursoras de tecido adiposo do paciente foi verificada três semanas após o início da indução da diferenciação. O sucesso da diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica foi demonstrado pela presença de vacúolos lipídicos, depósitos ricos em mucopolissacarídeos e depósitos de cálcio, respectivamente (Figura III.3). Não foram observadas diferenças no processo de diferenciação, seja com relação ao tempo ou aos aspectos morfológicos, quando comparamos as células do paciente com as células do indivíduo controle.

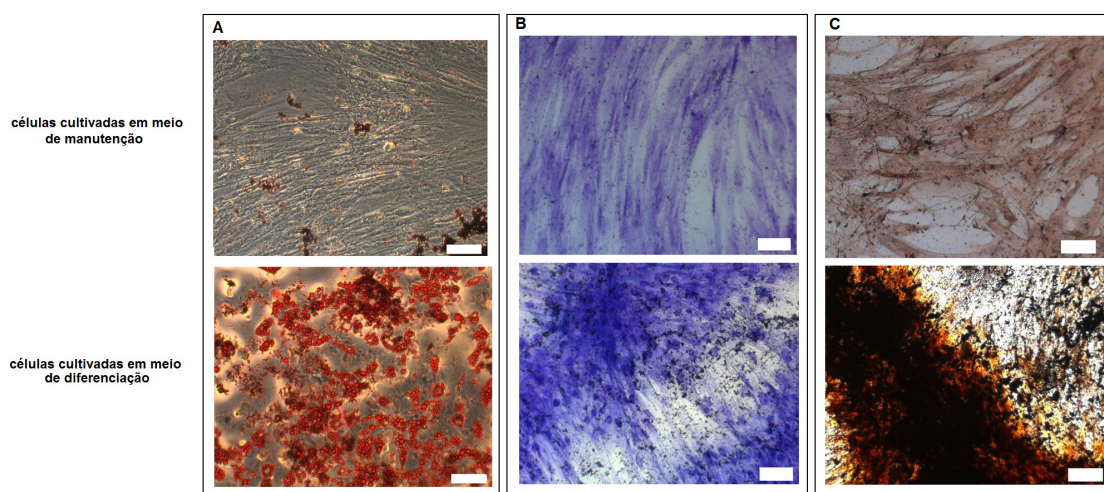


Figura III.3 Plasticidade das células precursoras de tecido adiposo de paciente portador da mutação c.382C→T do gene *UBE2A* após 21 dias em meio de diferenciação. A: diferenciação adipogênica evidenciada pela presença de vacúolos lipídicos corados com *Oil Red O* (barra branca corresponde a 200  $\mu$ m); B: diferenciação em linhagem condrogênica evidenciada pela presença de depósitos ricos em mucopolissacarídeos corados com azul de toluidina (barra branca, 100  $\mu$ m); C: diferenciação osteogênica; evidenciada pela presença de depósitos de cálcio corados com corante de Von Gieson (barra branca, 100  $\mu$ m).

## Diferenciação em linhagem neuronal

A indução da diferenciação em linhagem neuronal foi realizada segundo Ashjian e col. (2003). Após duas semanas de tratamento com isobutilmetilxantina, indometacina e insulina, verificamos que uma pequena porcentagem (aproximadamente 5%) das células apresentou modificação da morfologia, apresentando estruturas semelhantes a neuritos. A morfologia adquirida após diferenciação das células do indivíduo controle e do portador de mutação em *UBE2A*, após diferenciação, foi semelhante quando comparadas uma com a outra, porém diferente da morfologia adquirida pelas células diferenciadas por Ashjian e col. (2003) (Figura III.4). A indução da diferenciação foi realizada duas vezes e os resultados obtidos não diferiram.

Técnica de imunocitoquímica com anticorpo anti-NF200, específico de neurônios maduros, revelou marcação em aproximadamente 25% das células; a marcação não foi exclusiva das células que exibiram prolongamentos (Figura III.5). A marcação foi mais intensa após indução da diferenciação, o que indica início/aumento da expressão desse marcador. A marcação visualizada na ausência de indução de diferenciação foi semelhante à visualizada na presença apenas do anticorpo secundário.

Com as células precursoras de tecido adiposo não conseguimos, portanto, obter um modelo para o estudo do efeito da mutação de *UBE2A* na formação de neuritos. Entretanto, o estabelecimento de cultura de pré-adipócitos permitiu a realização de ensaios de imunocitoquímica. Os ensaios com os anticorpo Anti-RAD6 (*Abcam*) e Anti-HR6A/HR6B (*Cell Signaling*) foram realizados na ausência de indução de diferenciação. Não houve marcação após incubação com o anticorpo Anti- HR6A/HR6B (*Cell Signaling*) (Figura III.6 B). A marcação do anticorpo Anti-RAD6 (*Abcam*) foi difusa por todo citoplasma (Figura III.6 C). Não observamos diferenças marcantes entre a amostra controle e a amostra do paciente.

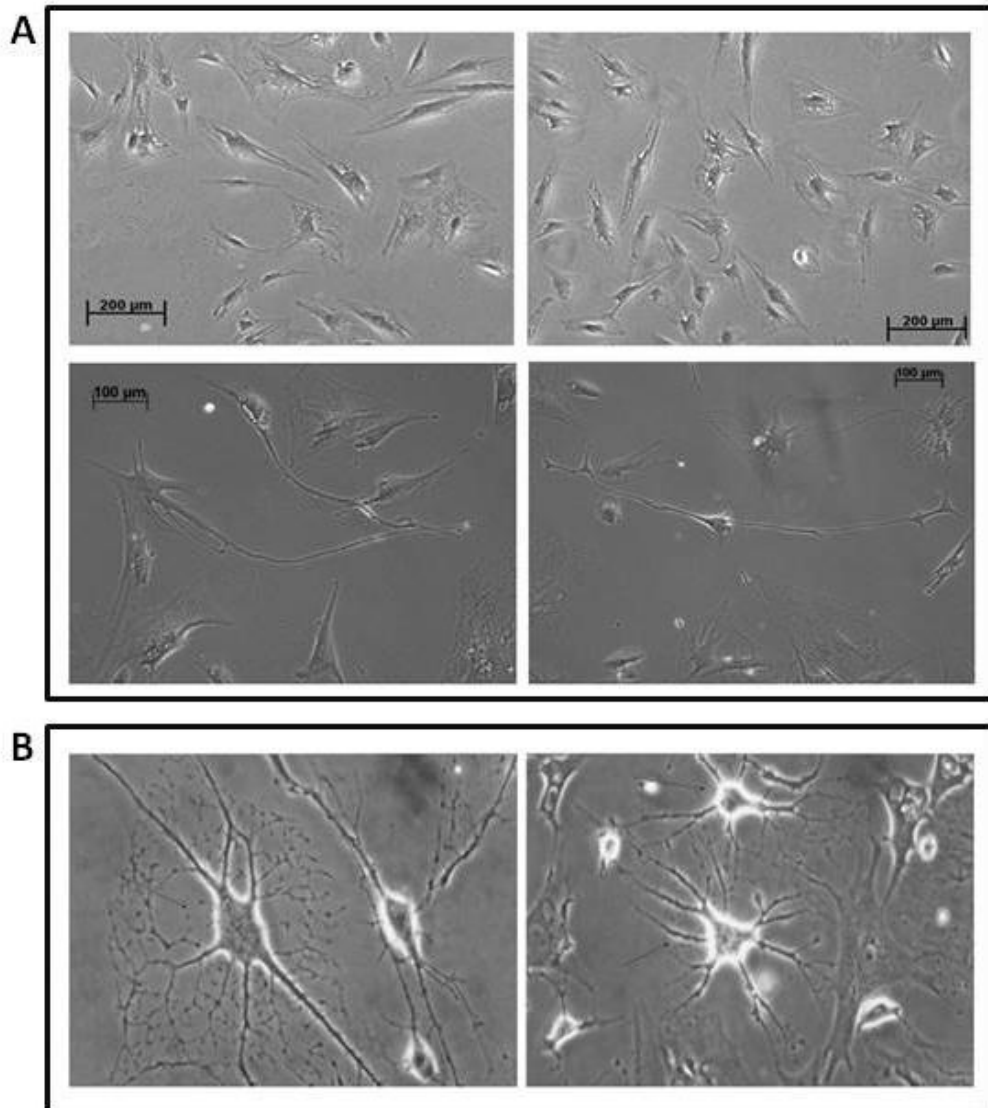


Figura III.4 Diferenciação das células precursoras de tecido adiposo em precursores neuronais. A: morfologia apresentada pelas células do controle (esquerda) e do paciente (direita) após duas semanas em meio de diferenciação. B: foto publicada por Ashjian e col. (2003), aqui reproduzida para fins comparativos.

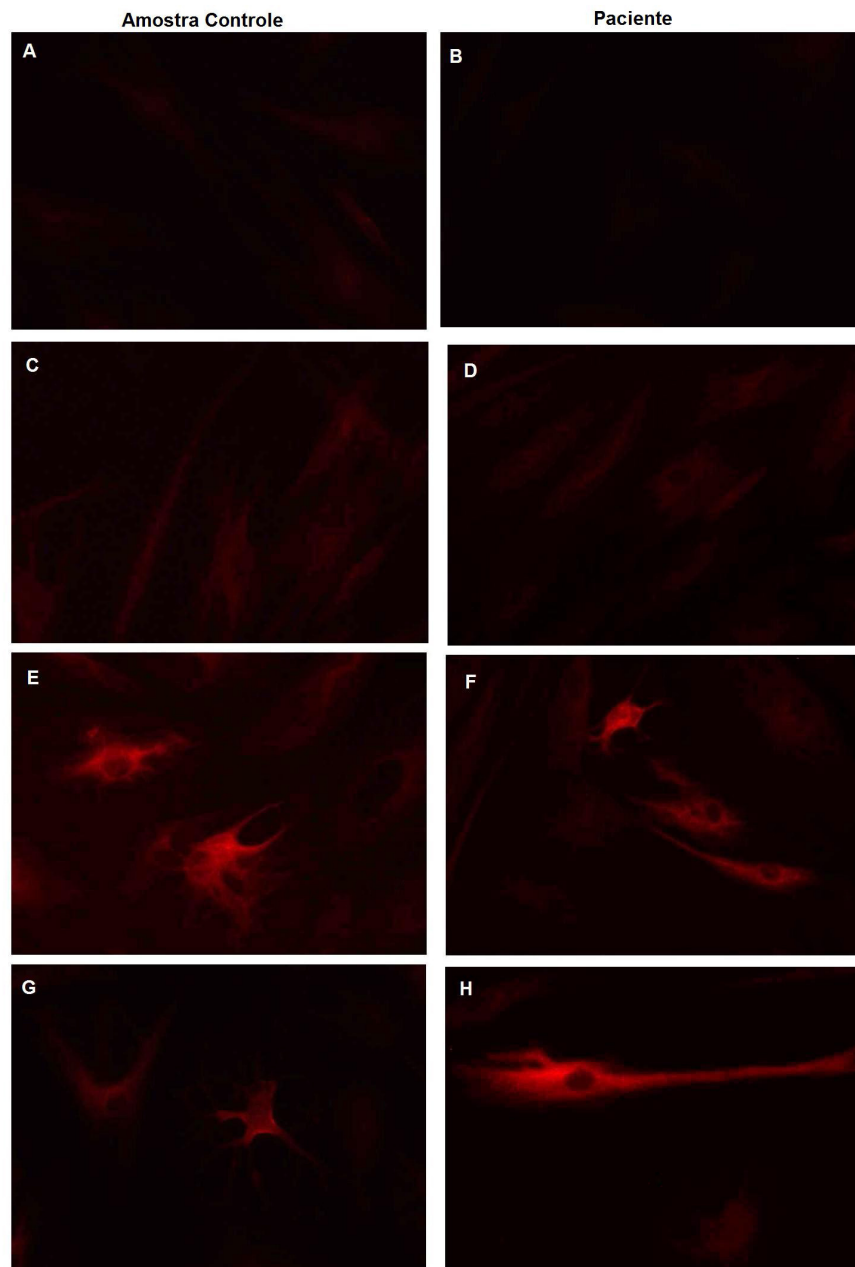


Figura III.5 Imunocitoquímica em pré-adipócitos, utilizando Anti-NF200. A e B: controle (anticorpo secundário). C e D: marcação na ausência de indução de diferenciação. E e F: marcação após 21 dias em meio de indução. G e H: detalhes de células apresentando morfologia neuronal.

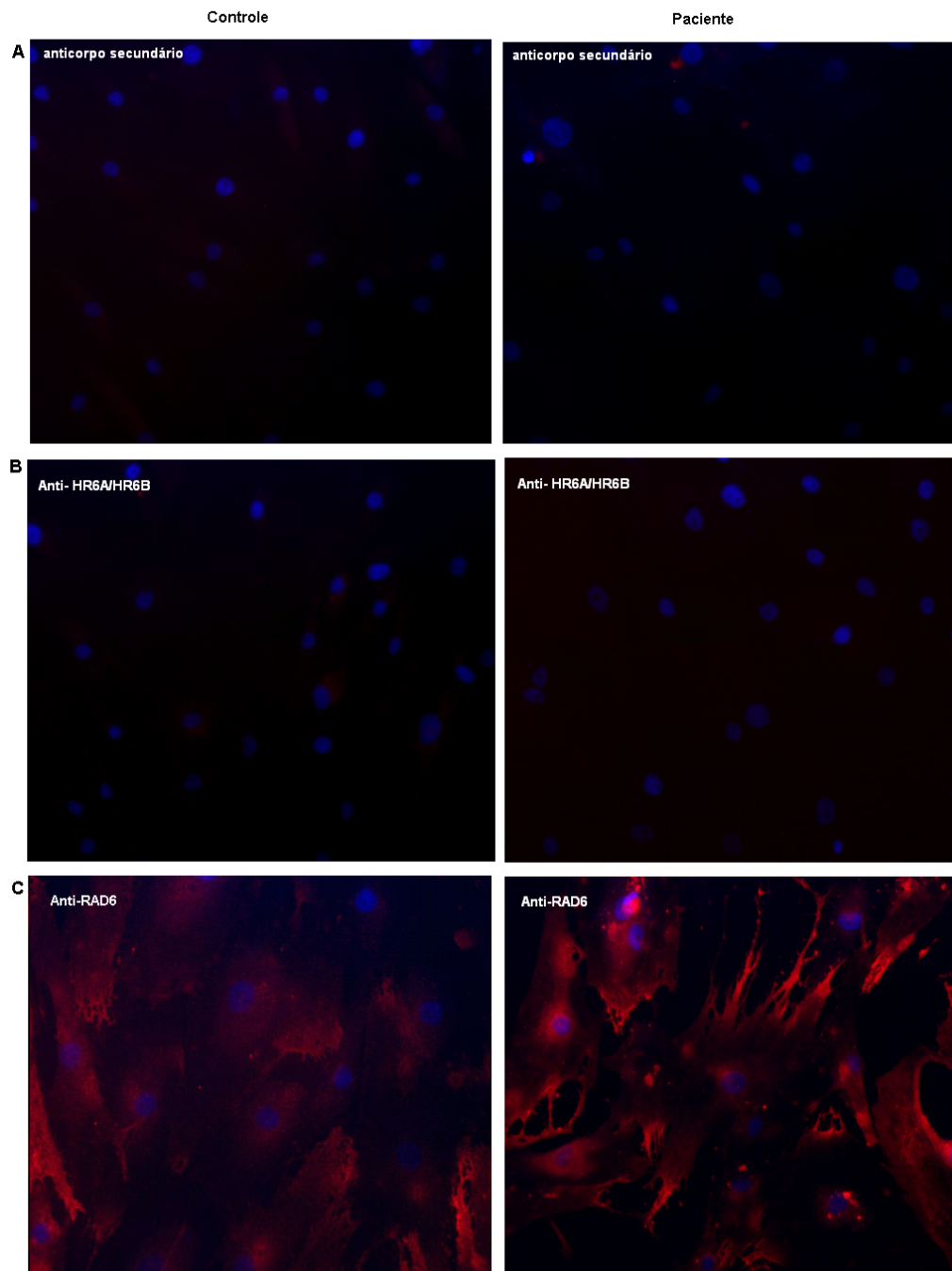


Figura III.6 Imunocitoquímica de pré-adipócitos do controle e do paciente. Os núcleos foram corados com DAPI. A: células incubadas apenas com anticorpo secundário; B: células incubadas com anti-HR6A/HR6B; C: células incubadas com anti-RAD6.

### III.4.1.2 Ensaio de complementação funcional em linhagem $\Delta rad6$ de *S. cerevisiae*

#### *Confirmação das linhagens selvagem e $\Delta rad6$ de *S. cerevisiae**

As linhagens selvagem e  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* foram validadas após eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR amplificados a partir de iniciadores específicos que flanqueiam o gene *RAD6* (Figura III.7). O fragmento de 600 pb, correspondente ao gene *RAD6* foi amplificado a partir de amostra de DNA de levedura controle (comercial) e da amostra de DNA extraída da linhagem selvagem (Wt) utilizada nestes estudos. O fragmento de aproximadamente 1400 pb amplificado a partir de DNA da linhagem  $\Delta rad6$  corresponde ao gene *RAD6* interrompido pelo gene de resistência ao antibiótico G418 (geneticina), utilizado no processo de recombinação homóloga que resulta na linhagem nocaute.

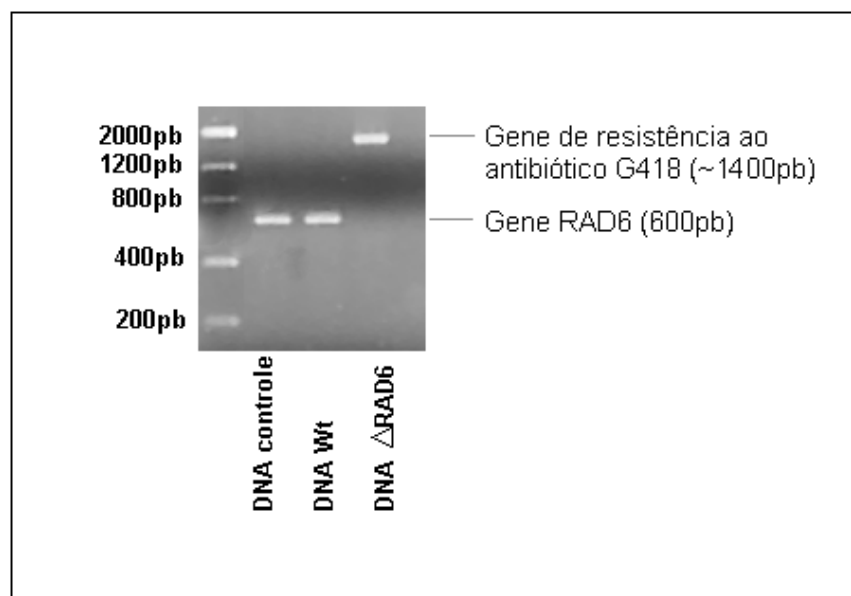


Figura III.7 Fragmentos amplificados por PCR com iniciadores que flanqueiam o gene *RAD6*: o fragmento de 600 pb corresponde ao gene *RAD6*; o fragmento de 1400 pb corresponde ao gene *RAD6*, interrompido pelo gene de resistência ao antibiótico G418.

### *Obtenção dos transcritos do gene UBE2A completos*

A região codificadora completa dos transcritos 1, 2 e 3 de *UBE2A* e transcrito 1 contendo a mutação c.382C→T foram amplificadas simultaneamente por PCR e os produtos validados por sequenciamento automático, conforme descrito no tópico (III.3.2).

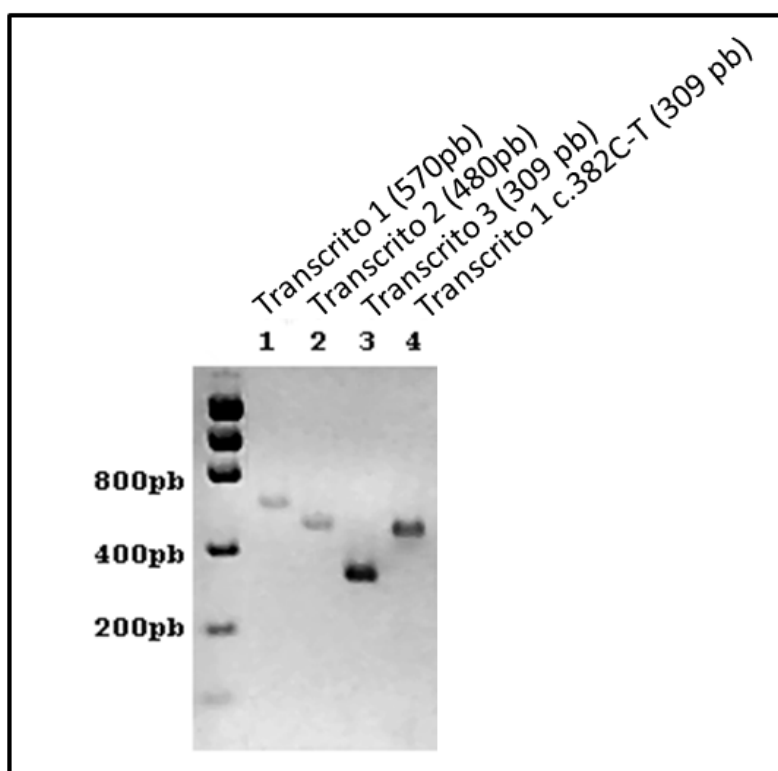


Figura III.8 Fragmentos correspondente às regiões codificadoras completas dos transcritos 1, 2 e 3 do gene *UBE2A* e do transcrito 1, contendo a mutação c.382C→T.

### *Identificação das colônias positivas*

As ligações dos insertos no plasmídeo pYES2.1 TOPO foram realizadas conforme protocolo do fabricante. A identificação dos plasmídeos contendo os transcritos do gene *UBE2A* inseridos corretamente no vetor foi realizada após extração de plasmídeos de dez colônias de *E. coli* resultantes de cada transformação, seguida da digestão pela enzima *PvuII*, que apresenta um único sítio de corte no vetor, assim como no inserto. A digestão dos plasmídeos contendo os transcritos 1, 2 e 3 inseridos na direção correta resulta na excisão de fragmentos de 471 pb, 381 pb e 210 pb, respectivamente. Caso eles estejam inseridos de maneira invertida, a digestão resulta, nos três casos, na excisão de um fragmento de 181 pb. Os produtos das digestões foram visualizados após eletroforese em agarose 2%. Das dez colônias analisadas, quatro continham o transcrito 1 inserido corretamente, duas, o transcrito 2 e seis, o transcrito 3 (Figura III.9 A, B e C, respectivamente).

Como a mutação c.382C→T remove o sítio de restrição da enzima *PvuII*, selecionamos a enzima *AflIII*, para análises dos plasmídeos contendo o transcrito mutado. A digestão dos plasmídeos contendo o transcrito 1 mutado inserido na direção correta resulta na excisão de um fragmento de 474 pb, além de quatro outros, correspondentes aos cortes em sítios do vetor: bandas de 2982 pb, 2395 pb, 264 pb e 220 pb. Quando inserido de maneira invertida, a digestão resulta na excisão de uma banda de 115 pb além de bandas de 3341 pb, 2395 pb, 264 pb, 220 pb. Para confirmar a presença da mutação, os plasmídeos foram também digeridos com *PvuII*. O esquema do vetor ligado ao transcrito mutado e o resultado da análise das dez colônias correspondentes, após digestão com *AflIII* ou *PvuII*, estão apresentados na Figura III.9 D. Sete das 10 colônias analisadas continham o transcrito mutado inserido corretamente e todas continham a mutação. O sequenciamento automático dos plasmídeos, utilizando o iniciador *GAL1*, confirmou a integridade e a fidelidade da sequência dos quatro insertos de interesse.



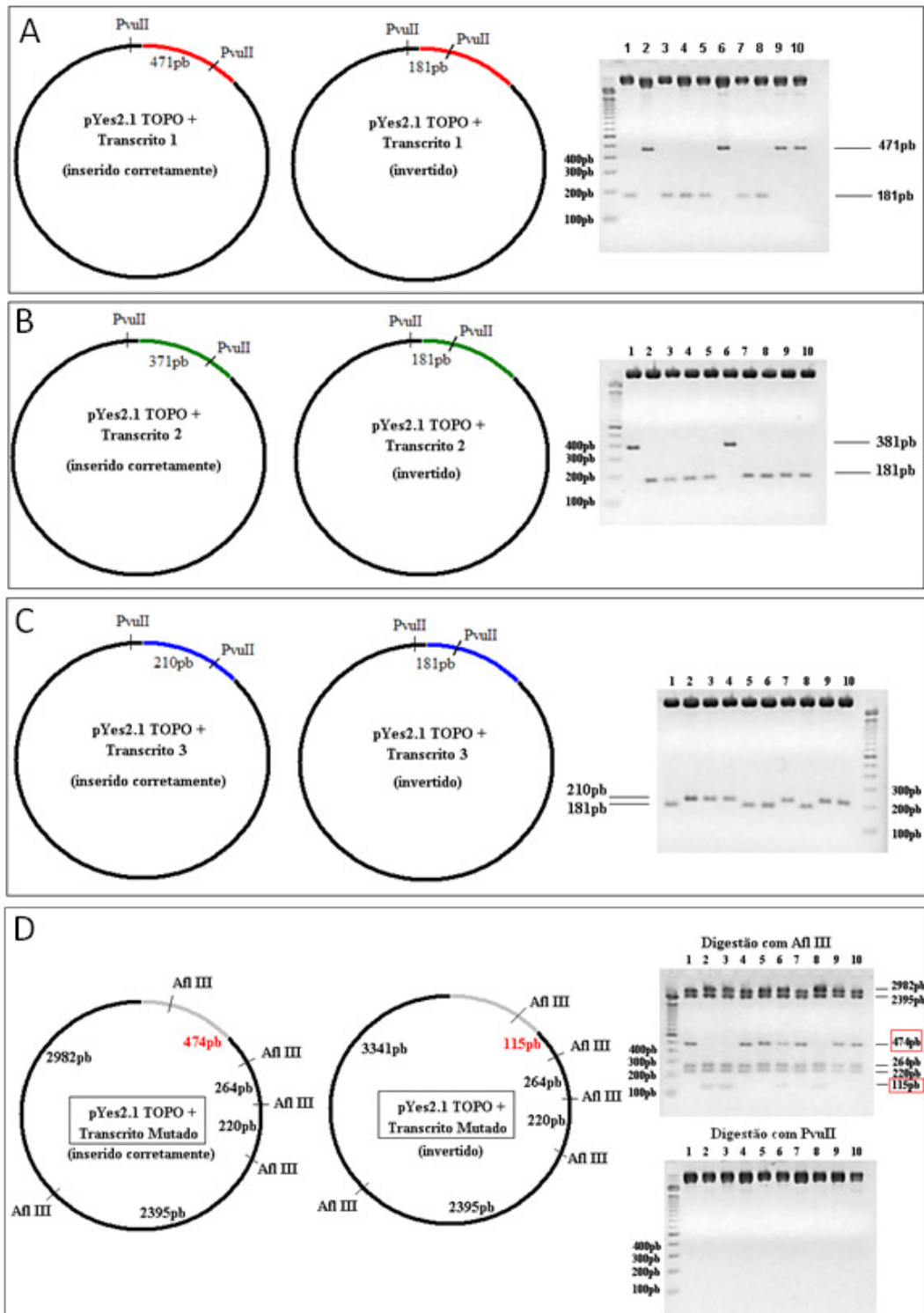


Figura III.9 Identificação dos plasmídeos contendo os transcritos 1, 2 e 3 do gene *UBE2A* inseridos corretamente no vetor *pYES2.1 TOPO*®, após digestão com a enzima de restrição *PvuII*. A, transcrito 1, amostras 2, 6, 9 e 10. B, transcrito 2, amostras 1 e 6. C, transcrito 3, amostras 2, 3, 4, 7, 9 e 10. D, transcrito 1c.382C→T - digestão com as enzimas *AflIII* e *PvuII*: amostras 1, 4, 5, 6, 7, 9 e 10.

*Transformação dos vetores ligados aos transcritos humanos de UBE2A na linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae**

A linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* foi transformada com os plasmídeos contendo os quatro transcritos do gene *UBE2A*: 1, 2 e 3 e o transcrito 1 mutado (c.382C→T). As transformantes foram denominadas de  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 1,  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 2,  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 3,  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 1/c.382C→T. Para controle do experimento, a transformação da linhagem selvagem e da  $\Delta rad6$  foi realizada com o plasmídeo pYes2.1 TOPO vazio (denominadas, respectivamente, Wt + vetor vazio e  $\Delta rad6$  + vetor vazio).

*Análise da expressão dos transcritos humanos em levedura: Northern blotting*

A análise da expressão dos transcritos foi realizada após extração de RNA das leveduras transformadas cultivadas em meios de cultura, contendo glicose ou galactose como fonte de carbono. A indução da expressão de sequências inseridas no vetor pYES2.1TOPO se dá pela ativação do promotor *GAL1*, na presença de galactose no meio de cultura. Na presença de glicose, a expressão deve ser reprimida, de acordo com o protocolo do fabricante do vetor.

Após *Northern blotting*, detectamos expressão dos transcritos nas células cultivadas não só na presença de galactose, mas também de glicose. A expressão dos transcritos em células cultivadas na presença de glicose indica haver escape de promotor, embora a expressão tenha sido em menor taxa do que a observada na presença de galactose (Figura III.10, faixas 3, 4, 5 e 6).

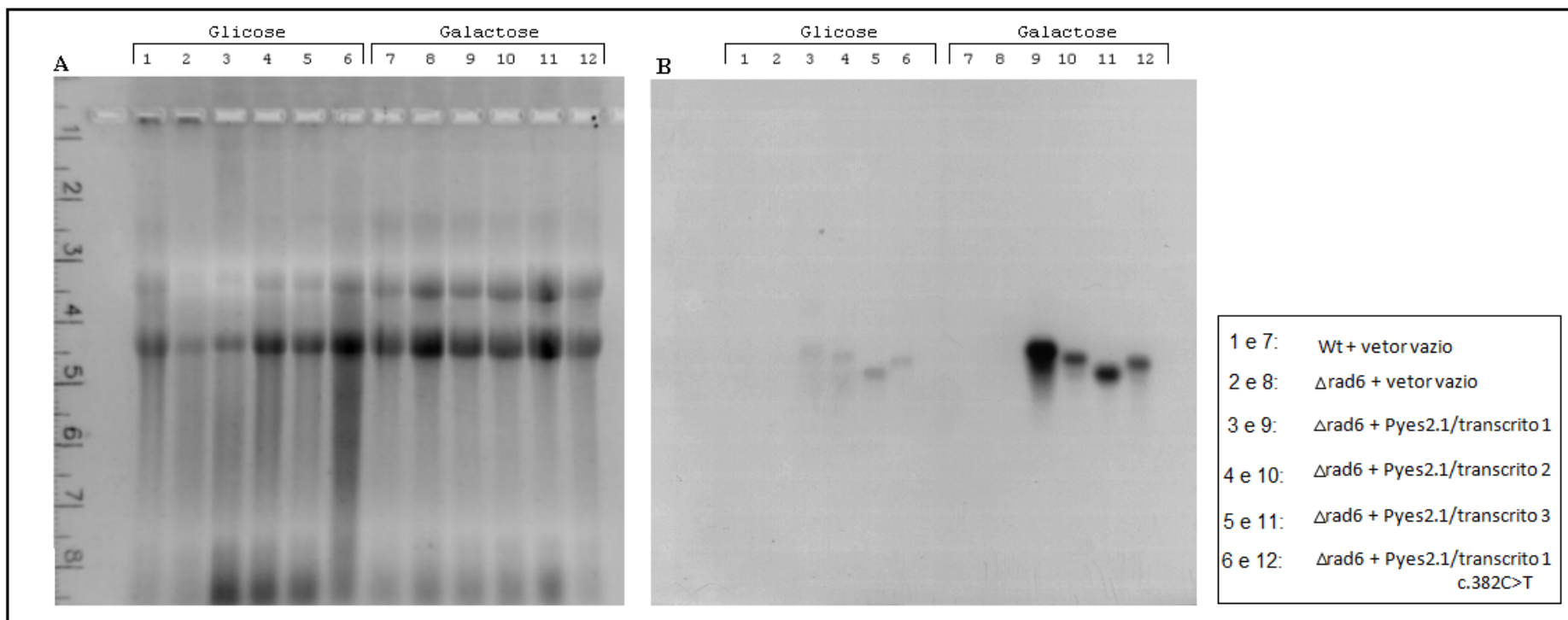


Figura III.10 Análise da expressão dos transcritos de *UBE2A* - 1, 2 e 3 e mutante - em *S. cerevisiae*, por *Northern blotting*. A, gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, mostrando a presença de RNA em todas as amostras. B, a presença dos transcritos é evidenciada após hibridação de sonda complementar ao transcrito 1, nas células cultivadas na presença de glicose (pistas 1 - 6) e de galactose (7 - 12).

### *Ensaio de complementação funcional*

Os experimentos de complementação funcional foram realizados em quadruplicata e as diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio SD- URA<sup>-</sup> contendo glicose e em meio contendo galactose.

#### *- Ensaio I: Resistência à luz ultravioleta (UV-C)*

A linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* é altamente sensível a agentes que danificam o DNA, como luz ultravioleta e raios  $\gamma$ , e provocam aumento da mortalidade celular (Jentsch e col., 1987). Assim, o crescimento das leveduras transformadas foi avaliado após diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta-C (T = 0, 10 s, 30 s e 1 min), em meio contendo glicose ou galactose (Figura III.11).

Observamos que, em meio contendo galactose, as linhagens Wt + vetor vazio,  $\Delta rad6$  + vetor vazio e  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito1 apresentaram proliferação semelhante, na ausência de exposição à luz UV-C (T=0). Com o início e aumento do tempo de exposição (10 s, 30 s e 1 min), observamos, conforme esperado, que a linhagem  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 1 foi capaz de proliferar de maneira semelhante à linhagem Wt + vetor vazio, evidenciando que a expressão do transcrito 1 corrige o fenótipo de sensibilidade à luz UV-C apresentados pela linhagem  $\Delta rad6$ , conforme previamente descrito (Koken e col., 1991).

A expressão dos transcritos 2 ou 3 de *UBE2A* não foi capaz de corrigir o fenótipo de sensibilidade à UV-C da linhagem  $\Delta rad6$ . Entretanto, na ausência de complementação funcional, as linhagens  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 2,  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 3 deveriam apresentar proliferação semelhante à linhagem  $\Delta rad6$  + vetor vazio. Entretanto observamos que apresentaram crescimento inferior, mesmo na ausência de exposição à luz UV-C (T=0), o que sugere que a expressão desses transcritos resulta em certa toxicidade para a levedura. A expressão do transcrito mutante também não corrigiu os fenótipos de  $\Delta rad6$  e mostrou-se claramente tóxico para a levedura: observamos que, em meio contendo galactose, a linhagem  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 1 c.382C→T prolifera em taxa

muito inferior às demais, mesmo na ausência de exposição à luz UV. A mortalidade das colônias aumentou com o tempo de exposição e, após 60 s de exposição, houve crescimento apenas das linhagens Wt + vetor vazio e  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 1.

O comportamento da linhagem  $\Delta rad6$ + Pyes2.1/transcrito 1 cultivada na presença de glicose diferiu do esperado. Na presença de glicose, as linhagens  $\Delta rad6$ + Pyes2.1/transcrito1,  $\Delta rad6$ + Pyes2.1/transcrito2,  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito 3 e  $\Delta rad6$ + Pyes2.1/transcrito1 c.382C→T deveriam apresentar níveis de proliferação semelhantes ao da linhagem  $\Delta rad6$ +vetor vazio, pois nenhuma delas deveria expressar os transcritos humanos. Em T=0, todas as linhagens apresentaram níveis de proliferação semelhantes. Entretanto, conforme iniciamos a exposição à luz UV-C, observamos diferenças de proliferação, explicáveis pelo escape de promotor que resulta em pequena expressão dos transcritos de UBE2A, detectada por *Northern blotting*, após cultivo na presença de glicose (Figura III.10).

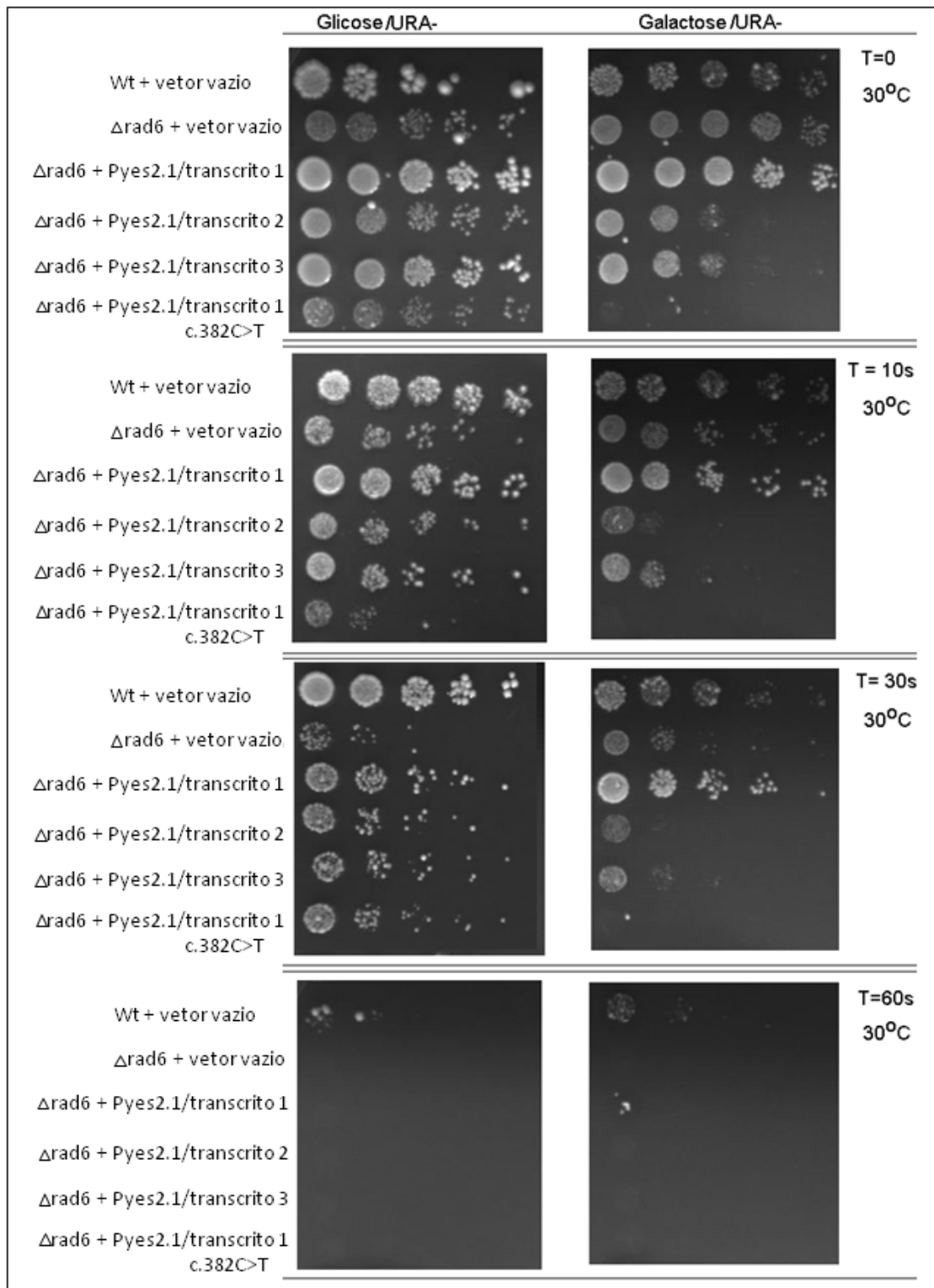


Figura III.11 Ensaio de complementação funcional da mutação  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* pelos transcritos humanos do gene *UBE2A* (transcritos 1, 2, 3 e transcrito 1c.382C→T), na ausência ou após exposição de 10, 30 e 60 s à luz UV-C. As células foram cultivadas em meio contendo glicose ou galactose. A galactose induz a expressão dos transcritos inseridos no vetor utilizado (promotor *GAL1*). Apenas a expressão do transcrito 1 corrigiu o fenótipo de sensibilidade à luz UV. A expressão dos transcritos 2, 3 e mutante resultou em toxicidade.

*- Ensaio II: Estresse por temperatura*

Avaliamos o crescimento das leveduras a 30° C e 37° C (Figura III.12), pois a alteração na proliferação da linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* parece ser mais pronunciado a 37° C (Ellison e col., 1991; McDonought e col., 1995 e Frieberg e col., 2000). Observamos que, a 30° C e em meio contendo glicose, todas as linhagens apresentaram níveis de proliferação semelhantes. Já em meio contendo galactose, enquanto as linhagens Wt + vetor vazio,  $\Delta rad6$  + vetor vazio e  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito1 apresentaram níveis de proliferação semelhantes, as linhagens  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito2,  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito3 e  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito1 c.382C→T apresentaram crescimento inferior, sugerindo toxicidade.

A 37° C, não observamos diferenças marcantes no crescimento das linhagens Wt + vetor vazio,  $\Delta rad6$  + vetor vazio e  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito1, em ambos os meios de cultura. Porém as linhagens  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito2 e  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito3 apresentaram crescimento prejudicado, tanto na presença de glicose quanto de galactose, apontando para uma toxicidade mais acentuada em condições de choque térmico (*heat shock*), independentemente da diferença nos níveis de expressão revelados por *Northern blotting*. A linhagem  $\Delta rad6$  + Pyes2.1/transcrito1/c.382C→T teve sua proliferação muito prejudicada em meio contendo glicose e não proliferou em meio contendo galactose.

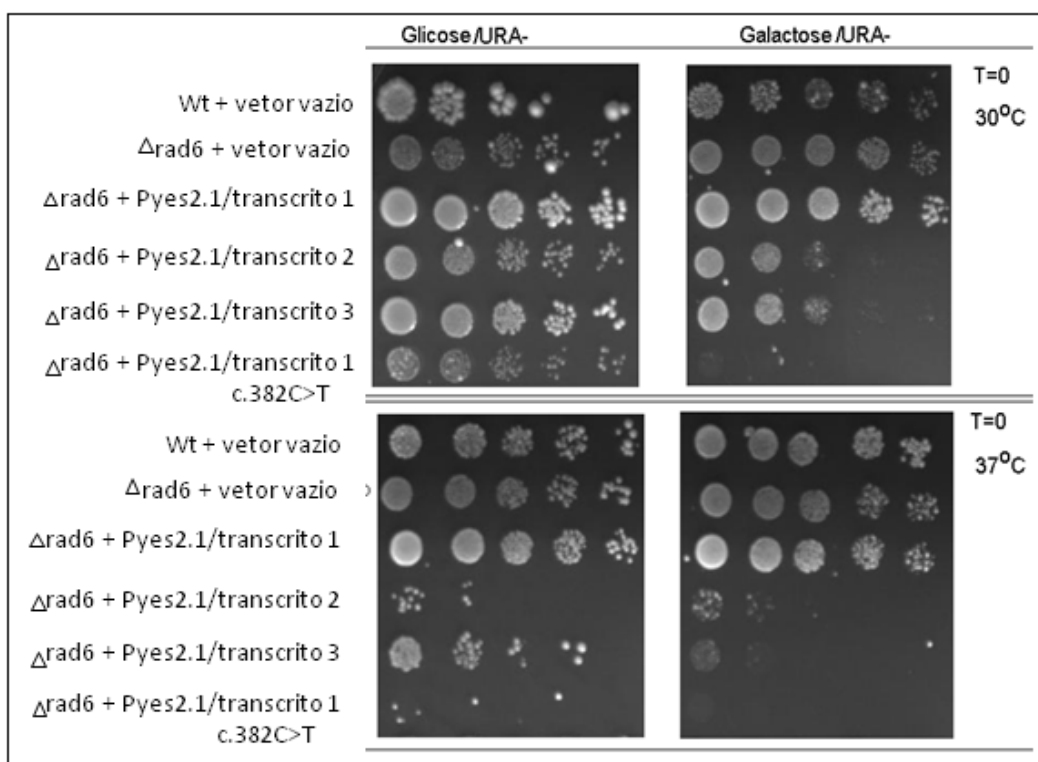


Figura III.12 Ensaio de complementação funcional da mutação  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* pelos transcritos humanos do gene *UBE2A* (transcritos 1, 2, 3 e transcritos 1/c.382C→T) a 30 °C e 37° C. O fenótipo de toxicidade das linhagens que expressam os transcritos 2, 3 e mutante foi agravado, após choque térmico.

#### *Análise da presença das isoformas de UBE2A após expressão em linhagem $\Delta rad6$ de *S. cerevisiae*: Western blotting*

A técnica de *Western blotting* foi utilizada para avaliar a presença das isoformas humanas da proteína UBE2A na linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae*, cultivadas em meio contendo galactose. Três anticorpos foram testados: anti-RAD6 (*Abcam*), anti-RAD6 (*Erasmus MC*) e anti-HR6A/HR6B (*Cell Signaling*).

O anticorpo anti-RAD6 (*Abcam*) foi capaz de reconhecer a proteína RAD6 na linhagem selvagem (Wt) de *S. cerevisiae* (Figura III.13 A, faixa 1 – banda de aproximadamente 20 kDa). RAD6 e a ortóloga humana compartilham 74% de similaridade nos 100 primeiros resíduos de aminoácidos, região da proteína humana utilizada na produção desse anticorpo. O anticorpo foi também capaz de



reconhecer a proteína codificada pelo transcrito 1 do gene *UBE2A* humano e parece ter detectado um dímero dessa proteína ou a interação entre ela e uma outra proteína (Figura III.13 A, faixa 3 – bandas de aproximadamente 17 kDa e 34 kDa). O anticorpo detectou, ainda, a proteína codificada pelo transcrito 1 do gene *UBE2A* humano contendo a mutação c.382C→T, formada pelos resíduos de aminoácidos 1-127 (Figura III. A, faixa 6 – banda de aproximadamente 15 kDa). Resultado similar foi observado para o anticorpo anti-RAD6 produzido no Centro Médico da Universidade Erasmus, Rotterdam, Holanda (Figura III.13 B, faixas 1, 3 e 6), embora a presença do dímero de *UBE2A* seja menos evidente (Figura III.13 B, faixa 3). Para ambos os anticorpos, foram observadas marcações inespecíficas.

O anticorpo anti-HR6A/HR6B foi capaz de reconhecer a proteína codificada pelo transcrito 1 do gene *UBE2A* humano e o provável dímero (Figura III.13 C, faixa 3 – de aproximadamente 17 kDa e 34 kDa). Observamos baixa afinidade pela proteína RAD6 da linhagem selvagem de *S. cerevisiae* (Figura III.13 C, faixa 1 – 20 kDa) e pela proteína mutada, codificada pelo transcrito 1 do gene *UBE2A* humano contendo a mutação c.382C→T (Figura III.13 C, faixa 6 – 15 kDa). Uma banda inespecífica de aproximadamente 25 kDa foi detectada em todas as amostras (Figura III.13 C).

As bandas de 14 e 8 kDa, que correspondem, respectivamente, às proteínas codificadas pelos transcritos 2 e 3 do gene *UBE2A* humano não foram detectadas pelos anticorpos testados (Figura III.13 A, B e C, faixas 4 e 5). O não reconhecimento dessas isoformas pode decorrer da não especificidade dos anticorpos utilizados. Conforme dados apresentado no Capítulo II (Figura II.2), as proteínas codificadas pelo transcrito 1 e 2 do gene *UBE2A* diferem pela ausência dos resíduos 51 a 81 na isoforma codificada pelo transcrito 2. Já a isoforma codificada pelo transcrito 3 tem, como primeiro resíduo de aminoácido, aquele correspondente ao 75º da isoforma codificada pelo transcrito 1. Dadas às características descritas pelo fabricante dos anticorpos – produzidos após imunização com a porção N-terminal de *UBE2A* – esperávamos que os três fossem capazes de detectar a isoforma 2. A isoforma 3, por não apresentar a porção N-terminal da isoforma 1, provavelmente não seria detectada.

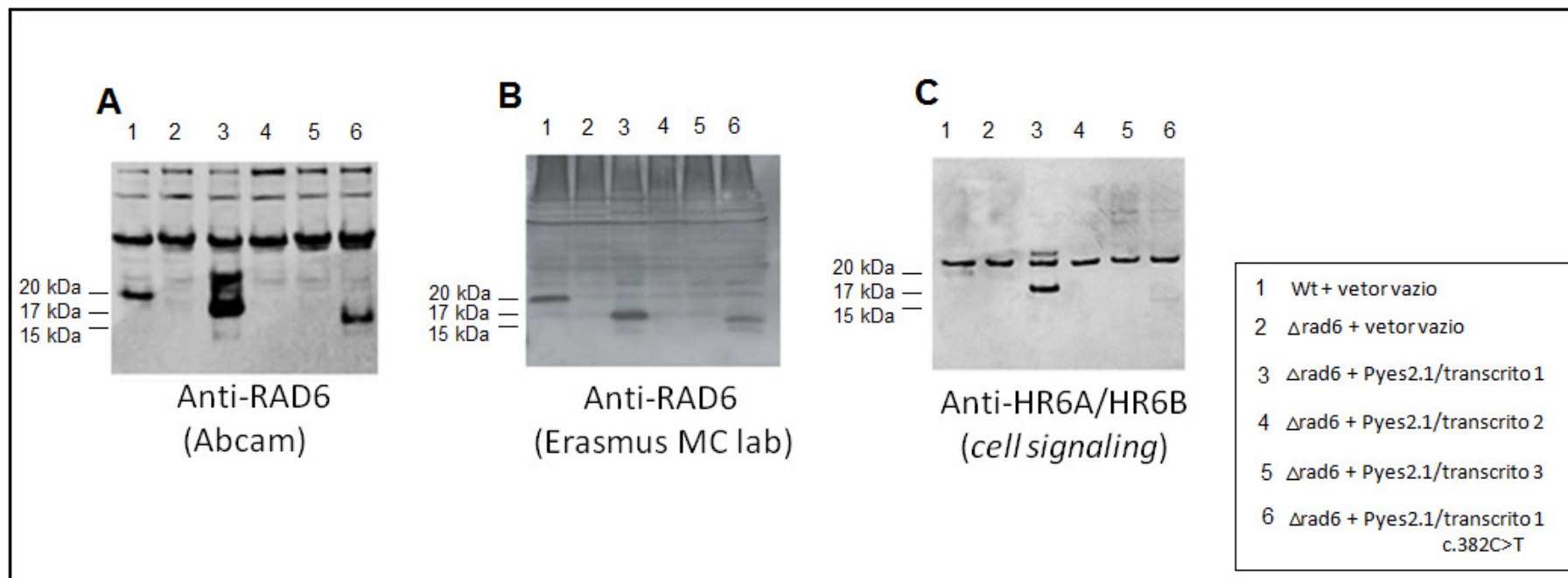


Figura III.13 *Western blotting* dos extratos protéicos das leveduras  $\Delta rad6$ , expressando os transcritos humanos de *UBE2A*. A: anticorpo Anti-RAD6 (Abcam); B: Anti-RAD6 (Erasmus MC Laboratories); C: Anti-HR6A/HR6B (Cell Signaling). (Ver texto, para pormenores)

A superexpressão de proteínas heterólogas muitas vezes leva à formação de agregados protéicos. Entretanto, não detectamos agregados de alto peso molecular nas frações solúvel e insolúvel dos extratos de levedura, após expressão das diferentes isoformas de UBE2A (Figura III.14, coloração com *Ponceau red*). As isoformas 2 e 3 de UBE2A também não foram detectadas na fração insolúvel dos extratos protéicos das leveduras  $\Delta rad6$ , expressando os transcritos correspondentes (Figura III.15 A). Não foram detectadas alterações no padrão global de ubiquitinação após *Western blotting* anti-ubiquitina (Figura III.15 B).

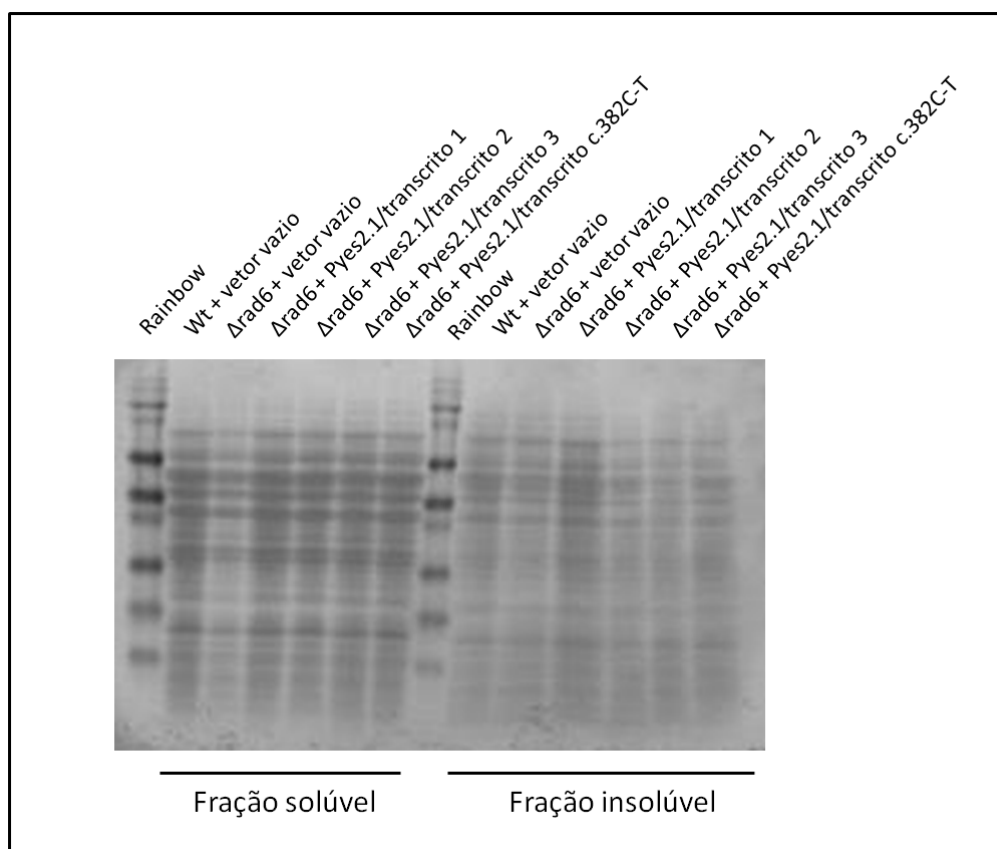


Figura III.14 *Western blotting* dos extratos protéicos das leveduras  $\Delta rad6$ , expressando os transcritos humanos de *UBE2A*: não foram observados agregados de alto peso molecular após coloração com *Ponceau red*. Como controle, utilizamos os extratos das linhagens selvagem e  $\Delta rad6$  transformadas com o vetor vazio. Marcador de peso molecular: *Rainbow* (GE Healthcare).

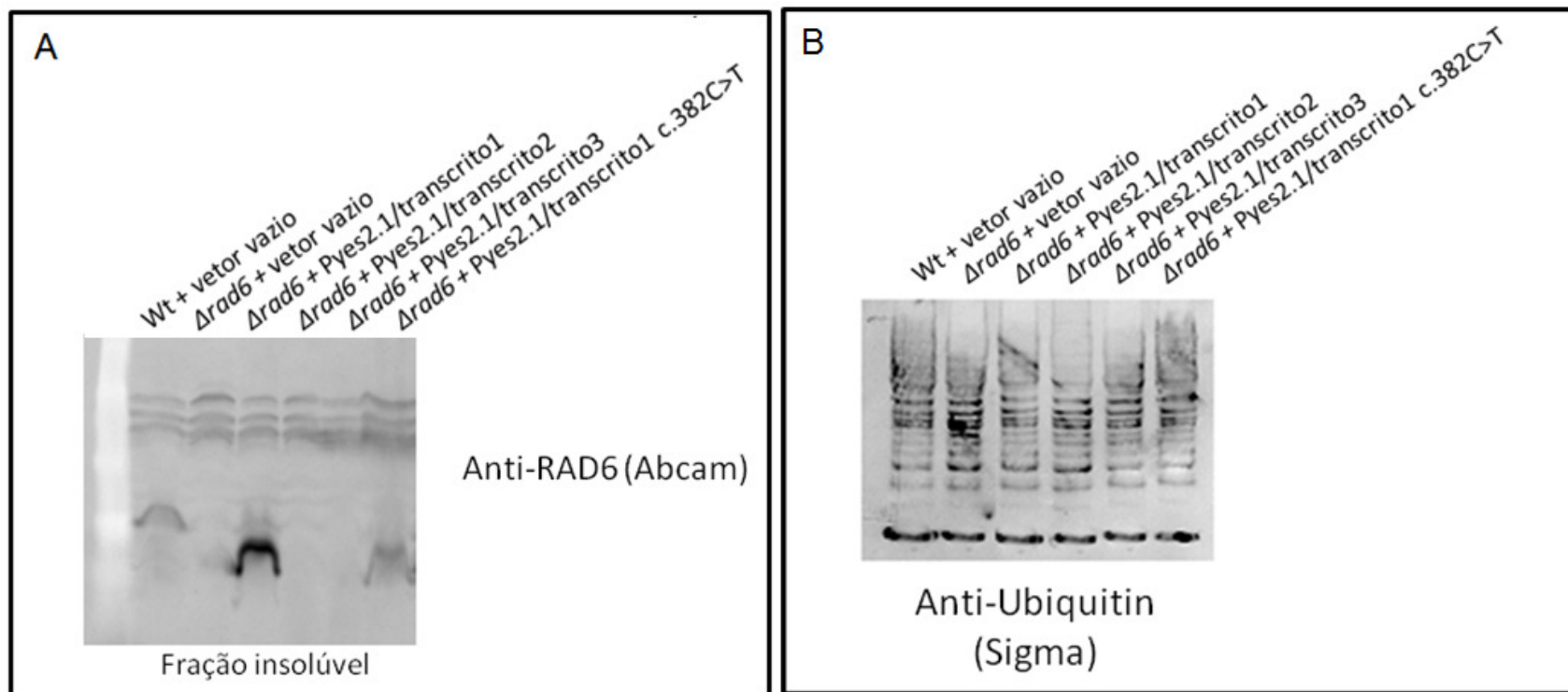


Figura III.15 A, *Western blotting* anti-RAD6 (*Abcam*) dos extratos protéicos das leveduras  $\Delta rad6$ , expressando os transcritos humanos de *UBE2A*: as isoformas 2 e 3 também não foram detectadas na fração insolúvel. B, *Western blotting* anti-ubiquitina (*SIGMA*) dos extratos protéicos das leveduras  $\Delta rad6$ , expressando os transcritos humanos de *UBE2A*: não foram observadas alterações no padrão geral de ubiquitinação. Como controle, utilizamos os extratos das linhagens selvagem e  $\Delta rad6$  transformadas com o vetor vazio.

### II.4.1.3 Expressão dos transcritos de *UBE2A* em linhagem selvagem de *S. cerevisiae*

Para verificar o caráter recessivo ou dominante da toxicidade observada após a expressão dos transcritos humanos 2, 3 e mutante (c.382C→T) em linhagem de levedura  $\Delta rad6$ , os mesmos plasmídeos contendo os transcritos humanos de *UBE2A* (pYes2.1/transcrito1, pYes2.1/transcrito2, pYes2.1/transcrito3, pYes2.1/transcrito1c.382C→T), foram clonados na linhagem selvagem (Wt) de *S. cerevisiae*. O crescimento das leveduras transformadas foi avaliado, após diferentes tempos de exposição à luz UV-C. Os resultados do ensaio de resistência à luz ultravioleta na ausência e após 60 s de exposição estão apresentados na Figura III.16.

Em contraste com o observado após a expressão dos transcritos humanos de *UBE2A* na linhagem  $\Delta rad6$ , a expressão dos mesmos transcritos na linhagem selvagem não resultou em toxicidade. A proliferação das colônias foi semelhante, independentemente do transcrito clonado, diminuindo com o aumento da exposição à luz UV, porém sendo sempre superior à proliferação da linhagem  $\Delta rad6$ .

Os experimentos de expressão na linhagem selvagem foram realizados em paralelo aos de expressão na linhagem  $\Delta rad6$  e em triplicata, para a confirmação dos resultados. A expressão dos transcritos de *UBE2A* nas linhagens selvagem foi validada por *Northern blotting* (Figura III.17).

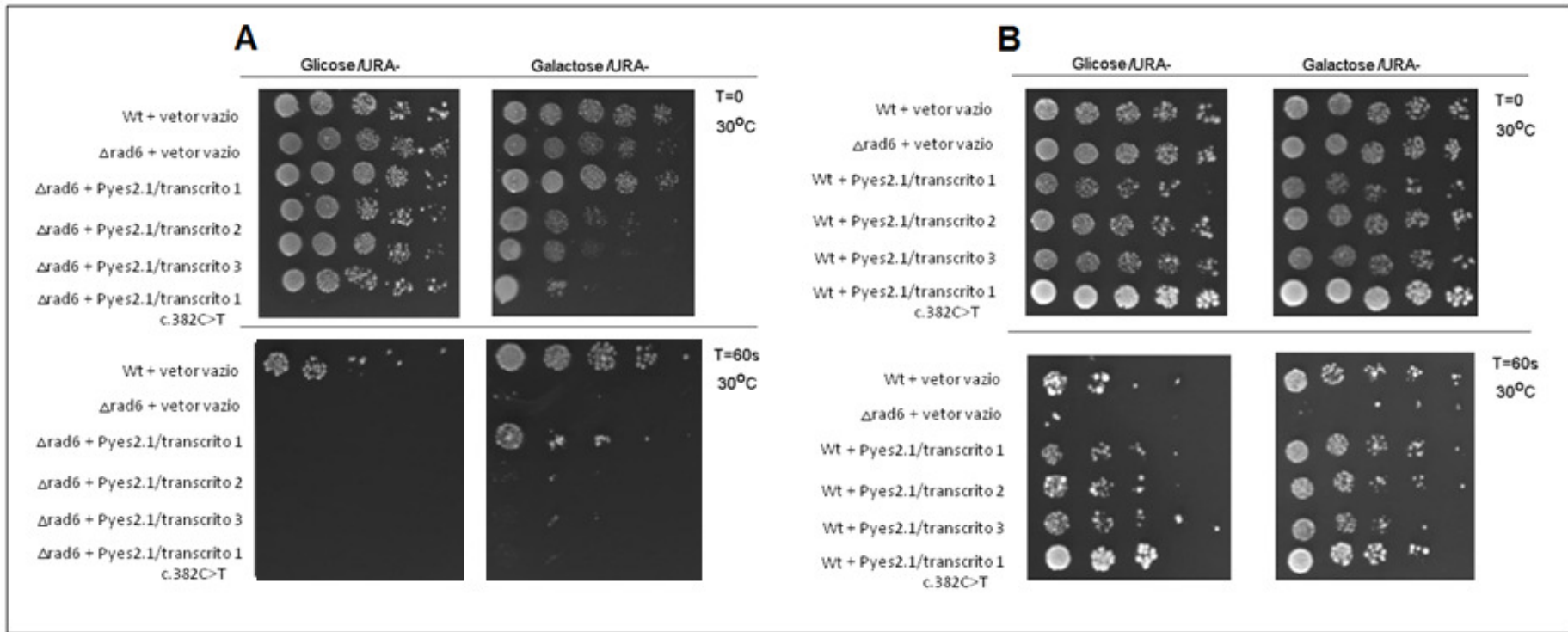


Figura III.16 A, ensaio de complementação funcional da mutação  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* pelos transcritos humanos do gene *UBE2A* (transcritos 1, 2, 3 e transcrito 1 c.382C→T), na ausência e após 60 s de exposição à luz UV-C. B, O caráter recessivo dos fenótipos de toxicidade relacionados à expressão dos transcritos humanos 2, 3 e mutante (c.382C→T) de *UBE2A* foi confirmado após transformação de linhagem selvagem de *S. cerevisiae*.

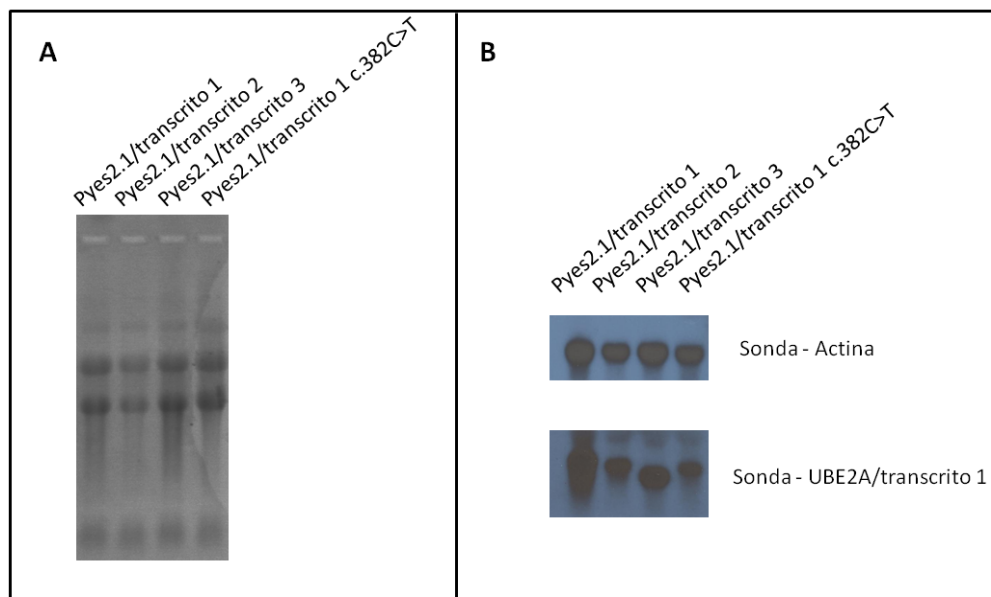


Figura III.17 A, eletroforese em gel de agarose 1,2% das amostras de RNA extraídas das leveduras selvagens que expressam os transcritos de *UBE2A*. Coloração por brometo de etídio. B, Northern blot com a sonda *UBE2A*/transcrito 1 e a sonda para actina (controle interno).

#### II.4.1.4 Ensaio de complementação funcional da mutação $\Delta rad6$ de *S. cerevisiae* pela expressão das isoformas de *UBE2A* em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina C-terminal

Decidimos realizar o ensaio de complementação funcional, desta vez com a retirada do códon de parada dos transcritos humanos de *UBE2A* (conforme descrito em III.3.2), o que permite a expressão das proteínas de interesse em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina C-terminal, ambos codificados pelo vetor PYES2.1 TOPO. Esse procedimento permitiria a purificação de complexos protéicos de que participassem as isoformas da proteína *UBE2A*, uma vez que a cauda de histidina possui afinidade a metais. Tentaríamos, ainda, detectar as isoformas 2 e 3 (não detectadas nos extratos das linhagens de levedura que expressam as proteínas nativas), utilizando anticorpo anti-V5.

Similarmente aos resultados observados após a expressão das isoformas nativas de UBE2A em linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* (Figura III.18 A, na presença de galactose), apenas a expressão da isoforma 1 de UBE2A, em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina (his-tag) C-terminal, resultou em correção de fenótipo de sensibilidade à UV. O fenótipo de toxicidade da linhagem que expressa o transcrito contendo a mutação não foi observado quando o epítipo V5 e a cauda de histidina estavam presentes (Figura III.18 B). A expressão dos transcritos de UBE2A foi confirmada por *Northern blotting* (Figura III. 18 B), entretanto, apenas a isoforma 1 foi detectada pelo anticorpo anti-V5 (Figura III.18D), nas frações solúvel (faixa 3) ou insolúvel (faixa 9). As isoformas 2 e 3 não foram detectadas pelo anticorpo anti-V5 (faixas 4 e 5 - frações solúveis; faixa 10 e 11 - frações insolúveis). Dessa maneira, a não detecção dessas isoformas nativas pelos anticorpos Anti-RAD6 (*Abcam*), Anti-RAD6 (*Erasmus MC*) e Anti-HR6A/HR6B (*Cell Signaling*) não é consequência da menor afinidade desses anticorpos e, sim, da ausência das isoformas. Esse fato pode resultar de falha no processo de tradução dessas isoformas (já que o RNA está presente) ou de sua degradação pós-tradução. A hipótese de degradação nos parece a mais provável, uma vez que os transcritos 1, 2 e mutante compartilham a mesma região de início de tradução e não foram observados problemas na tradução das isoformas 1 e mutante nativas, ou da isoforma 1 em fusão com o epítipo V5 e a cauda de histidina. Curiosamente, a isoforma mutante em fusão com o epítipo V5 e a cauda de histidina não foi detectada com Anti-RAD6 e Anti-V5 (Figura III.18 D, faixa 6 e faixa 12), sugerindo que, nesse caso, também ocorre degradação dessa isoforma. Assim, pode ser explicada a redução da toxicidade observada nessa linhagem.



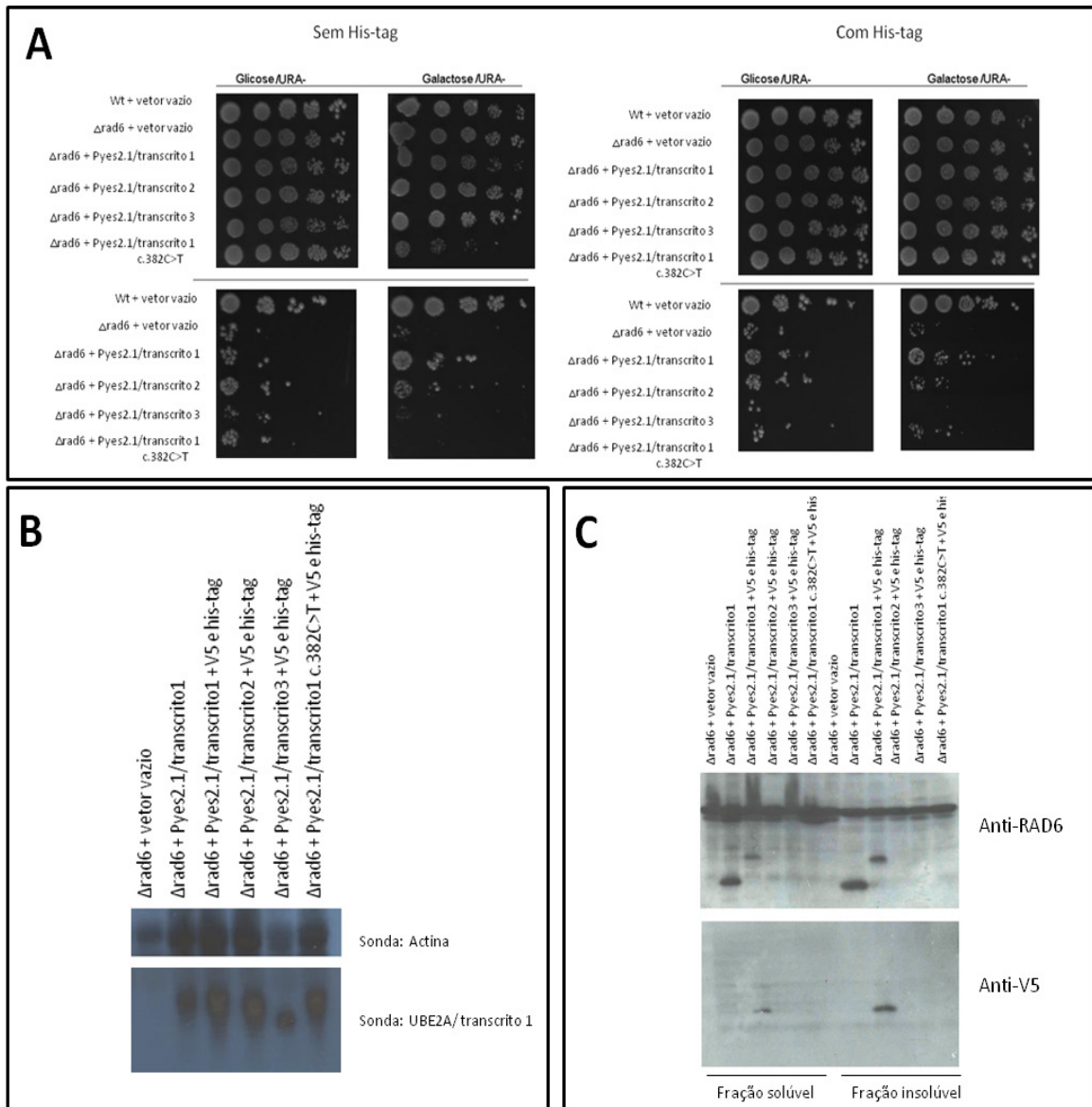


Figura III.18 A, ensaio de complementação funcional da mutação  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae* pela expressão das isoformas de UBE2A nativas e em fusão com o epítipo V5 e cauda de histidina, após exposição à luz UV (0 e 30 s). A expressão das isoformas é induzida por galactose (promotor *GAL1*). C, Northern blotting. D, Western blotting anti-RAD6 e anti-V5.

### III.4.2 Ensaios *in vitro*

#### *Expressão heteróloga e purificação das proteínas codificadas pelos transcritos do gene UBE2A*

Conseguimos expressar em *E. coli* e purificar por cromatografia de afinidade a metais as quatro proteínas codificadas pelos transcritos 1, 2 e 3 do gene *UBE2A* humano normal e pelo alelo contendo a mutação c.382C→T, às quais chamamos, respectivamente, de UBE2A/1, UBE2A/2, UBE2A/3, UBE2A/Q128X. O vetor utilizado (pET15b - Novagen) permite a expressão dessas isoformas em fusão com uma cauda de seis histidinas na porção N-terminal, o que aumenta seu peso em cerca de 2 kDa. Assim, as proteínas UBE2A/1, UBE2A/2, UBE2A/3, UBE2A/c.382C→T, que originalmente têm 17 kDa, 13 kDa, 8 kDa e 14 kDa, passam a ter aproximadamente 19 kDa, 15 kDa, 11 kDa e 16 kDa, respectivamente (Figura III.19).

Duas delas, UBE2A/1 e UBE2A/Q128X, foram purificadas a partir da fração solúvel do lisado de bactérias. Nesses casos, as proteínas mantêm a integridade e a estrutura. Já as isoformas UBE2A/2 e UBE2A/3 encontravam-se na fração insolúvel (no *pellet*, mais especificamente em corpos de inclusão da bactéria) e só puderam ser purificadas após adição de ureia 6 M às soluções de purificação.

A formação de corpos de inclusão ou agregados protéicos insolúveis resulta de estratégia de defesa do hospedeiro, tornando o produto superexpresso menos tóxico para a célula. Dependendo da finalidade para a qual se quer obter a proteína, a formação desses agregados pode não ser desvantajosa, pois protege a proteína de interesse da ação de proteases e geralmente são agregados puros da proteína superexpressa, facilmente isoláveis. A superexpressão de proteínas heterólogas em *E. coli* frequentemente leva à formação de corpos de inclusão. Estudos sugerem que a formação dos agregados pode ser devida a vários fatores, entre eles (a) a quantidade limitada de chaperonas em conjunto com a taxa elevada de síntese protéica que excede à capacidade da célula de dobrar

corretamente a proteína recém sintetizada, (b) as diferenças do estado redox entre *E. coli* e a célula eucariota e (c) as diferenças no processo de tradução de procariontes e eucariontes (Yasukama e col., 1995). A purificação das proteínas dos corpos de inclusão exige condições desnaturantes e nem sempre é possível refazer o dobramento da proteína para sua conformação nativa *in vitro*.

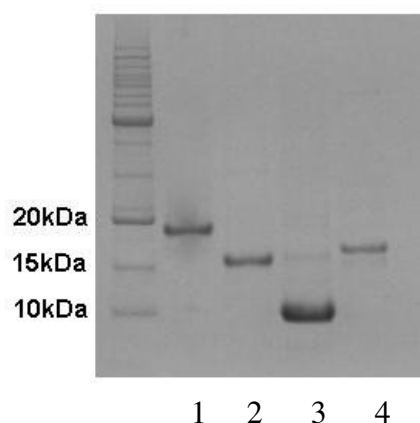


Figura III.19 SDS-PAGE 14% das proteínas purificadas: (1) UBE2A/1 (19kDa), (2) UBE2A/2 (15kDa), (3) UBE2A/3 (11kDa), (4) UBE2A/c.382C→T (16kDa). Coloração por *Comassi blue*.

Assim, quando os experimentos subsequentes envolvem estudos funcionais, a melhor opção é tentar obter a proteína de interesse na fração solúvel. Variações nas condições de expressão, linhagem de bactéria utilizada, temperatura de crescimento e expressão, assim como concentração final do desrepressor (IPTG) podem auxiliar na obtenção de proteínas em suas formas solúveis.

Algumas estratégias foram adotadas para tentar evitar que a superexpressão de UBE2A/2 e UBE2A/3 em *E. coli* resultasse na formação de corpos de inclusão. A primeira foi variar as concentrações de IPTG, com a finalidade de encontrar uma concentração que induzisse a expressão em taxa que permitisse o dobramento correto. Quatro diferentes concentrações de IPTG foram testadas em volumes de cultura de 100 mL de meio LB/Amp: 0,1 mM; 0,25 mM;

0,5 mM e 1 mM. Em todas essas concentrações, as proteínas foram encontradas nos corpos de inclusão. A segunda estratégia foi testar as diferentes concentrações de IPTG concomitantemente com a redução da temperatura de indução, de 37° C para 20° C. A redução da temperatura visa diminuir o metabolismo do hospedeiro e, conseqüentemente, a velocidade de síntese da proteína heteróloga. Culturas de 100 mL de meio LB/Amp foram mantidas a 20° C por cerca de 16 h, na presença de diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM; 0,25 mM; 0,5mM e 1 mM). As alterações nas condições temperatura de cultivo combinadas com variações na indução não resultaram na solubilização das proteínas.

O passo seguinte foi variar as linhagens utilizadas para superexpressão. Cinco outras linhagens de *E. coli* foram testadas: BL21 (DE3) pLysS, Origami, C41, C43 e AD494. As características dessas linhagens que nos levaram a utilizá-las, estão detalhadas no tópico III.3.2. As mesmas condições de cultura (temperatura e concentrações de IPTG) testadas para a linhagem BL21(DE3) foram também para essas linhagens. Em todas elas, as proteínas permaneceram na fração insolúvel.

Embora não seja a alternativa mais indicada, quando se objetiva realizar ensaio de atividade, decidimos renaturar as proteínas UBE2A/2 e UBE2A/3 *in vitro*. A primeira tentativa de renaturação foi realizada por meio de diálise: a proteína desnaturada em tampão contendo ureia (ureia 6 M, NaCl 500 mM, fosfato de sódio 20 mM) foi dialisada, utilizando membrana semipermeável, em gradiente de ureia em tampão fosfato de sódio 20 mM pH7,4, NaCl 0,1M. Após a remoção total da ureia, ocorreu precipitação das proteínas UBE2A/2 e UBE2A/3.

Na segunda tentativa de renaturação *in vitro*, utilizamos protocolo fornecido pelo fabricante da coluna *HiTrap*. Esse procedimento foi realizado apenas para a proteína UBE2A/3. Após isolar os corpos de inclusão, o *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de solução Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 5 mM, guanidina hidrocloreídrica 6M e 2-mercaptoetanol 1 mM. A presença de guanidina 6 M resulta na desnaturação da proteína. Após 60 min à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 15 min (4° C, 13000 rpm) e o sobrenadante foi, então, filtrado (filtro de 45 µM - *Millipore*). A coluna *HiTrap TM Chelating* de 5 mL foi lavada com 50 mL de água destilada, equilibrada com 50 mL do mesmo tampão

em que os corpos de inclusão foram ressuspensos, procedendo-se então à passagem do extrato protéico contendo a proteína de interesse desnaturada; esta, devido à presença da cauda de histidina, ficou ligada à matriz da coluna por afinidade ao níquel. A tentativa de redobramento da proteína foi realizada por gradiente linear de ureia, iniciando com tampão contendo 6 M até sua ausência. O gradiente teve volume de 150 mL em fluxo de 1 mL/min (em FPLC, GE Healthcare). A eluição da proteína recombinante renaturada *in vitro* foi realizada por gradiente linear de Imidazol, iniciando com tampão contendo 20 mM até a concentração de 500 mM. A tentativa de redobrar a proteína não foi bem sucedida: houve precipitação no interior da coluna, impedindo sua eluição. Esta só pôde ser realizada após adição de ureia ao tampão de eluição, o que resultou novamente na desnaturação da proteína.

A variação do pH do tampão final também pode auxiliar na solubilização de proteínas. Realizamos, diálise em tampão citrato de potássio 20 mM pH 3,8 e NaCl 0,1 M. Nesse tampão a isoforma 3 de UBE2A ficou solúvel, porém houve precipitação da isoforma 2. A melhor solubilização da isoforma 2 foi obtida em tampão fosfato de sódio pH 5,5. Entretanto, nessas condições, ainda ocorreu alguma precipitação. A isoforma 3, em tampão citrato de potássio 20 mM pH 3,8 e NaCl 0,1M, foi utilizada para a imunização de coelhos e produção de anticorpo capaz de reconhecer a porção C-terminal de UBE2A. O anticorpo obtido foi denominado anti-UBE2A/ISO3.

#### *Avaliação da afinidade dos anticorpos anti-RAD6 e anti-UBE2A/ISO3 às isoformas de UBE2A*

A obtenção das isoformas de UBE2A, solúveis ou insolúveis, nos permite avaliar, por *Western blotting*, a afinidade dos anticorpos anti-UBE2A/ISO3 e anti-RAD6 por cada uma delas. Para isso, diluições seriadas (0,1 ng, 0,5 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 500 ng e 1 µg) das isoformas puras de UBE2A (1, 1/Q128X, 2 e 3) foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 14%, transferidas para membrana de

nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-RAD6 (diluição 1:1000 em TBS/Tween 0.1%) ou anticorpo anti-UBE2A/ISO3 (diluição 1:100 em TBS/Tween 0,1%) por cerca de 16 h. As membranas foram, então, lavadas e incubadas com o anticorpo secundário por 1 h. A detecção foi realizada de acordo com protocolo do kit utilizado (*Amersham ECL Plus™ Western Blotting Reagent and Detection System*). As membranas foram escaneadas, utilizando o scanner STORM™ (*GE Healthcare*) para a visualização da fluorescência.

Como mostra a Figura III.20, o anticorpo anti-UBE2A/ISO3, na diluição 1:100, foi capaz de detectar todas as isoformas de UBE2A, porém apenas em concentrações superiores a 10 ng. Já o anticorpo comercial anti-RAD6 (*Abcam*) na diluição 1:1000 foi capaz de detectar a isoforma 1, a isoforma 1/Q128X e a isoforma 2, em todas as diluições testadas. Conforme esperado, esse anticorpo não foi capaz de detectar a isoforma 3 – segundo o fabricante, o anticorpo foi obtido após a imunização de coelhos com a porção N-terminal da isoforma 1 de UBE2A, ausente na isoforma 3. Esse resultado revela que a isoforma 2 de UBE2A não está presente nos extratos de levedura após superexpressão em meio contendo galactose, pois, se estivesse presente, teria sido detectada pelo Anti-RAD6 (*Abcam*).

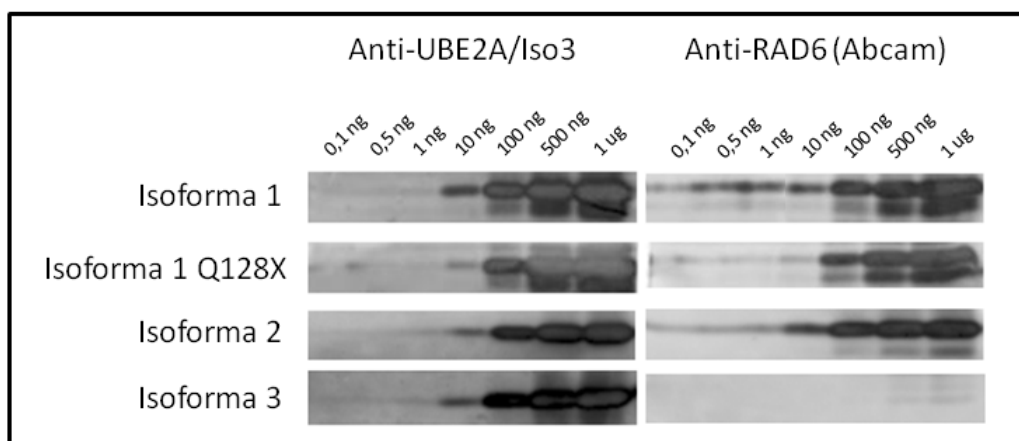


Figura III.20 *Western blotting* das isoformas puras de UBE2A: anticorpos anti-UBE2A/ISO3 (diluição 1:100) e anti-RAD6 (*Abcam*, diluição 1:1000). (Ver texto para pormenores)

Nos extratos celulares, o anticorpo anti-UBE2A/ISO3 foi capaz de detectar apenas a isoforma 1 de UBE2A em 50  $\mu$ g do extrato protéico da linhagem de levedura  $\Delta rad6 + Pyes2.1 / transcrit01$ . Não foi capaz de detectar RAD6 na linhagem selvagem ou as demais isoformas, nas linhagens que expressavam os transcritos correspondentes. Em extratos de pré-adipócitos humanos (amostra controle e do paciente III-2, Figura I.1), foram observadas marcações inespecíficas, nenhuma delas correspondendo ao peso molecular correspondente a UBE2A e UBE2B (17 kDa). (Figura III.21).

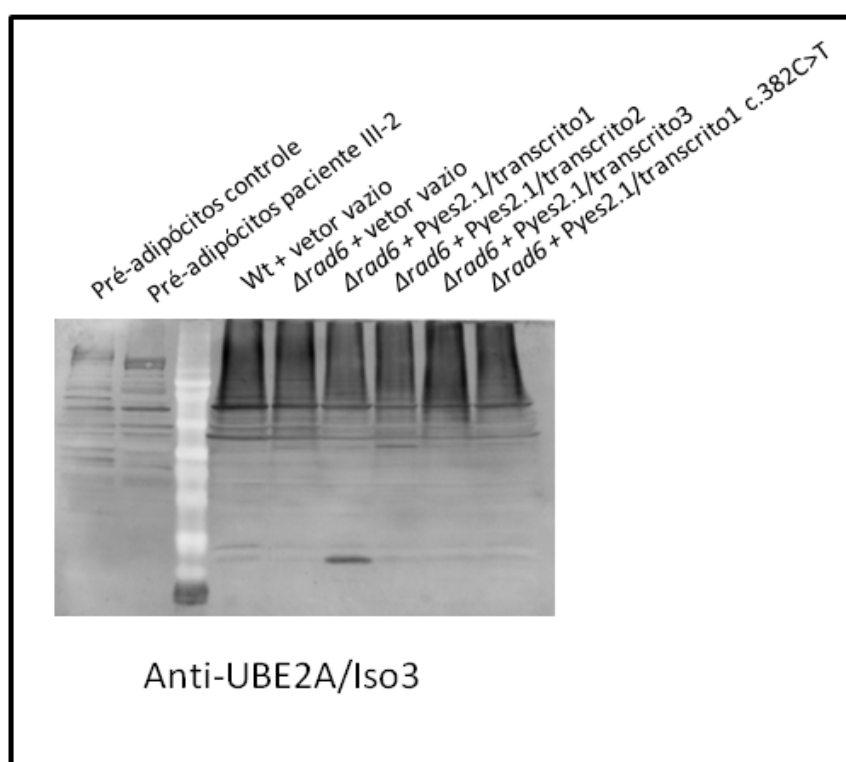


Figura III.21: *Western blot* dos extratos protéicos de pré-adipócitos humanos e das leveduras transformadas cultivadas na presença de galactose.

*Ensaio de atividade para avaliar a capacidade das diferentes isoformas de UBE2A de ubiquitinar histonas in vitro*

Os ensaios de atividade foram realizados conforme descrito por Sarcevic e col. (2002). Resumidamente, o ensaio consiste em incubar a E2 de interesse na presença de ubiquitina, histonas H2A, E1, ATP e  $Mg^{2+}$ , por 30 a 90 min a 37° C, em tampão adequado. A finalização se dá pela adição de tampão redutor (2-mercaptoetanol 15%) para rompimento das ligações tioéster ou dissulfeto, seguida de desnaturação por 2 min a 100° C. Em seguida, a reação é submetida à eletroforese em gel SDS-PAGE 14% e transferida para membrana de nitrocelulose, que é incubada, por cerca de 16 h, com anticorpo primário anti-ubiquitina (SIGMA), diluído em TBS/Tween 0.1% (diluição 1:250). A membrana é, então, lavada e incubada com o anticorpo secundário por 1 h, seguida de protocolo de detecção.

O controle positivo consistiu em ensaio contendo a proteína UBE2A/1 pura (Figura III.22, faixa 3). Conforme previamente descrito por Sarcevic e col. (2002), a proteína codificada pelo transcrito 1 do gene *UBE2A* foi capaz de monoubiquitinar histonas H2A *in vitro*. A banda de aproximadamente 24 kDa, correspondente à histona H2A ubiquitinada, está indicada na Figura III.22 pela seta vermelha (faixa 3). Como controles negativos do experimento, realizamos ensaios na ausência de histona (Figura III.22, faixa 2), ausência de ubiquitina (Figura III.21, faixa 6), ausência de E1 (Figura III.22, faixa 7), ausência de  $Mg^{2+}$  (Figura III.22, faixa 8), ausência de ATP (Figura III.22, faixa 9), ou ausência de E2 (Figura III.22, faixa 10). Dentre os controles negativos, a banda correspondente à histona H2A ubiquitinada pôde ser observada somente na ausência de  $Mg^{2+}$  (Figura III.22 seta vermelha, faixa 8), porém em menor intensidade, quando comparada à banda correspondente observada na faixa 3. O  $Mg^{2+}$  atua como cofator necessário para a atividade da E1, de forma que sua ausência resulta em baixa capacidade de ativação da molécula de ubiquitina e, como consequência, a E2 (no caso UBE2A/1) recebe menor número de moléculas de ubiquitina para transferir para a histona.



Nos demais controles negativos, a banda de 24 kDa não foi observada (faixas 2 e 6, 7, 9 e 10, Figura III.22).

Para avaliar a capacidade de ubiquitinação de histonas das isoformas de UBE2A, o ensaio foi realizado conforme o controle positivo, porém com a substituição da UBE2A/1 por UBE2A/Q128X (Figura III.22, faixa 1), UBE2A/2 (Figura III.22, faixa 4) ou UBE2A/3 (Figura III.22, faixa 5). A banda de 24 kDa, correspondente à histona H2A ubiquitinada, não foi observada nos ensaios com as isoformas de UBE2A. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que a incapacidade de ubiquitinação de histonas observada para UBE2A/2 e UBE2A/3 seja consequência de elas terem sido renaturadas *in vitro*.

Além da banda de 24 kDa correspondente à histona ubiquitinada, diversas outras foram observadas. As duas últimas faixas do ensaio nos permitem determinar quais são as bandas correspondentes à ubiquitina pura (Figura III.22, faixa 11) e às histonas (Figura III.22, faixa 12 - marcação inespecífica). Nos ensaios contendo UBE2A/1 (Figura III.22, faixa 2 e 3), observamos marcação do tipo *ladder* (escadaria), padrão comumente associado a poliubiquitinação. O fato de esse padrão ser observado tanto na ausência (faixa 2) como na presença (faixa 3) de histonas sugeria tratar-se de fenômeno de autoubiquitinação, já descrito para UBE2A. A autoubiquitinação de UBE2A/1 foi confirmada, utilizando o anticorpo anti-RAD6 (*Abcam*) (Figura III.23).

Voltando à Figura III.22, podemos observar na faixa 1 uma banda indicada pela seta preta, ausente nas demais faixas. Essa banda sugere que a isoforma UBE2A/Q128X, embora incapaz de ubiquitinar histonas, é capaz de interagir com a molécula de ubiquitina. A repetição dos ensaios com UBE2A/1 e UBE2A/Q128X confirmou a capacidade da isoforma UBE2A/Q128X em interagir com a ubiquitina: a banda de aproximadamente 27 kDa (16 kDa de UBE2A/Q128X + 10,7 kDa da ubiquitina em fusão com cauda de histidina) foi detectada tanto pelo anticorpo anti-ubiquitina, quanto pelo anti-RAD6 (Figura III. 24, faixas 2 e 4). A capacidade de autoubiquitinação de UBE2A/Q128X, menos evidente, é semelhante à capacidade de autoubiquitinação observada para UBE2A/1 na

ausência de magnésio, visualizada como um leve arrasto e bandas sutis (comparar as faixas 1 e 8, Figura III.22).

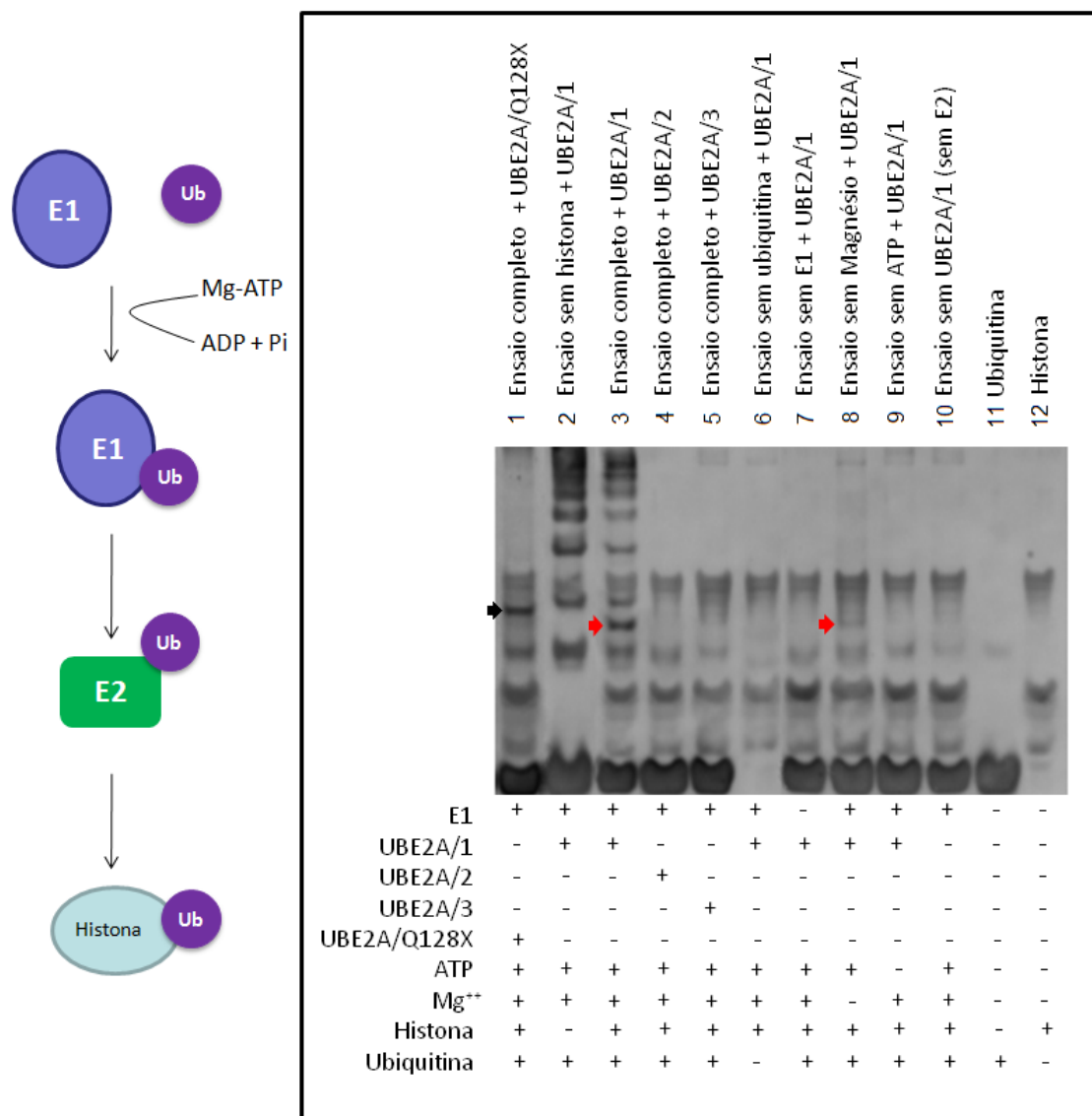


Figura III.22 Ensaio de atividade *in vitro*: capacidade de ubiquitinação de histonas avaliada por *Western blotting* anti-ubiquitina. A banda correspondente à histona ubiquitinada está indicada pela seta vermelha. A banda correspondente à interação de UBE2A/Q128X com a ubiquitina está indicada pela seta preta. Os componentes presentes (+) e ausentes (-) em cada um dos ensaios estão indicados. (Ver texto para pormenores).

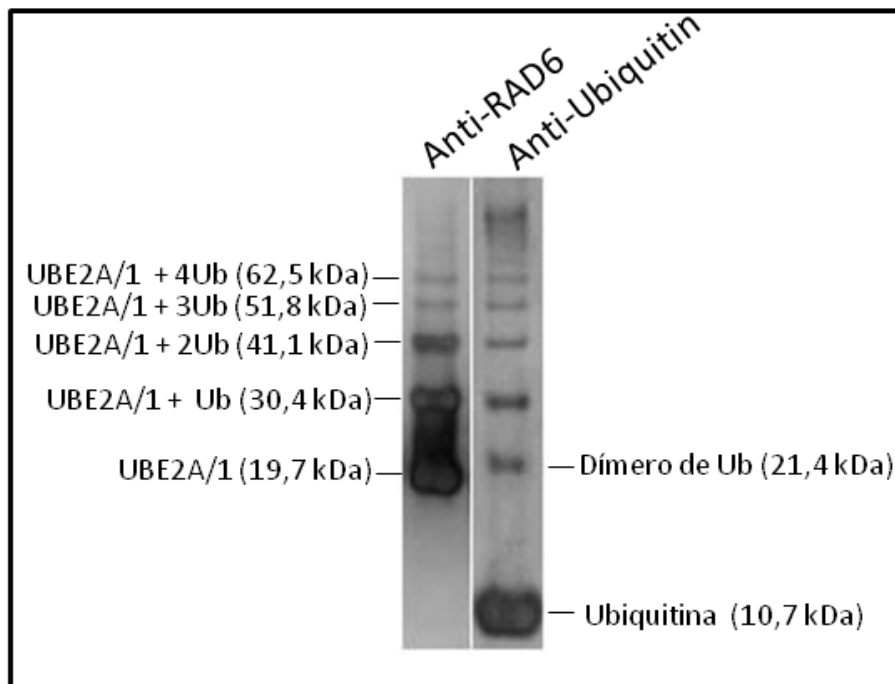


Figura III.23 Autoubiquitinação de UBE2A/1. O padrão do tipo *ladder* foi observado após incubação com os anticorpos anti-RAD6 e anti-ubiquitina.

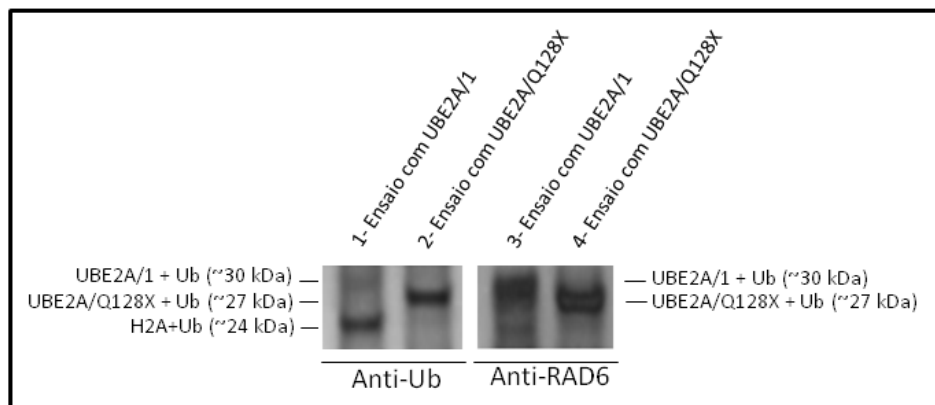


Figura III.24 Ensaio de atividade *in vitro*: Apenas UBE2A/1 é capaz de ubiquitinar histonas H2A (faixa 1, banda de ~24 kDa). Tanto UBE2A/1 (faixa 1 e 3, bandas de ~30 kDa) quanto UBE2A/Q128X (faixas 2 e 4, bandas de ~27 kDa) são capazes de interagir com a molécula de ubiquitina.

Embora os ensaios não tenham respondido às questões sobre a atividade das isoformas UBE2A/2 e UBE2A/3, eles despertaram nossa atenção para o fenômeno de autoubiquitinação. Apesar de a capacidade de autoubiquitinação não ter sido demonstrada nos resultados apresentados por Sarcevic e col. (2002), os autores comentam brevemente essa possibilidade na discussão dos dados e consideram-na como possível mecanismo de autorregulação.

Em nossos ensaios, ficou evidente que UBE2A/1 é capaz de monoubiquitinar histonas H2A e também de ubiquitinar-se. As cadeias de poliubiquitina permanecem ligadas à UBE2A/1, mesmo após adição de tampão redutor para finalização do ensaio, indicando que a poliubiquitinação ocorre, provavelmente, por ligação covalente com resíduo de lisina e não por ligação tioéster com o resíduo de cisteína do sítio ativo. UBE2A/Q128X, por sua vez, foi capaz de interagir com a ubiquitina, mas não de transferi-la para o substrato. A manutenção da interação de UBE2A/Q128X com a molécula de ubiquitina após adição de tampão redutor sugere o mesmo. A capacidade de autoubiquitinação é menos evidente para essa isoforma, porém também ocorre.

Esses dados nos levaram a considerar que a capacidade de autoubiquitinação pode ser o mecanismo que leva à degradação da isoforma mutada de UBE2A nas células do paciente. Ainda, passamos a considerar que as parálogas humanas UBE2A e UBE2B, devido à sua elevada conservação, poderiam regular-se de maneira recíproca. Dessa maneira, a degradação de UBE2A/Q128X nas células do paciente poderia, ser dependente de UBE2B. A reduzida capacidade de autoubiquitinação da isoforma mutada poderia não ser suficiente para sua eliminação, tornando necessária a atividade da paróloga em seu processo de degradação. Isso explicaria porque ela é estável quando expressa na linhagem *Δrad6*, mas não nas células do paciente.

Para testar a hipótese de degradação mediada por proteína homóloga, avaliamos a presença da proteína UBE2A/Q128X nas células da linhagem de levedura selvagem que expressava o transcrito mutado de *UBE2A*. Conforme demonstramos previamente, a expressão da isoforma mutada é tóxica para a linhagem *Δrad6*, mas não para a linhagem selvagem de *S. cerevisiae*. *Western*

*blotting* anti-RAD6 dos extratos protéicos das transformantes Wt + Pyes2.1/transcrito1 e Wt + Pyes2.1/transcrito1/c.382C→T revelou que, enquanto a proteína codificada pelo transcrito 1 é estável (Figura III.25, faixa 7), a proteína mutada encontra-se, de fato, em menor quantidade (Figura III.25, faixa 8), quando comparada à quantidade detectada na linhagem  $\Delta rad6$  após expressão desse transcrito (Figura III.25, faixa 6).

O aumento dos parâmetros de sensibilidade do *scanner* e no contraste da imagem revelou que a proteína mutada estava presente em pequena quantidade nas células do paciente e da levedura selvagem, após sua expressão (Figura III.26 A).

Dessa maneira, a ausência de um ortólogo funcional na levedura  $\Delta rad6$  preveniria a degradação da isoforma mutada nessa linhagem, levando ao fenótipo de toxicidade, não observado após expressão na linhagem selvagem. A inibição do proteassoma em cultura de pré-adipócitos do paciente revelou aumento na quantidade da isoforma mutada, indicando que ela é degradada via ubiquitinação e degradação proteassômica (Figura III.26 B). A não viabilidade de células duplo-nocautes quanto às parálogas humanas UBE2A e UBE2B nos impede de avaliar se, na ausência de UBE2B, a isoforma UBE2A/Q128X seria estável ou se seria degradada.

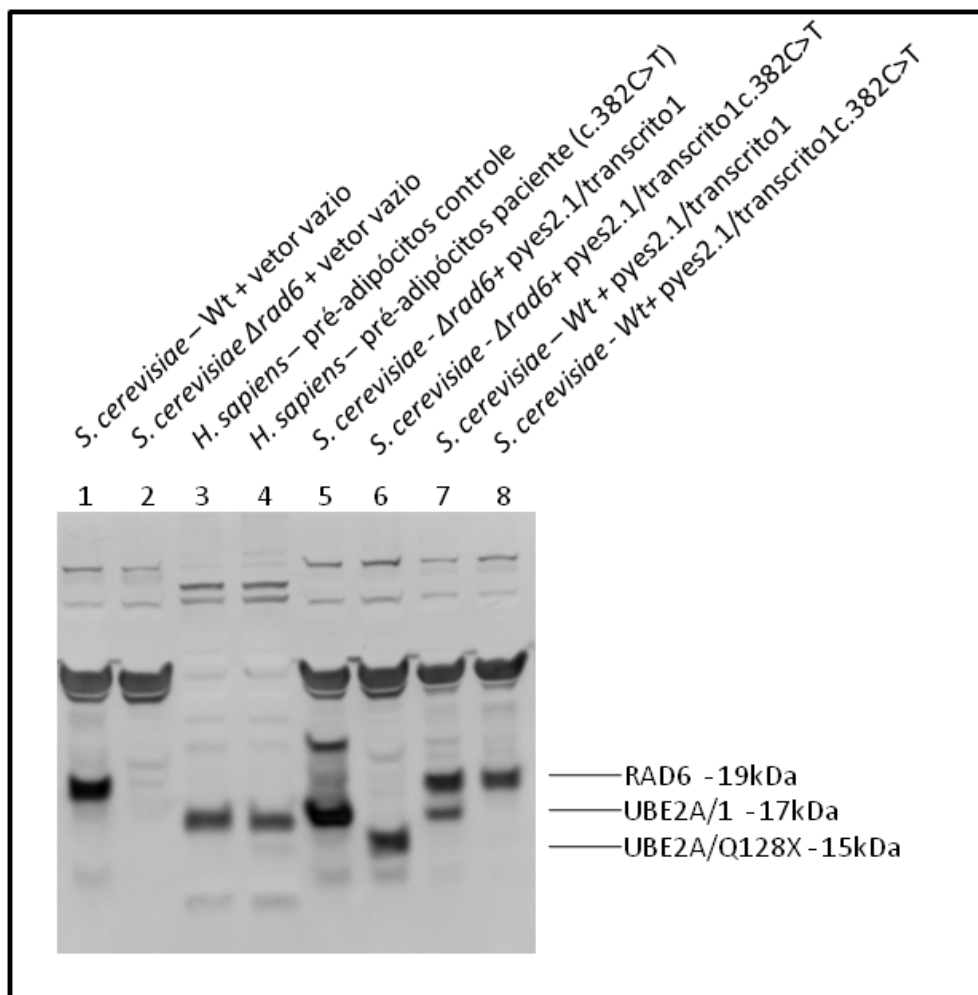


Figura III.25 *Western blotting* anti-RAD6 dos extratos protéicos de humanos (faixas 3 e 4) e linhagens transformadas selvagem (faixas 1,7 e 8) e  $\Delta rad6$  (faixas 2, 5 e 6). A isoforma UBE2A/Q128X parece ser degradada na presença de uma isoforma homóloga funcional (faixas 4 e 8).

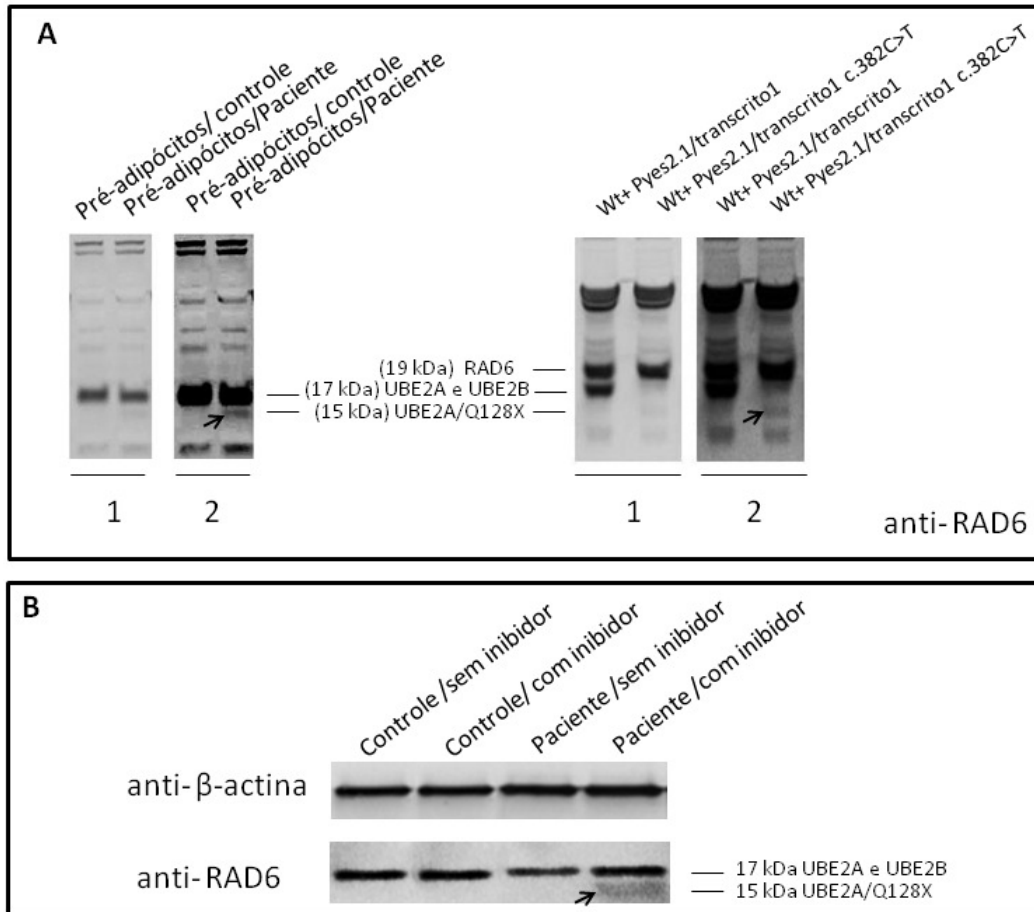


Figura III.26 A, *Western blotting* anti-RAD6 dos extratos protéicos obtidos de pré-adipócitos humanos e de levedura selvagem, após expressão dos transcritos 1 e 1c.382C→T de UBE2A. A banda de 15 kDa correspondente à isoforma mutada é visualizada após aumento na sensibilidade de detecção do sinal do anticorpo secundário (2). B, ensaio de inibição do proteossoma em células de pré-adipócitos humanos. UBE2A/Q128X pôde ser detectada na amostra do paciente em que foi adicionado o inibidor, sem necessidade de alteração dos padrões de detecção. As bandas correspondentes a UBE2A/Q128X estão indicadas pela seta.

### *Avaliação do efeito de mutações em UBE2A na capacidade de autoubiquitinação*

Para avaliação do efeito das mutações F72S e Q110E de UBE2A, descritas por Tarpey e col. (2009), sobre a capacidade de autoubiquitinação de UBE2A, realizamos o ensaio de atividade *in vitro* conforme descrito por Sarcevic e col. (2002) na ausência de histonas e com redução do tempo de incubação de 90 para 60 min. Sarcevic e col. (2002) testaram diferentes tempos de incubação e observaram que a atividade de UBE2A aumentava com o tempo de incubação. A redução no tempo de incubação nos permitiria, assim, verificar se a dinâmica das diferentes isoformas seria afetada. Após uma hora de incubação a 37° C, a capacidade de autoubiquitinação pareceu maior para a isoforma normal de UBE2A. UBE2A/Q128X e UBE2A/Q110E pareceram menos eficientes. UBE2A/F72S perdeu quase totalmente a capacidade de autoubiquitinação (Figura III.27). As duas novas mutações parecem, portanto, comprometer a função das enzimas.

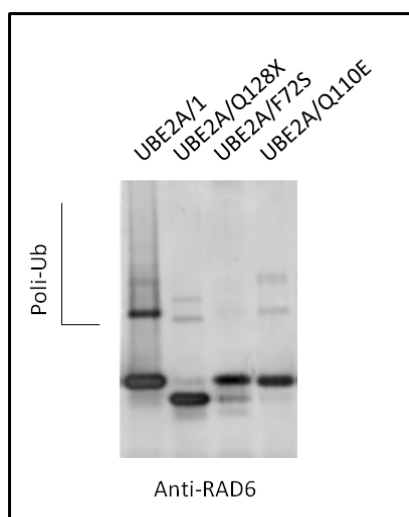


Figura III.27 Ensaio *in vitro* para avaliar a capacidade de autoubiquitinação de UBE2A com as mutações F72S e Q110E (Tarpey e col., 2009) e Q128X (Nascimento e col., 2006).



### III.5 Discussão

---

O presente capítulo foca estudos *in vivo* e *in vitro* realizados para avaliação funcional das isoformas de UBE2A e do efeito da mutação c.382C→T.

Infelizmente o modelo de diferenciação de pré-adipócitos não pôde ser usado para responder nossas questões sobre o efeito da mutação na formação de neuritos, pois não conseguimos nas células do controle ou do paciente a mesma densidade de neuritos obtida por Ashjian e col. (2003). Diferentemente das células PC12 utilizadas por Kavakebi e col. (2005), de origem ectodérmica, os pré-adipócitos têm origem mesodérmica, o que dificulta sua diferenciação em linhagem derivada de outro folheto germinativo.

Os resultados dos ensaios de complementação funcional *in vivo* indicam que apenas a expressão do transcrito 1 de UBE2A é capaz de corrigir os fenótipos de sensibilidade a luz UV e a choque térmico apresentados pela linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae*. A expressão dos transcritos 2 e 3 não resulta na correção dos fenótipos e sua superexpressão gera certa toxicidade, agravada quando as células são cultivadas a 37° C. Entretanto, as isoformas por eles codificadas não parecem ser estáveis na levedura: assim como nos tecidos humanos testados, não conseguimos detectá-las nos extratos protéicos das leveduras que expressam os respectivos transcritos. A expressão do transcrito 1 contendo a mutação c.382C→T revelou que a isoforma UBE2A/Q128X, por sua vez, é estável na linhagem  $\Delta rad6$ , porém, além de não corrigir o fenótipo de sensibilidade à UV, foi, dentre as isoformas de UBE2A, a mais tóxica. Os fenótipos de toxicidade, entretanto, não foram observados após expressão desses transcritos em linhagem selvagem de *S. cerevisiae*.

Os ensaios *in vitro* revelaram que apenas UBE2A/1 é capaz de ubiquitinar histonas H2A. Os ensaios com UBE2A/2 e UBE2A/3 não foram, entretanto, conclusivos, uma vez que a incapacidade de ubiquitinação de histonas que observamos pode ser consequência de falha no processo de renaturação dessas isoformas que realizamos *in vitro*. O dobramento incorreto pode ter prejudicado a função das isoformas. Observamos que a proteína UBE2A/Q128X é solúvel e

capaz de interagir com a E1 da qual recebe a molécula de ubiquitina, embora não seja capaz de transferi-la para a histona. O segmento C-terminal ausente nessa isoforma é, portanto, importante nesse processo.

Os ensaios *in vitro* despertaram nossa atenção para o fenômeno de autoubiquitinação de UBE2A. Embora a capacidade de autoubiquitinação não tenha sido demonstrada nos estudo de Sarcevic e col. (2002), os autores comentam brevemente essa observação e consideram-na como possível mecanismo de autorregulação. Nossos ensaios confirmaram que UBE2A/1, além de monoubiquitinar histonas H2A, é capaz de ubiquitinar-se. A capacidade de autoubiquitinação da isoforma mutada é menos evidente, porém também ocorre. As cadeias de poliubiquitina permanecem ligadas à UBE2A/1 e UBE2A/Q128X, mesmo após adição de tampão redutor para finalização do ensaio, o que sugere que ocorre em resíduo de lisina, e não por ligação tioéster com o resíduo de cisteína do sítio ativo.

Nossos resultados somados à elevada conservação entre as parálogas humanas UBE2A e UBE2B nos levaram a considerar um possível mecanismo de regulação recíproca. Dessa maneira, a degradação de UBE2A/Q128X nas células do paciente poderia ser dependente de UBE2B. A reduzida capacidade de autoubiquitinação da isoforma mutada dificultaria sua degradação e tornaria necessária a atividade da paróloga. Isso explicaria porque ela é estável quando expressa na linhagem *Δrad6*, mas não nas células do paciente. A presença de RAD6 estaria diretamente relacionada à ausência de toxicidade, após a expressão de UBE2A/Q128X em linhagem selvagem – de fato, observamos que a degradação da isoforma mutada está ocorrendo nessas células. A inviabilidade de modelo nocaute quanto a ambas as parálogas UBE2A e UBE2B não nos permite testar a estabilidade da isoforma mutada em células de mamíferos. Observamos, entretanto, que, em levedura, a presença de um ortólogo funcional resulta na degradação de UBE2A/Q128X.

Confirmamos que a mutação c.382C→T resulta na perda de função de UBE2A não apenas como consequência de sua degradação na célula do paciente: verificamos que a isoforma mutada foi incapaz de restituir o fenótipo de

sensibilidade à UV de *S. cerevisiae* e não foi capaz de ubiquitinar histonas H2A *in vitro*. Ainda, os ensaios funcionais aqui apresentados sugerem o possível mecanismo que leva à degradação da isoforma mutada: degradação proteossômica mediada por autoubiquitinação ou ubiquitinação recíproca realizada pela paróloga UBE2B. Em levedura, a proteína mutada parece depender da presença de RAD6 para ser degradada. De maneira similar, a presença da proteína mutada pode necessitar de UBE2B para ser degradada, caracterizando um ganho tóxico de função, comprometendo a função de ambas as parálogas.

David e col. (2010), com base em estudos *in vitro*, concluíram que a autoubiquitinação é característica comum a todas as E2 humanas por eles testadas. Dados de espectrometria de massa permitiram que os autores dividissem as E2 em dois grupos: aquelas que formam cadeia de poliubiquitina ligada a um de seus resíduos de lisina e aquelas em que a cadeia se estende por meio de ligação tioéster no resíduo de cisteína do sítio ativo. Enquanto nossos dados indicam que a interação observada da ubiquitina com UBE2A/1 e UBE2A/Q128X é em resíduo de lisina – já que a ligação não se desfez mesmo na presença de agente redutor – os dados de espectrometria de massa apresentados por David e col. (2010) indicam que, *in vitro*, apenas UBE2B é capaz de autoubiquitinação em resíduo de lisina e que a autoubiquitinação de UBE2A ocorreria no resíduo de cisteína do sítio ativo. De qualquer maneira, existem evidências *in vivo* de que cadeias de poliubiquitina estendidas no sítio ativo também servem como sinal de degradação de E2 (Ravid & Hochstrasser, 2007).

Alguns trabalhos sugerem que as E2 atuem também como dímeros *in vivo* e *in vitro* (Silver e col., 1992; Chen e col., 1993; Gazdoiu e col., 2005). A elevada identidade de aminoácidos entre UBE2A e UBE2B sugere que sejam capazes formar heterodímeros. Ainda, todos os resíduos de lisina de UBE2B são conservados em UBE2A, de forma que, *in vivo*, é possível que a sinalização para degradação das parálogas seja realizada de maneira mais eficiente por UBE2B, ubiquitinando resíduos de lisina, o que poderia ser uma das razões que levaram à conservação de isoformas tão semelhantes em mamíferos.

Nossos resultados sugerem que as isoformas 2 e 3 de UBE2A não possuem atividade de conjugase de ubiquitina. Em levedura são, aparentemente, degradadas imediatamente após sua expressão. Essa degradação pode ser resultado da ausência, na levedura, de parceiro que auxilie em sua estabilidade. Entretanto, como as isoformas também não foram encontradas em extratos protéicos de tecidos humanos, é possível que o mesmo processo de degradação ocorra em mamíferos. Nossos dados sugerem que a produção de transcritos alternativos de *UBE2A* tenha função reguladora no processo de transcrição de *UBE2A*, na produção da isoforma funcional codificada pelo transcrito 1. A identificação, em camundongos, de transcrito alternativo, correspondente ao transcrito 3 humano, vem apoiar a hipótese de que os produtos do *splicing* alternativo na regulação de UBE2A.

Sabe-se que a regulação da expressão gênica pode ocorrer em diversos níveis - por exemplo, transcrição, tradução, processamento do mRNA. As modificações da cromatina parecem ser os principais mecanismos de regulação da expressão gênica. Ocorrem em consequência da ação de uma série de enzimas reguladoras que agem na cromatina, introduzindo modificações em histonas (tais como, metilação, acetilação, forforilação e ubiquitinação) ou remodelando os nucleossomos, em reações dependentes de ATP, de maneira que limitam ou permitem o acesso de proteínas ao DNA (revisão em Kornberg e col., 1999). Esse controle epigenético da expressão gênica é mecanismo fundamental pelo qual uma série de modificações na cromatina permite o funcionamento normal da célula em diferentes condições (Strahl & Allis, 2000; Peterson & Laniel, 2004; de La Cruz X e col., 2005). Porém a atividade das enzimas modificadoras de cromatina deve ser também regulada a fim de produzir padrões de expressão gênica coerentes com a fase do ciclo celular, do desenvolvimento ou da diferenciação tecidual. (Lois e col., 2007). Existem evidências de que o *splicing* alternativo introduz alterações relevantes para o funcionamento de diversas dessas enzimas modificadoras de cromatina (Tominaga & Pereira-Smith, 2002; Tajul-Arifin e col., 2003; Barak e col., 2004; Convery e col., 2005). Análises *in silico* mostraram que cerca de 70% dos genes humanos conhecidos por codificar modificadores epigenéticos possuem

transcritos alternativos, sugerindo papel importante desse processo na modulação dessas enzimas (Lois e col., 2007). Desses genes, 65% possuem transcritos alternativos que codificam isoformas que são versões menores da isoforma funcional, com pelo menos um domínio funcional (catalítico ou de interação) ausente ou significativamente afetado. A geração de isoformas inativas constituiria um mecanismo simples e poderoso para regular a quantidade funcional de uma determinada proteína (Smith & Valcarel, 2000; Modrek & Lee, 2003; Neu-Yilik e col., 2004). De acordo com Lois e col., (2007) diversos genes codificadores de reguladores epigenéticos têm isoformas com redução de 35-95% em tamanho e, conseqüentemente, com domínios funcionais ausentes ou danificados. Os autores consideram que reduções drásticas de tamanho resultariam em isoformas inativas. Um exemplo por eles citado é o gene *UBE2A* - seus transcritos alternativos codificam isoformas em que faltam 22% e 47% do domínio UBC. Segundo a classificação das E2 (Jentsch, 1992), detalhada no Capítulo I, as diversas conjugases de ubiquitina mantêm em comum o domínio UBC altamente conservado e as variações observadas consistem em inserções ou extensões N- e C-terminais, mas nunca deleções, como observado nas isoformas 2 e 3 de *UBE2A*.

A não conservação do domínio UBC nas isoformas 2 e 3 de *UBE2A* é forte indício de que elas não são funcionais. Embora os mRNA estivessem presentes, as isoformas codificadas por eles não foram detectadas nos tecidos humanos avaliados no Capítulo II, nem após a superexpressão desses transcritos em linhagens de levedura selvagem e  $\Delta rad6$ . Assim, os transcritos alternativos 2 e 3 de *UBE2A* seriam traduzidos em isoformas não funcionais, que falhariam em dobrar-se corretamente e seriam degradadas imediatamente após sua síntese. Polipeptídeos recém sintetizados nos ribossomos devem dobrar-se em estruturas tridimensionais estáveis para exercerem corretamente suas funções. Proteínas mal dobradas ou desdobradas perdem sua funcionalidade e têm alta probabilidade de formar agregados ou interagir com outros componentes celulares, ambos prejudiciais para o funcionamento normal da célula (Goldberg, 2003). Na célula, mecanismos protetores evoluíram permitindo que lidem com proteínas desdobradas de forma segura. Chaperonas reconhecem características comuns a

polipeptídeos não nativos e promovem seu correto dobramento. Proteínas que não podem ser recuperadas são degradadas, em sua maioria via sistema ubiquitina-proteassoma. Os dois sistemas podem agir cooperativamente: algumas chaperonas recrutam o aparato de ubiquitinação para facilitar o processo de degradação (McDounough & Patterson, 2003).

O uso de inibidores irreversíveis do proteassoma revelou que mais de um quarto das proteínas recém sintetizadas são degradadas entre 10 e 30 min após sua síntese (Schubert e col., 2000; Princiotta e col., 2003; Yewdell e col., 2005). Esses polipeptídeos, definidos como DRiPs (*Defective ribosomal products* - produtos ribossômicos defeituosos) parecem representar 75% dos substratos do proteassoma e são produtos gênicos normais e fisiologicamente relevantes em células saudáveis, mas que falham em adquirir conformação terciária estável devido a erros no processo de transcrição ou tradução, variações no processamento do mRNA, falhas nos processos de modificações pós-tradução, no reconhecimento de sinais de localização celular ou incapacidade de encontrar um parceiro que auxilie na sua estabilização. Embora a degradação rápida de cerca de 30% das proteínas recém sintetizadas na célula faça com que o processo de tradução pareça ineficiente, diversos estudos apontam os DRiPs como as principais fontes de peptídeos antigênicos de proteínas aparentemente estáveis, apresentadas para o sistema imune pelo MHC I (*Major Histocompatibility Complex I*) (Schubert e col., 2000; Reits e col., 2000; Yedwell e col., 2001; Yewdell, 2005). Ainda, vários agentes presentes na célula podem danificar suas conformações, como os radicais livres de oxigênio, continuamente gerados pelo metabolismo celular (revisão em Goldberg, 2003).

O choque-térmico (*heat shock*) também pode danificar o dobramento de proteínas e dessa maneira alterar diversos processos celulares. Em condições de aumento de temperatura ocorre aumento da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma com a finalidade de direcionar as proteínas mal dobradas para degradação. Sabe-se que o estado da ubiquitina na célula é altamente dinâmico, uma vez que ela é constantemente ligada a (pela ação das enzimas E1, E2 e E3) ou desligada de (pela ação das DUB) proteínas-alvo. Embora a quantidade de

ubiquitina na célula seja elevada, o montante de ubiquitina livre é relativamente baixo (Dantuma e col., 2006), estando, a maioria, conjugada a outras proteínas. Um aumento na demanda de ubiquitina – como após superexpressão de uma proteína que falha em dobrar-se corretamente ou em situação de aumento de temperatura, por exemplo – pode alterar dramaticamente a homeostase por afetar outros processos dependentes de ubiquitina. De fato, o aumento na concentração de ubiquitina livre antes de choque térmico minimiza o estresse sobre o sistema ubiquitina-proteassoma (Salomons e col., 2009).

A sobrecarga dos sistemas de degradação explicaria a toxicidade, agravada após choque térmico, que observamos após a superexpressão dos transcritos 2 e 3 de *UBE2A* na linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae*. A inibição das vias de degradação nas linhagens de levedura pode esclarecer se as proteínas estão mesmo sendo degradadas imediatamente após a síntese. Entretanto, a parede celular da levedura não permite a entrada dos inibidores na célula. Experimentos de inibição do proteassoma em levedura utilizam linhagens mutantes, como  $\Delta erg6$  e  $\Delta pdr5$ , que apresentam permeabilidade aumentada (Gaczynska & Osmulski, 2005; Lee & Goldberg 1996), permitindo a entrada dos inibidores. Para a entrada do inibidor de proteassoma na linhagem  $\Delta rad6$  seria necessária a digestão enzimática da parede celular seguida da cultura dos esferoplastos para indução da expressão das isoformas de *UBE2A* concomitante à inibição do proteassoma. Hutchison e col. (1967) demonstraram que os esferoplastos em cultura levam cerca de 24 h para reconstruir a parede celular, tempo suficiente para indução da expressão e inibição do proteassoma. Liu e col. (2007) demonstraram que a substituição do sulfato de amônia por L-prolina e adição de SDS 0,003% ao meio de cultivo das leveduras, aumenta a permeabilidade da parede celular, permitindo a entrada dos inibidores de proteassoma. Esses protocolos estão em fase de padronização no laboratório.

A não detecção das isoformas 2 e 3 pelo anticorpo anti-V5, após expressão dessas proteínas em fusão com o epítipo V5, apóia a hipótese de degradação. Ainda, a expressão da isoforma mutada *UBE2A/Q128X* em fusão com o epítipo V5 e a cauda de histidina C-terminal parece resultar na sua degradação. Sem essas modificações na porção C-terminal, a isoforma mutante de *UBE2A* é estável e

solúvel em levedura, e sua degradação parece depender da presença de RAD6, conforme discutido acima. De fato, diferentes alterações em uma mesma proteína podem resultar na ativação de vias de degradação distintas. Liu e col. (2006) demonstraram que mutações N-terminais e C-terminais em Pma1, uma ATPase da membrana plasmática da levedura, eram distintamente reconhecidas: enquanto as mutações na porção C-terminal ativavam a via de degradação associada ao retículo endoplasmático, as alterações N-terminais resultavam em endocitose e degradação vacuolar. Situação similar pode ocorrer com as diferentes isoformas de UBE2A: diferenças na porção central (isoforma 2) ou N-terminal (isoforma 3) levariam a mecanismo de degradação distinto daquele observado para a isoforma mutada, que não possui a porção C-terminal.

Os resultados aqui obtidos confirmam a perda de função de UBE2A devida à mutação e sugerem possível mecanismo que leva à degradação da isoforma mutada nas células do paciente, indicando que pode haver também ganho tóxico de função. A possível participação da paróloga UBE2B no processo de degradação da isoforma mutada, pode resultar no comprometimento de ambas as isoformas, A e B. Os ensaios aqui apresentados podem ser utilizados para avaliar o efeito das mutações recentemente descritas por Budny e col. (2010) em UBE2A e, ainda, abrem novos caminhos de investigação sobre mecanismo de autorregulação e regulação recíproca das parálogas humanas UBE2A e UBE2B, processos não descritos antes e que podem explicar a conservação das duas parálogas de RAD6 em mamíferos.



## Referências Bibliográficas

---

- Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH - *In vitro* differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. **Plast Reconstr Surg** 111:1922-31, 2003.
- Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Seidman JA, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Caps. 2, 3 e 13, 1994.
- Barak O, Lazzaro MA, Cooch NS, Picketts DJ, Shiekhattar R - A tissue-specific, naturally occurring human SNF2L variant inactivates chromatin remodeling. **J Biol Chem** 279:45130-8, 2004.
- Botstein D, Fink GR - Yeast: an experimental organism for modern biology. **Science** 240:1439-43, 1988. Revisão.
- Budny B, Badura-Stronka M, Materna-Kiryluk A, Tzschach A, Raynaud M, Latos-Bielenska A, Ropers H - Novel missense mutations in the ubiquitination-related gene *UBE2A* cause a recognizable X-linked mental retardation syndrome. **Clin Genet**. 2010
- Chen P, Johnson P, Sommer T, Jentsch S, Hochstrasser M - Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the *in vivo* degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. **Cell** 74:357-69, 1993.
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S - Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. **Science** 313:324-8, 2006.
- Convery E, Shin EK, Ding Q, Wang W, Douglas P, Davis LS, Nickoloff JA, Lees-Miller SP, Meek K - Inhibition of homologous recombination by variants of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs). **Proc Natl Acad Sci USA** 102:1345-50, 2005.

- Dantuma NP, Groothuis TA, Salomons FA, Neefjes J - A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. **J Cell Biol** 173:19-26, 2006.
- David Y, Ziv T, Admon A, Navon A - The E2 ubiquitin conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. **J Biol Chem**. 2010 - Epub ahead of print
- de La Cruz X, Lois S, Sánchez-Molina S, Martínez-Balbás MA - Do protein motifs read the histone code? **Bioessays** 27:164-75, 2005. Revisão.
- Dolinski K, Botstein D. Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. **Genome Res** 15:1611-9, 2005. Revisão.
- Ellison KS, Gwozd T, Prendergast JA, Paterson MC, Ellison MJ - A site-directed approach for constructing temperature-sensitive ubiquitin-conjugating enzymes reveals a cell cycle function and growth function for RAD6. **J Biol Chem** 266:24116-20, 1991.
- Fields S, Johnston M. Cell biology - Whither model organism research? **Science** 307:1885-6 (2005).
- Freiberg G, Mesecar AD, Huang H, Hong JY, Liebman SW - Characterization of novel rad6/ubc2 ubiquitin-conjugating enzyme mutants in yeast. **Curr Genet** 37:221-33, 2000.
- Gaczynska M, Osmulski PA - Small-molecule inhibitors of proteasome activity. **Methods Mol Biol** 301:3-22, 2005. Revisão
- Gazdoiu S, Yamoah K, Wu K, Escalante CR, Tappin I, Bermudez V, Aggarwal AK, Hurwitz J, Pan ZQ - Proximity-induced activation of human Cdc34 through heterologous dimerization. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102:15053-8, 2005.
- Gitler AD - Beer and bread to brains and beyond: can yeast cells teach us about neurodegenerative disease? **Neurosignals** 16:52-62, 2008.
- Goldberg AL - Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature** 426:895-9, 2003. Revisão.
- Hutchison HT, Hartwell LH - Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. **J Bacteriol** 94:1697-705, 1967.

- Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A - The DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. **Nature** 329:131-34, 1987.
- Jentsch S - The ubiquitin-conjugation system. **Annu Rev Genet** 26:179-207, 1992. Revisão.
- Jiang YH, Beaudet AL - Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. **Curr Opin Pediatr** 16:419-26, 2004.
- Johansson BE, Brett IC - Changing perspective on immunization against influenza. **Vaccine** 25:3062-5, 2007. Revisão.
- Kavakebi P, Hausott B, Tomasino A, Ingorokva S, Klimaschewski L - The N-end rule ubiquitin-conjugating enzyme, HR6B, is up-regulated by nerve growth factor and required for neurite outgrowth. **Mol Cell Neurosci** 29:559-68, 2005.
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J - *UBE3A/E6-AP* mutations cause Angelman syndrome. **Nat Genet** 15:70-3, 1997. Erratum in: **Nat Genet** 15:411, 1997.
- Kim J, Guermah M, McGinty RK, Lee JS, Tang Z, Milne TA, Shilatifard A, Muir TW, Roeder RG - RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. **Cell** 137:459-71, 2009.
- Koken MH, Reynolds P, Jaspers-Dekker I, Prakash L, Prakash S, Bootsma D, Hoeijmakers JH - Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:8865-9, 1991.
- Koken MH, Smit EM, Jaspers-Dekker I, Oostra BA, Hagemmeijer A, Bootsma D, Hoeijmakers JH - Localization of two human homologs, HHR6A and HHR6B, of the yeast DNA repair gene *RAD6* to chromosomes Xq24-q25 and 5q23-q31. **Genomics** 12:447-53, 1992.
- Kornberg RD - Eukaryotic transcriptional control. **Trends Cell Biol** 9:M46-9, 1999. Revisão.
- Lee DH, Goldberg AL - Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 271:27280-4, 1996.

- Lehman NL - The ubiquitin proteasome system in neuropathology. **Acta Neuropathol** 118:329-47, 2009. Revisão
- Liu C, Apodaca J, Davis LE, Rao H - Proteasome inhibition in wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechniques** 42:158, 2007
- Liu Y, Sitaraman S, Chang A - Multiple degradation pathways for misfolded mutants of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. **J Biol Chem** 281:31457-66, 2006
- Lois S, Blanco N, Martínez-Balbás M, de la Cruz X -The functional modulation of epigenetic regulators by alternative splicing. **BMC Genomics** 8:252, 2007.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ - Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. **J Pathol** 155:9-15, 1988.
- Mager WH, Winderickx J - Yeast as a model for medical and medicinal research. **Trends Pharmacol Sci** 26:265-73, 2005. Revisão.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL - *De novo* truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. **Nat Genet** 15:74-7, 1997.
- McDonough M, Sangan P, Gonda DK - Characterization of novel yeast RAD6 (*UBC2*) ubiquitin-conjugating enzyme mutants constructed by charge-to-alanine scanning mutagenesis. **J Bacteriol** 177:580-5, 1995.
- McDonough H, Patterson C - CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. **Cell Stress Chaperones** 8:303-8, 2003. Revisão.
- Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro TF. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. **Biotechnol J** 3:325-38, 2008. Revisão.
- Miroux B, Walker JE - Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol** 260:289-98, 1996.

- Modrek B, Lee CJ - Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. **Nat Genet** 34:177-80, 2003.
- Nascimento RM, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM - *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet** 79:549-55, 2006.
- Neu-Yilik G, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE - Nonsense-mediated mRNA decay: from vacuum cleaner to Swiss army knife. **Genome Biol** 5:218, 2004. Revisão.
- Ocampo A, Barrientos A - From the bakery to the brain business: developing inducible yeast models of human neurodegenerative disorders. **Biotechniques** 45:vii-xiv, 2008.
- Outeiro TF, Lindquist S - Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*. 302:1772-5, 2003.
- Peterson CL, Laniel MA - Histones and histone modifications. **Curr Biol** 14:R546-51, 2004. Revisão.
- Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F, Bennink JR, Yewdell JW - Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. **Immunity** 18:343-54, 2003.
- Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, FeldmanGJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A - Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. **Nat Genet** 17:285-91, 1997.
- Ravid T, Hochstrasser M - Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. **Nat Cell Biol** 9:422-7, 2007.
- Reits EA, Vos JC, Grommé M, Neefjes J - The major substrates for TAP *in vivo* are derived from newly synthesized proteins. **Nature** 404:774-8, 2000.
- Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MH, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JT, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH - Inactivation of the HR6B ubiquitin-

- conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. **Cell** 86:799-810, 1996.
- Roest HP, Baarends WM, de Wit J, van Klaveren JW, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, van Cappellen WA, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA - The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. **Mol Cell Biol** 24:5485-95, 2004.
- Salomons FA, Menéndez-Benito V, Böttcher C, McCray BA, Taylor JP, Dantuma NP - Selective accumulation of aggregation-prone proteasome substrates in response to proteotoxic stress. **Mol Cell Biol** 29:1774-85, 2009.
- Sarcevic B, Mawson A, Baker RT, Sutherland RL - Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. **EMBO J** 21:2009-18, 2002.
- Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR - Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. **Nature** 404:770-4, 2000.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y - Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. **Ann Neurol** 45:668-72 (1999).
- Silver ET, Gwozd TJ, Ptak C, Goebel M, Ellison MJ - A chimeric ubiquitin conjugating enzyme that combines the cell cycle properties of CDC34 (UBC3) and the DNA repair properties of RAD6 (UBC2): implications for the structure, function and evolution of the E2s. **EMBO J** 11:3091-8, 1992.
- Smith CW, Valcárcel J - Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. **Trends Biochem Sci** 25:381-8, 2000. Revisão.
- Southern, JA, Young, DF, Heaney, F, Baumgartner, W, and Randall, RE - Identification of an Epitope on the P and V Proteins of Simian Virus 5 That Distinguishes Between Two Isolates with Different Biological Characteristics. **J Gen Virol** 72, 1551-1557, 1991.

- Sung P, Prakash S, Prakash L - The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. **Genes Dev** 2:1476-85, 1988.
- Strahl BD, Allis CD - The language of covalent histone modifications. **Nature** 403:41-5, 2000.
- Tajul-Arifin K, Teasdale R, Ravasi T, Hume DA, Mattick JS; RIKEN GER Group; GSL Members - Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. **Genome Res** 13:1416-29, 2003.
- Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slaugh R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M - Mutations in *CUL4B*, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. **Am J Hum Genet** 80:345-52, 2007.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T,

- Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41:535-43, 2009.
- Tominaga K, Pereira-Smith OM - The genomic organization, promoter position and expression profile of the mouse MRG15 gene. **Gene** 294:215-24, 2002.
- Winderickx J, Delay C, De Vos A, Klinger H, Pellens K, Vanhelmont T, Van Leuven F, Zabrocki P - Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. **Biochim Biophys Acta** 1783:1381-95, 2008.
- Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S - Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. **J Biol Chem** 27:25328-31(1995).
- Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR - At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. **J Cell Sci** 114:845-51, 2001. Revisão.
- Yewdell JW. Serendipity strikes twice: the discovery and rediscovery of defective ribosomal products (DRiPs). **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)** 51:635-41, 2005.
- Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, Beier M, Hülskamp G, Guzman C, Rehder H, Beemer FA, Hamel B, Vanlieferinghen P, Gershoni-Baruch R, Vieira MW, Dumic M, Auslender R, Gil-da-Silva-Lopes VL, Steinlicht S, Rauh M, Shalev SA, Thiel C, Ekici AB, Winterpacht A, Kwon YT, Varshavsky A, Reis A - Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). **Nat Genet** 37:1345-50, 2005.
- Zou Y, Liu Q, Chen B, Zhang X, Guo C, Zhou H, Li J, Gao G, Guo Y, Yan C, Wei J, Shao C, Gong Y - Mutation in *CUL4B*, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. **Am J Hum Genet** 80:561-6, 2007.



Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13:4279-95, 2002.

### **Recursos de Internet**

*Sacharomyces cerevisiae* Genome Database - <http://www.yeastgenome.org>

PRIMER3 - <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>

---

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

---

Em trabalho anterior, identificamos a mutação c.382C→T no gene *UBE2A*, localizado em Xq24 e codificador de enzima conjugadora de ubiquitina, como causa de nova síndrome de deficiência mental (DM) de herança ligada ao cromossomo X. Foi a primeira descrição de mutação nesse gene e a primeira associação de mutação em gene que codifica conjugase de ubiquitina com patologia humana. Neste trabalho, focalizamos o gene *UBE2A* quanto a expressão dos transcritos alternativos, função das isoformas por eles codificadas e o efeito da mutação c.382C→T como causa de deficiência mental (DM).

No Capítulo I, revisamos os aspectos genéticos da DM, dando ênfase à herança ligada ao cromossomo X, principal causa de DM herdada e resumimos o estudo que levou à identificação da mutação em *UBE2A* como causa de quadro sindrômico de DM. Revisamos o papel da via de ubiquitinação de proteínas e das enzimas que participam do processo, em especial as conjugases de ubiquitina. Levantamos evidências na literatura que não deixam dúvida sobre a importância da via de ubiquitinação no sistema nervoso, tanto em processos de neurodesenvolvimento como neurodegeneração.

No Capítulo II, avaliamos a contribuição de mutações em *UBE2A* como causa de DM. Apresentamos os resultados do sequenciamento direto da região codificadora do gene *UBE2A* em afetados de 23 famílias em que a DM segrega ligada à segmento que inclui Xq24, onde está localizado o gene *UBE2A*. Uma dessas famílias foi averiguada no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociência, USP (LGH-IB/USP), coordenado pelo Dr. Paulo A. Otto e pela Dra. Angela Vianna Morgante. As demais 22 famílias pertencem ao banco de amostras do Consórcio Europeu de Deficiência Mental (*European Mental Retardation Consortium* - EURO-MRX). A triagem foi também realizada em um indivíduo afetado por DM sindrômica que compartilha características clínicas com nossos pacientes. Como acontece com a maioria dos genes do cromossomo X, o

gene *UBE2A* não parece ser responsável por parcela significativa dos casos de DM, já que novas mutações em *UBE2A* não foram detectadas nessa triagem.

Avaliamos o efeito da mutação c.382C→T nos níveis da transcrição e da tradução em homem afetado e em mulher portadora. A presença da mutação que leva a um códon de parada prematura não resultou na degradação do RNA, que detectamos nas células do afetado. Já na mulher portadora, apenas o transcrito normal foi detectado, de acordo com nossos dados anteriores que mostraram desvio completo no padrão de inativação do cromossomo X nas portadoras da mutação, tendo um mesmo cromossomo X ativo nas células do sangue. A vantagem proliferativa das células em que o cromossomo X com alelo mutado estava inativo deve ter levado a esse padrão de inativação desviado do casual, evidenciando o efeito deletério da mutação.

Entretanto, o mecanismo pelo qual a mutação afeta a via de *UBE2A* permanece interrogado. A proteína *UBE2A* alterada foi encontrada em baixa quantidade nas células do paciente, o que pode ser o resultado de síntese prejudicada ou de degradação pós-tradução. Independente do mecanismo responsável, o fato de apenas uma pequena quantidade da proteína mutada ter sido encontrada, nos permite afirmar que, nas células desses indivíduos, há perda de função de *UBE2A*. Devemos, contudo, considerar que a proteína mutada é sintetizada e que, no caso de a menor quantidade dever-se à degradação pós-tradução, esse processo pode prejudicar a homeostase celular e contribuir para o quadro clínico.

O capítulo II focaliza os transcritos alternativos de *UBE2A*. Diversos bancos de dados apontam para a existência de três transcritos alternativos do gene *UBE2A* humano, mas não há trabalho científico que caracterize os tecidos em que os transcritos são expressos ou a função das proteínas por eles codificadas. A mutação c.382C→T localiza-se no éxon 6 do gene, comum a todos os transcritos, de forma que, no caso de eles codificarem proteínas funcionais, a mutação comprometeria três proteínas, e não apenas uma. Demonstramos que os três transcritos de *UBE2A* são expressos em leucócitos, pré-adipócitos, placenta, córtex cerebral e hipocampo humanos. Detectamos também os três transcritos nas células

de sangue e pré-adipócitos de um de nossos pacientes portador da mutação c.382C→T. Embora os bancos de dados apontem para a existência de apenas um transcrito de *Ube2A* em camundongos, identificamos um transcrito alternativo correspondente ao transcrito alternativo 3 humano. Este foi detectado inclusive em camundongos nocaute quanto ao gene *Ube2a* - o processo de geração do animal nocaute foi realizado por recombinação homóloga em que o cassete de neomicina foi inserido no éxon 1 do gene, de maneira que não eliminou a existência do transcrito correspondente ao transcrito 3 humano, que utiliza uma 5' UTR alternativa localizada no íntron 3. Entretanto, as proteínas codificadas pelos transcritos alternativos não foram detectadas nos extratos protéicos analisados humanos e de camundongo. Esse resultado poderia ser explicado pela falta de especificidade do anticorpo utilizado ou por essas isoformas representarem pequena parcela do *pool* de proteínas da célula. Os anticorpos comerciais anti-RAD6 e anti-HR6A/HR6B foram produzidos após imunização de coelhos com a porção N-terminal da isoforma 1. Seria, portanto, possível que não fossem capazes de detectar as isoformas 2 e 3, em que o segmento utilizado para a produção dos anticorpos está total ou parcialmente ausente. No caso de as proteínas estarem pouco representadas na célula, experimentos de co-immunoprecipitação auxiliariam na identificação dessas isoformas nos extratos protéicos. Entretanto, para a detecção de todas as isoformas de UBE2A seria necessário anticorpo que reconhecesse a porção C-terminal de UBE2A.

Em 2009, duas novas mutações em *UBE2A* foram descritas em estudo colaborativo realizado no *Welcome Trust Sanger Institute*, Hinxton, Cambridge, Reino Unido, após sequenciamento em larga escala de aproximadamente 700 genes do cromossomo X de cerca de 200 indivíduos com DM de herança ligada ao X. Ambas as mutações - c.215C→T e c.328C→G - eram do tipo *missense*. Não foram fornecidas informações quanto ao quadro clínico dos portadores dessas mutações e também não foi esclarecido porque apenas a alteração c.215C→T que resulta na troca do resíduo de fenilalanina da posição 72 por um resíduo de serina (F72S) foi considerada pelos autores como possivelmente patogênica. Nossos

estudos *in vitro*, apresentados no Capítulo III, sugerem que ambas as alterações afetam a função de UBE2A.

Em 2010, foram publicados dois trabalhos associando novas alterações em UBE2A a quadro de DM. Honda e col. (2010) descreveram uma microdeleção em Xq24 que inclui UBE2A e outros oito genes, em um menino com DM e características também presentes em nossos pacientes. Budny e col. (2010) descreveram mutações *missense* em UBE2A em duas famílias em que segregava quadro de DM sindrômica semelhante ao de nossos pacientes. Por comunicação pessoal de Arjan de Brouwer (Departamento de Genética Humana da Universidade Radboud, Nijmegen, Holanda), soubemos da existência de três outras microdeleções de segmentos do cromossomo X que incluem UBE2A, em pacientes do sexo masculino, não aparentados. Comparamos as características clínicas de nossos pacientes com as dos portadores das microdeleções em Xq24 e com aquelas dos portadores de mutações *missense* em UBE2A. A DM grave e o comprometimento significativo ou ausência de fala são comuns a todos. Outras características como baixa estatura, sinófris, boca grande e lábios finos com comissuras voltadas para baixo, pescoço curto e largo, implantação baixa de cabelos na nuca, mamilos espaçados, pênis pequeno, hirsutismo generalizado e a ocorrência de convulsões parecem predominar. Entretanto, enquanto a microcefalia aparece em dois dos três portadores de microdeleções avaliados, a macrocefalia parece predominar no grupo em que ocorrem as mutações de ponto.

No Capítulo III, abordamos estudos funcionais *in vivo* e *in vitro* para avaliar se as isoformas alternativas de UBE2A compartilham suas funções de conjugase de ubiquitina e compreender o efeito da mutação c.382C→T na função de UBE2A.

Buscamos estabelecer modelo celular para avaliar o efeito da mutação na formação de neuritos. Trabalho previamente publicado havia demonstrado que a diferenciação neuronal de células PC12 concomitantemente com a inibição parcial do mRNA de UBE2B (parálogo de UBE2A) resultava na redução de 20-30% do comprimento de neuritos. Entretanto, nossos ensaios de diferenciação de pré-adipócitos não responderam nossas questões sobre o efeito da mutação na formação de neuritos, pois não conseguimos obter, nas células do controle ou nas

do paciente, a densidade de neuritos descrita anteriormente na diferenciação de pré-adipócitos. Diferentemente das células PC12, de origem ectodérmica, os pré-adipócitos tem origem mesodérmica, o que dificulta sua diferenciação em linhagem derivada de outro folheto germinativo.

A elevada conservação entre as proteínas ortólogas UBE2A e UBE2B humanas e RAD6 de levedura e a observação de que ambas as parálogas humanas são capazes de complementar os fenótipos apresentados pela linhagem  $\Delta rad6$  de *Saccharomyces cerevisiae* nos levou a considerar a linhagem de levedura  $\Delta rad6$  como modelo para nossos estudos funcionais. Também, avaliamos a capacidade das isoformas 2 e 3 e da isoforma Q128X de UBE2A para ubiquitinar histonas H2A *in vitro*, conforme previamente descrito para a isoforma UBE2A/1.

Os resultados dos ensaios *in vivo* indicam que apenas a expressão do transcrito 1 de UBE2A é capaz de complementar os fenótipos apresentados pela linhagem  $\Delta rad6$  de *S. cerevisiae*. A expressão dos transcritos 2 ou 3 não resulta na restituição do fenótipo de sensibilidade à UV - a expressão gera certa toxicidade, agravada quando as células são cultivadas a 37° C. Entretanto, as isoformas por eles codificadas não parecem ser estáveis na levedura: assim como nos tecidos humanos testados, não conseguimos detectá-las nos extratos protéicos das leveduras que expressavam esses transcritos. A expressão do transcrito 1 contendo a mutação c.382C→T revelou que a isoforma UBE2A/Q128X, por sua vez, é estável na linhagem  $\Delta rad6$ , porém, além de não restituir o fenótipo de sensibilidade à UV, foi, dentre as isoformas de UBE2A, a mais tóxica. Os fenótipos de toxicidade não foram observados após expressão em linhagem selvagem de *S. cerevisiae*.

Esses resultados indicam que as isoformas 2 e 3 de UBE2A não apresentam atividade de conjugase de ubiquitina e que são, aparentemente, degradadas imediatamente após sua expressão em levedura. O fato de o fenótipo de toxicidade ser agravado, em condições de choque térmico, apóia a hipótese de degradação dessas isoformas, em levedura. A degradação pode ser resultado da ausência de parceiro que permita sua estabilidade, mas a ausência das isoformas também em extratos protéicos de tecidos humanos sugere que o mesmo processo

de degradação ocorra em mamíferos. Segundo a classificação das E2, as diversas conjugases de ubiquitina têm em comum o domínio UBC altamente conservado e as variações observadas consistem em inserções ou extensões C-terminais, mas nunca deleções, como ocorre nas isoformas 2 e 3 de UBE2A. Os transcritos alternativos teriam, assim, função regulatória.

Os ensaios *in vitro* confirmaram a capacidade de UBE2A/1 ubiquitinar histonas H2A. Os ensaios com UBE2A/2 e UBE2A/3 não foram conclusivos, uma vez que a incapacidade de ubiquitinação de histonas que observamos pode ter consequência da renaturação *in vitro*, que pode ter ocorrido prejudicando sua função. Entretanto a obtenção das isoformas puras nos permitiu verificar que, caso a isoforma 2 estivesse presente nos extratos de levedura, ela seria reconhecida pelo anticorpo anti-RAD6. Verificamos que a proteína mutada UBE2A/Q128X é capaz de interagir com a E1, da qual recebe a molécula de ubiquitina, mas não é capaz de transferi-la para a histona. O segmento C-terminal ausente nessa isoforma é, portanto, importante nesse processo.

Os ensaios *in vitro* despertaram nossa atenção para o fenômeno de autoubiquitinação de UBE2A, possível mecanismo de autorregulação previamente considerado na literatura. O fato de alguns trabalhos sugerirem que as E2 atuem também como dímeros *in vivo* e *in vitro* e a elevada conservação entre as parálogas humanas UBE2A e UBE2B nos levaram a considerar a possibilidade de mecanismo de regulação recíproca. Dessa maneira, a degradação de UBE2A/Q128X nas células do paciente poderia ser dependente de UBE2B. A reduzida capacidade de autoubiquitinação da isoforma mutada dificultaria sua degradação e tornaria necessária a atividade da paróloga. Isso explicaria porque ela é estável quando expressa na linhagem de levedura  $\Delta rad6$ , mas não nas células do paciente. A presença de RAD6 estaria diretamente relacionada à ausência de toxicidade após a expressão de UBE2A/Q128X em linhagem selvagem – a degradação da isoforma mutada está ocorrendo nessas células. A não viabilidade de camundongo duplo-nocaute quanto as parálogas UBE2A e UBE2B não permite testar a estabilidade da isoforma mutada em células de mamíferos. Observamos, de fato, que a inibição do proteassoma nas células do paciente leva ao acúmulo dessa proteína.



A presença da mutação c.382C→T nas células do paciente parece resultar no fenótipo de DM devido à perda de função de UBE2A: a isoforma mutada não restitui o fenótipo de sensibilidade à UV de *S. cerevisiae* e não foi capaz de ubiquitinar histonas H2A *in vitro*. Além disso, indivíduos com microdeleções de UBE2A apresentam fenótipo semelhante ao de nossos pacientes. Por outro lado, a presença da proteína mutada que necessitaria de UBE2B para ser degradada pode caracterizar um ganho tóxico de função - comprometeria a função de ambas as parálogas. É possível que os dois mecanismos contribuam para o quadro clínico. Os dados dos ensaios *in vivo* e *in vitro* abrem caminhos de investigação do processo de regulação de UBE2A e UBE2B no nível da proteína, sugerindo a autoubiquitinação e a ubiquitinação recíproca como possíveis mecanismos reguladores, que podem explicar a conservação das duas parálogas de RAD6 em mamíferos.

---

## **ABSTRACT**

## Abstract

We have previously described a nonsense mutation (c.382C\_T) in the *UBE2A* gene, at Xq24, which encodes a ubiquitin conjugating enzyme (E2), as the cause of a new X-linked mental retardation syndrome. The predicted protein lacks the 25 C-terminal amino acid residues conserved in vertebrates and in *Drosophila*. This was the first description of a mutation in a ubiquitin conjugating enzyme gene causative of a human disease. In the present work, we focused on the *UBE2A* gene, its alternative transcripts and isoforms, and the effect of the c.382C\_T mutation.

We screened for *UBE2A* mutations 23 males presenting X-linked mental retardation (XLMR), previously mapped to the interval encompassing this gene, and one isolated case, who shared clinical features with our previously described patients. No mutations were detected in this selected series of patients suggesting that mutations in *UBE2A* is not a common cause of XLMR, similarly to the majority of the XLMR genes hereto described. Very recently four Xq24 microdeletions encompassing *UBE2A* and three missense mutations were found by other groups in mentally retarded males that shared several clinical features with our patients. Comparing these and our patients, a clinical picture emerges of mental retardation associated with severe speech impairment, present in all of them. Short stature, large mouth with downturned corners and thin lips, short and broad neck, low posterior hairline, widely spaced nipples, marked generalized hirsutism and seizures are common features. However, microcephaly was observed only in patients carrying *UBE2A* deletions, while carriers of missense or nonsense mutations showed macrocephaly.

We evaluated the effect of the *UBE2A* c.382C\_T mutation on transcription and translation. This mutation affects the last *UBE2A* exon and, as expected, does not lead to nonsense mediated RNA decay, demonstrated by the presence of *UBE2A* mRNA in leucocytes of an affected male. However, only a small amount of the mutated protein was detected in the patient's cells, suggesting the loss of *UBE2A* function as the cause of the syndrome. The posttranslational degradation

of the mutated protein could also disturb the cellular homeostasis, a gain of function that remained a possibility.

The detrimental effect of the c.382C\_T mutation was further supported by the presence of only the normal transcript in leucocytes of a heterozygous woman, who had completely skewed X inactivation, thus pointing to the selective advantage of lymphocytes carrying the normal allele on the active X chromosome.

Our search in DNA and protein sequence databases suggested that the *UBE2A* gene produces three alternative transcripts all classified as protein coding. These three transcripts contain the mutation site (c.382C\_T). We showed that all three *UBE2A* transcripts are expressed in human leucocytes, adipocytes, placenta, cerebral cortex and hippocampus. We also detected an alternative transcript in murine, which corresponds to the human transcript 3. This alternative transcript was present in all murine tissues analyzed, including samples from a *Ube2A* knockout mouse. However, we failed to detect the proteins encoded by the alternative transcripts. This could result from low affinity of the used commercial antibody to the isoforms. Alternatively, a small amount of these proteins in the pool of cellular proteins, might have not been detected by Western blotting.

We performed *in vivo* and *in vitro* assays to address the role of the alternative *UBE2A* isoforms, and to evaluate the effect of c.382C-T mutation on *UBE2A* function. Taking into account the high amino acid conservation between the human *UBE2A* and the *Saccharomyces cerevisiae* ortholog RAD6, we used a  $\Delta rad6$  yeast strain to verify whether *UBE2A* alternative and mutated isoforms were able to complement its UV-sensitivity phenotype, as previously demonstrated for *UBE2A* isoform 1. We also performed *in vitro* assays to evaluate their ubiquitination activity towards histone H2A, a known *in vitro* substrate of RAD6 and *UBE2A*. Only *UBE2A* isoform 1 could rescue the UV sensitivity phenotype of the knockout yeast strain. The expression of the alternative isoforms 2 and 3 was partially toxic to this yeast strain, and toxicity increased under heat shock conditions. However, these two isoforms do not seem to be stable in yeast cells: as in human tissues, we failed to detect *UBE2A* isoforms 2 and 3 in yeast cells expressing the corresponding transcripts. The mutant isoform was stable in yeast,

but was unable to rescue the UV-sensitivity phenotype, its expression resulting in severe toxicity to the  $\Delta rad6$  strain. On the other hand, toxicity was not observed when the mutant UBE2A isoform was expressed in wild type yeast. These findings suggest that isoforms 2 and 3 do not have ubiquitin conjugating activity and, apparently, are degraded immediately after translation. The fact that toxicity is enhanced when these isoforms are expressed under heat shock conditions supports Degradation hypothesis. The degradation could also be due to the absence of a functional partner, in yeast, that could contribute to their stability. Since the alternative isoforms were not detected in the human tissues analyzed, the degradation might occur in human cells as well. E2 enzymes share a catalytic domain and variations among them consist of insertions or terminal extensions, never deletions. Both isoforms 2 and 3 would have deletions of the catalytic domain, suggesting that they are not functional. A regulatory role for these transcripts is a possibility. Our *in vitro* assays confirmed that UBE2A isoform 1 is capable of histone H2A ubiquitination. The assays for isoforms 2 and 3 were inconclusive, since their lack of ubiquitin conjugating activity could be caused by incorrect *in vitro* refolding, required because the proteins were obtained from bacterial inclusion bodies after heterologous expression. The mutated protein, however, was able to interact with the ubiquitin molecule, but failed to transfer it to histones, thus pointing to the importance of the C-terminal segment in this process. Our *in vitro* assays strongly suggested that UBE2A autoubiquitination occur, an activity previously considered a possible E2 regulatory mechanism.

Since there is evidence that some E2s form functional dimers, we hypothesized that, due to their high amino acid conservation, UBE2A and its paralog UBE2B might form heterodimers *in vivo*, as a mutual regulating mechanism. Under this hypothesis, the degradation of the mutated protein could be UBE2B dependent. The reduced autoubiquitination capacity of the mutated isoform could impair its degradation, and require the participation of the paralog. This would explain why the mutated protein was stable in the  $\Delta rad6$  yeast strain, but not in the patient's cells with a functional UBE2B. Following the same reasoning, in wild type yeast, the presence of RAD6 would explain the absence of

the mutated protein and toxicity. The non-viability of the double (*UBE2A* and *UBE2B*) knockout cells prevented testing whether the mutated protein was stable in the absence of its paralog. However, proteasome inhibition in cultured cells from one of our patients resulted in accumulation of the mutated protein, confirming its degradation via the ubiquitin-proteasome pathway.

In conclusion, the *UBE2A* c.382C\_T mutation seems to lead to mental retardation in our patients due to loss of *UBE2A* function: the mutated isoform is unable to rescue the UV-sensitivity phenotype of  $\Delta rad6$  yeast or to ubiquitinate histones *in vitro*. In addition, patients carrying *UBE2A* deletions share clinical manifestations with our patients. On the other hand, the possibility remains of a clinical effect of the requirement of *UBE2B* for degrading the mutated *UBE2A*. Our data suggest reciprocal ubiquitination in addition to autoubiquitination as *UBE2A* and *UBE2B* regulatory mechanism that would explain the conservation of the two paralog genes in mammals.