

---

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>Linhas 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>Linhas 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 proteossoma 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 sindrômica, quando associada a outras características físicas ou neurológicas e (b) DM não sindrômica 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 (Roopers, 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 intron-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).

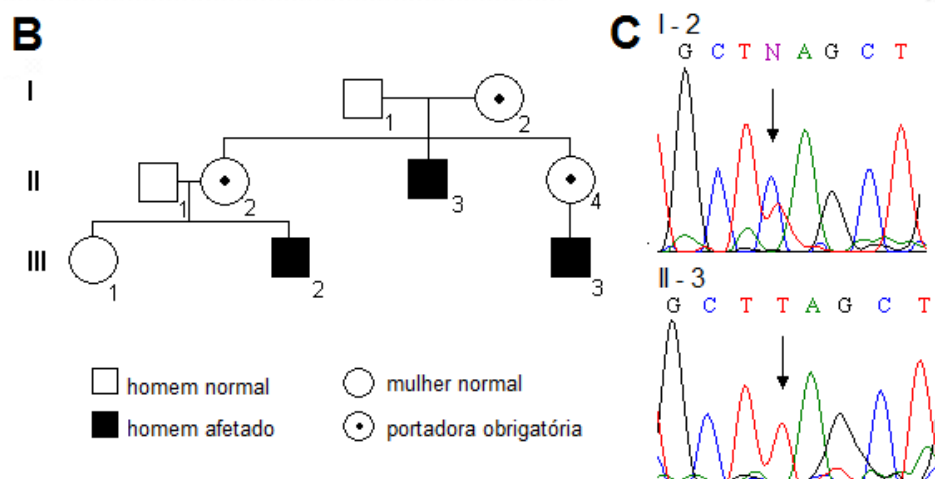


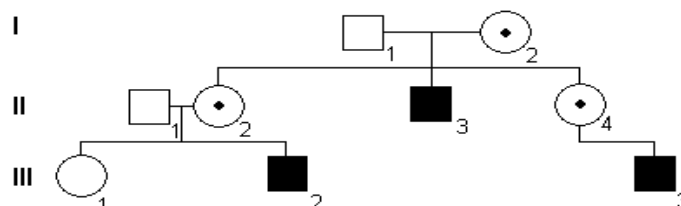
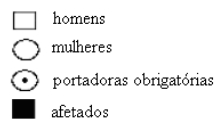
Figura I.1 A, os três homens afetados: II-3 (aos 46 anos e 7 meses); III-2 (aos 19 anos e 11 meses); e III-3 (aos 5 anos e 4 meses). B, genealogia da família onde segrega a síndrome, num padrão compatível com herança ligada ao cromossomo X. C, mutação c.382C→T encontrada no éxon 6 do gene *UBE2A* (modificada 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										
		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	<b>3</b>	1	<b>2</b>	2 3	2 1	<b>2</b>
DXS8051	9.3	17,2	Xp22.32	1 2	2	1 3	<b>1</b>	3	<b>1</b>	1 4	4 3	<b>3</b>
DXS7108	10.0	18,73	Xp22.32	1 1	1	1 1	<b>1</b>	1	<b>2</b>	1 2	2 1	<b>1</b>
DXS1224	12.9	21,23	Xp22.31	2 3	3	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 2	2 1	<b>1</b>
DXS987	14.4	22,18	Xp22.31	2 3	3	1 2	<b>1</b>	2	<b>3</b>	1 3	3 2	<b>2</b>
DXS999	18.59	23,26	Xp22.13	1 1	1	2 1	<b>1</b>	1	<b>2</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS1226	22.3	27,59	Xp22.13	2 4	4	2 3	<b>2</b>	3	<b>1</b>	1 2	1 3	<b>3</b>
DXS1214	31.0	33,54	Xp21.3	1 2	2	1 2	<b>1</b>	2	<b>3</b>	1 3	3 2	<b>2</b>
DXS1237	31.7		Xp21.3	2 2	2	1 2	<b>1</b>	2	<b>2</b>	1 2	2 2	<b>2</b>
DXS1068	38.6	37,33	Xp21.1	2 3	3	3 2	<b>3</b>	2	<b>1</b>	1 3	1 2	<b>2</b>
DXS993	40.9	42,21	Xp11.4	3 2	2	1 3	<b>1</b>	3	<b>2</b>	1 2	1 3	<b>3</b>
DXS8083	44.9	46,24	Xp11.3	1 2	2	1 1	<b>1</b>	1	<b>2</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS1055	46.2	47,08	Xp11.23	1 3	3	1 1	<b>1</b>	1	<b>2</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS991	55.4	52,5	Xp11.22	4 1	1	2 4	<b>2</b>	4	<b>3</b>	2 3	2 4	<b>4</b>
AR			Xp11-12	2 4	4	3 2	<b>3</b>	2	<b>1</b>	1 3	3 2	<b>2</b>
DXS986	78.9	57,37	Xp13.3	2 1	1	2 2	<b>2</b>	2	<b>1</b>	1 2	2 2	<b>2</b>
DXS990	89.9	60,62	Xq21.33	2 1	1	1 2	<b>1</b>	2	<b>1</b>	1 1	1 2	<b>2</b>
DXS8077	95.1	62,52	Xq21.33	1 1	1	3 1	<b>3</b>	1	<b>2</b>	2 3	3 1	<b>1</b>
DXS8020	96.4	65,5	Xq22.1	1 1	1	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	1 2	2 1	<b>1</b>
DXS1106	102.5	66,58	Xq22.2	1 2	2	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 3	2 1	<b>1</b>
DXS8112	104.7	66,58	Xq22.2	1 2	2	1 2	<b>2</b>	1	<b>2</b>	1 2	1 2	<b>1</b>
DXS1210	106.1	67,12	Xq22.2	1 3	3	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 2	2 1	<b>1</b>
DXS1059	111.1	68,2	Xq23	2 2	2	2 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 2	2 1	<b>2</b>
DXS8088	113.2	68,74	Xq23	1 1	1	2 1	<b>1</b>	1	<b>2</b>	1 2	2 1	<b>2</b>
DXS1220	114.4	70,91	Xq23	1 1	1	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS8055	114.5	70,91	Xq23	1 3	3	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS8053	115.4	70,91	Xq24	2 1	1	1 2	<b>1</b>	2	<b>1</b>	1 2	1 2	<b>1</b>
DXS8081	116.3	70,91	Xq24	2 2	2	1 2	<b>1</b>	2	<b>1</b>	1 2	1 2	<b>1</b>
DXS8064	117.0	70,91	Xq24	1 1	1	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS8067	119.1	75,79	Xq24	1 3	3	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 2	2 1	<b>2</b>
DXS1001	119.6	75,79	Xq24	2 3	3	1 2	<b>1</b>	2	<b>1</b>	1 1	1 2	<b>1</b>
DXS8059	121.9	78,5	Xq24	1 3	3	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 2	1 1	<b>1</b>
DXS8098	122.6	78,5	Xq24	1 1	1	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 2	2 1	<b>2</b>
DXS8057	123.3	79,19	Xq24	1 1	1	1 2	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 3	1 2	<b>2</b>
DXS8009	125.9	82,07	Xq25	1 2	2	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 2	2 1	<b>2</b>
DXS8044	126.3	82,07	Xq25	1 3	3	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 2	2 1	<b>2</b>
DXS1047	128.8	82,84	Xq26.1	2 3	3	2 2	<b>2</b>	2	<b>1</b>	1 2	2 2	<b>2</b>
DXS1227	140.5	88,33	Xq26.2	1 3	3	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 2	2 1	<b>2</b>
DXS1062	141.7	82,84	Xq26.2	1 4	4	3 1	<b>3</b>	1	<b>2</b>	2 3	2 1	<b>2</b>
DXS8043	143.7	94,22	Xq27.2	2 2	2	1 2	<b>1</b>	2	<b>1</b>	1 3	3 2	<b>3</b>
FMR1			Xq27.3				<b>1</b>		<b>1</b>			<b>2</b>
DXS8091	147.3	96,14	Xq28	1 4	4	2 1	<b>2</b>	1	<b>2</b>	2 3	3 1	<b>3</b>
DXS8069	149.3	98,83	Xq28	1 1	1	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 1	1 1	<b>1</b>
DXS8103	149.8	100,73	Xq28	1 1	1	3 1	<b>3</b>	1	<b>3</b>	2 3	3 1	<b>1</b>
DXS8061	151.7	100,73	Xq28	1 1	1	3 1	<b>3</b>	1	<b>2</b>	2 3	2 1	<b>2</b>
DXS1073	153.4	102,35	Xq28	1 1	1	1 1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	1 1	1 1	<b>1</b>

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-nocaute (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 nocaute *Ube2A* e o nocaute *Ube2B* são ambos viáveis, mas diferem pelo menos quanto ao aspecto reprodutivo. A esterilidade do camundongo macho nocaute quanto ao gene *Ube2B* (*Ube2B*<sup>-/-</sup>) (Roest e col., 1996) e a infertilidade da fêmea nocaute 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.



	<b>1</b>	<b>85</b>
<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>	MSTPARRRLMRDFKRLQEDPPTGVSGAPTDNNIMIWNAVIFGPHDTPFEDGTFKLTIEFTEEYPNKPPTVRFVSKVHHPNVYADG	

		Número do acesso (GenBank)
	<b>86</b>	<b>152</b>
<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>	GICLDILQNRWSPTYDVSAIILTSIQSLLSDPNPN <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*.

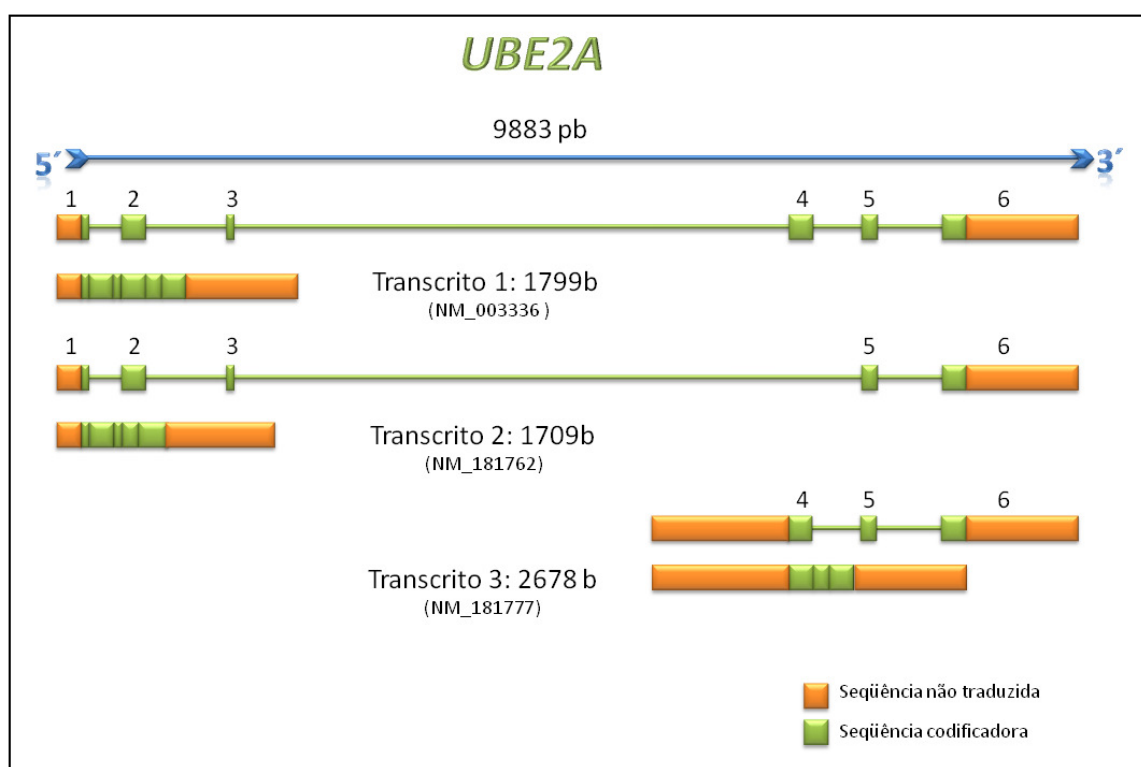


Figura I.3 Transcritos do gene *UBE2A*: Transcrito 1: 1799 b, corresponde aos seis éxons; transcrito 2: 1709 b, ausência do éxon 4; transcrito 3: 2678 b, 5' UTR alternativa no íntron 3 e corresponde apenas aos três últimos éxons. Fonte: *NCBI*.

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).

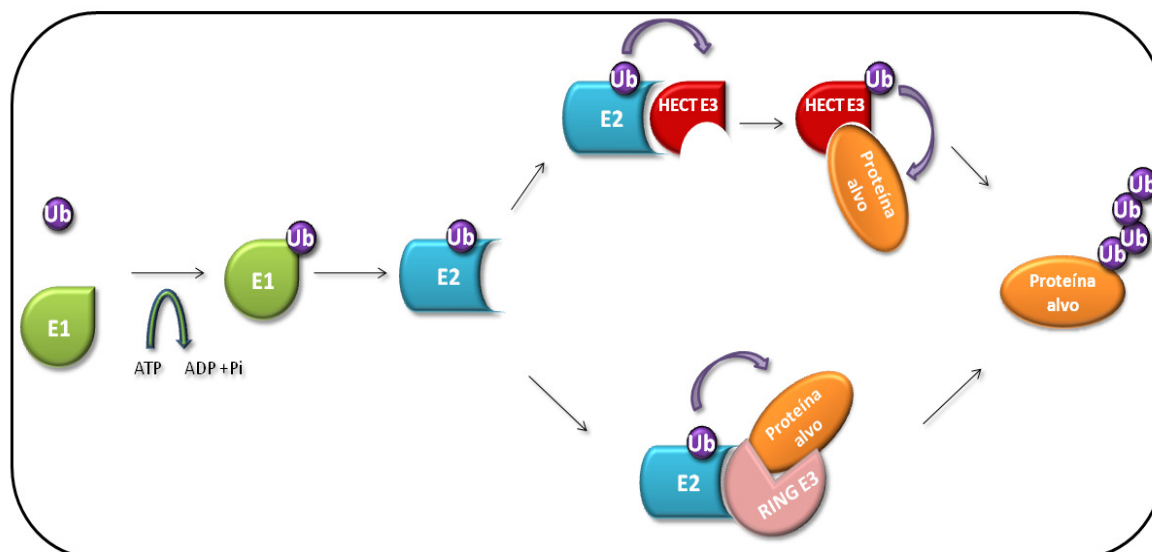


Figura I.4 Sequência de passos enzimáticos que levam à ubiquitinação da proteína alvo. E1, enzima ativadora de ubiquitina (Ub); E2: enzima conjugadora de ubiquitina; RING E3 e HECT E3: ligases de ubiquitina (baseado em Woelk e col., *Cell Div* 2:1, 2007).

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).

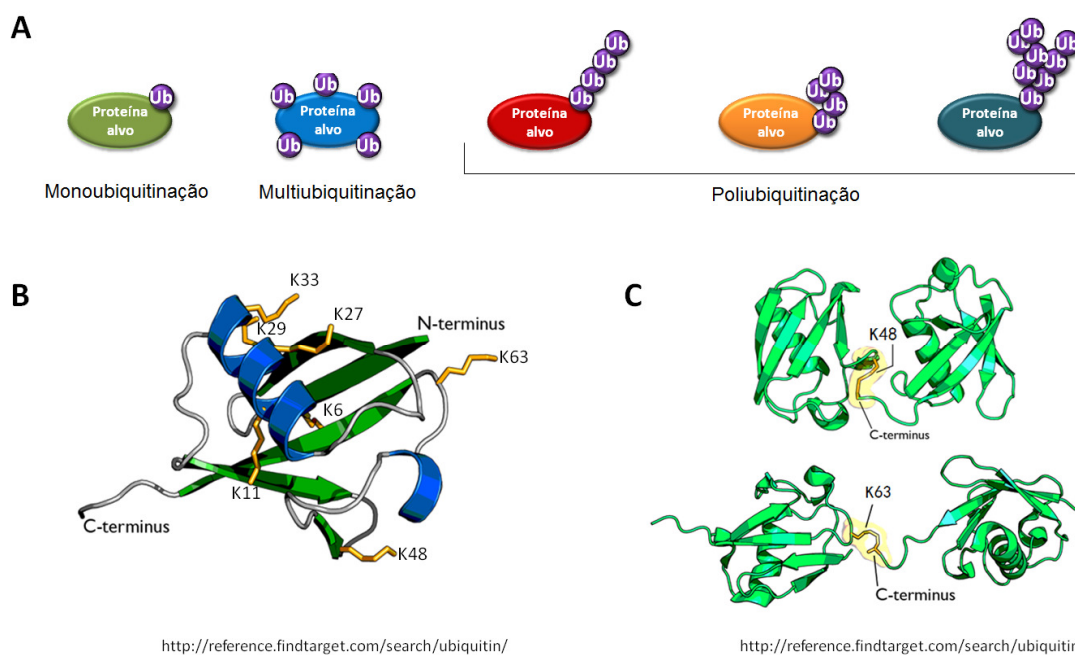
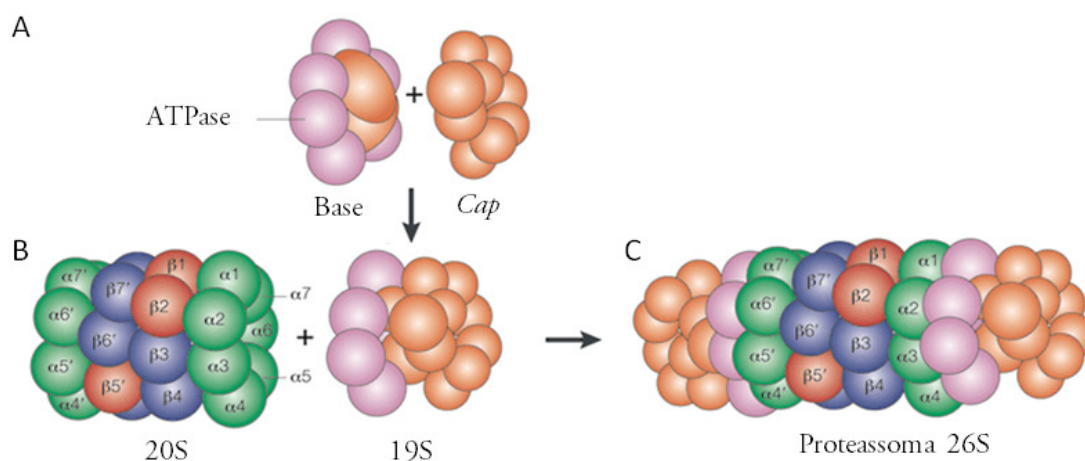


Figura I.5 A, mono, multi e poliubiquitinação (baseado em Woelk e col., *Cell Div* 2:11, 2007). B, representação da molécula de ubiquitina e seus sete resíduos de lisina (K). C, diferentes topologias adquiridas pela ligação de duas moléculas de ubiquitina a partir dos resíduos de lisina 48 e 63. Créditos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



Baseado em Klotzel 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 Klotzel 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 proteossoma. 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 - Substratemoification 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, Myszkowski 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>

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 proteossoma 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.