

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DE MODIFICADORES GENÉTICOS DO FENÓTIPO
DA ATAXIA ESPINOCEREBELAR TIPO 3**

Vanessa Erichsen Emmel

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Saraiva Pereira

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Laura Bannach Jardim

Porto Alegre, Setembro de 2010

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Identificação Genética, no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com apoio financeiro parcial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O período sanduíche foi realizado na Unidade de Investigação Genética e Epidemiológica de Doenças Neurológicas (UnIGENe), no Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto, Portugal, com apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), convênio CAPES-FCT (Brasil-Portugal) e da Fundação Gulbenkian, pelo Financiamento Plurianual de Unidades de Investigação e FEDER, Portugal. Neste período, a aluna recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe
e vencer com ousadia, porque o mundo
pertence a quem se atreve e a vida é “muito”
para ser insignificante.*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira, por ter me recebido ainda no mestrado, pela confiança ao longo destes anos, pela orientação e pelos ensinamentos, indispensáveis ao meu crescimento profissional e científico.

À minha co-orientadora Dra. Laura Bannach Jardim, cuja valiosa co-orientação teve importância fundamental para o desenvolvimento e conclusão deste projeto, pelo incentivo, confiança e entusiasmo.

Aos meus orientadores no período sanduíche, Dra. Isabel Alonso e Dr. Jorge Sequeiros, por me receberem em seu laboratório e pelo aprendizado que me proporcionaram.

Aos médicos Leonardo Vedolim e Jonas Saute pelos valiosos dados de ressonância magnética, à estagiária Karina Carvalho Donis pela organização dos dados clínicos e da escala NESSCA, e a toda equipe do Ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo trabalho clínico junto aos pacientes.

Aos estatísticos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente a Dra. Suzi Alves Camey pela sua incansável e preciosa assistência.

Ao CNPq, CAPES e FIPE-HCPA pelo apoio financeiro.

Aos pacientes e seus familiares por proverem amostras biológicas para este estudo.

Aos amigos do Laboratório de Identificação Genética e ao “bonde do café”, especialmente à Marina, Tailise, Juliana, Mariana, Hugo, Thaís, Fernanda e Gabriel pela amizade, alegria, motivação, pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pelas belas risadas. Aos colegas do Centro de Pesquisa Experimental e do Serviço de Genética Médica do HCPA, pela amizade e pelas risadas.

Aos novos e distantes amigos da UnIGENE, especialmente à Milena, que me recebeu e me acolheu em outro país de uma forma tão carinhosamente brasileira (ou cubana?).

Às colegas de doutorado do PPGBM, especialmente Deise, Fernanda e Tiago e às colegas de doutorado “internacionais” Carolina, Priscilla e Francine.

Ao Elmo e à Ellen, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

Aos meus amigos, especialmente Liciane e Rodrigo, confidentes e fundamentais, por apenas estarem ao meu lado, sempre. Sem vocês a vida não seria tão engraçada e divertida.

Aos meus pais, incentivadores e orgulhosos, pelo imenso e incondicional amor, constante estímulo, enorme dedicação e compreensão. Meu reconhecimento e eterna gratidão... Sem vocês eu nada seria.

Ao Maurício, pela compreensão, amor e mesmo distante, por estar sempre ao meu lado me dando forças para que eu pudesse transpor todas as barreiras e concluir mais esta etapa.

A Deus, em sua onipresença, por me permitir explorar o mundo, me acolhendo, encorajando, enchendo de esperanças e guiando meus passos até aqui.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS..... | 8 |
| PRINCIPAIS ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES..... | 9 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Ataxias espinocerebelares | 16 |
| 1.2. Ataxia espinocerebelar tipo 3 ou Doença de Machado-Joseph..... | 18 |
| 1.2.1. Mutação..... | 18 |
| 1.2.2. Epidemiologia..... | 19 |
| 1.2.3. Manifestações clínicas | 21 |
| 1.2.4. Genética clássica – correlação entre tamanho da expansão e clínica, antecipação, transmissão preferencial do alelo mutante e <i>fitness</i> aumentado. | 23 |
| 1.2.5. Mutação causal e fisiopatologia | 25 |
| 1.3. Epigenética..... | 28 |
| 1.4. Genes modificadores | 32 |
| 1.4.1. Proteína X associada à Bcl-2 (<i>BAX</i>) | 33 |
| 1.4.2. Cristalina α -B (<i>CRYAB</i>)..... | 35 |
| 1.4.3. Receptor ionotrópico do glutamato, kainato 2 (<i>GRIK2</i>)..... | 37 |
| 1.4.4. Interleucina-1 β (<i>IL1B</i>) | 39 |
| 1.4.5. Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 (<i>ITPR1</i>)..... | 41 |
| 1.4.6. <i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8 (NEDD8)</i> 44 | |
| 1.4.7. <i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9)</i> 45 | |
| 1.4.8. Proteína que interage com a porção carboxi-terminal de Hsp70 (<i>CHIP</i>) | 47 |
| 1.5. Justificativas..... | 50 |
| 2. OBJETIVOS | 52 |
| 2.1. Objetivo Geral | 52 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 52 |
| 3. RESULTADOS..... | 53 |
| 3.1. ARTIGO 1..... | 54 |
| 3.2. ARTIGO 2..... | 58 |

| | |
|----------------------|-----|
| 3.3. ARTIGO 3..... | 93 |
| 4. DISCUSSÃO | 120 |
| 5. CONCLUSÕES | 125 |
| 6. REFERÊNCIAS | 126 |
| 7. ANEXOS | 152 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Bases moleculares das ataxias cerebelares autossômicas dominantes Página 17

Figura 1. Frequências das SCAs em famílias brasileiras Página 19

PRINCIPAIS ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|-------|--|
| A | adenina |
| BAX | proteína X associada à Bcl-2 (<i>BCL2-associated X protein</i>) |
| C | citossina |
| CHIP | proteína que interage com a porção carboxi-terminal da Hsp70 (<i>C-terminal heat shock protein 70-interacting protein</i>) |
| CpG | dinucleotídeos citossina-guanina |
| CREB | proteína ligante a elementos responsivos a cAMP (<i>cAMP responsive element binding protein</i>) |
| CRYAB | cristalina α -B (<i>crystallin, alpha B</i>) |
| DA | doença de Alzheimer |
| DH | doença de Huntington |
| DMJ | doença de Machado-Joseph |
| DNA | ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DNMTs | DNA metiltransferases |
| DP | doença de Parkinson |
| DRPLA | atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (<i>dentatorubral pallido luisian atrophy</i>) |
| FRDA | ataxia de Friedreich |
| G | guanina |
| GluRs | receptores glutamatérgicos |
| GRIK2 | receptor ionotrópico do glutamato, kainato 2 (<i>glutamate receptor, ionotropic, kainate 2</i>) |
| HATs | acetiltransferases de histonas |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |

| | |
|---------|--|
| HDACs | desacetilases de histonas |
| HMTs | metiltransferases de histonas |
| Hsp | proteínas de choque térmico (<i>heat shock proteins</i>) |
| IL1 | interleucina-1 |
| ITPR1 | receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 (<i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type I</i>) |
| kb | kilobases |
| MBDs | proteínas que se ligam a resíduos metilados (<i>Methyl Binding Domain proteins</i>) |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MS-MLPA | ensaio de amplificação multiplex dependente de sondas – específico para metilação (<i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>) |
| NEDD8 | <i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i> |
| NEDD9 | <i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9</i> |
| NES | sequência de exportação nuclear (<i>nuclear export sequences</i>) |
| NESSCA | escala de exame neurológico para ataxia espinocerebelar (<i>Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia</i>) |
| NII | inclusões intranucleares neuronais (<i>neuronal intranuclear inclusions</i>) |
| NLS | sequência de localização nuclear (<i>nuclear localization sequence</i>) |
| pb | pares de bases |
| PCR | reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PLC | proteína ligante de CREB |
| pmol | picomol |
| RE | retículo endoplasmático |
| RNA | ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>) |

| | |
|-----|--|
| SCA | ataxia espinocerebelar (<i>spinocerebellar ataxia</i>) |
| SNP | polimorfismo de base única (<i>single nucleotide polymorphism</i>) |
| SNC | sistema nervoso central |
| SPU | sistema proteossomo dependente de ubiquitina |
| T | timina |

RESUMO

A doença de Machado-Joseph (DMJ/SCA3) é uma doença neurodegenerativa causada pela expansão de poliglutaminas na proteína ataxina-3. O número de repetições CAG presentes no gene *ATXN3* é inversamente correlacionado com a idade de início da doença, mas é responsável por somente 45-60% desta variação. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito da metilação no promotor do gene *ATXN3*, de polimorfismos em genes candidatos e do alelo normal *ATXN3* como modificadores do fenótipo da doença. A análise do padrão de metilação em seis sítios CpG através de um ensaio de amplificação multiplex dependente de sondas – específico para metilação foi realizada em amostras de 123 pacientes de 62 famílias. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *BAX*, *CRYAB*, *GRIK2*, *IL1B*, *ITPR1*, *NEDD8*, *NEDD9* e *CHIP* foram analisados em 273 pacientes de 119 famílias. Os volumes cerebrais foram medidos através de ressonância magnética em 30 pacientes não relacionados. A gravidade foi medida pela Escala de Exame Neurológico para Ataxia Espinocerebelar (NESSCA) dividida pelo tempo de duração da doença. Uma correlação inversa significativa foi encontrada entre a idade de início e tamanho da repetição ($r=-0,76$, $r^2=0,58$, $p<0,001$). Houve uma tendência de correlação direta entre o grau de metilação e a idade de início para um sítio CpG ($p=0,055$). Uma correlação significativa foi encontrada entre a gravidade e o tamanho da repetição CAG ($r=0,48$, $r^2=0,23$, $p=0,001$). O SNP no gene *IL1B* (rs16944) apresentou um efeito significativo na idade de início de pacientes com SCA3 ($p=0,042$). Associação significativa foi observada entre o SNP no gene *NEDD9* (rs760678) e a gravidade ($p=0,003$). SNPs nos genes *GRIK2* (rs2227281) e *NEDD8* (rs2144487) se relacionaram à medida do volume do cerebelo ($p=0,006$) e à medida do volume da ponte ($p=0,023$), respectivamente. Estes resultados sugerem que o controle epigenético no sítio CpG no promotor *ATXN3* e que os SNPs nos genes *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8* e *NEDD9* podem contribuir para a variação fenotípica na SCA3. Ademais, os genótipos protetores dos genes *GRIK2*, *IL1B* e *NEDD8* mostraram ter um efeito aditivo no adiamento do início da doença. O mecanismo exato pelo qual a mutação no gene *ATXN3* causa a SCA3 ainda não foi determinado. A expansão da repetição CAG pode conferir uma função tóxica para a proteína, como acontece em outras doenças neurodegenerativas causadas por expansões de poliglutaminas. Considerando esta hipótese, uma maior metilação do promotor do gene

ATXN3 pode se relacionar a sua menor expressão e a um menor acúmulo de poliglutaminas no neurônio. Ainda considerando esta hipótese, *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8* e *NEDD9* podem desempenhar um papel protetor, possivelmente por promover a sobrevivência de células neuronais em pacientes com SCA3. SNPs nestes genes poderiam modificar a expressão das proteínas, afetando a agregação de poliglutaminas no cérebro de tal forma que os indivíduos portadores de um genótipo de risco teriam significativamente maior perda gradual de neurônios e um início mais precoce dos sintomas.

ABSTRACT

Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) is a neurodegenerative disease caused by expansion of a polyglutamine tract in ataxin-3. The CAG repeat number of *ATXN3* gene is inversely correlated with disease age at onset (AO) but is responsible for only 45-60% of this variation in SCA3. In this study, we investigate if DNA methylation status of the *ATXN3* promoter, if polymorphisms in candidate genes, and if normal *ATXN3* allele are related to disease phenotype. We designed a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) assay for quantitative analysis of methylation status at 6 CpG sites, located within the promoter region of the *ATXN3* gene. We have applied this MS-MLPA to 123 SCA3 Brazilian patients from 62 families. We investigated single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes *BAX*, *CRYAB*, *GRIK2*, *IL1B*, *ITPR1*, *NEDD8*, *NEDD9*, and *CHIP* in 273 Brazilian SCA3 patients from 119 families. The brain volumetries were obtained from magnetic resonance imaging's from 30 unrelated patients. The SCA3 severity degree was measured by Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia (NESSCA) divided by duration of disease. A significant inverse correlation was found between AO and repeat length ($r=-0.76$, $r^2=0.58$, $p<0.001$). There was a trend toward direct correlation between methylation degree and AO for one CpG site in the SCA3 sample ($p=0.055$). A significant correlation was found between severity and CAG repeat length ($r=0.483$, $r^2=0.233$, $p=0.001$). We have found significant associations between a *GRIK2* SNP (rs2227281) and cerebellum volume ($p=0.006$), an *IL1B* SNP (rs16944) and AO ($p=0.042$), a *NEDD8* SNP (rs2144487) and pons volume ($p=0.023$), and a *NEDD9* SNP (rs760678) and disease severity ($p=0.003$). These results suggest that epigenetic control at *ATXN3* CpG-site and that the SNPs in *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* genes may contribute to the phenotypic expression of SCA3. Moreover, protective genotypes of *GRIK2*, *IL1B*, and *NEDD8* genes shown to have an additive effect in delaying the onset of disease. The exact mechanism by which the mutation in the *ATXN3* gene causes SCA3 has not been determined. The CAG repeat expansion may confer a novel toxic function onto the protein, as it does in other polyglutamine neurodegenerative disorders. Considering this hypothesis, increased methylation of *ATXN3* gene promoter can relate to its lower expression and a smaller accumulation of polyglutamine in the neuron. Still considering this hypothesis, *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* might play a protective role, possibly

a survival promoting effect, for neuronal cells in SCA3 patients. These four SNPs could affect the protein expression and polyglutamine aggregation in the brain such that risk genotype carriers have a significantly higher gradual loss of neurons and an earlier onset of symptoms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ataxias espinocerebelares

As ataxias espinocerebelares (*Spinocerebellar Ataxia* – SCA) formam um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas de herança autossômica dominante caracterizadas por uma lenta e progressiva disfunção cerebelar.

Até o momento, 30 *loci* distintos foram associados às formas mendelianas de SCAs (Tabela 1). Sete delas, a SCA1, a SCA2, a SCA3, a SCA6, a SCA7, a SCA17 e a atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (*dentatorubral pallido luisian atrophy* - DRPLA) apresentam como alteração uma expansão de repetições trinucleotídicas CAGs na região codificante dos genes, as quais codificam o aminoácido glutamina (Bird, 2009).

As expansões de repetições nucleotídicas também podem ocorrer em outras três regiões dos genes associados às SCAs: na região promotora na SCA12 (CAG), em um íntron na SCA10 (ATTCT) e na SCA31 (TGGAA) e na região 3' não traduzida do RNA transcrito na SCA8 (CTG) (Koob *et al*, 1999; Sato *et al*, 2009; Ranum *et al*, 2002). Mutações de ponto e deleções estão relacionadas à SCA5, à SCA13, à SCA14, à SCA15, à SCA27 e à SCA28 (Bird, 2009). A SCA11 é causada por inserção ou deleção (Houlden *et al*, 2007).

A prevalência mundial estimada de SCA varia de 0,3 a 3,0 em 100.000 (van de Warrenburg *et al*, 2002). Contudo, as frequências relativas de algumas SCAs variam significativamente de acordo com a população e o local de nascimento, provavelmente devido a um efeito fundador, como demonstrado em um grande estudo de haplótipos da doença de Machado-Joseph (DMJ ou SCA3) (Gaspar *et al*, 2001).

Tabela 1. Bases moleculares das ataxias cerebelares autossômicas dominantes

| Subtipo de SCA | Gene | Locus | Proteína | Referência |
|--------------------|----------------|-----------------|--|---|
| SCA1 | <i>ATXN1</i> | 6p23 | Ataxina 1 | Orr <i>et al</i> , 1993 |
| SCA2 | <i>ATXN2</i> | 12q24 | Ataxina 2 | Imbert <i>et al</i> , 1996 Pulst <i>et al</i> , 1996 Sanpei <i>et al</i> , 1996 |
| SCA3 | <i>ATXN3</i> | 14q32.1 | Ataxina 3 | Kawaguchi <i>et al</i> , 1994 |
| SCA4 | Desconhecida | 16q22.1 | Desconhecida | Flanigan <i>et al</i> , 1996 |
| SCA5 | <i>SPTBN2</i> | 11p11-q11 | Beta espectrina III | Ikeda <i>et al</i> , 2006 |
| SCA6 | <i>CACNA1A</i> | 19p13 | Subunidade 1α do canal de cálcio tipo P/Q dependente de voltagem | Zhuchenko <i>et al</i> , 1997 |
| SCA7 | <i>ATXN7</i> | 3p12-p13 | Ataxina 7 | David <i>et al</i> , 1997 |
| SCA8 | <i>ATXN8OS</i> | 13q21 | Desconhecida | Koob <i>et al</i> , 1999 |
| SCA9 ¹ | Desconhecido | Reservado | Desconhecida | --- |
| SCA10 | <i>ATXN10</i> | 22q13 | Ataxina 10 | Matsuura <i>et al</i> , 2000 |
| SCA11 | <i>TTBK2</i> | 15q14-q21.3 | Tau-tubulina cinase 2 | Houlden <i>et al</i> , 2007 |
| SCA12 | <i>PPP2R2B</i> | 5q31-q33 | Subunidade reguladora da enzima fosfatase PP2A | Holmes <i>et al</i> , 1999 |
| SCA13 | <i>KCNC3</i> | 19q13.3-q13.4 | Canal de potássio dependente de voltagem, subfamília C, membro 3 | Waters <i>et al</i> , 2006 |
| SCA14 | <i>PRKCG</i> | 19q13.42 | Proteína cinase C tipo gama | Chen <i>et al</i> , 2003 |
| SCA15 | <i>ITPR1</i> | 3p26-p25 | receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 | van de Leemput <i>et al</i> , 2007 |
| SCA16 | Desconhecido | 3p26.2-pter | Desconhecida | Miura <i>et al</i> , 2006 |
| SCA17 | <i>TBP</i> | 6q27 | Proteína ligante TATA-box | Nakamura <i>et al</i> , 2001 |
| SCA18 | Desconhecido | 7q22-q32 | Desconhecida | Devos <i>et al</i> , 2001 |
| SCA19 ² | Desconhecido | 1p21-q21 | Desconhecida | Verbeek <i>et al</i> , 2002 |
| SCA20 | Desconhecido | 11q12.2-11q12.3 | Desconhecida | Knight <i>et al</i> , 2004 |
| SCA21 | Desconhecido | 7p21-15 | Desconhecida | Vuillaume <i>et al</i> , 2002 |
| SCA22 ² | Desconhecido | 1p21-q21 | Desconhecida | Chung <i>et al</i> , 2003 |
| SCA23 | Desconhecido | 20p13-12.3 | Desconhecida | Verbeek <i>et al</i> , 2004 |
| SCA24 | Desconhecido | 1p36 | Desconhecida | Swartz <i>et al</i> , 2002 |
| SCA25 | Desconhecido | 2p21-p13 | Desconhecida | Stevanin <i>et al</i> , 2005 |
| SCA26 | Desconhecido | 19p13.3 | Desconhecida | Yu <i>et al</i> , 2005 |
| SCA27 | <i>FGF14</i> | 13q34 | Fator de crescimento de fibroblasto 14 | van Swieten <i>et al</i> , 2003 |
| SCA28 | <i>AFG3L2</i> | 18p11 | Proteína 2 <i>AFG3-like</i> | Cagnoli <i>et al</i> , 2006 Mariotti <i>et al</i> , 2008 Di Bella <i>et al</i> , 2010 |
| SCA30 | Desconhecido | 3p26 | Desconhecida | Dudding <i>et al</i> , 2004 |
| DRPLA | <i>ATNI</i> | 12p13.31 | Atrofina 1 | Koide <i>et al</i> , 1994 |
| SCA31 | <i>BEAN</i> | 16q22.1 | <i>brain expressed, associated with Nedd4</i> | Sato <i>et al</i> , 2009 |

¹A categoria SCA9 foi reservada, mas informações clínicas e genéticas deste tipo ainda não foram publicadas. ²SCA19 e SCA22 são prováveis formas alélicas do mesmo gene.

As SCAs não são facilmente diferenciadas de acordo com suas manifestações clínicas, já que apresentam expressão variada e fenótipos neurológicos semelhantes. A ressonância magnética é largamente utilizada para visualizar os processos atróficos que ocorrem nas SCAs (Döhlinger *et al*, 2008). Embora algoritmos possam prever a probabilidade do tipo específico de SCA, um diagnóstico exato depende de testes moleculares que detectam uma mutação no gene causador específico (Schelhaas *et al*, 2000). Como os sintomas dessas doenças se sobrepõem e há uma intensa variabilidade fenotípica, as ferramentas moleculares se tornaram úteis para o diagnóstico diferencial e confirmatório, bem como para a testagem preditiva. A identificação correta da patologia torna possível a aplicação de terapias apropriadas e de um aconselhamento genético adequado.

O teste preditivo de adultos assintomáticos em risco (parentes de indivíduos com alguma SCA) pode ser realizado após a identificação da mutação específica causadora da doença no probando, desde que se trate de uma condição com penetrância completa ou quase completa. Esse teste não é útil para prever a idade de início, a gravidade, os tipos de sintomas ou a taxa de progressão da doença em indivíduos assintomáticos.

Atualmente, não existe nenhum tratamento efetivo para modificar a progressão da doença nas SCAs ou nas doenças neurodegenerativas relacionadas, embora alguns benefícios no alívio dos sintomas atáxicos tenham sido descritos em alguns ensaios clínicos.

1.2. Ataxia espinocerebelar tipo 3 ou Doença de Machado-Joseph

1.2.1. Mutação

A SCA3 é causada por uma expansão de uma sequência CAG no gene *ATXN3*. Este gene foi clonado e a mutação foi identificada em 1994 (Kawaguchi *et al*, 1994). Esse gene está localizado no cromossomo 14q32.1, engloba 48.240 pb sendo dividido em 11 éxons. A mutação ocorre no éxon 10 do gene. Os indivíduos normais apresentam de 12 a

41 repetições CAG, enquanto os indivíduos afetados apresentam alelos com 61 a 84 repetições (Kawaguchi *et al*, 1994). As repetições intermediárias são raramente observadas em indivíduos afetados (van Schaik *et al*, 1997; Takiyama *et al*, 1997; van Alfen *et al*, 2001).

1.2.2. Epidemiologia

Dados sugerem que a SCA3 é o subtipo de SCA mais comum, com uma prevalência mundial de aproximadamente 30% (Schöls *et al*, 2004). A frequência estimada de indivíduos afetados com SCA3 foi calculada em 3:100.000 e a frequência de outras SCAs, exceto a SCA3, em 0,2:100.000 em estudo prévio realizado pelo nosso grupo (Jardim *et al*, 2001; Prestes *et al*, 2008). A proporção de casos da doença de Machado-Joseph foi bastante elevada na amostra estudada, provavelmente refletindo um efeito fundador açoriano (Jardim *et al*, 2001). Em outro estudo do nosso grupo, realizado com 114 famílias com SCAs provenientes do sul do Brasil, a SCA3 foi identificada em 96 (84%) famílias (Figura 1) (Trott *et al*, 2006).

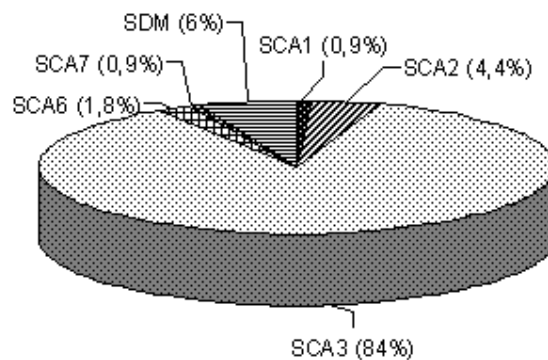


Figura 1. Frequências das SCAs em famílias brasileiras (SDM: sem diagnóstico molecular) (adaptado de Trott *et al*, 2006)

A SCA3 foi originalmente descrita entre descendentes de portugueses açorianos, radicados nos Estados Unidos da América, no período entre 1972 e 1976, nos trabalhos de

Nakano e colaboradores (doença de Machado, descrita em descendentes de emigrantes portugueses - família Machado, radicados em Massachussets), Woods e Schaumburg (degeneração nigro-espino-denteada, com oftalmoplegia nuclear - descrita na família Thomas, de origem açoriana) e Rosemberg e colaboradores (degeneração estriato-nigral autossômica dominante - descrita na família Joseph, descendentes de José Bastiana, originário dos Açores) (Nakano *et al*, 1972; Woods and Schaumburg, 1972; Rosenberg *et al*, 1978).

Nos anos seguintes, os estudos de Coutinho e colaboradores trouxeram maiores esclarecimentos sobre o entendimento clínico desta enfermidade, com trabalhos que enfatizaram que a doença seria uma enfermidade única, com expressão fenotípica variável (Coutinho e Andrade, 1978; Coutinho *et al*, 1980; Lima e Coutinho, 1980). A doença foi então designada como degeneração sistêmica autossômica dominante em famílias portuguesas das ilhas dos Açores: uma nova condição genética envolvendo os sistemas cerebelar, piramidal, extrapiramidal e da medula espinhal; doença do sistema motor autossômica dominante dos portugueses; ataxia de causa desconhecida hereditária autossômica dominante dos portugueses; doença de Joseph; doença açoriana de Machado-Joseph e, finalmente, ficou conhecida como doença de Machado-Joseph (Coutinho e Andrade, 1978; Lima e Coutinho, 1980; Sachdev *et al*, 1982; Rosenberg e Grossman, 1988).

No Brasil, a SCA3 foi descrita inicialmente em uma família e apresentada na forma de pôster no Congresso Brasileiro de Neurologia, por Lisboa e Mariotto (1984), sem, contudo, uma correta definição da doença, e, posteriormente, por Radvany e colaboradores (1988, 1990) também na forma de pôster, a qual foi publicada alguns anos mais tarde (Radvany *et al*, 1993). Entretanto, a primeira publicação da SCA3 em nosso meio foi a descrição de cinco pacientes de uma mesma família (Teive *et al*, 1991).

Atualmente, tem sido descrita a ocorrência de casos de SCA3 em diferentes etnias, sendo esta que se tornou a SCA mais comumente encontrada em muitos países. Essa nova situação motivou uma acirrada discussão sobre a presença de uma mutação isolada na SCA3 (*founder mutation*), com difusão da doença pelos portugueses, na época das grandes navegações ou a presença de várias mutações em diferentes países (Lima *et al*, 1997; Gaspar *et al*, 2001). Por outro lado, haplótipos intragênicos definidos na SCA3 (por polimorfismos de base única - *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs estáveis)

sugeriram a existência de pelo menos dois eventos mutacionais. A linhagem de propagação mundial (o “haplótipo Joseph”) é compartilhada por 19 das 20 populações estudadas e, em Portugal, predomina entre as famílias com ascendência açoriana da ilha de Flores e no nordeste do continente. Um segundo haplótipo (“haplótipo Machado”) é praticamente restrito às famílias originárias da ilha de São Miguel e do centro de Portugal (Vale do Tejo) e é esporadicamente encontrado na Espanha, no Brasil, na Índia Ocidental, em algumas famílias norte-americanas e no Japão (Gaspar *et al*, 2001, Martins *et al*, 2008). Para o haplótipo de propagação mundial, a diversidade nas regiões flangeadoras da repetição expandida (estimada através do acúmulo de mutações *stepwise* em STRs) foi comparada entre famílias com a SCA3. Uma antiga origem asiática (cerca de 6.000 anos) foi sugerida, dado a maior variabilidade encontrada em japoneses. Introduções mais recentes deste haplótipo Joseph parecem ter ocorrido, sucessivamente, na América do Norte, Alemanha, França, Portugal e Brasil. Um cenário totalmente diferente foi hipotetizado para a origem do haplótipo Machado (a segunda principal linhagem mutacional DMJ), sendo a população portuguesa a mais provável do local de nascimento para a mutação, a menos de 2.000 anos atrás (Martins *et al*, 2008).

1.2.3. Manifestações clínicas

A SCA3 apresenta um amplo espectro clínico, sendo arbitrariamente dividida em quatro tipos: tipo 1, com longas repetições, início na juventude, distonia e rigidez; tipo 2 (a forma mais comum), com idade de início entre 20 e 45 anos, sinais cerebelares e piramidais; tipo 3, com idade de início entre 40 e 60 anos, progressão lenta, predominância de sinais cerebelares e neuropatia periférica; e possivelmente o tipo 4, com proeminente Parkinsonismo (Paulson, 1998).

Ataxia, do grego *ataxis*, é um termo que literalmente significa desordem ou confusão. O termo ataxia locomotora vem sendo empregado desde o século XIX, significando perda total ou parcial dos movimentos coordenados, sendo um sintoma comum em diversas doenças neurológicas (Schelhaas *et al*, 2000).

Ataxia pode ser causada pela disfunção nas vias aferentes e eferentes do cerebelo (Harding, 1993; Klockgether *et al*, 2000). Um bom exemplo de um indivíduo atáxico é a

pessoa em estado de embriaguez: a fala é mal articulada, explosiva, intercorrida (disartria), o andar de base alargada, em equilíbrio instável, os movimentos finos das mãos são desajeitados, por vezes com tremor. Outras características são perturbação da amplitude dos movimentos (dismetria), visível principalmente nos atos sob comando executados rapidamente (provas dedo-nariz e calcanhar-joelho), oscilações repetidas e involuntárias rítmicas de um ou ambos os olhos (nistagmo), podendo ainda haver alterações nos gânglios da base, tronco cerebral, na medula espinhal, nos nervos ópticos, na retina e nos nervos periféricos. Quando muito marcada, a ataxia pode afetar o equilíbrio do tronco, com oscilações e desequilíbrio na posição sentada.

As avaliações neurológicas mais amplamente utilizadas e validadas para medir a gravidade das SCAs são a ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e a SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) (Schmitz-Hubsch *et al*, 2006; Trouillas *et al*, 1997). Ambas as escalas visam especificamente à gravidade da ataxia em relação aos componentes axial, membros, ocular e da fala. Um método global e abrangente para a avaliação da SCA3 intitulado NESSCA (*Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia*) foi desenvolvido pelo nosso grupo (Kieling *et al*, 2008). A avaliação é composta por 18 itens gerando um escore total de 0 a 40. Treze itens fazem parte de um exame neurológico padrão (achados piramidais, ataxia, ataxia de limbo, nistagmo, retração palpebral, oftalmoparesia, disartria, fasciculação, movimentos distônicos, blefarospasmo, rigidez extrapiramidal, bradicinesia, amiotrofia distal e atrofia óptica); cinco itens são subjetivos e dependem de informações relatadas pelo paciente (disfagia, perda sensorial, câimbras, vertigem e disfunção do esfíncter).

A avaliação da taxa de progressão da doença deve ser a diferença de escore clínico entre dois exames dividida pelo tempo decorrido entre estes exames. Porém, como a SCA3 exhibe um lento e progressivo avanço clínico, um longo intervalo de tempo é necessário entre duas avaliações para obter uma diferença perceptível. Também é desejável que a repetição das avaliações clínicas seja realizada pelo mesmo médico para reduzir a variabilidade inter-observador. Uma forma alternativa, embora menos precisa de avaliar a taxa de progressão clínica da doença, é a determinação dos escores de gravidade ajustados pela idade do paciente no primeiro exame (Netravathi *et al*, 2009). A escala NESSCA foi utilizada pelo nosso grupo em um estudo prospectivo de 10 anos de duração. Nesse estudo longitudinal, fomos capazes de demonstrar que a NESSCA – ou seja, a disfunção

neurológica global – piora 1,26 pontos por ano e que cada CAG adicional na repetição expandida corresponde a uma piora de 0,15 pontos naquela taxa (Jardim *et al*, 2010).

1.2.4. Genética clássica – correlação entre tamanho da expansão e clínica, antecipação, transmissão preferencial do alelo mutante e *fitness* aumentado.

Uma correlação inversa entre a idade de início e o tamanho da sequência que contém as repetições é observada e, embora o indivíduo já nasça com o alelo mutante, as consequências neurológicas somente aparecerão após algumas décadas de vida, durante as quais as funções neuronais são normais (Zoghbi, 2000). O tamanho da repetição do alelo anormal determina a taxa de progressão da doença em pacientes com SCA3 (Klockgether *et al*, 1996); nós mesmos já tínhamos identificado esse fenômeno, anos atrás (Jardim *et al*, 2001).

A idade de início da doença varia bastante, geralmente ocorrendo entre a terceira e a quarta década de vida, apesar de terem sido descritos casos com início precoce, durante a infância, e com início tardio, após sessenta anos de idade. O número de repetições CAG sozinho explica de 45% a 60% desta variabilidade (van de Warrenburg *et al*, 2002), indicando que outros fatores devem estar envolvidos, como o nível da proteína ataxina-3 mutante nas células afetadas. Esta diferença pode estar relacionada, por exemplo, à metilação do DNA específica para o alelo mutante, levando ao silenciamento da transcrição. Conseqüentemente, os sintomas da doença começariam mais tardiamente nestes pacientes.

A doença evolui progressivamente, levando o paciente à morte em média 21 anos após o início dos sintomas, conforme um estudo prévio realizado pelo nosso grupo (Kieling *et al*, 2007).

Um fenômeno chamado antecipação ocorre nas SCAs com repetições trinucleotídicas CAG. Sequências com repetições grandes, maiores que a faixa normal, são instáveis durante a meiose e tendem a se expandir nas próximas gerações. Isto leva ao início mais precoce dos sintomas e fenótipo mais severo em gerações subsequentes da família, que caracteriza antecipação (Richards, 2001). A maioria dos casos juvenis é

causada por expansões extremas entre as gerações, como observadas em esperma em casos de SCA7 e de SCA2 (Monckton *et al*, 1999; Benton *et al*, 1998). Na SCA7, a antecipação pode ser tão grave que crianças com início precoce podem morrer antes mesmo dos pais tornarem-se sintomáticos (La Spada, 1997; Nance, 1997).

Para expansões de repetições grandes, como na SCA3, a instabilidade somática também poderia ocorrer, tornando a correlação genótipo-fenótipo ainda mais problemática (Maciel *et al*, 1997). Por outro lado, pequenas expansões, que algumas vezes são próximas ao tamanho normal, como na SCA2 e na SCA6, podem apresentar penetrância reduzida e aparecer como casos esporádicos sem uma história familiar (Schöls *et al*, 2000).

Antecipação é uma questão importante no aconselhamento genético de indivíduos em risco assintomáticos e no diagnóstico pré-natal. Porém, embora exista uma correlação inversa entre o número de repetições CAG e a idade de início da doença, não se pode prever pela história familiar ou por testes moleculares a idade de aparecimento dos sintomas, assim como a gravidade, os sintomas específicos e a taxa de progressão da doença, já que estes fatores são variáveis entre os indivíduos. Outros fatores genéticos e ambientais devem influenciar o histórico da doença, seu início e desenvolvimento. Esses fatores são conhecidos como fatores modificadores. É importante lembrar que o número de repetições trinucleotídicas pode também permanecer estável ou mesmo diminuir de tamanho quando transmitido para gerações subseqüentes (Bird, 2009).

Há uma transmissão preferencial do alelo mutante em famílias com SCA3, que é ainda mais significativa quando o transmissor é o pai (Takiyama *et al*, 1995; Ikeuchi *et al*, 1996; Iughetti *et al*, 1998). Esse fenômeno, chamado de distorção da segregação, costuma sugerir a existência de uma vantagem seletiva do gameta portador do alelo mutante – fenômeno conhecido como deriva meiótica. Há evidências de que algum mecanismo desconhecido que opere na fertilização ou em estágios pós-zigóticos esteja atuando e explique esse fenômeno (Leeflang *et al*, 1996). Suas repercussões clínicas são muito importantes, pois a chance de um indivíduo assintomático em risco de ser mesmo portador da SCA3 não é, de fato, de 50%, mas é maior do que isso.

Em um estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo, foi demonstrado que o *fitness* de indivíduos afetados é estatisticamente maior que o da população em geral (Prestes *et al*, 2008). Neste trabalho, os indivíduos afetados tinham mais filhos do que os

parentes não afetados e as mulheres também apresentaram menor idade no primeiro parto e início mais precoce da menopausa em comparação com as familiares não afetadas. Também foi observado que, como o início da doença ocorre geralmente após a idade reprodutiva, a maioria dos indivíduos afetados teve seus filhos antes de saber se era ou não portador da mutação, sugerindo um maior *fitness* do alelo mutante (Prestes *et al*, 2008).

1.2.5. Mutação causal e fisiopatologia

A expansão das repetições CAG não altera a transcrição ou a tradução do gene *ATXN3*, mas leva à ocorrência de extensões anormais de poliglutamina na proteína ataxina-3, que são geralmente acumuladas no núcleo celular na forma de agregados insolúveis e estruturas neuropatológicas chamadas inclusões intranucleares neuronais (*Neuronal Intranuclear Inclusions - NII*) (Clark e Orr, 2000; Orr e Zoghbi, 2000; Davies *et al*, 1998). Estas inclusões apresentam componentes celulares como ubiquitina, componentes do proteossomo, chaperonas e fatores de transcrição (Cummings *et al*, 1998; McCampbell *et al*, 2000; Schmidt *et al*, 2002). O bloqueio da agregação é um método utilizado para minimizar a toxicidade. A propriedade de agregação e as possíveis interações causadas pelos agregados nos núcleos das células parecem ser a maior causa de morte celular (Siyanova e Mirkin, 2001; Perutz e Windle, 2001).

A proteína ataxina-3 apresenta na sua estrutura primária o domínio globular conservado, denominado domínio Josephina, na região amino-terminal com atividade catalítica, dois domínios de interação com ubiquitina e um domínio não estruturado contendo a faixa de poliglutaminas na região carboxi-terminal (Masino *et al*, 2003). Uma sequência de localização nuclear (*nuclear localization sequence - NLS*) também está presente na estrutura primária da proteína (Tait *et al*, 1998). Estudos independentes sugerem que a ataxina-3 está envolvida no sistema proteossomo dependente de ubiquitina (SPU), atuando com uma atividade ubiquitina protease, ligando-se a cadeias protéicas poliubiquitinadas e a outros fatores envolvidos na translocação de substratos ao proteossomo (Chai *et al*, 2004; Mao *et al*, 2005). A proteína ataxina-3 é encontrada no citoplasma, no núcleo das células e também nas mitocôndrias (Pozzi *et al*, 2008).

Foi demonstrado *in vivo* que a adição de uma NLS exógena a ataxina-3 expandida aumentou a gravidade do fenótipo e induziu precocemente a morte em modelos transgênicos (Bichelmeier *et al*, 2007). Neste mesmo estudo também foi demonstrado que a adição de uma sequência de exportação nuclear (*nuclear export sequences* – NES) exógena não apenas diminuiu quase completamente a formação de NIIs, mas também impediu a agregação de ataxinas-3 (Bichelmeier *et al*, 2007). Estes dados sugerem que defeitos no transporte nucleocitoplasmático da proteína expandida poderiam estar relacionados à patologia e especificidade neuronal.

A exportação nuclear depende de um domínio complexo localizado na porção amino-terminal da proteína, que exige o domínio Josephina e o domínio de interação com a ubiquitina (Macedo-Ribeiro *et al*, 2009). Além disso, a exportação da ataxina-3 expandida é menos eficiente que a exportação da ataxina-3 normal (Chai *et al*, 2002), sugerindo um defeito na atividade de transporte nucleocitoplasmático da proteína expandida. Duas NES foram identificadas e associadas, sob condições normais, à manutenção da ataxina-3 no citoplasma (Antony *et al*, 2009). Porém, a clivagem proteolítica levaria a uma separação das duas NES localizadas na porção amino-terminal da ataxina-3, da NLS e da repetição de poliglutaminas, localizadas na porção carboxi-terminal da proteína. Isso permitiria que a porção carboxi-terminal fosse translocada para o núcleo para formar os agregados intranucleares. A identificação do transportador nuclear ou dos transportadores nucleares responsáveis por este transporte esclarecerá como a localização subcelular da ataxina-3 é regulada em condições fisiológicas e patológicas.

Em um estudo com camundongos, a perda fisiológica da ataxina-3 não contribuiu para a patologia em SCA3, mas confirmou a importância da proteína como uma enzima deubiquitinante *in vivo* (Schmitt *et al*, 2007). O achado que a ausência da ataxina-3 em camundongos não tem efeitos deletérios sugere que futuras estratégias terapêuticas poderiam visar à redução da proteína.

Apesar do fato que a maioria das proteínas associadas às SCAs é expressa sistemicamente, a citotoxicidade resultante parece restrita a poucos subtipos neuronais do sistema nervoso central (SNC). Condições celulares seletivas e interações proteína-proteína específicas poderiam conferir condições de insolubilidade local, levando a oligomerização e fibrilação em neurônios vulneráveis. Interferência na expressão gênica poderia ocorrer

pelos efeitos da interação da proteína mutante com proteínas que regulam a transcrição. Este fato explicaria a neurodegeneração de tipos específicos de células nas SCAs, pelo sequestro de fatores cuja expressão está confinada a estas células (Dueñas *et al*, 2006). Já foram descritas várias interações entre as poliglutaminas expandidas e fatores de transcrição/co-fatores como, por exemplo, proteína ligante de CREB (proteína de ligação a elementos responsivos ao cAMP) – PLC, fator associado a p300/CBP (p/CAF), p53, Sp1, TAFIII130 e PQBP-1 (Okazawa, 2003).

Em SCA3, a localização nuclear da ataxina-3 mutante em camundongos transgênicos reforça a patogênese da doença (Bichelmeier *et al*, 2007). A análise por microarranjo em outro modelo de SCA3 demonstrou desregulação transcricional de proteínas envolvidas na neurotransmissão glutamatérgica, sinalização/mobilização de cálcio intracelular, proteínas de choque térmico e fatores de transcrição regulando a diferenciação e sobrevivência neuronal, corroborando com a hipótese de disfunção nuclear em SCA3 (Chou *et al*, 2008). Em transcrição mediada por receptores nucleares, um papel para o SPU na remodelação da cromatina através da modificação de histonas e regulação transcricional foi estabelecido (Dennis e O'Malley, 2005; Kinyamu *et al*, 2005). Interessantemente, foi demonstrado que a ataxina-3 mutante age como uma repressora da transcrição, através de sua interação com a histona desacetilase 3 e com o co-repressor de receptor nuclear (NCoR) (Evert *et al*, 2006). Esta atividade repressora é dependente de seus domínios de interação com a ubiquitina (Evert *et al*, 2006), sugerindo uma ligação entre a função da ataxina-3 no SPU e seu papel na regulação da transcrição.

Um grupo de proteínas nucleares cuja expressão poderia ser alterada pelas ataxinas mutantes, é o grupo das acetiltransferases de histonas (HATs). As HATs são responsáveis pela acetilação de histonas e de várias outras proteínas, alterando as suas funções (Kouzarides, 2000). As HATs também regulam processos de modificação transcricional de cromossomos, regulação temporária de promotores e ativação e inativação de proteínas. O desequilíbrio entre acetilação e desacetilação de proteínas pode ser um processo chave na patogênese (Steffan *et al*, 2001). A PLC é uma acetiltransferase, cuja atividade está alterada em doenças de poliglutaminas. A interação entre as poliglutaminas e PLC nas inclusões causa a perda da função de PLC por diminuir a sua disponibilidade. Visivelmente, a superexpressão de PLC protege os neurônios contra a

toxicidade de poliglutaminas expandidas (McCampbell *et al*, 2000; Nucifora *et al*, 2001; Taylor *et al*, 2003).

Os pacientes homocigotos para a mutação SCA3 têm idade de início dos sintomas mais precoce e fenótipo mais grave que os pacientes heterocigotos (Carvalho *et al*, 2008). Isto poderia ser explicado pela perda de função da proteína ou pelo ganho de atividade tóxica (Lerer *et al*, 1996). Estudos em drosófilas demonstraram que a ataxina-3 normal suprime a neurodegeneração causada pela ataxina-3 mutante e esta supressão é dependente da sua atividade ligante a ubiquitina e atividade proteásica (Warrick *et al*, 2005). Isto implica (pelo menos neste modelo de drosófila) que parte do fenótipo neurodegenerativo poderia ser resultado da perda de função da ataxina-3.

Alguns estudos também indicam que NII pode não ser a causa direta da doença, podendo ser um fenômeno relacionado ou mesmo representar uma resposta protetora. Após a interrupção da função da ubiquitina, poucas inclusões são observadas, mas a neurodegeneração procede (Cummings *et al*, 1999). As proteínas mutantes poderiam ser mais tóxicas se não forem sequestradas em inclusões. Estudos em animais desenvolvendo o modelo NII poderão esclarecer a sua relação com a morte celular.

1.3. Epigenética

A herança da informação baseada nos níveis de expressão gênica é conhecida como epigenética, sendo oposta à genética, a qual se refere às informações transmitidas na base da sequência gênica (Esteller e Herman, 2002). A palavra epigenética literalmente significa “mudanças em adição à sequência genética”. O termo foi desenvolvido para incluir alguns processos que alteram a atividade de determinado gene sem mudar a sequência do DNA, e este mecanismo leva a modificações que podem ser transmitidas para as células filhas através das divisões mitóticas e meióticas, além de ser um processo que pode ser reversível (Egger *et al*, 2004; Weinhold, 2006).

A metilação que ocorre por adição covalente de um grupo metil ao resíduo do carbono 5' da citosina em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), resultando na formação

de um composto chamado 5-metilcitosina, é uma característica de genomas eucarióticos e é um dos principais mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica. A transferência do grupo metil é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs). Em mamíferos, as DNMTs incluem DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, que são responsáveis pela aquisição do padrão de metilação durante a gametogênese, embriogênese e desenvolvimento do tecido somático. As DNMTs utilizam S-adenosil-L-metionina como doador dos grupos metil (Turek-Plewa e Jagodzinski, 2005). As DNMTs de mamíferos estão agrupadas em duas classes baseadas em suas afinidades pelo DNA substrato. As DNMTs *de novo* (DNMTs 3A e 3B) são responsáveis por introduzir o radical metil em sítios CpG que nunca foram metilados, principalmente durante a gametogênese e no embrião em pré-implantação, enquanto DNMT1 mantém o padrão de metilação nas novas fitas de DNA que são formadas durante a replicação. A DNMT3L está fisicamente associada com as DNMTs 3A e 3B e é responsável por modular a atividade catalítica de ambas. Quando combinadas, essas DNMTs *de novo* e de manutenção parecem constituir um conjunto de componentes enzimáticos do sistema de metilação do DNA em mamíferos (Klose e Bird, 2006).

Aproximadamente 60 a 90% dos dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma são metilados, enquanto que as regiões ricas em CpG denominadas “ilhas CpG” são não-metiladas (Nakao, 2001). Ilha CpG foi definida como uma região de DNA maior ou igual a 200 pb que contém pelo menos 50% de G+C e uma razão entre o observado e o esperado da frequência de dinucleotídeos CG maior ou igual a 0,6 (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). Estima-se que 60% dos genes humanos são associados a ilhas CpG. Por análises computacionais do genoma humano, calcula-se que existam aproximadamente 29 mil ilhas CpG (Venter *et al*, 2001). A localização destas ilhas CpG não é randômica no genoma, localizando-se preferencialmente na região promotora dos genes. Estas ilhas são encontradas nas proximidades de genes de expressão constitutiva e em 40% das regiões promotoras de genes que apresentam expressão tecido-específica (Nakao, 2001).

A presença de ilhas CpG foi correlacionada com a estrutura gênica quando foi observado que as regiões do genoma acessíveis a nucleases e, portanto, ativas transcricionalmente, continham DNA hipometilado. Este dado, associado ao fato de que estas ilhas se localizam preferencialmente na região promotora dos genes, sugeriu um papel importante destas regiões na regulação da expressão gênica. De modo geral, a

presença de metilação nas ilhas CpG das sequências promotoras dos genes pode ser correlacionada com o silenciamento gênico (Esteller, 2002).

Vários mecanismos foram propostos para explicar o papel da metilação na diminuição da atividade transcricional. Em um primeiro modelo, foi proposto que os resíduos de citosina metilados poderiam interferir diretamente na interação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação, uma vez que o grupo metil se projeta no sulco maior da dupla fita de DNA. Além desta interferência direta, um segundo modelo propõe que a metilação dos dinucleotídeos CpG tenha consequência direta no posicionamento nucleossomal precedendo a montagem desta estrutura. Dessa forma, a estrutura nucleossômica compactada silencia mais eficientemente a transcrição do que a estrutura convencional da cromatina (Esteller, 2005). A informação armazenada por ilhas CpG hipermetiladas é, em parte, interpretada por proteínas que se ligam a resíduos metilados (*Methyl Binding Domain proteins* - MBDs). As MBDs são importantes “tradutoras” entre a metilação do DNA e genes modificadores de histonas que estabelecem um ambiente de cromatina transcricionalmente inativo (Esteller, 2007). As MBDs podem recrutar complexos protéicos contendo co-repressores e desacetilases de histonas (HDACs) e, com base nessa interação, foi proposto que a ligação destes complexos ao DNA levaria a uma mudança na estrutura da cromatina impedindo a transcrição (Yang *et al*, 2001).

A maioria das modificações nas histonas ocorre nas suas caudas amino-terminais. Várias modificações são compatíveis com o silenciamento gênico. Em geral, a desacetilação das histonas leva ao silenciamento gênico, enquanto a acetilação leva à ativação gênica. Deste modo, ilhas CpG hipermetiladas são conhecidas por exibir um código de modificação de histonas, caracterizado especialmente por hipoacetilação e metilação, que deve ser lido por fatores nucleares (Jenuwein, 2001). Outras conexões encontradas foram que as DNMTs também são capazes de recrutar HDACs, enquanto de outro lado, ambas DNMTs e MBDs recrutam metiltransferases de histonas (HMTs) que modificam a lisina 9 da histona H3 (Esteller, 2007).

Mudanças na estrutura da cromatina são uma característica patológica proeminente de muitas doenças neurodegenerativas. Na doença de Alzheimer (DA), a transformação aberrante da proteína precursora de amilóide resulta em significantes alterações transcricionais (Mattson e Sherman, 2003; Robakis, 2003). A alteração da

transcrição gênica na DA tem sido associada com alterações nos perfis de acetilação de histonas (Kim *et al*, 2004). Anomalias transcricionais também são observadas na doença de Parkinson (DP), onde um subconjunto de genes identificados em estudos de perfis de expressão está significativamente desregulado (Mandel *et al*, 2005). Em ambos os casos, alterações neuropatogênicas na atividade transcricional levam a perturbações na função neuronal normal e morte neuronal.

Na doença de Huntington (DH) ocorre uma significativa redução na transcrição gênica. A acetilação de histonas é reduzida em modelos de DH (Ferrante *et al*, 2003; Gardian *et al*, 2005). Inversamente, a metilação de histonas é aumentada em camundongos transgênicos (Gardian *et al*, 2005; Ferrante *et al*, 2004) e em pacientes com DH (Ryu *et al*, 2006).

A formação do padrão de metilação é iniciada durante o desenvolvimento, com um processo de desmetilação de todo o genoma ocorrendo dentro de 1-2 divisões celulares após a fecundação (Razin e Shemer, 1995). A desmetilação continua progressivamente até aproximadamente o tempo da implantação do blastocisto (Sanford *et al*, 1987). Assim que ocorre a implantação do blastocisto, os níveis de metilação do genoma aumentam drasticamente, resultando na formação de padrões de metilação encontrados em indivíduos adultos (Razin e Shemer, 1995). O início da metilação *de novo* resulta de interações entre DNMTs e elementos *cis*-atuante. Alto conteúdo de GC, juntamente com estruturas secundárias de DNA incomuns, pode ser um alvo para a metilação (Scrabble e Stambrook, 1997; Turker, 1999).

A metilação do DNA está envolvida em vários processos biológicos normais, como o *imprinting* genômico e a inativação do cromossomo X. Várias síndromes herdadas são geradas devido à falta do *imprinting* genômico, como a síndrome de Angelman, a síndrome de Prader-Willi e a síndrome de Beckwith-Wiedemann (Egger *et al*, 2004).

A hipermetilação associada ao silenciamento gênico é um dos mais importantes mecanismos epigenéticos em doenças humanas (Ozanne e Constancia, 2007). Alterações nestes mecanismos estão relacionadas à patogênese do câncer (Esteller e Herman, 2002), à DA (Wang *et al*, 2008) e a várias doenças hereditárias (Waggoner, 2007). Em particular, hipermetilação foi descrita na distrofia miotônica tipo 1 (Steinbach *et al*, 1998) e síndrome do X-Frágil (Sutcliffe *et al*, 1992), diminuindo a quantidade de mRNA do gene mutante.

No caso da síndrome do X-Frágil, o diagnóstico pode ser confirmado pela identificação de padrões anormais de metilação (Robert, 2008). Mudanças epigenéticas também foram associadas à patogênese da ataxia de Friedreich (FRDA) (Herman *et al*, 2006; Greene *et al*, 2007; Al-Mahdawi *et al*, 2008; Castaldo *et al*, 2008). A análise do padrão de metilação de 15 sítios CpG na região 5' da repetição GAA demonstrou que 3 sítios são mais metilados em pacientes FRDA quando comparados a controles saudáveis (Greene *et al*, 2007). Neste trabalho, os autores também destacaram o papel de um sítio CpG específico como um marcador robusto de modificação epigenética na FRDA. Por outro lado, os autores afirmaram que a metilação deste sítio, por si só, é improvável que seja a principal causa de deficiência da proteína frataxina. Na SCA2, alguma evidência do envolvimento da metilação alelo-específica na etiologia da doença já foi relatada (Bauer *et al*, 2004). Dois pacientes com 37 repetições CAG foram analisados. O paciente com manifestação posterior dos sintomas (67 anos de idade) mostrou maior metilação do alelo expandido em relação ao paciente que apresentou os primeiros sintomas aos 20 anos de idade.

1.4. Genes modificadores

A ampla variação observada na idade de início e nas manifestações clínicas dos pacientes com SCA3, inclusive entre indivíduos com o mesmo tamanho de repetição CAG, evoca a questão: quais fatores contribuem para a variação do fenótipo da doença? Outros fatores genéticos além da mutação patogênica também poderiam contribuir para tal variabilidade. Os genes modificadores foram descritos para explicar a variabilidade da expressão fenotípica de uma determinada doença, sendo que sozinhos não causariam esta doença, mas afetariam a sua gravidade. Alguns efeitos modificadores já foram associados a alguns genes em modelo animal para SCA3 (Bilen e Bonini, 2007). Nosso grupo também descreveu um significativo efeito da influência do tamanho da repetição CAG do alelo normal do gene *ATXN2* no fenótipo neurológico de pacientes com SCA3 (Jardim *et al*, 2003). A seguir serão descritas algumas proteínas que poderiam agir como modificadoras do fenótipo na SCA3.

1.4.1. Proteína X associada à Bcl-2 (*BAX*)

A proteína X associada à Bcl-2 (*BAX*) é um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) de proteínas envolvidas na regulação da apoptose. Devido à sua importância fundamental, a apoptose é uma via altamente regulada. Mais de 25 membros desta família já foram identificados e são classificados como proteínas pró- ou anti-apoptóticas que compartilham até quatro domínios conservados conhecidos como regiões de homologia a Bcl-2 (BH) (Reed, 2000; Adams e Cory, 1998). As proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-_{xL}, contêm todos os quatro subtipos de domínios BH e promovem a sobrevivência da célula, inibindo a função das proteínas pró-apoptóticas.

Os membros pró-apoptóticos podem ser separados em duas subfamílias estruturalmente distintas. As proteínas multidomínio (Bax e Bak) apresentam três regiões BH, faltando o domínio BH4. As proteínas "somente-BH3", que incluem Bnip3, Nix/Bnip3L, Bim, Bid, Noxa, Puma e Bad, apresentam apenas o domínio BH3. A maioria dos membros da família Bcl-2 contêm um domínio transmembrana na região carboxi-terminal, que é importante para a sua ligação a membranas intracelulares. As proteínas BH3 se ligam às proteínas anti-apoptóticas, permitindo a liberação das proteínas pró-apoptóticas (Gustafsson e Gottlieb, 2007).

As proteínas pró- e anti-apoptóticas podem ser encontradas no retículo endoplasmático (RE), citosol, mitocôndria e envelope nuclear. Em condições normais, Bax está localizada no citosol, mas, em resposta a estímulos apoptóticos, Bax sofre uma mudança de conformação que provoca a sua translocação para a membrana externa da mitocôndria. Isto leva a permeabilização da membrana externa mitocondrial e a liberação de proteínas pró-apoptóticas (Gustafsson e Gottlieb, 2007). Não está claro como Bax é mantido em um estado inativo no citoplasma e o que controla a mudança de conformação de Bax em resposta ao estresse.

A homeostase é mantida através do controle da quantidade de proteínas pró- e anti-apoptóticas juntamente com padrões de expressão tecido-específico. Determinados estímulos, tais como danos ao DNA, levam a superexpressão de proteínas pró-apoptóticas, perturbando o equilíbrio e levando à morte celular programada.

As proteínas pró- ou anti-apoptóticas da família Bcl-2 desempenham um papel importante na regulação da liberação de citocromo *c* e Smac do espaço intermembranar mitocondrial (Adams, 2003; Danial e Korsmeyer, 2004). As proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, ativadas por membros BH3 da família de proteínas Bcl-2, incluindo Bim, induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial e permitem o efluxo do citocromo *c* citotóxico e Smac. As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L inibem a apoptose por prevenir a ativação de proteínas Bax/Bak ou BH3. A perturbação do equilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas, através da expressão e ativação de proteínas Bax e Bak, pode levar a ativação de caspase mitocôndria-dependente e morte celular por apoptose (Chou *et al*, 2006).

O aumento da expressão e a ativação de Bax regulam a apoptose de neurônios do SNC em resposta a vários estímulos indutores de morte celular, incluindo excitotoxicidade do glutamato, isquemia e peptídeo β-amilóide (Paradis *et al*, 1996; Xiang *et al*, 1998; Graham e Chen, 2001; Guegan *et al*, 2001; Yang *et al*, 2009). Bcl-x_L, expressa em neurônios embrionários e adultos, desenvolve um papel crítico na cascata neuronal inibindo a apoptose, que é ativada durante o desenvolvimento do cérebro ou após estímulos patológicos (Parsadanian *et al*, 1998, Cao *et al*, 2002).

Em um modelo celular de SCA3, foi observado que a ataxina-3 expandida ativa a caspase-9, um importante iniciador da apoptose mitocôndria-dependente, e induz a morte neuronal através do aumento da expressão de Bax e da diminuição da expressão de Bcl-x_L no cerebelo, estriado e neurônios da substância negra sem afetar a expressão Bak, Bcl-2 ou Bim (Chou *et al*, 2006). Estes resultados sugerem que a ataxina mutante regula a expressão de Bcl-x_L e Bax por alterar o padrão normal de transcrição dos genes correspondentes. A ataxina mutante poderia interagir com os fatores de transcrição de forma anormal ou sequestrá-los (Chou *et al*, 2006).

O gene *BAX* compreende 6 éxons e apresenta aproximadamente 7 kb, estando localizado na posição 19q13.3-q13.4 do genoma humano. O SNP de transição rs1805419 (G/A) está localizado no íntron 3 do gene.

1.4.2. Cristalina α -B (*CRYAB*)

A cristalina α -B (HspB5) é um membro da família de pequenas proteínas de choque térmico (sHsp - *small heat shock protein*) que atua como uma chaperona molecular, impedindo a agregação de polipeptídeos durante a recuperação do estresse celular. As sHsps são caracterizadas pela baixa massa molecular (12-43 kDa) e um domínio carboxi-terminal conservado. Em mamíferos, cristalina α -B é o principal polipeptídeo da lente do olho, onde está associada diretamente com a cristalina α -A (HspB4) para formar grandes estruturas hetero-oligoméricas (Arrigo *et al*, 2007).

Chaperonas moleculares, proteínas que podem reparar ou facilitar a degradação proteossômica de proteínas mal enoveladas, estão presentes em agregados de tecidos humanos *postmortem* (Ross e Poirier, 2004). Esta evidência indica que os mecanismos de sobrevivência celular mediados por chaperonas do RE e a resposta a proteínas mal enoveladas são ativados durante a neurodegeneração nas SCAs. A presença de proteínas mal enoveladas pode causar um estresse no RE e, para restaurar a homeostase, ocorre a ativação transcricional de genes que codificam chaperonas. Consistente com esta hipótese, a superexpressão experimental de chaperonas modula a formação de agregados protéicos em cultura celular, em camundongos transgênicos e em drosófilas, diminuindo a toxicidade da cadeia expandida (Cummings *et al*, 1998; Cummings *et al*, 2001; Bonini, 2002). Um possível mecanismo para as chaperonas modularem a toxicidade seria pela estabilização da conformação das proteínas ou pela interação com a proteína mutada, prevenindo interações anormais com outras proteínas celulares (Sakahira *et al*, 2002; Dueñas *et al*, 2006).

A proteína cristalina α -B está envolvida em diversos processos celulares fisiológicos e patológicos, como doenças de conformação protéica, doenças inflamatórias, apoptose e câncer (Arrigo *et al*, 2007). A expressão de cristalina α -B também se correlaciona com o aumento da resistência de células a danos oxidativos, através da diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (Firdaus *et al*, 2006).

A cristalina α -B é codificada pelo gene *CRYAB* que abrange 3 éxons, apresenta aproximadamente 3 kb e está localizado na posição 11q23 do genoma humano. O polimorfismo g.CRYAB-249C>G está situado em uma região importante para a atividade

promotora no gene *CRYAB* (Aki *et al*, 2003). Esta região é conservada entre as espécies de mamíferos e na família de sHsps humanas. A influência deste polimorfismo foi demonstrada na suscetibilidade à esclerose múltipla, provavelmente por afetar a transcrição de *CRYAB*. O genótipo GG foi associado com idade de início precoce da doença (Stoevring *et al*, 2007).

Estudos computacionais demonstraram que a substituição de C para G induz a ligação de fatores de transcrição, como TF68 e Nrf2 (Stoevring *et al*, 2007). A função do fator de transcrição TF68 ainda não é conhecida, mas Nrf2 é um membro da família de fatores de transcrição para zíper de leucina (Chan *et al*, 1995), sendo importante para mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo e na indução de apoptose (Venugopal *et al*, 1996; Ohtsubo *et al*, 1999; Itoh *et al*, 1997). Estes resultados sugerem que a indução de um sítio para Nrf2 pode ser importante na transcrição do gene *CRYAB* em pacientes com esclerose múltipla (Stoevring *et al*, 2007).

A cristalina α -B também regula a apoptose através de vários mecanismos: ligação à Bax e inibição da translocação dessa proteína a mitocôndrias, impedindo a apoptose Bax-dependente (Mao *et al*, 2004), e também ligação à pró-caspase 3, a proteína mais comum na via de apoptose, bloqueando assim a proteólise (Li *et al*, 2001; Kamradt *et al*, 2001; Kamradt *et al*, 2002). Recentemente, foi demonstrado que *CRYAB* é um gene alvo para p53 e que a cristalina α -B interage diretamente com p53, sendo necessária para a apoptose p53-dependente (Watanabe *et al*, 2009).

O gene *CRYAB* é expresso em vários tecidos, incluindo o SNC. Aumento da expressão deste gene e um acúmulo de cristalina α -B em corpos de inclusão foram descritos em muitas doenças de conformação protéica, como, por exemplo, em fibras de Rosenthal na doença de Alexander, doença de corpos de Lewy, placas na DA e depósitos de sinucleína associados à DP (Muchowski e Wacker, 2005). A cristalina α -B pode ser considerada uma potente supressora de neurodegeneração (Arrigo *et al*, 2007).

No nível bioquímico, mutações no gene *CRYAB* modificaram as propriedades da proteína cristalina α -B, como a sua oligomerização e atividade de chaperona *in vitro*. Além disso, a capacidade de cristalina α -B para interagir com membros da cascata de apoptose ou com outras sHsps também pode ser afetada (Bova *et al*, 1999). Essas observações levam à conclusão de que a cristalina α -B é um alvo importante para o desenvolvimento de

estratégias terapêuticas para patologias tão diversas como doenças neurodegenerativas, miopatias, asma, catarata e câncer.

1.4.3. Receptor ionotrópico do glutamato, kainato 2 (*GRIK2*)

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e exerce um importante papel na plasticidade e no desenvolvimento neuronal, bem como nos processos de neurodegeneração e excitotoxicidade (Nakanishi, 1992). O glutamato medeia vários processos vitais, como o desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação e migração (McDonald *et al*, 1990), a modulação de mecanismos de aprendizado e memória (Izquierdo e Medina, 1997) e o envelhecimento (Segovia *et al*, 2001). A ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos (GluRs) durante episódios de estresse cerebral, tais como isquemia, traumatismo craniano e surtos epiléticos, leva à morte de neurônios.

Os GluRs estão amplamente distribuídos no SNC e são divididos em duas classes: receptores metabotrópicos e receptores ionotrópicos.

Os GluRs metabotrópicos constituem um grupo de receptores ligados a proteínas G. O glutamato, ao ligar-se nestes receptores, ativa uma proteína G que pode ativar ou inibir a adenilato ciclase ou estimular a fosfolipase C, regulando, assim, a concentração de diferentes mediadores intracelulares (IP₃, AMPc ou Ca²⁺). Dentro deste grupo de receptores já se conhecem oito subtipos, os quais estão divididos em grupo I, grupo II e grupo III (Pin e Duvoisin, 1995; Conn e Pin, 1997).

Por sua vez, os receptores ionotrópicos são canais que permitem a passagem de um cátion específico quando ativados por um agonista e foram subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), com as subunidades NR1, NR2A-NR2D, NR3A, NR3B e não-NMDA, que compreendem os receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazolenopropionato), com as subunidades GluR1-GluR4, e kainato, que inclui as subunidades GluR5-GluR7, KA1 e KA2 (Ozawa *et al*, 1998).

Interação de aminoácidos excitatórios com seus receptores pode potencialmente causar toxicidade, por alterar a homeostase do cálcio e danificar o metabolismo energético

(Coyle *et al.*, 1983). Vários trabalhos mostraram que a excitotoxicidade do glutamato está envolvida no dano agudo do SNC ou em doenças neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica e DH, levando a morte celular (Lipton e Rosenberg, 1994; Lee *et al.*, 1999; Maragakis e Rothstein, 2001; Feigin e Zgaljardic, 2002).

Receptores ionotrópicos do tipo kainato têm duas atividades principais: contribuir para o potencial pós-sináptico excitatório em resposta ao glutamato e modular a liberação de neurotransmissores (γ -aminobutírico [GABA] e glutamato) através da ação pré-sináptica (Chittajallu *et al.*, 1999; Contractor *et al.*, 2001; Mulle *et al.*, 2000). O gene *GRIK2* (*glutamate receptor, ionotropic, kainate 2*) codifica a subunidade GluR6 do receptor kainato e é expresso abundantemente em regiões do cérebro envolvidas na aprendizagem e memória (como o hipocampo), bem como na atividade motora e aspectos motivacionais do comportamento (como o cerebelo e os gânglios basais). Portanto, GluR6 vem sendo associado como um principal contribuinte para as funções cognitivas mais elevadas e, assim, podendo desempenhar um papel na patogênese de vários distúrbios neuropsiquiátricos e doenças neurológicas.

Em um estudo recente sobre a expressão de genes envolvidos na transmissão glutamatérgica em cerebelo de camundongos transgênicos expressando a proteína ataxina-3 mutante, foi observada uma expressão reduzida de GluR6, sugerindo que esta redução tem um importante papel no processo de morte celular em SCA3 (Chou *et al.*, 2008). A subunidade GluR6 do receptor kainato regula a excitação do glutamato nos neurônios cerebelares (Smith *et al.*, 1999; Bureau *et al.*, 2000). O complexo de sinalização formado por PLC β 4, IP3R-1 e GluR1 é necessário para respostas pós-sinápticas mediadas pelo glutamato e plasticidade sináptica no cerebelo (Nakamura *et al.*, 2004). Camundongos deficientes em PLC β 4 ou IP3R-1 apresentam sintomas atáxicos de descoordenação motora (Hashimoto *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Portanto, a baixa expressão destes genes poderia levar a uma deficiência na transmissão glutamatérgica e, conseqüentemente, a disfunção cerebelar (Chou *et al.*, 2008).

O gene *GRIK2* compreende 17 éxons e apresenta aproximadamente 670 kb, estando localizado na posição 6q16.3 do genoma humano. Estudos independentes demonstraram que o polimorfismo de repetição TAA na região 3' não traduzida do gene apresenta um efeito modificador da idade de início na DH (Rubinsztein *et al.*, 1997;

MacDonald *et al*, 1999; Chattopadhyay *et al*, 2003; Cannella *et al*, 2004). Outro polimorfismo, o SNP rs2227281 (C/T), localizado no íntron 14 a 8 pb do éxon 15, foi estudado no autismo, demonstrando a transmissão preferencial do alelo T (Shuang *et al*, 2004; Dutta *et al*, 2007). Foi postulado que o autismo pode ser um transtorno hipoglutamatérgico (Carlsson, 1998). Conhecendo o fato de que a função de GluR6 é regulada pela edição do mRNA (Paschen *et al*, 1994), foi sugerido que o polimorfismo rs2227281 poderia influenciar esta edição (Shuang *et al*, 2004). A edição do mRNA de GluR6 no sítio Q/R modifica a permeabilidade dos canais de cálcio (Egebjerg e Heinemann, 1993).

1.4.4. Interleucina-1 β (*IL1B*)

A interleucina-1 (IL1) exerce a sua atividade pró-inflamatória por dois tipos de polipeptídeos: IL1 α e IL1 β . As duas formas de IL1 mostram menos de 30% de homologia estrutural, porém as duas ligam-se aos mesmos receptores de superfície e suas atividades biológicas são essencialmente idênticas (Abbas *et al*, 1998). A IL1 α parece se concentrar na membrana celular, enquanto a IL1 β é secretada para o meio extracelular e parece ser a principal responsável pelas atividades da IL1 (Dinarello, 1988). A família da IL1 ainda é constituída por um terceiro polipeptídeo, denominado antagonista do receptor da IL1 (IL1ra). Esta citocina funciona como um inibidor competitivo, pois se liga aos receptores da IL1 inibindo a sua atividade biológica (Abbas *et al*, 1998).

A IL1 β é uma importante citocina mediadora da resposta inflamatória e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. A IL1 β pode desenvolver um importante papel na resposta a danos ao SNC. É induzida em experimentos de danos cerebrais e aumenta o efeito isquêmico (Rothwell *et al*, 1997). Por outro lado, IL1 β pode atuar como um fator promotor do crescimento pluripotente, induzindo o desenvolvimento axonal dopaminérgico em modelos animais para a DP (Wang *et al*, 1994). Assim, IL1 β pode exercer efeitos neurotóxicos e neuroprotetores no cérebro.

Embora IL1 β possa ser expressa por células cerebrais, seus níveis são baixos no SNC “saudável” (Vitkovic *et al*, 2000). IL1 β é liberada por monócitos, microglia,

astrócitos e células endoteliais cerebrais (Corsini *et al*, 1996). Níveis estatisticamente elevados de IL1 β foram encontrados no líquido cérebro-espinhal de pacientes com esclerose múltipla, quando comparados a controles (Dujmovic *et al*, 2009). IL-1 pode contribuir para a ativação glial, expressão de moléculas inflamatórias, alterações da barreira hematoencefálica (McManus *et al*, 1998; Liu *et al*, 1996) e invasão de células do sistema imunológico para o SNC (Rothwell *et al*, 1996; Perry *et al*, 1998). Assim, a IL1 β promove alterações inflamatórias, apoptose e/ou necrose de neurônios e oligodendrócitos (Merrill *et al*, 1993; D'Souza *et al*, 1995; Takahashi *et al*, 2003).

Uma expressão protéica aumentada de IL1 β foi observada em cultura de células neuronais e em tecidos do SNC de pacientes com SCA3, sugerindo que esta citocina inflamatória tem um importante efeito na patogênese da SCA3 (Evert *et al*, 2001; Evert *et al*, 2006). A síntese aumentada de IL1 β no cérebro contribui para o desenvolvimento de patologias agudas e crônicas no SNC, como doença Alzheimer, síndrome de Down e esclerose múltipla (Griffin *et al*, 1989; Rothwell *et al*, 1997; Huitinga *et al*, 2000; Dujmovic *et al*, 2009). Em outro trabalho com camundongos atáxicos, alterações de expressão de IL1 β foram encontradas exclusivamente no cerebelo, a única região do cérebro onde uma enorme neurodegeneração ocorre (Garabedian *et al*, 1998). Os resultados deste estudo fornecem evidência adicional de que IL1 β exerce um importante papel nos processos neurodegenerativos.

A indução de expressão de transcritos IL1 β em várias regiões do cérebro foi observada na presença de kainato (Minami *et al*, 1991). Também foi demonstrado que IL1 β desempenha um papel importante no aumento do efeito atáxico induzido por kainato em cerebelo de camundongos (Andoh *et al*, 2008). Os mecanismos detalhados sobre o efeito da IL1 β na indução de ataxia permanecem desconhecidos. Uma possível causa seria o efeito regulador de IL1 β sobre os sistemas neurotransmissores. IL1 está envolvida na regulação de neurotransmissores inibitórios e excitatórios (Miller e Fahey, 1994; Andoh *et al*, 2008).

O gene *IL1B* compreende 7 éxons e apresenta aproximadamente 7 kb, estando localizado na posição 2q14 do genoma humano. Polimorfismos no gene *IL1B*, especialmente em regiões regulatórias, podem estar relacionados com a quantidade de citocinas produzidas. O alelo A do polimorfismo na região promotora na posição -511 (IL-

1B-511) está relacionado ao aumento da síntese de IL1 β (Pociot *et al*, 1992). Em pacientes com SCA6, homozigotos para o alelo A apresentaram uma maior idade de início quando comparados aos indivíduos homozigotos para o alelo G, mostrando um papel protetor de IL1 β nesta doença (Nishimura *et al*, 2001). Na DP, IL1 β também mostrou um efeito protetor (Nishimura *et al*, 2000), corroborando o fato de que IL1 β pode atuar como um fator promotor do crescimento pluripotente, induzindo o desenvolvimento axonal dopaminérgico em animais modelos para a DP (Wang *et al*, 1994).

1.4.5. Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 (*ITPR1*)

O receptor de inositol (1,4,5)-trifosfato (ITPR) é um canal de liberação de cálcio (Ca²⁺) intracelular que desenvolve um papel importante na sinalização neuronal de Ca²⁺ (Berridge, 1998). Três isoformas de ITPR foram identificadas (Furuichi *et al*, 1994), sendo o receptor do tipo 1 (ITPR1) a isoforma predominante neuronal. ITPR1 apresenta três domínios: um domínio amino-terminal de ligação ao inositol trifosfato (IP3), um domínio de acoplamento e um domínio transmembrana carboxi-terminal. ITPR1 facilita a liberação de Ca²⁺ do RE após a ligação do segundo mensageiro IP3 (Matsumoto e Nagata, 1999). ITPR1 é abundante nas células de Purkinje do cerebelo (Matsumoto *et al*, 1996).

Uma característica notável da via de sinalização inositol trifosfato/cálcio (IP3/Ca²⁺) é a participação no controle de um grande número de processos celulares. Em alguns casos, ela desempenha um papel direto na geração de sinais de Ca²⁺ enquanto que, em outros casos, tem a função de modular os sinais de Ca²⁺ produzidos por outras vias de sinalização (Berridge, 2009). O cérebro é particularmente rico em componentes que funcionam na via de sinalização IP3/Ca²⁺ que podem desempenhar um papel importante em diversos processos neuronais, tais como as mudanças na plasticidade sináptica que fundamentam a aprendizagem e a memória (Berridge, 1998). Os receptores metabotrópicos são responsáveis pela geração de IP3 que contribui para o processo de depressão a longo prazo, responsável pela aprendizagem motora (Sharp *et al*, 1993).

Existem vários efeitos potencialmente tóxicos resultantes da excessiva liberação de Ca²⁺ do RE. Ocorre a ativação de calcineurina e calpaina, que clivam uma variedade de substratos importantes para a função neuronal, ocorre a modificação do citoesqueleto

neuronal, perda sináptica, atrofia neurítica e produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, levando a abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial e a apoptose (Bezprozvanny, 2009). A perturbação da homeostase do Ca^{2+} tem sido associada a muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Bezprozvanny e Mattson, 2008), DP (Surmeier, 2007) e DH (Bezprozvanny e Hayden, 2004).

Na SCA6, a degeneração de células de Purkinje está associada com expansões de poliglutamina no gene *CACNA1A* (Zhuchenko *et al*, 1997). O gene *CACNA1A* codifica a subunidade alfa 1A, que é a maior subunidade formadora de poros do canal de cálcio voltagem dependente tipo P/Q (Pietrobon, 2002). Canais de cálcio tipo P/Q são ativados por alta voltagem e encontrados principalmente nos neurônios e expressos em células de Purkinje no córtex cerebelar. Seu principal papel parece estar associado à transmissão sináptica (Mantuano *et al*, 2003). Modelos de ratos SCA6 *knockin* para a mutação CAG sugerem que, ao contrário de experiências anteriores com cultura de células, a expansão de poliglutamina não é tão prejudicial para a condutância de cálcio na célula. Esses dados apoiam a hipótese de que SCA6 é causada principalmente por um ganho de função, em vez de uma perda parcial de função (Saegusa *et al*, 2007; Watase *et al*, 2008). Parte do ganho de função pode ser devido ao acúmulo de canais de cálcio mutantes levando a um aumento na sinalização do cálcio (Gatchel e Zoghbi, 2005).

O gene *ITPR1* compreende 58 éxons e apresenta aproximadamente 354 kb, estando localizado na posição 3p26-p25 do genoma humano. Mutações em *ITPR1* podem ter mais de um mecanismo potencialmente patogênico. Primeiro, a doença pode ser resultado de uma haploinsuficiência do receptor; este conceito é consistente com a observação de que a deleção heterozigota leva a um distúrbio de início tardio em humanos, enquanto que a deleção homozigota em camundongos leva a um transtorno de início precoce. Em segundo lugar, pode haver um local alternativo para iniciar a transcrição do gene *ITPR1* resultando em um produto que confere um ganho de função patogênico para as proteínas. No entanto, a análise por *western blot* de células derivadas de indivíduos afetados utilizando um anticorpo contra a porção carboxi-terminal de ITPR1, não conseguiu identificar algum produto de proteína truncada (van de Leemput *et al*, 2007).

Os camundongos sem o receptor ITPR1 exibem um comportamento atáxico grave (Matsumoto *et al*, 1996) e os camundongos com uma mutação espontânea no gene *ITPR1*

apresentam convulsões e ataxia (Street *et al*, 1997), sugerindo um papel importante de ITPR1 na função neuronal. Pacientes heterozigotos para a deleção de *ITPR1* apresentam SCA15 (van de Leemput *et al*, 2007). A redução na expressão de várias proteínas da via de sinalização de Ca^{2+} , incluindo ITPR1, foi relatada em perfis de microarranjo em um modelo de rato transgênico para SCA1 (Lin *et al*, 2000).

A proteína mutante causadora da DH se liga especificamente à região carboxi-terminal de ITPR1 (fragmento IC10) e ativa o receptor (Tang *et al*, 2003). A introdução do peptídeo IC10, através da proteína de fusão GFP-IC10, em neurônios de ratos transgênicos para DH interrompeu a associação patogênica entre ITPR1 e a huntingtina expandida, normalizando os sinais neuronais de Ca^{2+} e prevenindo a morte celular (Tang *et al*, 2009). Assim, a alteração na sinalização do Ca^{2+} pode desempenhar um papel importante na patogênese da DH (Bezprozvanny e Hayden, 2004).

Associação específica entre a ataxina-3 mutante, e não entre a ataxina-3 normal e ITPR1 foi demonstrada por experimentos bioquímicos (Chen *et al*, 2008). Em experimentos eletrofisiológicos e com imagens, ITPR1 foi sensibilizado para a ativação por IP3 na presença da proteína mutante. Ao alimentar camundongos transgênicos para SCA3 com dantroleno, um estabilizador clinicamente relevante da sinalização intracelular de Ca^{2+} , o desempenho motor melhorou e diminuiu a perda de células neuronais. Assim, a desregulação da via de sinalização de Ca^{2+} pode desempenhar um papel importante na patologia SCA3 e estabilizadores de Ca^{2+} , tais como dantroleno, podem ser considerados como potenciais drogas terapêuticas para o tratamento de pacientes SCA3 (Chen *et al*, 2008). Também foi demonstrado que a ataxina-2 mutante se liga a ITPR1 e aumenta a sensibilidade do receptor à ativação por IP3 (Liu *et al*, 2009).

O receptor de inositol trifosfato e a consequente mobilização de cálcio também estão envolvidos na via de sinalização intracelular plaquetária. Em um recente trabalho analisando o efeito de 61 SNPs no gene *ITPR1* na atividade plaquetária, o SNP rs17786144 (T/C) mostrou uma associação significativa com fenótipos de resposta plaquetária. O alelo T foi associado a um aumento mais sustentado do cálcio intracelular. O efeito do genótipo *ITPR1* na função plaquetária não se deveu a diferenças mensuráveis nos níveis de proteína, sugerindo que o SNP intrônico rs17786144 modifica a resposta plaquetária por outro mecanismo ainda não conhecido (Jones *et al*, 2009).

1.4.6. *Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8* (NEDD8)

A proteína NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) é composta por 81 aminoácidos e se conjuga a proteínas alvo de forma semelhante à ubiquitina, sendo então considerada uma ULP (*Ub-like proteins*) tipo 1 (Lowe *et al*, 2001). As ULP tipo 2 são caracterizadas pela presença de uma estrutura semelhante à ubiquitina em uma grande proteína mas que tem uma função aparentemente distinta (Tanaka *et al*, 1998; Yeh *et al*, 2000). Entre as ULP, NEDD8 apresenta a mais alta homologia de sequência com ubiquitina (80%). Vários estudos indicam que NEDD8 pode desempenhar um papel na proteólise através do SPU (Kamitani *et al*, 2001; Tateishi *et al*, 2001). No entanto, a nedilação tem seu próprio conjunto de enzimas para garantir uma conjugação por uma via distinta. NEDD8, como ocorre com a grande maioria das ULP, é sintetizada como um precursor com uma cauda carboxi-terminal, com o comprimento variando em diferentes espécies (Kerscher *et al*, 2006). O processamento desta cauda por proteases expõe o domínio diglicina através do qual NEDD8 é covalentemente ligado ao substrato.

Apesar do alto grau de identidade com ubiquitina, a ativação de NEDD8 e a transferência para a enzima de conjugação E2 é altamente específica. Estudos estruturais do complexo E1-NEDD8 mostraram que Ala⁷² em NEDD8 (Arg⁷² em ubiquitina) desempenha um papel crucial nesta especificidade, garantindo que, em condições fisiológicas, NEDD8 e não ubiquitina ou outras UPL são ativadas pela enzima E1 (Walden *et al*, 2003).

A NEDD8 pode se conjugar com um número limitado de proteínas-alvo, incluindo os membros da família culina e p53 (Xirodimas *et al*, 2004). Culininas são componentes do complexo ubiquitina ligase SCF (Skp1/culina/F-box) que controla a ubiquitinação e degradação proteossômica de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (p27 e ciclina E), regulação transcricional e de transdução de sinal {I κ B α [inibidor da NF- κ B (fator nuclear κ B) α], β -catenina}, regulação de oxigênio [HIF-1 α (fator hipóxia induzível 1 α)] e na regulação do citoesqueleto (Bloom *et al*, 2003; Freed *et al*, 1999; Karin

e Ben-Neriah, 2000; Kondo e Kaelin, 2001; Kurz *et al*, 2002; Ohh *et al*, 2002). Nedilação de culinas modula a atividade ubiquitina-ligase do complexo, resultando em um aumento da ubiquitinação e degradação proteossômica dos substratos (Pan *et al*, 2004).

Deleções em componentes da via de nedilação em *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, drosófila e ratos resultaram em um fenótipo letal, demonstrando um papel essencial de NEDD8 na viabilidade celular (Osaka *et al*, 2000; Ou *et al*, 2002; Jones e Candido, 2000; Tateishi *et al*, 2001).

A presença de NEDD8 em inclusões gliais e neuronais reativas a ubiquitina foi demonstrado em diversas doenças neurodegenerativas, como DA, DP e SCA3, sugerindo um papel ativo da NEDD8 na formação de inclusões ubiquitinadas no cérebro (Mori *et al*, 2005).

A ataxina-3 é capaz de estabelecer uma interação direta com NEDD8 *in vitro* e *in vivo*, através do domínio Josephina em diferentes tecidos e em diferentes estágios do desenvolvimento (Ferro *et al*, 2007). A proteína atx-3 de *Caenorhabditis elegans*, homóloga da ataxina-3, também interage com NEDD8, indicando que esta interação protéica é conservada evolutivamente e com relevância funcional.

O gene *NEDD8* compreende 15 éxons e apresenta aproximadamente 15 kb, estando localizado na posição 14q12 do genoma humano. O SNP de transição rs2144487 (C/T) está localizado no íntron 1 do gene. Estudos já demonstraram que o primeiro íntron de muitos genes contém sequências regulatórias importantes para a expressão gênica (De Jaco *et al*, 2005; Lee *et al*, 2005) Assim este SNP poderia causar a variação na expressão ou função de NEDD8, diminuindo a nedilação e a degradação proteossômica de substratos.

1.4.7. *Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9)*

A proteína NEDD9 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9*) é um membro da família Cas de proteínas de adesão e está envolvida na formação de extensões de membrana como neuritos e crescimento neuronal (Sasaki *et al*, 2005; Hodges *et al*, 2006).

A sequência 3' não-traduzida foi primeiramente descrita em 1992 após a clonagem de cDNAs para identificar genes predominantemente expressos no cérebro embrionário. Genes identificados foram intitulados *NEDD* para *Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated*. Os genes eram preferencialmente expressos em cérebros embrionários, mas a expressão diminuía durante o desenvolvimento (Kumar *et al*, 1992).

As duas primeiras descrições do gene *NEDD9* completo e a análise funcional inicial da proteína NEDD9 foram em 1996. Como os recursos disponíveis em 1996 não detectaram homologia com a sequência de *NEDD9* inicialmente descrita, estes dois trabalhos atribuíram nomes diferentes para o mesmo gene. Os autores expressaram uma biblioteca de cDNA humano em *S. cerevisiae* e procuraram por genes que induziam filamentos de brotamento em leveduras, com o objetivo de identificar uma classe de proteínas que pudesse regular coordenadamente a polarização celular e o ciclo celular em células humanas (Law *et al*, 1996). Este estudo identificou uma potente atividade de polarização celular no domínio carboxi-terminal da proteína HEF1 (*Human Enhancer of Filamentatio 1*).

Também em 1996, foi identificada uma proteína denominada Cas-L (para *Crk-associated substrate-related protein, Lymphocyte type*), sendo o mesmo gene de HEF1/NEDD9. O objetivo deste estudo foi clonar o gene que codifica uma proteína mostrada previamente ser hiperfosforilada na tirosina após a ligação de β 1-integrinas nas células T e de desenvolver um papel no processo de co-estimulação da célula T (Minegishi *et al*, 1996). A partir de 2007, todos os três nomes para o mesmo gene (*NEDD9*, *HEF1* e *Cas-L*) são de uso comum.

NEDD9 desempenha um papel importante na regulação de pelo menos três classes distintas de processos biológicos. Estas incluem: 1) migração e invasão; 2) apoptose e 3) regulação do ciclo celular. Os níveis de NEDD9 estão acentuadamente elevados nas metástases. Notavelmente, a migração celular é crítica durante muitos processos celulares não patológicos (por exemplo, a embriogênese e a inflamação) e é anormalmente ativada em muitos tipos de câncer (Singh *et al*, 2007).

Durante a última década, NEDD9 emergiu como uma proteína sujeita a uma regulação complexa e dinâmica que, por sua vez, pode influenciar vários processos biológicos diferentes. O controle através da fosforilação é uma característica comum de

proteínas da família Cas e é responsável pela adesão celular. NEDD9 também é fosforilada na tirosina e tem a transcrição do gene aumentada em neurônios do córtex cerebral e hipocampo após uma isquemia transiente global em cérebros de ratos adultos (Sasaki *et al*, 2005). Os papéis de NEDD9 nestas vias adicionais permanecem apenas minimamente explorados até o momento.

A função de NEDD9 no sistema nervoso ainda não é bem conhecida. Recentemente foi demonstrado que NEDD9 está envolvida na diferenciação mediada Tgf β (*Transforming growth factor b*) em linhagem neuronal. NEDD9 poderia promover um estado no progenitor que tornaria as células competentes para a diferenciação em neurônios (Vogel *et al*, 2009).

O gene *NEDD9* compreende 8 éxons e apresenta aproximadamente 199 kb, estando localizado na posição 6p25-p24 do genoma humano. O gene *NEDD9* foi descrito como um potencial candidato para suscetibilidade tardia à DA e à DP (Li *et al*, 2008). O polimorfismo rs760678 (C/G) mostrou associação a estas duas doenças após a análise de 4692 SNPs em 3664 genes. O genótipo CC foi associado com um risco aumentado de desenvolver a DA e a DP em suas coortes. O polimorfismo rs760678 está localizado na região contendo domínios de ligação TATA e GATA. Proteínas ligantes de GATA desenvolvem um importante papel na regulação da expressão gênica neurônio-específica (Lawson *et al*, 1996). Assim, os autores sugeriram que este polimorfismo poderia modificar a ligação de fatores de transcrição ao gene *NEDD9*. Expressão diferencial de transcritos NEDD9 poderia indiretamente afetar o número de células neuronais/sinapses no cérebro tal que indivíduos com o genótipo de risco apresentam uma maior perda neuronal (Li *et al*, 2008). Também este efeito diferencial pode ser crítico na influência da regeneração neuronal sob condições de estresse. Por exemplo, a expressão de NEDD9 é aumentada em células-tronco humanas expostas a hipóxia (Martin-Rendon *et al*, 2006) e após isquemia transiente global em um modelo de rato (Sasaki *et al*, 2005).

1.4.8. Proteína que interage com a porção carboxi-terminal de Hsp70 (*CHIP*)

A proteína que interage com a porção carboxi-terminal de Hsp70 (*C-terminal heat shock protein 70-interacting protein* - CHIP) é uma co-chaperona e ubiquitina ligase.

Através de três domínios na sua porção amino-terminal, CHIP interage com proteínas de choque térmico Hsp70 ou Hsp90 e modula o enovelamento protéico. Através do domínio U-box de sua porção carboxi-terminal com atividade ubiquitina ligase E3, CHIP ubiquitina substratos e os direciona para degradação (Connell *et al*, 2001). Contudo, CHIP exibe atividade intrínseca de chaperona molecular e pode se associar a proteínas mal enoveladas de uma maneira independente de Hsp70 (Rosser *et al*, 2007).

Este duplo papel de CHIP em vias ubiquitina e chaperona dependentes sugere que ela poderia ser importante no sistema de controle de qualidade de proteínas neuronais. Diversos estudos mostraram a sua influência em doenças neurodegenerativas. Por exemplo, CHIP promove a atividade da parkina, uma proteína associada a parkinsonismo recessivo (Imai *et al*, 2002), regula a degradação de tau fosforilada, uma proteína implicada em várias doenças neurodegenerativas (Dickey *et al*, 2007) e também regula a degradação de formas oligoméricas de α -sinucleína, que formam agregados nos corpos de Lewy, na DP (Tetzlaff *et al*, 2008). A superexpressão de *CHIP* diminuiu a agregação de poliglutaminas e a toxicidade em modelos celulares de SCA1, SCA3 e DH (Jana *et al*, 2005; Miller *et al*, 2005) e *in vivo* em SCA1 (Al-Ramahi *et al*, 2006) e SCA3 (Williams *et al*, 2009).

A relação entre neurodegeneração em SCAs e o SPU, a principal maquinaria celular para degradar proteínas enoveladas de forma errada, é evidenciada por achados consistentes de agregados protéicos ubiquitinados em estudos neuropatológicos (Ross e Poirier, 2004). A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional fundamental na homeostase celular. Neste sistema, as enzimas E1 (ativação), E2 (conjugação) e E3 (ligação) agem sequencialmente para promover a fixação da ubiquitina, um peptídeo de 76 aminoácidos, à proteína alvo em um ou mais resíduos de lisina. As proteínas podem ser mono ou poliubiquitinadas. As proteínas poliubiquitinadas são transportadas ao proteossomo 26S, uma complexa protease nuclear e citosólica com um núcleo proteolítico multicatalítico 20S (Bonifacino e Weissman, 1998; Voges *et al*, 1999).

O SPU é um dos mecanismos chaves para degradar proteínas não necessárias à célula e falhas neste sistema resultam em toxicidade celular (Jesenberger e Jentsch, 2002). Proteínas com poliglutaminas expandidas são mal enoveladas e marcadas para a proteólise, mas são resistentes à degradação. Foi observado que a inibição da função proteossomal em

diferentes linhagens celulares transfectadas com um fragmento truncado de ataxina-3 aumentou a agregação da ataxina-3 mutante (Chai *et al*, 1999).

Existem evidências que a ataxina-3 é suscetível ao processo de ubiquitinação e sinalização para a degradação no proteossomo (Matilla *et al*, 2001). Enovelamento errado causado pela poliglutamina expandida poderia levar a dificuldades de reconhecimento pelo SPU e, assim, prejudicar a degradação dessas proteínas mutantes. Alguns estudos indicam que as expansões e os agregados podem também alterar a função SPU. Por exemplo, a ataxina-3 expandida poderia alterar a função normal e produzir falhas no sistema SPU. Como o SPU desenvolve um papel proeminente na detoxificação e sinalização de proteínas danificadas para degradação, falha neste sistema poderia levar a um acúmulo anormal de uma variedade de proteínas tóxicas, incluindo aquelas contendo as poliglutaminas e, assim, causando disfunção e/ou morte celular (Dueñas *et al*, 2006).

A ubiquitinação desempenha um papel importante nas doenças de poliglutaminas, reduzindo a toxicidade por aumentar a degradação protéica. Por exemplo, a superexpressão da ubiquitina ligase E4B aumenta a ubiquitinação da ataxina-3, reduzindo o acúmulo de espécies insolúveis e suprime a neurodegeneração em um modelo de drosófila para SCA3 (Matsumoto *et al*, 2004).

A presença de componentes do sistema de controle de qualidade de proteínas em inclusões de poliglutaminas indica que esta co-agregação poderia ser devido à falha na função deste sistema para lidar adequadamente com doenças relacionadas a proteínas não devidamente enoveladas ou proteínas agregadas. Alternativamente, pode refletir um mecanismo de proteção para processar as proteínas mal enoveladas. Vários trabalhos indicam que, em particular, chaperonas Hsp70 podem modular a patogênese de poliglutaminas. A maquinaria Hsp70 ajuda no enovelamento adequado de proteínas-alvo por controlar a ligação e a liberação do substrato protéico, estabilizado uma conformação instável (Hartl, 1996). O ciclo de ligação do substrato, impulsionado pela hidrólise de ATP, é regulado por pelo menos quatro cofatores: Hsp40, Hip, Bag-1 e CHIP (Rujano *et al*, 2007). Hsp70 pode impedir a agregação irreversível de proteínas durante estresses como choque térmico e ajuda no reenovelamento de proteínas desnaturadas pelo calor, uma ação que é regulada por estes cofatores. Com relação a doenças de poliglutaminas, a superexpressão de Hsp70 em modelos de rato e drosófila retardou a disfunção neuronal,

melhorou a sobrevivência da célula e suprimiu a neurodegeneração (Warrick *et al*, 1999, Chan *et al*, 2000; Cummings *et al*, 2001; Adachi *et al*, 2003).

O gene *CHIP* compreende 7 éxons e apresenta aproximadamente 2,6 kb, estando localizado na posição 16p13.3 do genoma humano. Polimorfismos na região promotora ou em regiões regulatórias do gene poderiam alterar a transcrição, diminuindo o nível de CHIP e aumentando o acúmulo de proteínas que teriam que ser degradadas. O SNP rs12599315 (C/T) está localizado na região promotora. O SNP rs6597 (G/T) está localizado no íntron 3. O SNP rs11558085 está localizado no éxon 1 e a substituição G/A causa a troca do aminoácido arginina por uma glutamina. O SNP rs11861355, localizado no éxon 3, é uma substituição sinônima T/C, permanecendo o aminoácido arginina. O SNP rs3204090, localizado no éxon 7, também é uma substituição sinônima A/G, permanecendo o aminoácido glutamato. Os SNPs citados acima foram escolhidos por estarem distribuídos por toda a extensão do gene.

1.5. Justificativas

A SCA3 é a SCA mais frequente no Brasil. A idade de início da doença e a gravidade dos sintomas estão frequentemente relacionadas ao número de repetições CAG. Porém, esta correlação não é possível para muitos indivíduos afetados considerados *outliers*, os quais exibem comportamento atípico em relação à idade de início dos sintomas e às manifestações clínicas. As causas dessas diferenças ainda não são conhecidas.

O silenciamento da transcrição pode ser causado por metilação em regiões promotoras. Repetições de trinucleotídeos, além de formarem estruturas secundárias de DNA como grampos, possuem alto conteúdo de GC, atraindo as metiltransferases. Em situações patológicas, as citosinas são metiladas diferentemente (numa extensão maior ou menor) imprimindo um desenho distinto e específico em cada situação. Assim, a comparação do padrão de metilação entre indivíduos *outliers* poderia explicar a diferença observada. A análise do padrão de metilação nas SCAs, em diferentes indivíduos e entre

diferentes famílias, parece de especial relevância no caso da SCA3, uma vez que além da sua elevada frequência no Brasil, apresenta uma enorme variabilidade fenotípica.

Embora os genes *BAX*, *CRYAB*, *GRIK2*, *IL1B*, *ITPR1*, *NEDD8*, *NEDD9* e *CHIP* tenham sido identificados como possíveis modificadores em cultura de células, ou em modelos animais para SCA3 ou em indivíduos com outras doenças neurodegenerativas, não existem estudos para o efeito destes genes em pacientes com SCA3. Por serem encontrados ao longo de todo o genoma, os SNPs geram alelos funcionais ou fisiologicamente relevantes, pois, em uma região codificante, podem ter impacto na proteína, em um íntron, podem influenciar no mecanismo de *splicing* e, no promotor, podem modificar a transcrição gênica (Krawczak *et al*, 1992). A maioria dos modificadores escolhidos está envolvida no envelhecimento, degradação protéica ou apoptose. O estudo da contribuição de SNPs nestes genes pode ter grande importância no entendimento da patogênese da doença, no aconselhamento genético de indivíduos pré-sintomáticos e no possível desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Identificar modificadores genéticos do fenótipo da SCA3.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar o padrão de metilação do promotor do gene *ATXN3* e comparar com a idade de início em pacientes com SCA3.
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos nos genes *BAX* (rs1805419), *CRYAB* (rs14133), *GRIK2* (rs2227281), *IL1B* (rs16944), *ITPR1* (rs17786144), *NEDD8* (rs2144487) e *NEDD9* (rs760678) em pacientes e indivíduos controles.
- Investigar a possível influência dos polimorfismos citados acima na variabilidade da idade de início, na gravidade da doença e nos volumes cerebrais de pacientes com SCA3.
- Correlacionar o número de repetições CAG do alelo normal do gene *ATXN3* e polimorfismos no gene *CHIP* (rs12599315, rs11558085, rs11861355, rs6597 e rs3204090) com a idade de início em pacientes com SCA3.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de três artigos científicos.

3.1. ARTIGO 1

Does DNA methylation in the promoter region of the *ATXN3* gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients?

Artigo aceito para publicação no periódico *Clinical Genetics*, doi: 10.1111/j.1399-
0004.2010.01508.x

Letter to the Editor

Does DNA methylation in the promoter region of the *ATXN3* gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients?

AO1

To the Editor:

Machado–Joseph disease (MJD/SCA3) is a neurodegenerative disease caused by an unstable CAG repeat expansion in *ATXN3* gene, leading to an expanded polyglutamine tract in ataxin-3, the corresponding protein (1).

The distribution of age at onset (AO) is inversely correlated with CAG expansion size; however, repeat length is responsible only for 45–60% of AO variation in MJD (2, 3), indicating other still unidentified factors (genetic, environmental or others).

The degree of neurodegeneration induced by the polyQ protein is correlated with protein storage levels (4). We therefore hypothesized that DNA methylation, specifically targeting the mutant allele and leading to transcriptional deregulation, might influence the levels of mutant ataxin-3 in affected cells and thus AO in MJD patients.

Our aim was to assess the methylation degree at six CpG dinucleotides at the *ATXN3* promoter and explore their role as potential modifiers for AO in MJD.

One hundred and twenty-three Brazilian patients from 62 families with MJD were ascertained in Rio Grande do Sul, Brazil. The inclusion criterion was molecular confirmation in a symptomatic patient. AO was defined as the age at which the patient, or a close person, noticed the first symptoms (usually gait unbalance); 35 healthy individuals were also neurologically examined to be used as controls. This study was approved by the Hospital Ethics Committee.

DNA was isolated from leukocytes, as described (5). Evaluation of the (CAG)_n tract was performed by fluorescently labeled polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) analysis was carried out according to manufacturer's instructions (MRC Holland, Amsterdam) (6). We designed four specific probes for the *ATXN3* promoter, which were

able to detect the methylation degree at six CpG dinucleotides, through restriction enzyme recognition. We have also designed three control probes, lacking a restriction enzyme recognition site, in genes located outside this region. Data analysis was performed by exporting peak areas to an Excel-based analysis program.

Methylation differences between patients and controls, for each probe, were evaluated using the Student's unpaired *t*-test. Generalized linear models (GLMs) by generalized estimating equations (GEEs) were used to test the effect of the methylation degree in AO variation. Controlled variables were the family and (CAG)_n length (normal and expanded). Statistical analyses were performed using SPSS for Windows v.16.

Length distribution of (CAG)_n with AO is shown in Table 1. A significant inverse correlation was found between AO and repeat length ($r^2 = 0.57$, $p < 0.001$).

Probe 1 (containing one CpG) was predominantly methylated (average 94.8%). Probe 2, also containing one CpG dinucleotide, had an average methylation degree of 40.1%. Probes 3 and 4, both containing two CpGs, were predominantly non-methylated (averages of 6.7% and 3.6%) (Fig. 1).

No statistically significant differences were found when comparing methylation status between the whole patients' cohort and controls ($p > 0.05$). A stepwise analysis of each probe was performed. Given the factor effect under study being the family, a trend toward a direct relation between methylation degree for probe 1 and AO was suggested ($p = 0.055$), when GLM analyzed methylation status against AO only (Fig. 1a). The regression coefficient relating probe 1 and AO was 24.0; i.e. each 10% decrease in probe 1 methylation status was related to a 2.4-year reduction in AO. The effect of the methylation status was small; however, when compared to the effect of the expanded repeat: when (CAG)_n

Letter to the Editor

Table 1. Distribution of age at onset and (CAG)_n length in Machado–Joseph disease (MJD) patients

| | CAG repeat length | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
|------------------------|-------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|
| | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | | 82 |
| Number of patients | 2 | 5 | 8 | 4 | 13 | 14 | 13 | 20 | 9 | 9 | 9 | 5 | 3 | 4 | 3 | 1 | 1 | 123 |
| Age at onset | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Average | 53 | 42 | 49 | 45 | 40 | 38 | 39 | 37 | 32 | 30 | 25 | 23 | 19 | 15 | 18 | 16 | 13 | |
| Minimum | 50 | 29 | 42 | 36 | 28 | 24 | 26 | 19 | 22 | 19 | 17 | 12 | 10 | 9 | 14 | 16 | 13 | |
| Maximum | 57 | 55 | 56 | 55 | 53 | 56 | 49 | 50 | 50 | 40 | 36 | 36 | 26 | 20 | 24 | 16 | 13 | |
| SD | 4.9 | 9.8 | 5.1 | 8.0 | 9.1 | 7.7 | 6.4 | 7.5 | 7.7 | 8.0 | 6.0 | 9.1 | 8.2 | 5.6 | 5.3 | NA | NA | |
| % of affected patients | 1.6 | 4.1 | 6.5 | 3.3 | 10.6 | 11.4 | 10.5 | 16.3 | 7.3 | 7.3 | 7.3 | 4.1 | 2.4 | 3.3 | 2.4 | 0.8 | 0.8 | 100.0 |

NA, not applicable.

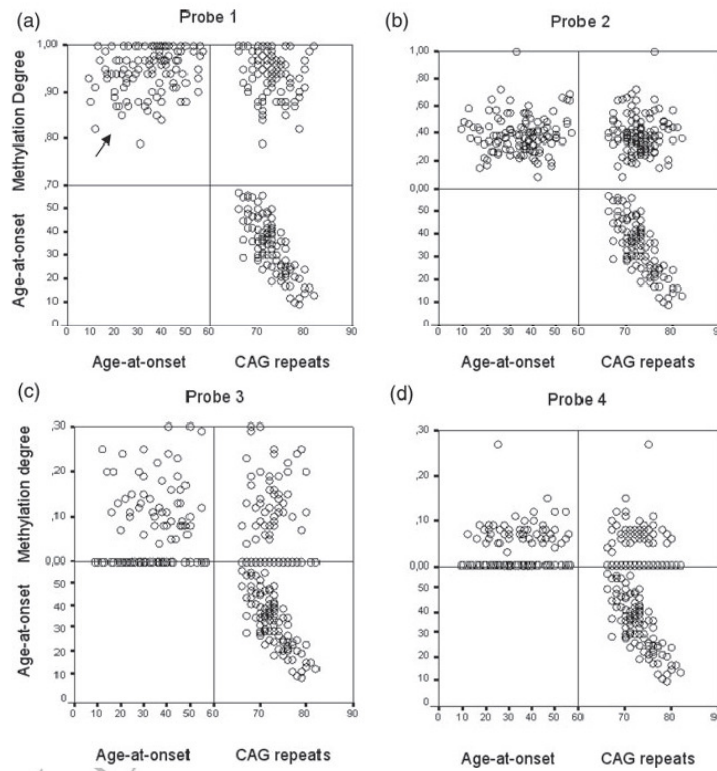


Fig. 1. Scatter plot of methylation degree, age at onset (AO) (years) and (CAG)_n length for (a) probe 1, (b) probe 2, (c) probe 3, and (d) probe 4. The direct relation between the higher probe 1 methylation degree and AO is indicated by an arrow. Note that methylation degree is in a different scale for each probe.

length was also included in the model, the effect of probe 1 methylation was lost, at the expense of the effect of both normal and expanded CAG repeats ($p = 0.062$ and $p < 0.0001$). One reason might be that this CpG was methylated in the vast

majority of patients, meaning that its effect might not be very prevalent, when the whole group was considered.

The *ATXN3* promoter is divided into two large CpG islands (7). Probe 1 contains one CpG

1 dinucleotide (-499) within the first island. The
 2 other five CpGs studied (-228, -205, -183, -103,
 3 and -93) are located in the second island. A previ-
 4 ous analysis of the promoter sequence from -1089
 5 to +1 showed several potential transcription regula-
 6 tion elements (7). The region between -768 and -
 7 495 contains an Alu repeat with 94% identity to the
 8 Alu-Sp subfamily consensus sequence (7). This
 9 region contains the CpG presently showing a trend
 10 toward association with AO. Alu sequences have
 11 been shown to have regulatory functions when
 12 located near promoters and are usually hyperme-
 13 thylated, thus the possible effect reported here may
 14 be common to other conditions (8, 9). Also, it has
 15 been shown previously that the region between
 16 -632 and -292, harboring a potential binding site
 17 for myelin transcription factor 1 (MYT1), had
 18 a positive effect on transcription (7). MYT1 has
 19 been found to be highly expressed in cells of
 20 the subventricular zone (10), a germinal area from
 21 which neurons, astrocytes, and oligodendrocytes
 22 arise, suggesting that this DNA-binding protein
 23 may regulate the differentiation of neuronal pro-
 24 genitors (7).

25 We conclude that an epigenetic control of the
 26 *ATXN3* promoter cannot be excluded as a possible
 27 contributor for AO variation in MJD. Additional
 28 studies, with a larger sample or specially designed
 29 to investigate differential methylation patterns in
 30 MJD patients' brains, are needed to confirm this
 31 putative epigenetic control. If *ATXN3* hyperme-
 32 thylation is shown to be associated to a better
 33 prognosis, this effect would help the proof of con-
 34 cept for RNA silencing or other therapies aiming at
 35 reducing the expression of the expanded ataxin-3
 36 in MJD.

37 Acknowledgements

38 We would like to thank all patients for providing biological material
 39 for this study, Helena Duarte for technical assistance, and Suzi
 40 Carney for statistics assistance. This study was supported by
 41 the Brazilian Funding Agency CNPq, the Instituto Nacional de
 42 Genética Médica Populacional (INAGEMP), and an International
 43 Cooperation Program CAPES-FCT (Brazil-Portugal). It was also
 44 supported by the Gulbenkian Foundation, Financiamento Plurianual
 45 de Unidades de Investigação (FCT) and FEDER, Portugal. I. A. is
 46 the recipient of a post-doctoral scholarship from FCT. V. E. E., L.
 47 B. J. and M. L. S. P. are supported by CNPq.

48 VE Emme^{1a,b,c}

49 I Alonso^d

50 LB Jardim^{a,c,e}

51 ML Saraiva-Pereira^{a,b,c,f}

52 J Sequeiros^d

^aLaboratório de Identificação Genética, Centro de
 Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto
 Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,
^bDepartamento de Genética, Universidade Federal do
 Rio Grande do Sul, Brazil,
^cServiço de Genética Médica, Hospital de Clínicas
 de Porto Alegre, Brazil,
^dUnIGENE, IBMC – Institute for Molecular and Cell
 Biology, Universidade do Porto, Portugal, and
^eDepartamento de Medicina Interna, and
^fDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal
 do Rio Grande do Sul, Brazil

References

1. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M et al. CAG expan-
 sions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chro-
 some 14q32.1. *Nat Genet* 1994; 8: 221–228.
2. Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z et al. Molecular
 features of the CAG repeats and clinical manifestation of
 Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (5):
 807–812.
3. van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans
 CC et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: preva-
 lence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002;
 58 (5): 702–708.
4. Bilen J, Bonini NM. Genome-wide screen for modifiers of
 ataxin-3 neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2007;
 3 (10): 1950–1964.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out
 procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res 1988; 16 (3): 1215.
6. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM et al. Methylation spec-
 ific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG
 methylation and copy number changes of up to 40 sequences.
Nucleic Acids Res 2005; 33 (14): e128.
7. Schmitt I, Evert BO, Khazneh H et al. The human *MJD*
 gene: genomic structure and functional characterization of the
 promoter region. *Gene* 2003; 18: 81–88.
8. Wu J, Grindlay GJ, Bushel P et al. Negative regulation of the
 human epsilon-globin gene by transcriptional interference: role
 of an Alu repetitive element. *Mol Cell Biol* 1990; 10 (3):
 1209–1216.
9. Schmid CW. Human Alu subfamilies and their methylation
 revealed by blot hybridization. *Nucleic Acids Res* 1991; 19
 (20): 5613–5617.
10. Armstrong RC, Kim JG, Hudson LD. Expression of myelin
 transcription factor I (MyT1), a “zinc-finger” DNA-binding
 protein, in developing oligodendrocytes. *Glia* 1995; 14 (4):
 303–321.

Correspondence:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD
 Laboratório de Identificação Genética
 Centro de Pesquisa Experimental
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Genética Médica
 Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90035-903
 Porto Alegre
 Rio Grande do Sul
 Brazil
 Tel.: +55 51 33598011
 Fax: +55 51 33598010
 e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

3.2. ARTIGO 2

Polymorphisms in *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* genes modify the phenotype of patients with SCA3.

Artigo submetido ao periódico *Brain*.

Polymorphisms in *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* genes modify the phenotype of patients with SCA3.

Vanessa Erichsen Emmel^{1,2,3}, Karina Carvalho Donis^{3,4}, Tailise Conte Gheno^{1,2,3}, Jonas Saute⁴, Leonardo Vedolin⁵, Laura Bannach Jardim^{1,3,6}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,3,7}.

¹Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

³Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

⁴Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

⁵Serviço de Neuroradiologia, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil.

⁶Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

⁷Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Genética Médica

Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90035-903

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Phone: + 55 51 33598011 Fax: + 55 51 33598010

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is a neurodegenerative disease caused by expansion of a polyglutamine tract in ataxin-3 that is coded for by *ATXN3* gene. CAG length is inversely correlated with disease age at onset but is responsible for about 45-60% its variation in SCA3. In order to identify genetic modifiers that can influence age at onset, severity of disease, and volumes of infratentorial structures at MRI, we investigated if single-nucleotide polymorphisms in candidate genes would modify these phenotypes in a large group of Brazilian patients with SCA3. We have found significant associations between a *GRIK2* polymorphism (rs2227281) and cerebellum volume (P=0.006), an *IL1B* polymorphism (rs16944) and age at onset (P=0.042), a *NEDD8* polymorphism (rs2144487) and pons volume (P=0.023), and a *NEDD9* polymorphism (rs760678) and disease severity (P=0.003). These results suggest that polymorphisms in *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* genes may contribute to the phenotypic expression of SCA3.

Keywords: SCA3, modifiers genes, age at onset, severity, volumes of infratentorial structures.

Total number of words in the text (excluding references, tables and figure legends): 3499

Introduction

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is the most common form of autosomal spinocerebellar ataxia (Durr, 2010). SCA3 is a neurodegenerative disease caused by an unstable CAG repeat expansion in *ATXN3* gene that leads to an expanded polyglutamine tract in ataxin-3, the corresponding protein (Kawaguchi *et al.*, 1994). The relative frequency of SCA3 among SCAs in South Brazil was previously established by our group to be 84% (Trott *et al.*, 2006), where the minimal prevalence was estimated to be 3:100,000 inhabitants (Prestes *et al.*, 2008).

SCA3 presents a wide phenotypic variation. Clinical differences are related to age at onset (AO) and to features of neuropathological involvement (Sequeiros and Coutinho, 1993; Paulson, 2007). This disease is associated to extensive morbidity, in addition to almost five-fold increase in mortality risk, when compared to non-carrier relatives (Kieling *et al.*, 2007). Disease onset usually occurs during adulthood with a mean AO (\pm SD) of 32 (\pm 12) years in Brazilian patients (Jardim *et al.*, 2001), or 37 (\pm 14) years in the Portuguese and those of Portuguese descent (Sequeiros and Coutinho, 1993). AO distribution ranges from 5 to 73 years in Portuguese patients (Sequeiros and Coutinho, 1993), and is inversely correlated with (CAG) $_n$ expansion length, a feature common to several nucleotide repeat disorders. However, the repeat length is responsible for only 45-60% of AO variation in SCA3 (Maruyama *et al.*, 1995; van de Warrenburg *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 1995). Patients with identical expansion size may still exhibit large variation in AO, indicating the influence of other factors (genetic, environmental or both) that remain to be identified.

We have recently investigated the role of methylation in gene promoter *ATXN3* on AO of SCA3 patients (Emmel *et al.*, 2010). The effect of methylation status was small, however an epigenetic control of the *ATXN3* promoter was not excluded as a possible contributor for AO variation in SCA3.

Analysis of candidate genes is another way of addressing genetic factors as disease modifiers. Based on data available in the literature, we have then chosen the following candidate genes to be included in this study: BCL2-associated X protein (*BAX*); crystallin, alpha B (*CRYAB*); glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (*GRIK2*); interleukin 1, beta (*IL1B*); inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 (*ITPRI*); neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8 (*NEDD8*); and neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (*NEDD9*). These genes code for proteins that, in a way, interact to wild-type or normal ataxin-3. In the present study, we address specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes in order to correlate their role as modifiers of AO, severity, and volumes of infratentorial structures in a large cohort of Brazilian SCA3 patients.

Materials and Methods

Patients

Two hundred seventy-three Brazilian SCA3 patients (119 families) were ascertained. Inclusion criteria was symptomatic patients with a confirmed diagnosis by molecular analysis. AO was defined as that age at which patient or a close relative noticed the beginning of first symptom (usually gait unbalance). Gender distribution was as follows: 48% males and 52% females. In a subgroup of 100 individuals, the degree of neurological manifestations was measured by the Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia (NESSCA) (Kieling *et al.*, 2008). In those individuals, disease severity was defined as the quotient of NESSCA score divided by disease duration (NESSCA/duration). Other quotients similar to this have been used before in SCA3 patients by other groups (Abe *et al.*, 1998; Netravathi *et al.*, 2009). Finally, magnetic resonance imaging's (MRI) were randomly obtained from 30 of these patients (see below).

Samples from one hundred healthy individuals were tested as control subjects in order to establish SNP allele distribution in our population. Gender distribution in the control group was even (50% each).

The study was approved by our local hospital Ethics Committee.

MRI studies

MRI was done using 1.5 T system. Sagittal T1 weighted images (TR=2000 ms and TE=3.45 ms) - slice thickness of 1mm, pixel size of 0.49mm - were performed. The normalized volumes of the brainstem, midbrain, pons, medulla oblongata, and cerebellum of SCA3 patients were measured on fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), using semi-automated segmentation techniques and voxel count volumetry using the software ImageJ.

DNA isolation and measurement of repeat length

DNA was isolated from leukocytes as described previously (Miller *et al.*, 1988). Fluorescence based assay (Quant-iT – Invitrogen) was used for DNA quantitation. Evaluation of the (CAG)_n tract was performed by PCR amplification with fluorescently labeled primers. After amplification, an aliquot of PCR products were mixed with formamide (HiDye formamide, Applied Biosystems) and GeneScan™ 500 LIZ (Applied Biosystems), and capillary electrophoresis was performed in an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Amplicon lengths were estimated using GeneMapper 3.2 software (Applied Biosystems).

SNP Genotyping

Specific SNP of *BAX* (rs1805419), *CRYAB* (rs14133), *GRIK2* (rs2227281), *IL1B* (rs16944), *ITPR1* (rs17786144), *NEDD8* (rs2144487), and *NEDD9* (rs760678) genes

were determined by qualitative real time PCR using the TaqMan[®] PCR Assay (Applied Biosystems), which is based on fluorescent minor groove binding probes. PCR reaction was performed in a final volume of 8 μ L containing 4 ng of DNA, 0.2 μ L of specific TaqMan assay and 4 μ L of 2X PCR Genotyping Master Mix (Applied Biosystems). Amplification included an initial step at 50°C for 2 minutes (activation of AmpErase UNG function), AmpliTaq[®] Gold activation at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing extension at 60°C for 1 minute. Allelic discrimination step was performed at 60°C for 1 minute. PCR products were analyzed by the Sequence Detection System Software version 1.2.1 (Applied Biosystems) in the ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) through allelic discrimination plot.

Statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies were established by counting method. Genotype distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium. Allelic and genotypic frequencies of each SNP from overall cohort of patients and controls were evaluated using Pearson chi-square test and chi-square test with Yates's correction. Generalized Linear Models (GLM) by Generalized Estimating Equations (GEE) was used to test if genotypes would partially explain AO variation and severity in the SCA3 cohort. This model was chosen in order to keep family effects under control. Kolmogorov-Smirnov test was applied to verify whether AO and severity observed normal distribution. Since normal distribution was not seen for disease severity, this variable was evaluated by gamma distribution. The working correlation matrix under use was the exchangeable, assuming that correlation between individuals within a

family as the same. In order to detect which genotype was important in each locus, comparisons between genotypes and either the adjusted mean ages at onset and adjusted mean severities were performed, using Bonferroni corrections. The effect of genotypes in the studied loci was also tested through multiple linear regression. All statistical tests were controlled for the effect of CAG repeat length on AO. The effect of genotypes in volumes of infratentorial structures was tested through *t* test. Finally, the ANOVA with Tukey correction was used to measure possible combinations between genotypes and AO. All statistical analyses were performed by SPSS for Windows v.16. P values < 0.05 were considered significant.

Results

CAG repeat length on mutant alleles ranged from 68 to 91 (mean \pm SD: 75.2 \pm 3.6). AO ranged from 7 to 57 years (mean \pm SD: 33.9 \pm 11.1). No difference in AO (mean \pm SD) was found between males (32.9 \pm 10.4) and females (34.8 \pm 11.6) ($P=0.340$). Repeat length (mean \pm SD) was also similar in males (75.2 \pm 3.7) and females (75.3 \pm 3.5) ($P=0.753$). A significant inverse correlation was found between AO and repeat length ($r=-0.76$, $r^2=0.58$, $P<0.001$).

The severity scores were determined in 100 patients from 60 families. Severity scores ranged from 0.48 to 8.00 (mean \pm SD: 2.27 \pm 1.47). No statistically significant difference in severity was found between males and females ($P=0.459$). A significant correlation was detected between severity and CAG repeat length ($r=0.48$, $r^2=0.23$, $P=0.001$).

All polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium at both SCA3 and control groups. Allelic and genotypic frequencies of polymorphisms in both groups are shown in Table 1. There was no statistical difference between SCA3 patients and controls regarding frequencies of alleles and genotypes.

Association results for SNPs are shown in Table 2. A tendency was observed when rs2227281 (*GRIK2*) polymorphism was correlated to severity ($P=0.095$). This polymorphism showed a significant effect on cerebellum volume of SCA3 patients

($P=0.006$, t test, Table 2). Volume mean was 10.92 for CC and 9.70 for CT+TT genotype (Fig 1A).

The *IL1B* polymorphism (rs16944) showed a significant effect on AO of SCA3 patients ($P=0.042$, GEE). Mean AO was 32.85 years for GG and 37.96 years AA genotype ($P=0.036$, GEE after Bonferroni correction; Fig 1B). Linear regression analysis confirmed this association (Table 3).

Significant association was observed between *NEDD8* polymorphism (rs2144487) and pons volume ($P=0.023$, t test, Table 2). Volume mean was 0.96 for GG and 0.84 for AA+AG genotype (Fig 1C).

Significant association was also observed between *NEDD9* polymorphism (rs760678) and severity ($P=0.003$, GEE). Severity mean was 1.59 for CC and 2.68 for GG genotype ($P=0.003$, GEE after Bonferroni correction; Fig 1D). This result was also confirmed by linear regression analysis (Table 3). A tendency was observed when this polymorphism was associated to brainstem volume ($P=0.068$, Table 2).

The effect of combined protective genotypes for AO was investigated by analysis of the *GRIK2* (CC), *IL1B* (AA), *NEDD8* (GG), and *NEDD9* (CC) distribution. As shown in Table 4, combined genotypes for *GRIK2* (CC) + *NEDD8* (GG) ($P=0.008$) and *IL1B* (AA) + *NEDD8* (GG) ($P=0.055$) are associated with increased AO when compared with any other genotype combination.

Discussion

We present here evidences in favor of modulating effect by specific polymorphisms in *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* genes on SCA3 phenotype. Moreover, we were able to show a synergistic effect between *GRIK2* and *NEDD8*, and of *IL1B* and *NEDD8* genes. When protective genotypes were present in pairs, age of onset was even more delayed.

Phenotypic variation on age at onset and neurological manifestations of SCA3 was early recognized (Sequeiros and Coutinho 1993; Schöls *et al.*, 1997). Besides the striking effect of the (CAG)_n expansion length on the age of onset, it is not sufficient to explain all the clinical variation in SCA3, as it happens with other polyglutamine diseases. Other genes as well as environmental and stochastic factors should be operating as disease modifiers. Analysis of candidate genes included few studies up to date. For instance, some modifying effects have been associated to other genes in an animal model (Bilen and Bonini, 2007). We have formerly described a small effect of the (CAG)_n length at ATXN2 normal alleles on neurological phenotype of SCA3 patients (Jardim *et al.*, 2003), as well as a lack of association between polymorphisms of CHIP gene and age at onset (França Jr *et al.*, submitted). Among others, possible candidates are genes encoding products that interact with wild type or mutant ataxin-3, genes involved in protein folding, protein degradation or apoptosis, and genes that control transcriptional regulation. Identification and characterization of such modifiers is of critical importance, since their capacity to alter pathogenesis would make them potential therapeutic targets for this currently untreatable disorder.

We have now analyzed specific SNPs within candidate genes and demonstrated significant effect of the rs16944 polymorphism in the *IL1B* gene on the AO in a representative sample of 273 SCA3 patients. Interleukin 1 beta is a proinflammatory cytokine that is related to several chronic inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, and type 1 diabetes. *IL1B* was demonstrated to be expressed in brain of patients with Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) (Blum-Degen *et al.*, 1995). This cytokine can exert both neurotoxic and neuroprotective effects in the brain. The polymorphism studied here is located within the promoter region at position -511 and was previously shown to be associated with several neurological diseases, including AD (Grimaldi *et al.*, 2000), PD (Nishimura *et al.*, 2000), temporal lobe epilepsy (Kanemoto *et al.*, 2000), and SCA6 (Nishimura *et al.*, 2000). As established previously, G allele carriers are regarded as low *IL1B* producers, whereas A allele carriers are considered to produce high amounts of *IL1B* (El-Omar *et al.*, 2000). In our study, homozygous individuals for G allele (low *IL1B* secretors) showed earlier disease onset when compared to homozygous individuals for A allele. Thus, results presented here suggest a protective role of *IL1B* on SCA3 phenotype.

However, *IL1B* effects are not always straightforward. The frequency of high secretor allele of *IL1B* gene polymorphism is increased in AD patients, pointing to a deleterious role of this protein (Grimaldi *et al.*, 2000; Nicoll *et al.*, 2000). Results suggest that *IL1B* may enhance inflammatory responses in brain of AD patients (Buxbaum *et al.*, 1992; Sheng *et al.*, 1998). These results are opposite to those seen in PD, in SCA6 (Nishimura *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2001) and now in SCA3, where a low *IL1B* secretor status

is associated with a significantly earlier disease onset. Therefore, IL1B exerts multiple effects in a more complex scenario. One may speculate if IL1B would act, in PD, SCA6 and SCA3, as a pluripotential growth-promoting factor, similar to what have been described in animal models of PD, where IL1B induces dopaminergic axonal prouting in the denervated striatum of (Wang *et al.*, 1994). The protective role of IL1B at least in SCA3 patients should also be put in perspective with former studies that have shown that some pro-inflammatory genes are actually upregulated, both in cells expressing expanded ataxin3 and in human pons tissue (Evert *et al.*, 2001; Evert *et al.*, 2003).

We have also demonstrated a significant effect of rs760678 polymorphism in the *NEDD9* gene on disease severity in 100 SCA3 patients. As a member of the Cas family of adhesion proteins, NEDD9 is involved in the formation of neurite-like membrane extensions and neurite outgrowth (Sasaki *et al.*, 2005; Bargon *et al.*, 2005). SNP rs760678 is located on a region containing clusters of TATA- and GATA-binding motifs within *NEDD9* gene. GATA-binding proteins play an important role in regulating neuron-specific gene expression, and rs760678 is within the region that surrounds the core consensus sequence to which transcription factor binding extends (Lawson *et al.*, 1996). We have shown that homozygous for allele C shows a protective function, reducing SCA3 severity.

NEDD9 gene polymorphism rs760678 was previously shown to be associated with susceptibility to late-onset cases in AD and in PD (Li *et al.*, 2008). In those patients, the risk allele was the C. Differential expression of NEDD9 transcripts may indirectly affect the number of neuronal cells/synapses in the brain such that risk genotype carriers have a significantly smaller reservoir of cells/synapses to withstand the gradual loss of

neurons caused by other factors. Alternatively, the presumed differential effect may be critical in influencing neuronal regeneration under stressful conditions. For example, expression of *NEDD9* is up-regulated in human stem cells exposed to hypoxia (Martin-Rendon *et al.*, 2006) and after transient global ischemia in a rat model (Sasaki *et al.*, 2005). We speculate that, whatever the mechanisms involved with *NEDD9* transcripts, they should be complex and should vary according to brain topography, explaining the contradictory results found in AD, PD, and SCA3.

Homozygosis for allele C in *GRIK2* gene, coding for the ionotropic glutamate receptor subunit 6 (GluR6), was associated with larger cerebellum volumes, whereas homozygosis for allele G in *NEDD8* gene was related to larger pons volumes, in our SCA3 patients. Brainstem volumes were reduced in the present patients, but detailed results will be presented elsewhere.

GRIK2 is abundantly expressed in the caudate nucleus, cortex, hippocampus and cerebellum in human. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system of mammals and plays an important role in neural development and plasticity, as well as in processes of neurodegeneration and excitotoxicity (Nakanishi, 1992). Glutamate mediates many vital processes such as the development of nerve cells, including proliferation and migration (McDonald *et al.*, 1990), the modulation mechanisms of learning and memory (Izquierdo and Medina, 1997), and aging (Segovia *et al.*, 2001). Downregulated expression of *GRIK2* gene was observed in ataxin-3-Q79 mice, suggesting that an impairment of glutamatergic transmission is involved in ataxin-3-Q79-induced cerebellar malfunction (Chou *et al.*, 2008). Since the function of *GRIK2* is regulated by RNA editing (Paschen *et al.*, 1994), it is possible that the intronic SNP

rs2227281 might influence this processing. The Ca^{++} permeability is influenced considerably by RNA editing (Burnashev *et al.*, 1992). Variation in function or expression of glutamate receptor subunits could modulate neural development and affect the cerebellar atrophy. Shuang *et al.* (2004) studied parental transmission of alleles of this marker in trios with autistic probands, considered a hypoglutamatergic disorder, and showed preferential transmission of T allele. Results presented here suggest a protective role of CC genotype on SCA3 phenotype, possibly upregulating expression of *GRIK2* gene and improving the glutamatergic transmission involved in ataxin-3-induced cerebellar malfunction. However, the excessive activation of glutamate receptors brain during episodes of stress such as ischemia, head trauma and epileptic seizures, leads to death of neurons. Such 'excitotoxicity' due to glutamate has long been postulated to be involved in Huntington's disease pathogenesis (Coyle *et al.*, 1983; Brustovetsky *et al.*, 2004). Others polymorphisms in *GRIK2* gene have been associated with AO in Huntington's disease (Andresen *et al.*, 2007).

NEDD8 protein is conjugated to target proteins similar to ubiquitin (Lowe *et al.*, 2001). NEDD8 is present in glial and neuronal inclusions ubiquitin reactive in several neurodegenerative diseases, including SCA3, suggesting an active role in the formation of inclusions in the brain (Mori *et al.*, 2005). Ataxin-3 is able to establish a direct interaction with NEDD8 *in vitro* and *in vivo* (Ferro *et al.*, 2007). The rs2144487 polymorphism is located in intron 1 of the *NEDD8* gene. Since the first intron of many genes contains regulatory sequences important for gene expression (De Jaco *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005), this polymorphism could be involved in the SCA3 pathogenesis by mechanisms that could involve differential expression of the NEDD8 protein. We have shown that pons volume was significantly higher in SCA3 patients homozygous

for allele G, suggesting a protective role of GG genotype. Since NEDD8 is essential for cell viability (Tateishi *et al.*, 2001) variation in function or expression of NEDD8 could affect the pons atrophy.

We have shown a synergistic effect between the protective genotypes of *GRIK2* (CC) and *NEDD8* (GG), and of *IL1B* (AA) and *NEDD9* (CC) on the age of onset of SCA3 patients (Table 4). These results increased the strength of our evidences, and may be put in perspective with what is known about pathophysiology of polyQ diseases. Several lines of evidence showed that mutant polyQ proteins interact aberrantly with various cellular proteins, including both normal partners and novel interactors (Rubinsztein, 2006; Lim *et al.*, 2006). The diversity of the proposed pathways suggests a multidimensional network in the pathogenesis of SCA3 and other polyQ diseases. Protein folding and degradation, apoptosis, transcriptional deregulation, mitochondrial dysfunction and inhibition of axonal transport may be all operating (Soong and Paulson, 2007; Katsuno *et al.*, 2008; Lessing and Bonini 2008). If the examined polymorphisms we presented here are actually interacting with ataxin-3, they should be seen as parts of a complex scenario where one could also interact with the other.

We have examined polymorphisms in genes that could interact with ataxin-3. These polymorphisms were chosen due to previous studies that demonstrated modifying effects, either in other neurodegenerative diseases, or in animal model for SCA3. In spite of their plausibility, no association was found between the phenotypic characteristics under study, and the remaining SNPs-associated genes. BAX protein is a pro-apoptotic member of Bcl-2 family. Polyglutamine-expanded ataxin-3-Q79 may activate mitochondrial apoptotic pathway and induce neuronal death by upregulating

BAX expression (Chou *et al.*, 2006). CRYAB is a small heat shock protein accumulated in inclusion bodies in Alexander's, Alzheimer's and Parkinson's disease, and may be regarded as a potent suppressor of neurodegeneration (Muchowski *et al.*, 2005; Arrigo *et al.*, 2007). ITPR1 plays an important role in neuronal Ca⁺² signaling (Berridge, 1998). It was recently demonstrated by biochemical experiments that mutant ataxin-3, but not the normal ataxin-3, associates specifically with ITPR1 (Chen *et al.*, 2008).

The exact mechanism by which the mutation in the *ATXN3* gene causes SCA3 remains to be established and will certainly be complex and multidimensional. In either case, we have shown that GRIK2, IL1B, NEDD8, and NEDD9 play some role in the disease process, probably through a protective role for neuronal cells, and possibly through a survival promoting effect. Data presented here generated relevant evidences to the fact that changes in additional cell pathways may contribute to the inherited variability of the SCA3 phenotype in addition to CAG repeat length.

Acknowledgements

We would like to thank patients for providing biological material for this study. We would also thank Suzi Camey for her assistance with statistical analysis. This study was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA). V.E.E., L.B.J. and M.L.S.P. are supported by CNPq.

References

- Abe Y, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Hirayama M, Kachi T, et al. CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease. *Neurology* 1998; 51: 882-84.
- Andresen JM, Gayán J, Cherny SS, Brocklebank D, Alkorta-Aranburu G, Addis EA, et al. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *J Med Genet* 2007; 44: 44-50.
- Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, et al. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 2007; 581: 3665-74.
- Bargon SD, Gunning PW, O'Neill GM. The Cas family docking protein, HEF1, promotes the formation of neurite-like membrane extensions. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746: 143-54.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998; 21: 13-26.
- Bilen J, Bonini NM. Genome-Wide Screen for Modifiers of Ataxin-3 Neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2007; 3: 1950-64.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995; 202: 17-20.
- Brustovetsky T, Purl K, Young A, Shimizu K, Dubinsky JM. Dearth of glutamate transporters contributes to striatal excitotoxicity. *Exp Neurol* 2004; 189: 222-30.

Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 1992; 8: 189-98.

Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, et al. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 10075-78.

Chen X, Tang TS, Tu H, Nelson O, Pook M, Hammer R, et al. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 2008; 28: 12713-24.

Chou AH, Yeh TH, Kuo YL, Kao YC, Jou MJ, Hsu CY, et al. Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 333-45.

Chou AH, Yeh TH, Ouyang P, Chen YL, Chen SY, Wang HL. Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol Dis* 2008; 31: 89-101.

Coyle JT, Ferkany JW, Zaczek R. Kainic acid: insights from a neurotoxin into the pathophysiology of Huntington's disease. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1983; 5: 617-24.

De Jaco A, Camp S, Taylor P. Influence of the 50 intron in the control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Chem Biol Interact* 2005; 158: 372-73.

Durr, A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 2010; 9: 885-94.

El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.

Emmel VE, Alonso I, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML, Sequeiros J. Does DNA methylation in the promoter region of the *ATXN3* gene modify age at onset in SCA3 (SCA3) patients? *Clin Genet* 2010; doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01508.x

Evert BO, Vogt IR, Kindermann C, Ozimek L, de Vos RA, Brunt ER, et al. Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci* 2001; 21: 5389-96.

Evert BO, Vogt IR, Vieira-Saecker AM, Ozimek L, de Vos RA, Brunt ER, et al. Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 1006-18.

Ferro A, Carvalho AL, Teixeira-Castro A, Almeida C, Tomé RJ, Cortes L, et al. NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1619-27.

França MC, Emmel VE, D'Abreu A, Maurer-Morelli CV, Secolin R, Bonadia LC, et al. Normal *ATXN3* allele but not *CHIP* polymorphisms modulates age at onset in Machado Joseph Disease. Submitted.

Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, et al. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1 alpha gene polymorphism. *Ann Neurol* 2000; 47: 361-65.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 68: 285-316.

Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Neurologic findings in Machado–Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)_n. *Arch Neurol* 2001; 58: 899–904.

- Jardim L, Silveira I, Pereira ML, do Céu Moreira M, Mendonça P, Sequeiros J, et al. Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurol Scand* 2003; 107: 211-14.
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)-1b, IL-1a, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000; 47: 571-74.
- Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, et al. Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases. *Curr Mol Med* 2008; 8: 221-34.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994; 8: 221–8.
- Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Survival estimates for patients with Machado–Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 2007; 72: 543–5.
- Kieling C, Rieder CR, Silva AC, Saute JA, Cecchin CR, Monte TL, et al. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol* 2008; 15: 371-6.
- Lawson MA, Whyte DB, Mellon PL. GATA factors are essential for activity of the neuron-specific enhancer of the gonadotropin-releasing hormone gene. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3596–605.
- Lee JG, Dahi S, Mahimkar R, Tulloch NL, Alfonso-Jaume MA, Lovett DH, et al. Intronic regulation of matrix metalloproteinase-2 revealed by in vivo transcriptional analysis in ischemia. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 16345–50.
- Lessing D, Bonini NM. Polyglutamine genes interact to modulate the severity and progression of neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Biol* 2008; 6: e29.

Li Y, Rowland C, Holmans P, Segurado R, Abraham R, et al. Evidence that common variation in NEDD9 is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 759-67.

Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabó G, Rual JF, et al. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006; 125: 801-14.

Lowe J, Mayer J, Landon M, Layfield R. Ubiquitin and the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol* 2001; 487: 169–86.

Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 54-61.

Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, Baban D, Forde SP, Roubelakis M, et al. Transcriptional profiling of human cord blood CD133⁺ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells* 2006; 25: 1003–12.

Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, et al. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 807–12.

McDonald JW, Johnston MV, Young AB. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp Neurol* 1990; 110: 237-47.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.

Mori F, Nishie M, Piao YS, Kito K, Kamitani T, Takahashi H, et al. Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; 31: 53–61.

Muchowski PJ and Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 11–22.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258: 597-603.

Netravathi M, Pal PK, Purushottam M, Thennarasu K, Mukherjee M, Jain S. Spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3: age adjusted clinical severity of disease at presentation correlates with size of CAG repeat lengths. *J Neurol Sci* 2009; 277: 83-6.

Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, et al. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 365-8.

Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kuno S. Influence of interleukin-1b gene polymorphisms on age at onset of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2000; 284: 73-6.

Nishimura M, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Kuno S, Kaji R, et al. Influence of interleukin-1beta gene polymorphism on age at onset of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6) in Japanese patients. *Neurosci Lett* 2001; 307: 128-30.

Paschen W, Hedreen JC, Ross CA. RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in human brain tissue. *J Neurochem* 1994; 63: 1596-1602.

Paulson HL. Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 2007; 27: 133-42.

Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Silveira I, Sequeiros J, Jardim LB. Machado-Joseph disease enhances genetic fitness: a comparison between affected and unaffected women and between SCA3 and the general population. *Ann Hum Genet* 2008; 72: 57-64.

Rubinsztein DC. Protein-protein interaction networks in the spinocerebellar ataxias. *Genome Biol* 2006; 7: 229.

Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, et al. Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke* 2005; 36: 2457-62.

Schöls L, Amoiridis G, Büttner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 1997; 42: 924-32.

Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1-29.

Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol* 1993; 61: 139-53.

Sheng JG, Griffen WS, Royston MC, Mrak RE. Distribution of interleukin-1-immunoreactive microglia in central cortical layers: implications for neuritic plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 278-83.

Shuang M, Liu J, Jia MX, Yang JZ, Wu SP, Gong XH, et al. Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 131: 48-50.

Soong BW, Paulson HL. Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 438-46.

Tateishi K, Omata M, Tanaka K, Chiba T. The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol* 2001; 155: 571–79.

Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, Saute JA, Artigalás O, Kieling C, et al. Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet* 2006; 70: 173-6.

van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002; 58: 702–8.

Wang J, Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Olfeld EH. Intraatrial implantation of interleukin-1. Reduction of parkinsonism in rats by enhancing neuronal sprouting from residual dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain. *J Neurosurg* 1994; 80: 484-90.

Figure 1. Correlation of genotypes and clinical features of SCA3 patients. Mean is represented as a black bar and range is indicated by the margins. A) *GRIK2* (rs2227281) genotypes and cerebellum volume for SCA3 patients (n=30). B) *IL1B* (rs16944) genotypes and AO for SCA3 patients (n=273). C) *NEDD8* (rs2144487) genotypes and cerebellum volume for SCA3 patients (n=30). D) *NEDD9* (rs760678) genotypes and severity for SCA3 patients (n=100).

Table 1. Allelic and genotypic distribution.

| Allele/genotype | SCA3 patients | Normal individuals | | |
|-------------------------|---------------|--------------------|----------|---------|
| | n=273 | n=100 | χ^2 | P value |
| <i>BAX</i> rs1805419 | | | | |
| A | 175 (0.32) | 66 (0.33) | | |
| G | 371 (0.68) | 134 (0.67) | 0.000 | 1.000 |
| AA | 24 (0.09) | 9 (0.09) | | |
| AG | 127 (0.46) | 48 (0.48) | | |
| GG | 122 (0.45) | 43 (0.43) | 0.085 | 0.958 |
| <i>CRYAB</i> rs14133 | | | | |
| C | 128 (0.23) | 60 (0.30) | | |
| G | 418 (0.77) | 140 (0.70) | 3.000 | 0.083 |
| CC | 18 (0.06) | 7 (0.07) | | |
| CG | 92 (0.34) | 46 (0.46) | | |
| GG | 163 (0.60) | 47 (0.47) | 5.110 | 0.078 |
| <i>GRIK2</i> rs2227281 | | | | |
| C | 334 (0.62) | 135 (0.67) | | |
| T | 212 (0.38) | 65 (0.33) | 2.247 | 0.134 |
| CC | 101 (0.37) | 46 (0.46) | | |
| CT | 132 (0.48) | 43 (0.43) | | |
| TT | 39 (0.15) | 11 (0.11) | 2.536 | 0.283 |
| <i>IL1B</i> rs16944 | | | | |
| G | 344 (0.63) | 115 (0.57) | | |
| A | 202 (0.37) | 85 (0.43) | 1.648 | 0.199 |
| GG | 104 (0.38) | 33 (0.33) | | |
| GA | 136 (0.50) | 49 (0.49) | | |
| AA | 33 (0.12) | 18 (0.18) | 2.398 | 0.301 |
| <i>ITPR1</i> rs17786144 | | | | |

Genetic modifiers of SCA3 phenotype.

| | | | | |
|------------------------|------------|------------|-------|-------|
| C | 69 (0.13) | 20 (0.1) | | |
| T | 477 (0.87) | 180 (0.9) | 0.197 | 0.658 |
| CC | 8 (0.03) | 2 (0.02) | | |
| CT | 53 (0.19) | 16 (0.16) | | |
| TT | 212 (0.78) | 82 (0.82) | 0.873 | 0.646 |
| <i>NEDD8</i> rs2144487 | | | | |
| C | 190 (0.35) | 70 (0.35) | | |
| T | 356 (0.65) | 130 (0.65) | 0.000 | 1.000 |
| CC | 38 (0.14) | 18 (0.18) | | |
| CT | 114 (0.42) | 34 (0.34) | | |
| TT | 121 (0.44) | 48 (0.48) | 2.140 | 0.343 |
| <i>NEDD9</i> rs760678 | | | | |
| C | 178 (0.33) | 66 (0.33) | | |
| G | 368 (0.67) | 134 (0.67) | 0.000 | 0.988 |
| CC | 32 (0.12) | 13 (0.13) | | |
| CG | 114 (0.42) | 40 (0.40) | | |
| GG | 127 (0.46) | 47 (0.47) | 0.158 | 0.924 |

Frequencies are shown within parentheses. Pearson chi-square test was used to compare SCA3 patients with controls for distributions of alleles and genotypes. Chi-square with Yates's correction was used for 2 x 2 table.

Table 2. Effect of SNPs on AO, severity, and volumes of infratentorial structures of SCA3 patients.

| SNP | Gene | Protein function | AO | Severity | MRI volumetries | | | | P value |
|------------|--------------|---------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|----------|---------------|------------------------------|---------------|
| | | | | | brainstem | midbrain | pons | medulla cerebellum oblongata | |
| rs1805419 | <i>BAX</i> | Pro-apoptotic protein | 0.308 | 0.820 | 0.171 | 0.754 | 0.197 | 0.368 | 0.444 |
| rs14133 | <i>CRYAB</i> | Chaperone | 0.358 | 0.587 | 0.858 | 0.799 | 0.704 | 0.657 | 0.299 |
| rs2227281 | <i>GRIK2</i> | Glutamatergic transmission | 0.330 | 0.095 | 0.102 | 0.576 | 0.789 | 0.974 | 0.006* |
| rs16944 | <i>IL1B</i> | Proinflammatory cytokine | 0.042* | 0.639 | 0.998 | 0.212 | 0.343 | 0.125 | 0.938 |
| rs17786144 | <i>ITPR1</i> | Intracellular calcium release channel | 0.717 | 0.108 | 0.250 | 0.641 | 0.749 | 0.682 | 0.087 |
| rs2144487 | <i>NEDD8</i> | Ubiquitin-like protein | 0.792 | 0.431 | 0.535 | 0.848 | 0.023* | 0.539 | 0.209 |
| rs760678 | <i>NEDD9</i> | Scaffolding protein | 0.261 | 0.003* | 0.068 | 0.345 | 0.410 | 0.793 | 0.391 |

**P*<0.05

Table 3. Linear regression analysis of *IL1B* and *NEDD9* on AO and severity of SCA3 patients

| Phenotype | | | | |
|-------------------------------------|-------|--------------|--------------------|-------------------|
| AO | | | | |
| | | | % Additional | |
| Model | R^2 | ΔR^2 | explained variance | P value |
| SCA3 CAG | 0.578 | | | <0.001* |
| SCA3 CAG + <i>IL1B</i> rs16944 AA | 0.588 | 0.01 | 2.4 | 0.025* |
| Severity | | | | |
| | | | % Additional | |
| Model | R^2 | ΔR^2 | explained variance | P value |
| SCA3 CAG | 0.233 | | | <0.001* |
| SCA3 CAG + <i>NEDD9</i> rs760678 GG | 0.293 | 0.06 | 7.8 | 0.026* |

* P values refer to R^2 . R^2 illustrates the relative improvement of the regression model when genotypes are considered in addition to the CAG repeats, ΔR^2 values quantify these differences.

Table 4. Effect of combined *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8*, and *NEDD9* protective genotypes on AO of SCA3 patients

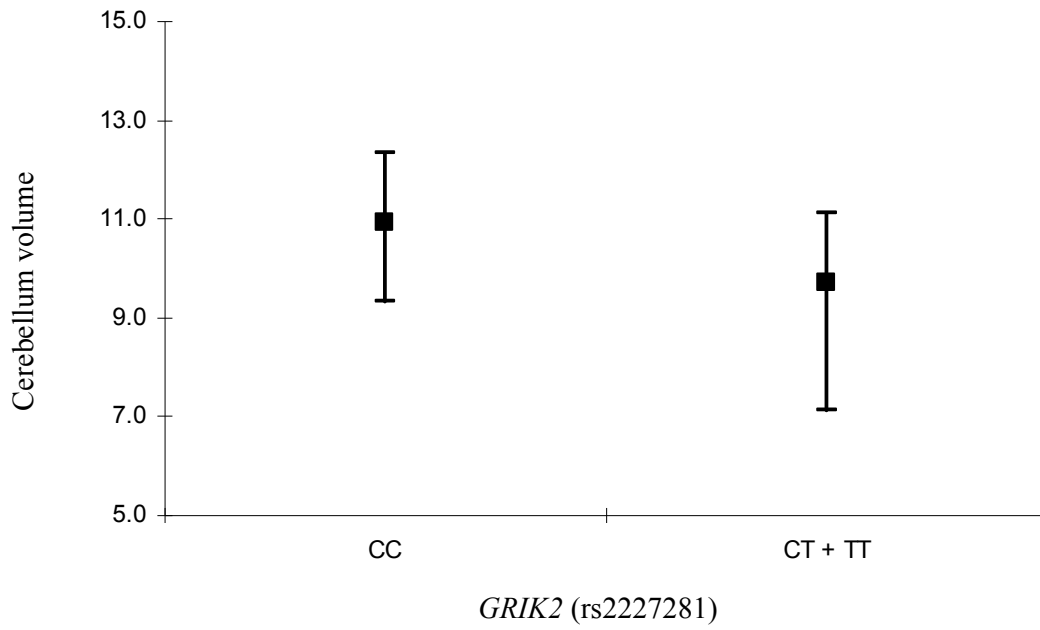
| <i>GRIK2</i> (CC) | <i>IL1B</i> (AA) | <i>NEDD8</i> (GG) | <i>NEDD9</i> (CC) | n | Mean | 95% Confidence | | P value |
|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----|-------|----------------|-------|---------------|
| | | | | | | Interval | | |
| | | | | | | Lower | Upper | |
| - | - | + | + | 9 | 36.11 | 24.89 | 47.33 | 1.000 |
| + | + | - | - | 9 | 38.44 | 31.36 | 45.53 | 0.715 |
| + | - | + | - | 34 | 38.62 | 35.46 | 41.77 | 0.008* |
| + | - | - | + | 8 | 39.13 | 28.99 | 49.26 | 0.918 |
| - | + | + | - | 13 | 40.38 | 35.46 | 45.31 | 0.055* |
| Any other combination | | | | 200 | 32.20 | 30.66 | 33.74 | |

* The difference is statistically significant compared with any other combination. There was no *IL1B* (AA) +

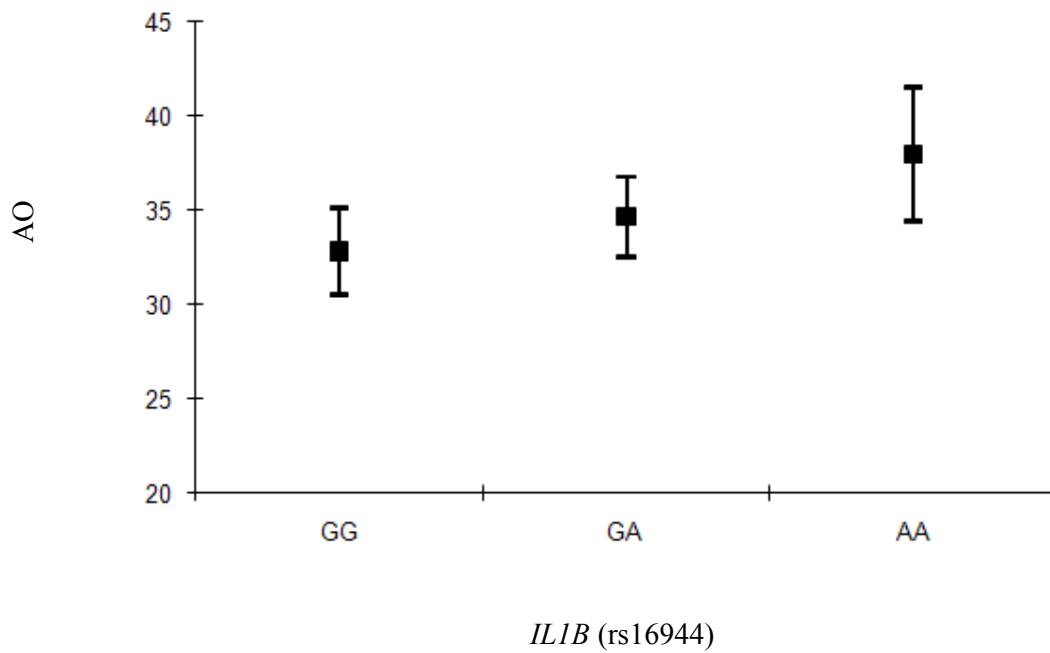
NEDD9 (CC) in the sample.

Figure 1.

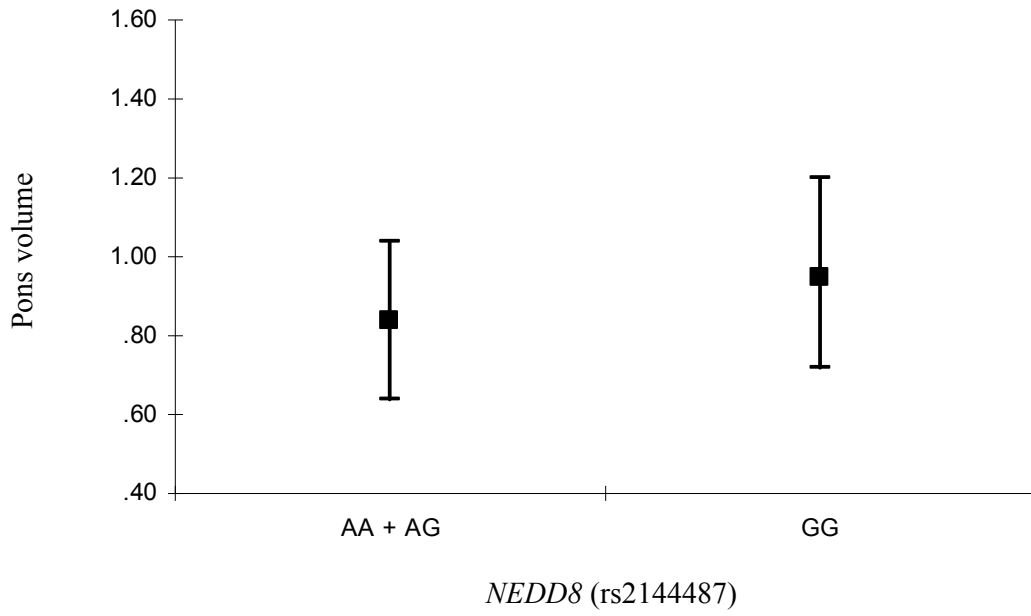
A)



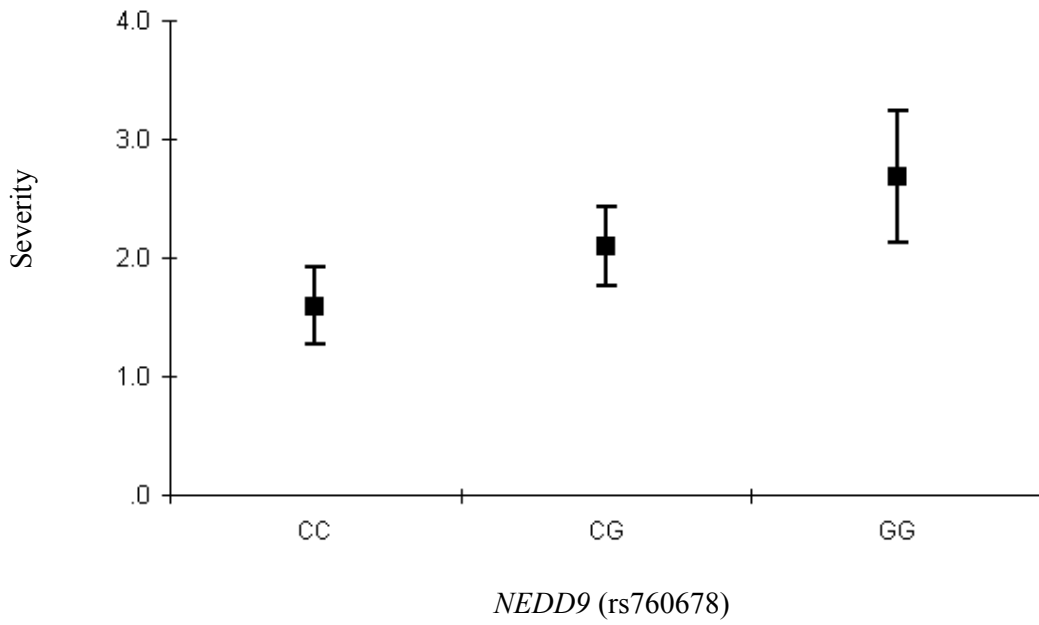
B)



C)



D)



3.3. ARTIGO 3

CAG repeat length in the normal *MJD1* allele but not *CHIP* polymorphisms modulate age at onset in patients with Machado-Joseph disease.

Artigo submetido ao periódico *Neurobiology of Disease*.

**Normal *ATXN3* allele but not *CHIP* polymorphisms modulates age at onset in
Machado Joseph Disease**

Marcondes C. França Jr ¹, MD, PhD, Vanessa E. Emmel ², Msc, Anelyssa D`Abreu ¹, MD,
PhD, Cláudia V. Maurer-Morelli ³, Rodrigo Secolin, BSc ³, PhD, Luciana Cardoso
Bonadia ³, Msc, Marilza Santos da Silva ³, Msc, Anamarli Nucci ¹, MD, PhD, Laura B.
Jardim ², MD, PhD, Maria Luiza Saraiva-Pereira ², PhD, Wilson Marques Jr ⁴, MD, PhD,
Henry Paulson ⁵, MD, PhD, Iscia Lopes-Cendes ³, MD, PhD

Departments of Neurology ¹ and Medical Genetics ³, University of Campinas
(UNICAMP), Campinas, Brazil

Laboratory of Genetics Identification, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e
Department of Internal Medicine and Biochemistry ², Federal University of Rio Grande do
Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Department of Neurology ⁴, University of Sao Paulo at Ribeirao Preto, Ribeirao Preto,
Brazil

Department of Neurology ⁵, University of Michigan, Ann Arbor, USA.

Regular article

Address correspondence to:

Ischia Lopes-Cendes, MD, PhD

Department of Medical Genetics, University of Campinas – UNICAMP.

Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitaria “Zeferino Vaz”

Campinas, SP, Brazil - 13084-971

Phone: +55 19 35218907 / Fax: +55 19 32891818

E-mail: icendes@unicamp.br

Abstract

Experimental evidence indicates that the normal *ATXN3* allele and the C-terminal heat shock protein 70 (Hsp70)-interacting protein (*CHIP*) may be genetic modifiers of age at onset (AO) in Machado-Joseph disease (MJD). To investigate this, we determined the length of normal and expanded CAG repeats at the *ATXN3* gene in 210 unrelated patients with MJD. In addition, we genotyped 5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *CHIP* gene. AO was associated with length of the expanded allele CAG ($r^2 = 0.592$, $p < 0.001$). Frequencies of the normal CAG repeats at the *ATXN3* gene and of *CHIP* polymorphisms were not significantly different in groups with highly discordant ages at onset after correction for expanded (CAG) repeat. However, addition of the normal allele improved the model fit ($r^2 = 0.604$, $p = 0.014$). Therefore, we conclude that, the normal CAG repeat at the *ATXN3* gene has a small but significant influence in AO of MJD.

Keywords: SCA3; PolyQ; CHIP; age at onset

Introduction

Machado-Joseph disease (MJD) is the most common autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA) worldwide (Schols et al, 2004). It is caused by an unstable trinucleotide (CAG) repeat expansion in exon 10 of the *ATXN3* gene, which leads to an elongated polyglutamine (PolyQ) tract in the encoded protein, ataxin-3 (*ATXN3*) (Kawaguchi et al, 1994). MJD belongs to a group of neurodegenerative disorders (PolyQ diseases) caused by these unstable mutations, such as SCAs 1, 2, 6, 7 and Huntington disease (HD) (Everett and Wood, 2004). These disorders usually begin in early adulthood and slowly progress over years, but there is significant phenotypic variability (Schols et al, 2004; Everett and Wood, 2004).

Length of the expanded allele in polyQ disorders is tightly associated to age at onset (AO) of symptoms. In MJD, previous data indicate that the *ATXN3* expansion explains 50 to 80% of AO variance (van de Warrenburg et al, 2005; Maciel et al, 1995; Dürr et al, 1996). Additional environmental and/or genetic factors must exist that account for the remaining variability. In other polyQ disorders, some modifier loci and genes have been already identified (Rubinsztein et al, 1997; Metzger et al, 2008; Hayes et al, 2000; Pulst et al, 2005). This motivated us to investigate two possible genetic modifiers of AO in a large sample of unrelated Brazilian patients with MJD, C-terminal heat shock protein 70 (Hsp70)-interacting protein (CHIP) and the normal *ATXN3* allele.

CHIP is an ubiquitin ligase shown to suppress polyglutamine aggregation in polyQ disorders (Miller et al, 2005; Al-Ramahi et al, 2006). In cellular and animal MJD models, CHIP underexpression aggravates disease phenotype (Miller et al, 2005; Williams et al, 2009). Regarding the potential influence of normal *ATXN3*, there are conflicting results

about its role as an independent modifier of AO in MJD (Dürr et al, 1996; van de Warrenburg et al, 2002). Recent evidence, however, suggests that it interacts with its mutant counterpart, and this might be relevant in the pathogenic cascade of neurodegeneration (Jia et al, 2008).

Methods

Subject selection

Two-hundred and ten patients from unrelated families and with molecular confirmation of MJD were included in the study. They were recruited from three Neurogenetic centers in southern Brazil: University of Campinas (UNICAMP), University of Sao Paulo at Ribeirao Preto (USP-RP) and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). This study was approved by our institution Ethics Committee and a written informed consent was obtained from all participants.

Age at onset (AO) was defined as the age at which the first symptoms of ataxia began. This was estimated according to the reports of patients and close relatives. Individuals with autosomal dominant SCA but no molecular confirmation of MJD and those without available data about AO were excluded from the study.

Molecular studies

Normal and expanded *ATXN3* alleles

Genomic DNA (gDNA) was extracted from lymphocytes in peripheral blood following standard techniques (Sambrook et al, 1989). We performed polymerase chain reaction (PCR) to determine the length of the normal and expanded alleles at exon 10 of *ATXN3*. Final volume for each assay was 10 μ l: 50ng of gDNA; 125 μ M of each dNTP

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2.5 pmol of each primer; Tris-HCl 20mM; MgCl₂ 1.75mM; KCl 50mM; e 1.5 units of Taq DNA polymerase. PCR products were resolved using capillary electrophoresis on MegaBACE™ 1000 96-capillary sequencers (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) or ABI3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA) and length of (CAG) repeats determined by comparison with standard makers.

CHIP polymorphisms

We selected five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CHIP* gene, rs12599315, rs11558085, rs11861355, rs6597 and rs3204090, to genotype in our cohort of patients with MJD. These polymorphisms were chosen through SNP tagging by HAPLOVIEW software (Barrett et al, 2005), based on the four populations evaluated in the HapMap Project (The International HapMap Consortium, 2005). We used HAPLOVIEW to estimate minor allele frequency (MAF) and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) for these SNPs. We used Real-Time PCR (Applied biosystems, Foster City, CA) to genotype these SNPs, and each reaction was performed in a final volume of 7 µl: 1µl of DNA; 3.5µl of TaqMan; 0.175 µl of SNP genotyping assay; and 2.325µl of miliQ water.

Statistical analysis

We first examined the association of AO and length of the expanded (CAG) using a linear regression model. This allowed us to determine the residual AO corrected for expanded (CAG) for each patient. We selected two groups of patients from the curve of

residual AO, those with extremely early and late onset. These were defined as patients who had residual AO at least one standard deviation earlier and later than mean AO, respectively. We then compared the distribution of genotypes and alleles for the normal *ATXN3* allele and for *CHIP* polymorphisms in the two groups using Mann-Whitney U test. Subsequently, we examined whether the addition of the genotypes for each candidate gene as independent variables improved the AO vs expanded (CAG) model in a stepwise regression analysis. Statistical analysis was performed on SYSTAT 10.2. P values < 0.05 were considered significant.

Results

Mean age of onset in the cohort was 35.7 (range 7 – 64, SD = 11.3) years. Mean length of expanded and normal (CAG) repeats were 72 (ranging from 63 to 87, SD = 3.6) and 21 (range 13 - 37, SD = 5.3), respectively. There was a significant negative correlation of AO and the (CAG) repeat expansion (Pearson $r^2 = 0.573$, $p < 0.001$ – Table 1). Logarithmic transformation of AO led to a slightly better fit ($\log[r^2] = 0.596$, $p < 0.001$), so that log-transformed AO was used in all further comparative analyses (Figure 1).

SNP average genotype call rate was 100% and average genotyping success rate of sample subjects was 100%. Three CHIP SNPs presented MAF < 0.05 , and one was not under Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.001$); therefore these four SNPs were excluded from further analysis (Table 2).

According to residual AO corrected for expanded (CAG) repeat, there were 34 and 33 patients in the extremely early and late onset groups, respectively. Mean AO was significantly different in both groups (26.4 ± 8.4 vs 48.7 ± 6.3 , Mann-Whitney $p < 0.001$), but not length of (CAG) repeat expansion (72 ± 3.7 vs 71 ± 3.0 , Mann-Whitney $p = 0.350$). Allele and genotype frequencies for rs6597 were not different between the two groups (Mann-Whitney $p = 0.392$ and 0.435 , respectively. Figure 2A). The distribution of normal *ATXN3* (CAG) repeat alleles was also similar in both groups (Mann-Whitney $p = 0.217$, Figure 2B).

The inclusion of the normal *ATXN3* allele as an independent variable in the log-transformed AO vs expanded (CAG) model resulted in a small but significant improvement of the association ($r^2 = 0.601$, $p = 0.034$ – Table 3). In this combined model,

patients with identical lengths of the (CAG) expansion at the mutant allele but different at the normal allele would have predicted AO separated for up to 7 years (Table 4). By contrast, addition of rs6597 genotypes as independent variables in the previous model did not yield a better fit – Table 3.

Discussion

Our results confirm the close association of AO and length of *ATXN3* (CAG) expansion in MJD, which is particularly evident among patients with large expansions. In this cohort, we found a correlation coefficient between AO and (CAG) expansion ($r^2=0.59$) slightly higher than that reported in previous European and North American studies (van de Warrenburg et al, 2005; Maciel et al, 1995; Dürr et al, 1996). Such discrepancy is possibly due to the greater number of individuals with large expansions in the present study. However, much of the AO variance cannot be explained by the (CAG) repeat expansion in the *ATXN3* gene, so that other intervening factors, either environmental or genetic, must also contribute. In other polyQ disorders such as HD and SCA2, some genetic modifiers have been already found, with individual contributions that account for 1 to 13% of unexplained AO variability (Rubinsztein et al, 1997; Metzger et al, 2008; Hayes et al, 2000; Pulst et al, 2005). Although DeStefano et al. reported in 1996 that a familial factor independent of (CAG) repeat expansion influences AO in MJD, no such genetic modifier for MJD has been identified yet (DeStefano et al, 1996). One possible reason is that large cohorts are needed to detect small modulating effects in MJD. These limitations underscore the importance of multicenter initiatives, such as the present one that includes 3 Brazilian clinical centers.

The initial candidate gene to be evaluated was the normal *ATXN3* allele. We failed to find significant difference of allele and genotype frequencies for normal *ATXN3* between patients with extremely late and early onset. This was possibly due to the small sample in either group. However, regression analyses confirmed that the normal allele indeed had a small but significant modulating effect on AO. The contribution was actually

smaller than 1%, but, it was clinically relevant. This can be fully appreciated by examining the data presented on Table 4, in which one can see that patients matched for (CAG) length at the mutant allele would have clearly different predicted AO depending on the normal alleles they inherited. Durr et al., using a different approach, reported similar results in a cohort of French patients (Dürr et al, 1996). There is also some evidence that the normal allele modifies AO in other polyQ disorders, such as SCA2 and SCA7 (van de Warrenburg et al, 2005). The normal *HTT* allele was also recently shown to interact with the expanded allele to determine AO in patients with HD (Aziz et al, 2009). In contrast, authors of a survey in the Netherlands did not replicate these findings (van de Warrenburg et al, 2002). That study, however, may have been underpowered to detect such small modifier effects (around 1%).

The association of AO and the normal *ATXN3* (CAG) repeat allele suggests that this allele might play a modulatory role in disease pathogenesis. Although speculative, this possibility is supported by some experimental and pathologic data. Normal *ATXN3* is found in the intraneuronal inclusions characteristic of MJD (Rüb et al, 2008). Furthermore, cell models have shown that normal *ATXN3* interacts with its mutant counterpart in a polyQ length-dependent manner and the rate of co-aggregate formation (normal + mutant *ATXN3*) is proportional to the polyglutamine stretch in either the normal or expanded allele (Slepko et al, 2006). In this scenario, normal *ATXN3* with longer polyQ chains could associate more efficiently with mutant *ATXN3*. Such an effect would sequester higher amounts of the mutant protein into the inclusion bodies and avoid its aberrant interactions with other proteins, thus slowing the neurodegenerative cascade. Indeed, this pathogenetic model would account for our finding that the association of (CAG) expansion at the normal allele and AO is negative.

CHIP is a small protein that acts as an ubiquitin ligase and a co-chaperone in neurons (Miller et al, 2005; Al-Ramahi et al, 2006). It thus links two important mechanisms involved in the protein quality control, the ubiquitin proteasome system and the molecular chaperones; these mechanisms have been increasingly implicated in the pathogenesis of polyQ diseases (Orr and Zoghbi, 2007). Evidence from cellular and animal models of MJD indicates that reduction or elimination of CHIP aggravates disease course and neuropathological abnormalities (Miller et al, 2005; Williams et al, 2009). Similar observations have been published in other polyQ disorders, such as SCA1 and Kennedy disease (Al-Ramahi et al, 2006; Adachi et al, 2007). In face of these results, CHIP was the second candidate gene to be evaluated. Three out of the five SNPs selected for genotyping in *CHIP* (rs11558085, rs11861355 and rs3204090) were not polymorphic among the patients with MJD studied. Another SNP rs12599315 was not under HWE. The remaining SNP rs6597 did not influence AO in our MJD cohort. This result apparently contrasts with experimental data. A possible explanation is that CHIP plays an important role in steps of MJD pathogenesis occurring after disease onset. Mounting evidence indicates that factors driving the onset of disease and its rate of progression are not necessarily the same in polyQ diseases. Consistent with this, the length of the expanded (CAG) repeat at *ATXN3*, which is the main determinant of AO in patients with MJD, was not associated with progression of ataxia (measured by the international cooperative ataxia rating scale scores) in a recent prospective study (França Jr et al, 2009). An alternative explanation is that this cohort may just not have sufficient and functionally significant variation in CHIP to be detectable by genetic analysis.

Our results indicate that the normal *ATXN3* (CAG) repeat allele has a small, but significant contribution to AO of patients with MJD. In contrast, we were unable to show

an association of *CHIP* polymorphisms with AO. Further research will be useful to determine whether these findings also hold in individuals with different ethnic backgrounds and to identify other modifier genes.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant # 04/13725-4; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INAGEMP)

References

Adachi H, Waza M, Tokui K, et al. CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci* 2007; 27:5115-5126.

Al-Ramahi I, Lam YC, Chen HK, et al. CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 2006; 281:26714-26724.

Aziz NA, Jurgens CK, Landwehrmeyer GB, et al. Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. *Neurology* 2009; 73:1280-1285.

Barrett, JC, Fry, B, Maller, J, Daly, MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21:263-265.

Chen S, Ferrone FA, Wetzel R. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11884-11889.

DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, et al. A familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1996; 59:119-127.

Dürr A, Stevanin G, Cancel G, et al. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol* 1996; 39:490-499.

Everett CM, Wood NW. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 2004; 127:2385-2405.

França MC Jr, D'Abreu A, Nucci A, et al. Progression of ataxia in patients with Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 2009; 24:1387-1390.

Hayes S, Turecki G, Brisebois K, et al. CAG repeat length in RAI1 is associated with age at onset variability in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Hum Mol Genet.* 2000; 9:1753-1758.

Jia NL, Fei EK, Ying Z, et al. PolyQ-expanded ataxin-3 interacts with full-length ataxin-3 in a polyQ length-dependent manner. *Neurosci Bull* 2008; 24:201-208.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994; 8:221-228.

Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57:54-61.

Metzger S, Rong J, Nguyen HP, et al. Huntingtin-associated protein-1 is a modifier of the age-at-onset of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1137-1146.

Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, et al. CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2005; 25:9152-9161.

Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 2007; 30:575-621.

Pulst SM, Santos N, Wang D, et al. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 2005; 128:2297-2303.

Rüb U, Brunt ER, Deller T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 2008; 21:111-116.

Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, et al. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3872-3876.

Sambrook J, Fritsch ES, Maniatis T, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schols L, Bauer P, Schmidt T, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004; 3:291-304.

Slepko N, Bhattacharyya AM, Jackson GR, et al. Normal repeat-length polyglutamine peptides accelerate aggregation nucleation and cytotoxicity of expanded polyglutamine proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103: 14367–14372

The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437:1299-1320.

van de Warrenburg BP, Hendriks H, Dürr A, et al. Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch-French cohort. *Ann Neurol* 2005; 57:505-512.

van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002; 58:702-708.

Warrick JM, Morabito LM, Bilen J, et al. Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by an ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell* 2005; 18:37-48.

Williams AJ, Knutson TM, Colomer Gould VF, Paulson HL. In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis. *Neurobiol Dis* 2009; 33:342-353.

Legends (Figures)

1. Scatterplot of age at onset vs length of expanded (CAG) repeat at *ATXN3*.
2. Distribution of normal *ATXN3* (CAG) repeat alleles in the extremely early (black column) and late (dashed column) onset groups (A). Distribution of genotypes for the SNP rs6597 within the *CHIP* gene in the extremely early (black column) and late (dashed column) onset groups (B).

Figure 1.

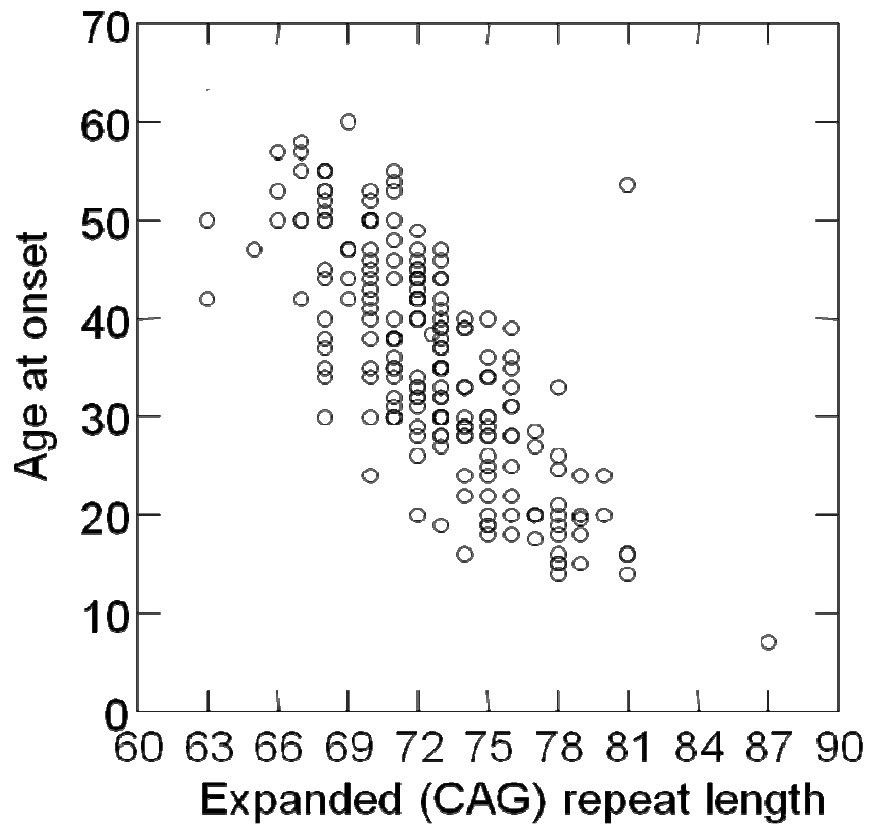
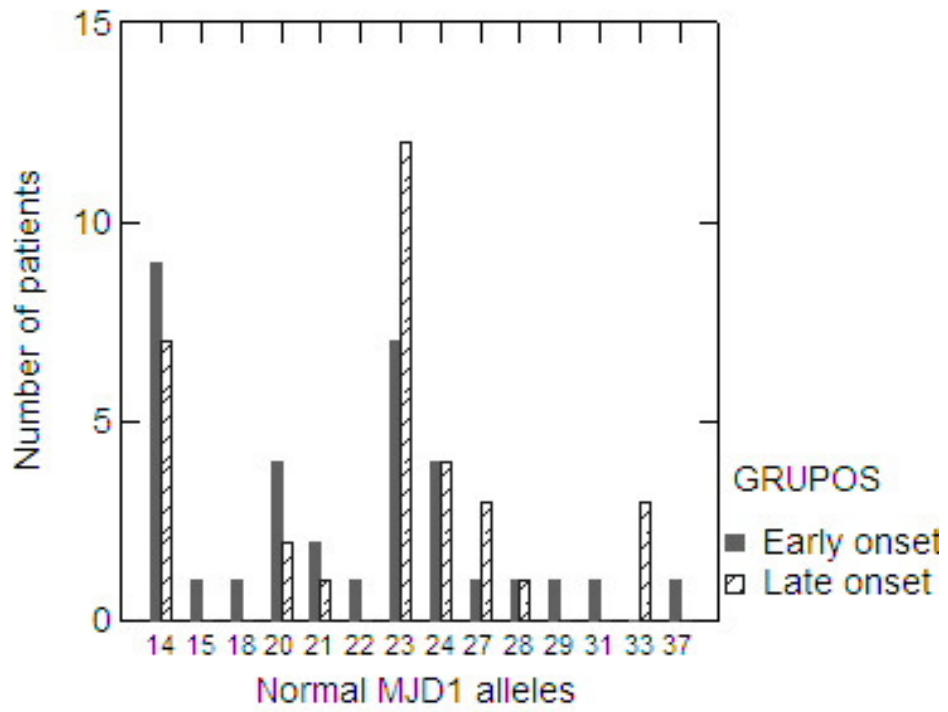


Figure 2.

A



B

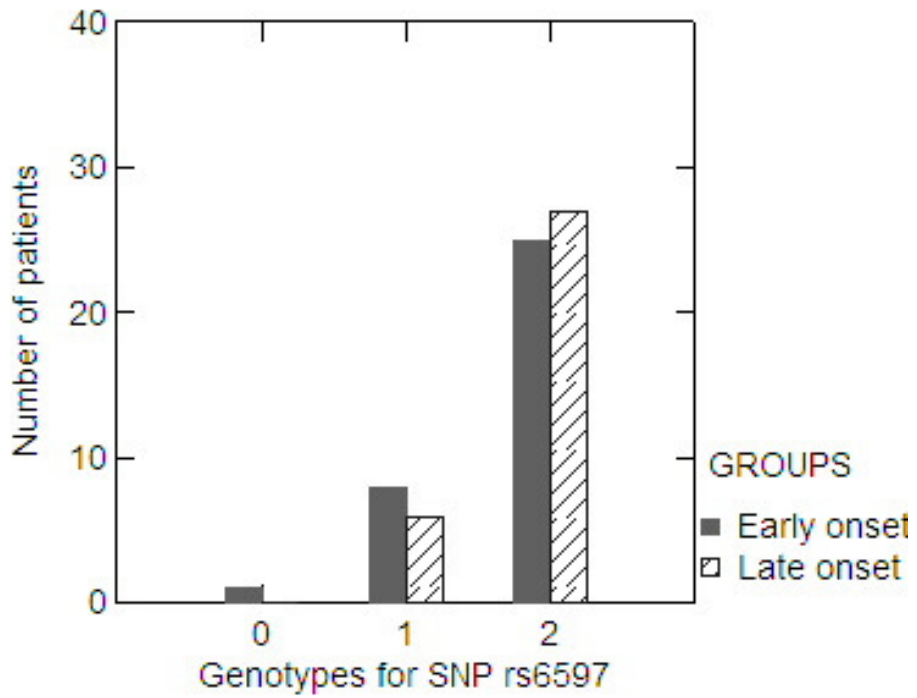


Table 1. Predicted ages at onset for each expanded (CAG) length at the mutant allele in MJD.

| Expanded CAG | AO | 95% CI |
|---------------------|-----------|---------------|
| 60 | 88 | 79 - 98 |
| 61 | 81 | 73 - 90 |
| 62 | 76 | 69 - 83 |
| 63 | 70 | 64 - 76 |
| 64 | 65 | 60 - 70 |
| 65 | 60 | 56 - 65 |
| 66 | 56 | 52 - 59 |
| 67 | 52 | 49 - 55 |
| 68 | 48 | 46 - 50 |
| 69 | 44 | 42 - 46 |
| 70 | 41 | 40 - 43 |
| 71 | 38 | 37 - 39 |
| 72 | 35 | 34 - 36 |
| 73 | 33 | 32 - 34 |
| 74 | 30 | 29 - 31 |
| 75 | 28 | 27 - 29 |
| 76 | 26 | 25 - 27 |
| 77 | 24 | 23 - 25 |
| 78 | 22 | 21 - 24 |
| 79 | 21 | 19 - 22 |
| 80 | 19 | 18 - 21 |
| 81 | 18 | 16 - 19 |
| 82 | 17 | 15 - 18 |
| 83 | 15 | 14 - 17 |
| 84 | 14 | 13 - 16 |
| 85 | 13 | 12 - 15 |
| 86 | 12 | 11 - 14 |
| 87 | 11 | 10 - 13 |
| 88 | 10 | 9 - 12 |
| 89 | 10 | 8 - 11 |
| 90 | 9 | 8 - 10 |

Table 2. SNPs from CHIP gene evaluated in this cohort.

| SNP | Position Ch16 (bases) | MAF | HWE p-value |
|------------|------------------------------|------------|--------------------|
| rs12599315 | 729831 | 0.281 | <0.001* |
| rs11558085 | 730620 | <0.05* | <0.001* |
| rs11861355 | 731517 | <0.05* | <0.001* |
| rs6597 | 731725 | 0.136 | 0.345 |
| rs3204090 | 732465 | <0.05* | <0.001* |

* These SNPs were removed from further analyses due to MAF and/or HWE status.

Table 3. Multiple linear regression analyses of possible candidate genetic modifiers of log-transformed age at onset in Machado-Joseph disease.

| Model | r² | Δr² | pvalue |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------|
| MJD (CAG) exp | 0.596 | - | <0.001 |
| MJD (CAG) exp + normal (CAG) | 0.601 | 0.05 | 0.034 |
| MJD (CAG) exp + CHIP rs6597 genotype | 0.594 | 0.0 | 0.452 |

Table 4. Predicted ages at onset for each normal (CAG₁₀₋₄₀) and expanded (CAG₆₀₋₉₀)

repeat lengths in MJD.

| Expanded CAG | Normal CAG | | | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| 60 | 85 (75-97) | 86 (77-97) | 88 (78-98) | 89 (79-100) | 90 (80-102) | 92 (80-105) | 93 (80-109) |
| 61 | 79 (70-89) | 80 (72-89) | 81 (73-90) | 82 (74-92) | 84 (75-94) | 85 (74-97) | 86 (74-100) |
| 62 | 73 (65-82) | 74 (67-82) | 75 (68-83) | 76 (69-84) | 77 (70-86) | 79 (69-89) | 80 (69-92) |
| 63 | 68 (60-76) | 69 (62-76) | 70 (64-76) | 71 (65-77) | 72 (65-79) | 73 (65-82) | 74 (64-85) |
| 64 | 63 (56-70) | 64 (58-70) | 65 (60-70) | 66 (60-71) | 67 (61-73) | 68 (60-76) | 69 (60-78) |
| 65 | 58 (53-64) | 59 (54-64) | 60 (56-64) | 61 (56-65) | 62 (57-67) | 63 (56-70) | 64 (56-72) |
| 66 | 54 (49-59) | 55 (51-59) | 55 (52-59) | 56 (53-60) | 57 (53-62) | 58 (52-64) | 59 (52-67) |
| 67 | 50 (46-55) | 51 (47-54) | 51 (48-54) | 52 (49-55) | 53 (49-57) | 54 (49-59) | 55 (48-62) |
| 68 | 46 (42-50) | 47 (44-50) | 48 (45-50) | 48 (46-51) | 49 (46-53) | 50 (45-55) | 51 (45-57) |
| 69 | 43 (39-46) | 43 (41-46) | 44 (42-46) | 45 (43-47) | 45 (43-48) | 46 (42-50) | 47 (42-53) |
| 70 | 40 (37-43) | 40 (38-43) | 41 (39-43) | 41 (40-43) | 42 (40-45) | 43 (39-47) | 43 (39-49) |
| 71 | 37 (34-40) | 37 (35-39) | 38 (37-39) | 38 (37-40) | 39 (37-41) | 40 (36-43) | 40 (36-45) |
| 72 | 34 (32-37) | 35 (33-36) | 35 (34-36) | 36 (34-37) | 36 (34-38) | 37 (34-40) | 37 (33-42) |
| 73 | 32 (29-34) | 32 (30-34) | 33 (31-34) | 33 (32-34) | 34 (32-35) | 34 (31-37) | 35 (31-39) |
| 74 | 29 (27-32) | 30 (28-31) | 30 (29-31) | 31 (29-32) | 31 (29-33) | 32 (29-34) | 32 (29-36) |
| 75 | 27 (25-29) | 28 (26-29) | 28 (27-29) | 28 (27-30) | 29 (27-31) | 29 (27-32) | 30 (27-33) |
| 76 | 25 (23-27) | 25 (24-27) | 26 (25-27) | 26 (25-27) | 27 (25-28) | 27 (25-30) | 27 (25-31) |
| 77 | 23 (21-25) | 24 (22-25) | 24 (23-25) | 24 (23-26) | 25 (23-26) | 25 (23-27) | 25 (23-29) |
| 78 | 22 (20-24) | 22 (20-23) | 22 (21-24) | 23 (21-24) | 23 (21-25) | 23 (21-26) | 24 (21-27) |
| 79 | 20 (18-22) | 20 (19-22) | 21 (19-22) | 21 (20-22) | 21 (20-23) | 22 (20-24) | 22 (19-25) |
| 80 | 19 (17-20) | 19 (17-20) | 19 (18-20) | 19 (18-21) | 20 (18-21) | 20 (18-22) | 20 (18-23) |
| 81 | 17 (15-19) | 17 (16-19) | 18 (16-19) | 18 (17-19) | 18 (17-20) | 18 (17-21) | 19 (17-21) |
| 82 | 16 (14-18) | 16 (15-18) | 16 (15-18) | 17 (15-18) | 17 (15-19) | 17 (15-19) | 17 (15-20) |
| 83 | 15 (13-17) | 15 (13-17) | 15 (14-17) | 15 (14-17) | 16 (14-17) | 16 (14-18) | 16 (14-19) |
| 84 | 14 (12-15) | 14 (12-15) | 14 (13-16) | 14 (13-16) | 14 (13-16) | 15 (13-17) | 15 (13-17) |
| 85 | 13 (11-14) | 13 (11-14) | 13 (12-15) | 13 (12-15) | 13 (12-15) | 14 (12-16) | 14 (12-16) |
| 86 | 12 (10-13) | 12 (10-14) | 12 (11-14) | 12 (11-14) | 12 (11-14) | 13 (11-15) | 13 (11-15) |
| 87 | 11 (9-13) | 11 (10-13) | 11 (10-13) | 11 (10-13) | 12 (10-13) | 12 (10-14) | 12 (10-14) |
| 88 | 10 (9-12) | 10 (9-12) | 10 (9-12) | 11 (9-12) | 11 (9-12) | 11 (9-13) | 11 (9-13) |
| 89 | 9 (8-11) | 9 (8-11) | 10 (8-11) | 10 (8-11) | 10 (9-11) | 10 (9-12) | 10 (9-12) |
| 90 | 9 (7-10) | 9 (7-10) | 9 (8-10) | 9 (8-11) | 9 (8-11) | 9 (8-11) | 9 (8-11) |

4. DISCUSSÃO

Este estudo enfatiza três aspectos principais: o efeito da metilação no promotor do gene *ATXN3*, o efeito de polimorfismos em genes candidatos a modificadores da idade de início, da gravidade e de volumes cerebrais relacionados à atrofia na SCA3 e o efeito do alelo normal *ATXN3* na idade de início.

Os trabalhos realizados até agora sugerem que as expansões de repetições causam doenças neurodegenerativas por um dos três mecanismos: toxicidade da poliglutamina, alteração da função protéica normal ou alteração da expressão gênica.

O presente estudo buscou evidências de que o estado de metilação do gene *ATXN3* estaria relacionado ao fenótipo SCA3. O impacto da metilação do DNA na atividade do promotor *ATXN3* é desconhecido até o momento. A metilação *de novo* do DNA pode ser parte de um sistema de defesa celular contra os efeitos tóxicos da poliglutamina expandida, especificamente através da redução da expressão da proteína mutante. Consequentemente, a diminuição dos níveis da ataxina-3 mutante pode resultar em um fenótipo mais brando da doença, o que é consistente com os nossos resultados. No presente estudo não houve diferença no padrão de metilação entre pacientes e controles. Este resultado está de acordo com o esperado, já que níveis de mRNA de *ATXN3* e de ataxina-3 são semelhantes entre pacientes e controles (Nishiyama *et al*, 1996; Zijlstra *et al*, 2010).

O uso da técnica MS-MLPA permitiu a quantificação dos níveis de metilação de seis sítios CpG localizados no promotor *ATXN3*. O método molecular empregado apresenta várias vantagens sobre as análises tradicionais de sequenciamento após o tratamento com bissulfito. MS-MLPA requer uma quantidade de 20-200 ng de DNA da amostra; devido ao seu procedimento simples, grande número de amostras pode ser analisado simultaneamente; a fragmentação do DNA não é um problema, uma vez que as sondas requerem apenas 50-60 pb para hibridação e ligação. Neste estudo, nós definimos a quantidade de DNA em 100 ng para reduzir a variação inter-amostral. Por outro lado, não

foi possível realizar uma análise completa de todos os CpGs na região promotora. Apenas os CpGs que bloqueiam ou permitem a digestão por endonucleases sensíveis a metilação podem de ser analisadas por MS-MLPA. Outra limitação desta técnica é que as sequências de hibridização das sondas devem ser únicas, específicas para a região que contém o CpG a ser analisado. No entanto, um ensaio bem projetado e uma vez estabelecido, torna-se muito simples de usar e proporciona excelentes resultados. Estamos conscientes de que análises complementares de outros sítios CpGs nesta primeira ilha seriam relevantes para fornecer informações adicionais para este estudo. Esta limitação foi imposta pelo protocolo MS-MLPA, como mencionado acima.

Concluimos que um controle epigenético do promotor *ATXN3* pode contribuir parcialmente para a variação da idade de início em pacientes SCA3. Estudos adicionais, ou com grande número de casos ou especialmente desenhados para investigar o padrão de metilação diferencial em cérebros de pacientes SCA3, são necessários para confirmar este possível controle epigenético. Se a hipermetilação no promotor *ATXN3* está associada a um melhor prognóstico, terapias dirigidas à diminuição da expressão da ataxina-3 mutante ou ao silenciamento de RNA devem ser estudadas.

Além da possível expressão reduzida da proteína ataxina-3 mutante causada pela metilação do promotor do gene *ATXN-3*, outra possível explicação para a variabilidade fenotípica na SCA3 seria polimorfismos em genes candidatos a modificadores, alterando a expressão destes genes e, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de proteínas que poderiam minimizar a patogênese da doença.

O presente estudo mostrou os seguintes efeitos dos SNPs no fenótipo de pacientes SCA3: SNP rs16944 (gene *IL1B*) na idade de início da doença; SNP rs760678 (gene *NEDD9*) na gravidade; SNP rs2227281 (gene *GRIK2*) no volume do cerebelo e SNP rs2144487 (gene *NEDD8*) no volume da ponte. Através da análise dos genótipos neuroprotetores combinados, indivíduos com os genótipos CC (*GRIK2*) + GG (*NEDD8*) e AA (*IL1B*) + GG (*NEDD8*) apresentaram uma maior idade de início quando comparados às outras combinações genotípicas, sugerindo uma sinergia entre estes polimorfismos. Outros estudos, além da expressão gênica, poderão revelar como estas proteínas modulam a expressão fenotípica e o quadro clínico observado em pacientes SCA3.

O método escolhido neste estudo para medir a gravidade da doença apresentou resultados satisfatórios, sendo, como esperado, a gravidade diretamente proporcional ao tamanho da repetição CAG. Este resultado reforça a hipótese de que o tamanho da expansão CAG desempenha um papel importante na patogênese dos sintomas. A escala NESSCA foi dividida pelo tempo de duração da doença para evitar a redundância de valores e a chance dos dados se tornarem inconsistentes. Por exemplo, um indivíduo com um valor da escala 8,0 apresentará uma gravidade considerada dentro dos padrões se já apresentar a doença a 10 anos ($NESSCA/duração=0,8$), diferentemente de um indivíduo que apresentar a escala com valor 8,0 e tempo de duração de apenas um ano ($NESSCA/duração=8,0$). Este último indivíduo terá então uma gravidade maior do que a esperada, sendo considerado um *outlier*. Em um estudo utilizando a escala ICARS dividida pelo tempo de duração da doença para avaliar a gravidade não houve correlação significativa com o tamanho da repetição CAG (Netravathi *et al*, 2009).

A ataxina-3 normal é encontrada nas inclusões intraneuronais características da SCA3 (Rüb *et al*, 2008), sugerindo que o alelo normal pode ter um papel na patogênese da doença. Modelos celulares têm mostrado que a proteína ataxina-3 normal interage com o seu homólogo mutante de uma forma dependente do comprimento poliQ, e é recrutada para a inclusão. Este sequestro da ataxina-3 normal em inclusões pode diminuir a sua atividade e, assim, aumentar a toxicidade na SCA3 (Jia *et al*, 2008). Como descrito anteriormente na DH, é concebível que o comprimento poliQ da ataxina-3 normal também pode influenciar a interação acima descrita com a ataxina-3 expandida (Aziz *et al*, 2009; Chen *et al*, 2002). Este efeito seria a base da ação moduladora do alelo normal na idade de início.

A significativa associação entre a variação da idade de início e repetição CAG do alelo expandido sugere que a contribuição de modificadores seja menos evidente em indivíduos com grandes repetições devido ao grande efeito do tamanho da poliglutamina mutada. Assim, maior variação na idade de início para pequenas repetições indicaria que modificadores teriam um papel maior quando o tamanho CAG é menor, de acordo com os resultados vistos neste trabalho. A influência do alelo normal *ATXN3* na idade de início foi menor quando o alelo expandido era maior. Também, em nosso estudo, o tamanho do alelo normal não mostrou influência significativa na idade de início da doença nem na gravidade do fenótipo na amostra de 273 pacientes do sul do Brasil. Porém, ao analisar a amostra de

pacientes não aparentados (103 pacientes do HCPA) em conjunto com amostras de outros centros brasileiros (107 pacientes da UNICAMP e USP-RP), a influência tornou-se significativa. Esta diferença poderia ser explicada baseada no fato de que a amostra do sul do Brasil é composta por pacientes que apresentam grandes repetições CAG no alelo mutado, enquanto que a amostra de São Paulo é composta por pacientes com pequenas repetições.

A função da ataxina-3 normal ainda não foi totalmente descrita. Recentemente, um estudo utilizando ratos como modelo da SCA3 demonstrou que a super-expressão da ataxina-3 normal não protegeu contra a patologia, o modelo *knockdown* para a ataxina-3 não agravou a patologia e que o silenciamento não-alelo-específico da ataxina-3 reduziu fortemente a neuropatologia dos ratos (Alves *et al*, 2010). Mais estudos em outras populações e com um maior número de amostras poderão confirmar se existe alguma influência do tamanho da repetição do alelo normal na idade de início e na patogênese da doença.

CHIP também foi avaliado como um gene candidato a modificador. O polimorfismo rs12599315, por não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não foi incluído nas análises do artigo 3. Mas o teste de Modelos Lineares Generalizados (*Generalized Linear Models* - GLM) através das Equações de Estimativa Generalizadas (*Generalized Estimating Equations* - GEE) foi aplicado com os resultados da genotipagem dos 273 pacientes e este polimorfismo mostrou associação com a idade de início ($p=0.005$). Este resultado permaneceu significativo mesmo após os ajustes para comparações múltiplas usando a correção de Bonferroni. A média da idade de início foi 31,77 anos para os genótipos CC+CT e 38,48 anos para os homocigotos TT. Não foi observada associação significativa entre os SNPs de *CHIP* e a gravidade da doença. A inclusão do alelo normal *ATXN3* como uma variável independente não mostrou significância estatística.

Este SNP está localizado na região promotora do gene *CHIP*. Em modelos celulares e animais de SCA3, a diminuição da expressão de *CHIP* agravou o fenótipo da doença (Miller *et al*, 2005; Williams *et al*, 2009). Portanto, a expressão diferencial dos transcritos *CHIP* pode afetar indiretamente a agregação de poliglutaminas no cérebro de tal

forma que os portadores do genótipo de risco (CC ou CT) têm uma perda significativamente maior e gradual de neurônios e um início mais precoce dos sintomas.

Os dados obtidos neste trabalho enfatizam a importância da pesquisa de genes modificadores da idade de início na SCA3. Embora a contribuição dos polimorfismos em cada gene modificador seja pequena, estes dados são inovadores e podem servir como ponto de partida para a busca de novas terapias agindo especificamente do mesmo modo que as proteínas com um possível efeito neuroprotetor descrito aqui. Outros estudos envolvendo mais genes modificadores, além de estudos de expressão gênica, podem revelar, caso existam, as interações entre os produtos de tais genes e, se de fato, tais relações podem modular a expressão fenotípica e o quadro clínico observado em pacientes com SCA3 ou outro tipo de ataxia espinocerebelar dominante.

Os resultados apresentados aqui corroboram com o mecanismo patogênico multidimensional de SCA3, envolvendo diversas vias celulares. A integração dos resultados de metilação e dos genes modificadores estudados poderá ser comprovada em uma amostra maior, tendo representatividade de indivíduos que possuam todos os efeitos neuroprotetores combinados.

5. CONCLUSÕES

- O controle epigenético do promotor *ATXN3* pode contribuir parcialmente para a variação da idade de início em pacientes SCA3.
- Não houve diferença nas frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados neste trabalho entre pacientes e controles.
- Os polimorfismos nos genes *IL1B*, *GRIK2*, *NEDD8* e *NEDD9* desenvolvem algum papel na SCA3, afetando a idade de início, volume do cerebelo, volume da ponte e gravidade da doença, respectivamente. Um efeito sinérgico dos genótipos protetores *IL1B/NEDD8* e *GRIK2/NEDD8* também foi observado na idade de início.
- A contribuição do alelo normal *ATXN3* na idade de início foi pequena, mas clinicamente relevante.
- Os nossos resultados corroboram com o mecanismo patogênico complexo de SCA3, envolvendo diversas vias celulares.

6. REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman A, Pober J (1998) *Imunologia celular e molecular* (Rio de Janeiro: Revinter).
- Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, et al (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci* 23: 2203–2211.
- Adachi H, Waza M, Tokui K, et al (2007) CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci* 27: 5115–5126.
- Adams JM, Cory CS (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322–1325.
- Adams JM (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17: 2481–2495.
- Aki T, Yoshida K, Mizukami Y (2003) The mechanism of alphaB-crystallin gene expression by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 162–167.
- Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, et al (2008) The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet* 17: 735–746.
- Al-Ramahi I, Lam YC, Chen HK, et al (2006) CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 281: 26714–26724.
- Alves S, Nascimento-Ferreira I, Dufour N, et al (2010) Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 9. [Epub ahead of print]
- Andoh T, Kishi H, Motoki K, et al (2008) Protective Effect of IL-18 on Kainate and IL-1²-Induced Cerebellar Ataxia in Mice. *J Immunol* 180: 2322–2328.

- Antony PM, Mäntele S, Mollenkopf P, et al (2009) Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis* 36: 280-292.
- Arrigo AP, Simon S, Gibert B, et al (2007) Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 581: 3665-3674.
- Aziz NA, Jurgens CK, Landwehrmeyer GB, et al (2009) Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. *Neurology* 73: 1280-1285.
- Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, et al (2004) Can ataxin-2 be down-regulated by allele-specific de novo DNA methylation in SCA2 patients? *Med Hypotheses* 63: 1018-1023.
- Benton CS, de Silva R, Rutledge SL, et al (1998) Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology* 51: 1081-1086.
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13–26.
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1793: 933-940.
- Bezprozvanny I, Hayden MR (2004) Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1310–1317.
- Bezprozvanny I, Mattson MP (2008) Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 31: 454–463.
- Bezprozvanny I (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 15: 89-100.
- Bichelmeier U, Schmidt T, Hubener J, et al (2007) Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci* 27: 7418–7428.
- Bilen J, Bonini NM (2007) Genome-Wide Screen for Modifiers of Ataxin-3 Neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet* 3: 1950-1964.
- Bird TD. Ataxia overview. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, last revision 06/01/09, www.geneclinics.org/profiles/ataxias.
- Bloom J, Amador V, Bartolini F, et al (2003) Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* 115: 71–82.
- Bonifacino JS, Weissman AM (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 19-57.

- Bonini NM (2002) Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16407-16411.
- Bova MP, Yaron O, Huang Q, et al (1999) Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6137–6142.
- Bureau I, Dieudonne S, Coussen F, Mulle C (2000) Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6838–6843.
- Burnett B, Li F, Pittman RN (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 12: 3195–3205.
- Cao G, Pei W, Ge G, et al (2002) In vivo delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 22: 5423–5431.
- Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, et al (2006) SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 129: 235-242.
- Cannella M, Gellera C, Maglione V, et al (2004) The gender effect in juvenile Huntington disease patients of Italian origin. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 125: 92-98.
- Carlsson ML (1998) Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate-serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm* 105: 525–535.
- Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, et al (2008) Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol* 38: 296-299.
- Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, et al (2008) DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich's ataxia patients. *J Med Genet* 45: 808-812.
- Chai Y, Koppenhafer SL, Shoemith SJ, et al (1999) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum Mol Genet* 8: 673-682.
- Chai Y, Shao J, Miller VM, et al (2002) Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9310–9315.

- Chai Y, Berke SS, Cohen RE, Paulson HL (2004) Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem* 279: 3605-3611.
- Chan JY, Cheung MC, Moi P, et al (1995) Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 95: 265–269.
- Chan HY, Warrick JM, Gray-Board GL, et al (2000) Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9: 2811-2820.
- Chattopadhyay B, Ghosh S, Gangopadhyay PK, et al (2003) Modulation of age-at-onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett* 345: 93-96.
- Chen S, Ferrone FA, Wetzel R (2002) Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11884–11889.
- Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL (2003) Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 72: 839-849.
- Chen X, Tang TS, Tu H, et al (2008) Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 28: 12713-12724.
- Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM (1999) Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 20: 26–35.
- Chou AH, Yeh TH, Kuo YL, et al (2006) Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL. *Neurobiol Dis* 21: 333-345.
- Chou AH, Yeh TH, Ouyang P, et al (2008) Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol Dis* 31:89-101.
- Chung MY, Lu YC, Cheng NC, Soong BW (2003) A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. *Brain* 126:1293-1299.
- Clark HB, Orr HT (2000) Spinocerebellar ataxia type 1- modeling the pathogenesis of a polyglutamine neurodegenerative disorder in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 265-270.

- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Connell P, Ballinger CA, Jiang, J, et al (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3: 93–96.
- Contractor A, Swanson G, Heinemann SF (2001) Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 29: 209–216.
- Corsini E, Dufour A, Ciusani E, et al (1996) Human brain endothelial cells and astrocytes produce Il-1 beta but not Il-10. *Scand J Immunol* 44, 506–511.
- Coutinho P, Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azorean islands: a new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28: 703-709.
- Coutinho P, Almeida R, Andrade C (1980) Estudo clínico e genético de 25 famílias dos Açores com uma forma particular de heredoataxia. Livro de homenagem ao Professor Arnaldo Sampaio. Ed. Escola Nacional de Saúde Pública, Lisboa, p. 287-300.
- Coyle JT, Ferkany JW, Zaczek R (1983) Kainic acid: insights from a neurotoxin into the pathophysiology of Huntington's disease. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5: 617-624.
- Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, et al (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19: 148-154.
- Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, et al (1999) Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24: 879-892.
- Cummings CJ, Sun Y, Opal P, et al (2001) Overexpression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 10: 1511-1518.
- D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, et al (1995) Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci* 15: 72–93.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205–219.
- David G, Abbas N, Stevanin G, et al (1997) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17: 65-70.

- Davies SW, Beardsall K, Turmaine M, et al (1998) Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet-repeat disorders with polyglutamine-repeat expansions? *Lancet* 351: 131-133.
- Dennis AP, O'Malley BW (2005) Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:139-151.
- Devos D, Schraen-Maschke S, Vuillaume I, et al (2001) Clinical features and genetic analysis of a new form of spinocerebellar ataxia. *Neurol* 56: 234-238.
- De Jaco A, Camp S, Taylor P (2005) Influence of the 5' intron in the control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Chem Biol Interact* 157-158: 372-373.
- Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, et al (2010) Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet*: 42: 313–321.
- Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, et al (2007) The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest* 117: 648–658.
- Dinareello CA (1988) Biology of interleukin 1. *Faseb J* 2: 108-115.
- Döhlinger S, Hauser TK, Borkert J, et al (2008) Magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 7: 204–214.
- Dudding TE, Friend K, Schofield PW, et al (2004) Autosomal dominant congenital non-progressive ataxia overlaps with the SCA15 locus. *Neurology* 63: 2288-2292.
- Dueñas AM, Goold R, Giunti P (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129: 1357-1370.
- Dujmovic I, Mangano K, Pekmezovic T, et al (2009) The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: The elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. *J Neuroimmunol* 207: 101-106.
- Dutta S, Das S, Guhathakurta S, et al (2007) Glutamate receptor 6 gene (GluR6 or GRIK2) polymorphisms in the Indian population: a genetic association study on autism spectrum disorder. *Cell Mol Neurobiol* 27: 1035-1047.
- Egebjerg J, Heinemann SF (1993) Ca⁺² permeability of unedited and edited versions of the kainite selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 755–759.

- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457-463.
- Esteller M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196: 1-7.
- Esteller M (2002) CpG islands hipermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440.
- Esteller M (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 629-656.
- Esteller M (2007) Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hipermethyloome. *Human Molecular Genetics* 16: 50-59.
- Evert BO, Vogt IR, Kindermann C, et al (2001) Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci* 21: 5389-5396.
- Evert BO, Schelhaas J, Fleischer H, et al (2006) Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* 25: 272-81.
- Evert BO, Araujo J, Vieira-Saecker AM, et al (2006) Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci* 26: 11474-11486.
- Feigin A, Zgaljardic D (2002) Recent advances in Huntington's disease: implications for experimental therapeutics. *Curr Opin Neurol* 15: 483-489.
- Ferrante RJ, Kubitius JK, Lee J, et al (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 23: 9418-9427.
- Ferrante RJ, Ryu H, Kubitius JK, et al (2004) Chemotherapy for the brain: the antitumor antibiotic mithramycin prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 24: 10335-10342.
- Ferro A, Carvalho AL, Teixeira-Castro A, et al (2007) NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1619-1627.
- Firdaus WJ, Wytenbach A, Diaz-Latoud C, et al (2006) Analysis of oxidative events induced by expanded polyglutamine huntingtin exon 1 that are differentially restored by

- expression of heat shock proteins or treatment with an antioxidant. *Febs J* 273: 3076–3093.
- Flanigan K, Gardner K, Alderson K, et al (1996) Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. *Am J Hum Genet* 59: 392-399.
- Freed E, Lacey KR, Huie P, et al (1999) Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle. *Genes Dev* 13: 2242–2257.
- Furuichi T, Kohda K, Miyawaki A, Mikoshiba K (1994) Intra cellular channels. *Curr Opin Neurobiol* 4: 294–303.
- Garabedian B, Lemaigre-Dubreuil Y, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1998) Abnormal IL-1beta cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res* 62: 224-227.
- Gardian G, Browne SE, Choi DK, et al (2005) Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171–82Q transgenic mouse model of Huntington’s disease. *J Biol Chem* 280: 556–563.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-282.
- Gardner RJ, Knight MA, Hara K, et al (2005) Spinocerebellar ataxia type 15. *Cerebellum* 4: 47-50.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, et al (2001) Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68: 523-528.
- Gatchel JR, Zoghbi HY (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6: 743-755.
- Graham SH, Chen J (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 99–109.
- Greene E, Mahishi L, Entezam L, et al (2007) Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia *Nucleic Acids Research* 35: 3383–3390.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, et al (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7611–7615.

- Guegan C, Vila M, Rosoklija G, et al (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 21: 6569–6576.
- Gustafsson AB, Gottlieb RA (2007) Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C45–C51.
- Harding AE (1993) Clinical features and classification of the inherited ataxias. *Adv Neurol* 61: 1-14.
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–580.
- Hashimoto K, Miyata M, Watanabe M, Kano M (2001) Roles of phospholipase Cbeta4 in synapse elimination and plasticity in developing and mature cerebellum. *Mol Neurobiol* 23: 69–82.
- Herman D, Jenssen K, Burnett R, et al (2006) Histone Deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* 2: 551-558.
- Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, et al (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 15: 965–977.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, et al (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23: 391-392.
- Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, et al (2007) Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet* 39: 1434–1436.
- Huitinga I, van der Cammen M, Salm L, et al (2000) IL-1b immunoreactive neurons in the human hypothalamus: reduced numbers in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 107: 8–20.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, et al (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38: 184-190.
- Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, et al (1996) Non-mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet* 58: 730-733.
- Iughetti P, Otto PA, Zatz M e Passos-Bueno MR (1998) Different behavior in the paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet* 77: 246-248.

- Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, et al (2002) CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 10: 55–67.
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, et al (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14: 285-291.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al (1997) An Nrf2/smallMaf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313–322.
- Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68: 285-316.
- Jana NR, Dikshit P, Goswami A, et al (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* 280: 11635–11640.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, et al (2001) A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 248: 870-876.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, et al (2001) Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)_n. *Arch Neurol* 58: 899-904.
- Jardim L, Silveira I, Pereira ML, et al (2003) Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurol Scand* 107: 211-214.
- Jardim LB, Hauser L, Kieling C, et al (2010) Progression Rate of Neurological Deficits in a 10-Year Cohort of SCA3 Patients. *Cerebellum*. 2010 May 15. [Epub ahead of print]
- Jenuwein T (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 11: 266-273.
- Jessenberger V, Jentsch S (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 112-121.
- Jia NL, Fei EK, Ying Z et al (2008) PolyQ-expanded ataxin-3 interacts with full-length ataxin-3 in a polyQ length-dependent manner. *Neurosci Bull* 24: 201-208.

- Jones D, Candido EP (2000) The NED-8 conjugating system in *Caenorhabditis elegans* is required for embryogenesis and terminal differentiation of the hypodermis. *Dev Biol* 226: 152–165.
- Jones CI, Bray S, Garner SF, et al (2009) A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways. *Blood* 114: 1405–1416.
- Kamitani T, Kito K, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET (2001) Targeting of NEDD8 and its conjugates for proteasomal degradation by NUB1. *J Biol Chem* 276: 46655–46660.
- Kamradt MC, Chen F, Cryns VL (2001) The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem* 276: 16059–16063.
- Kamradt MC, Chen F, Sam S, Cryns VL (2002) The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277: 38731–38736.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621–663.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8: 221–227.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159–180.
- Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB (2007) Survival estimates for patients with Machado–Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72: 543–545.
- Kieling C, Rieder CR, Silva AC, et al (2008) A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol* 15: 371–376.
- Kim HS, Kim EM, Kim NJ, et al (2004) Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 75: 117–124.
- Kinyamu HK, Chen J, Archer TK (2005) Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J Mol Endocrinol* 34: 281–297.
- Klockgether T, Kramer B, Ludtke R, et al (1996). Repeat length and disease progression in spinocerebellar ataxia type 3. *Lancet* 348: 830.

- Klockgether T, Wullner U, Spauschus A, Evert B (2000) The molecular biology of the autosomal-dominant cerebellar ataxias. *Mov Disord* 15: 604-612.
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89-97.
- Knight MA, Gardner RJ, Bahlo M, et al (2004) Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification: spinocerebellar ataxia type 20. *Brain* 127: 1172-1181.
- Koob MD, Moseley ML, Shut LJ, et al (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21: 379-384.
- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, et al (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluyisian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6: 9-13.
- Kondo K, Kaelin WG (2001) The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res* 264: 117–125.
- Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19: 1176-1179.
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90: 41-54.
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M (1992) Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 1155–1155.
- Kurz T, Pintard L, Willis JH, et al (2002) Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science* 295: 1294–1298.
- La Spada AR (1997) Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol* 7: 943-963.
- Law SF, Estojak J, Wang B, et al (1996) Human Enhancer of Filamentation 1 (HEF1/NEDD9/CAS-L), a novel p130Cas-Like docking protein, associates with FAK, and induces pseudohyphal growth in yeast. *Mol Cell Biol* 16: 3327–3327.
- Lawson MA, Whyte DB, Mellon PL (1996) GATA factors are essential for activity of the neuron-specific enhancer of the gonadotropin-releasing hormone gene. *Mol Cell Biol* 16: 3596–3605.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399: A7-14.

- Lee JG, Dahi S, Mahimkar R, et al (2005) Intronic regulation of matrix metalloproteinase-2 revealed by in vivo transcriptional analysis in ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16345-16350.
- Leefflang EP, McPeck MS, Arnheim N (1996) Analysis of meiotic segregation, using single sperm typing: meiotic drive at myotonic dystrophy locus. *Am J Hum Genet* 59: 896-904.
- Lerer I, Merims D, Abeliovich D, et al (1996) Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *European J Human Genet* 4: 3-7.
- Li DW, Xiang H, Mao YW, et al (2001) Caspase-3 is actively involved in okadaic acid-induced lens epithelial cell apoptosis. *Exp Cell Res* 266: 279-291.
- Li Y, Grupe A, Rowland C, et al (2008) Evidence that common variation in NEDD9 is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 17: 759-67.
- Lima L, Coutinho P (1980) Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a nonazorean Portuguese family. *Neurology* 30: 319-322.
- Lima M, Mayer F, Coutinho P, Abade A (1997) Prevalence, geographic distribution, and genealogical investigation of Machado-Joseph disease in the Azores (Portugal). *Hum Biol* 69: 383-391.
- Lin X, Antalffy B, Kang D, et al (2000) Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat Neurosci* 3: 157-163.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-622.
- Lisboa MFS, Mariotto GSS (1984) Síndrome de Joseph: observação de uma família. *Arq Neuropsiquiatr (Suplemento, Resumo)*, p. 45.
- Liu J, Yao ML, Brosnan CF, Lee SC (1996) Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of Il-1 β and Il-1 receptor antagonist. *J Immunol* 157: 35-69.
- Liu J, Tang TS, Tu H, et al (2009) Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurosci* 29: 9148-9162.
- Lowe J, Mayer J, Landon M, Layfield R (2001) Ubiquitin and the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol* 487: 169-86.

- MacDonald ME, Vonsattel JP, Shrinidhi J, et al (1999) Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 53: 1330-1332.
- Macedo-Ribeiro S, Cortes L, Maciel P, Carvalho AL (2009) Nucleocytoplasmic Shuttling Activity of Ataxin-3. *PLoS ONE* 4: e5834.
- Maciel P, Lopes-Cendes I, Kish S, Sequeiros J, Rouleau GA (1997) Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. *Am J Hum Genet* 60: 993-996.
- Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, et al (2005) Gene expression profiling of sporadic Parkinson's disease substantia nigra pars compacta reveals impairment of ubiquitin-proteasome subunits, SKP1A, aldehyde dehydrogenase, and chaperone HSC-70. *Ann NY Acad Sci* 1053: 356-375.
- Mantuano E, Veneziano L, Jodice C, Frontali M (2003) Spinocerebellar ataxia type 6 and episodic ataxia type 2: differences and similarities between two allelic disorders. *Cytogenet Genome Res* 100: 147-153.
- Mao YW, Liu JP, Xiang H, Li DW (2004) Human aA- and aB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11: 512-526.
- Mao Y, Senic-Matuglia F, Di Fiore PP, et al (2005) Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12700-12705.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58: 365-370.
- Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, et al (2008) Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum* 7: 184-188.
- Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, et al (2006) Transcriptional profiling of human cord blood CD133⁺ and cultured bone marrow 766 Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 5 marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells* 25: 1003-1012.
- Martins S, Coutinho P, Silveira I, et al (2008) Cis-acting factors promoting the CAG intergenerational instability in Machado-Joseph disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147: 439-446.

- Masino L, Musi V, Menon RP, et al (2003) Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett* 549: 21–25.
- Matilla A, Gorbea C, Einum DD, et al (2001) Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex. *Hum Mol Genet* 10: 2821-2831.
- Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, (1996) Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 379: 168–171.
- Matsumoto M, Nagata E (1999) Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor knock-out mice: Their phenotypes and their meaning in neuroscience and clinical practice. *J Mol Med* 77: 406–411.
- Matsumoto M, Yada M, Hatakeyama S, et al (2004) Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J* 23: 659–669.
- Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, et al (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26: 191-194.
- Mattson MP, Sherman M (2003) Perturbed signal transduction in neurodegenerative disorders involving aberrant protein aggregation. *Neuromolecular Med* 4: 109–132.
- McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, et al (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9: 2197-2202.
- McDonald JW, Johnston MV, Young AB (1990) Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp Neurol* 110: 237-247.
- McManus CM, Brosnan CF, Berman JW (1998) Cytokine induction of MIP-1 α and MIP-1 β in human fetal microglia. *J Immunol* 160: 1449–1455.
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, et al (1993) Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151: 21–23.
- Miller LG, Fahey JM (1994) Interleukin-1 modulates GABAergic and glutamatergic function in brain. *Ann NY Acad Sci* 739: 292–298.
- Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, et al (2005) CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci* 25: 9152–9161.
- Minami M, Kuraishi Y, Satoh M (1991) Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha, and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 593–598.

- Minegishi M, Tachibana K, Sato T, et al (1996) Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta-1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med* 184: 1365–1365.
- Miura S, Shibata H, Furuya H, et al (2006) The contactin 4 gene locus at 3p26 is a candidate gene of SCA16. *Neurology* 67: 1236-1241.
- Monckton DG, Cayuela ML, Gould FK, et al (1999) Very large (CAG)(n) DNA repeat expansions in the sperm of two spinocerebellar ataxia type 7 males. *Hum Mol Genet* 8: 2473-2478.
- Mori F, Nishie M, Wakabayashi K, et al (2005) Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 53–61.
- Muchowski PJ, Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 6: 11–22.
- Mulle C, Sailer A, Swanson GT, et al (2000) Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28: 475–484.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, et al (2001) SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10: 1441-1448.
- Nakamura M, Sato K, Fukaya M, et al (2004) Signaling complex formation of phospholipase C β 4 with metabotropic glutamate receptor type 1 α and 1,4,5-trisphosphate receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 20: 2929–2944.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597-603.
- Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972) Machado Disease: A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22: 49-55.
- Nakao, M (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278: 25-31.
- Nance MA (1997) Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathol* 7: 881-900.
- Netravathi M, Pal PK, Purushottam M, et al (2009) Spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3: age adjusted clinical severity of disease at presentation correlates with size of CAG repeat lengths. *J Neurol Sci* 277: 83-86.

- Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, et al (2000) Influence of interleukin-1b gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 284: 73-76.
- Nishimura M, Kawakami H, Maruyama H, et al (2001) Influence of interleukin-1b gene polymorphism on age-at-onset of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6) in Japanese patients. *Neuroscience Letters* 307: 128-130.
- Nishiyama K, Murayama S, Goto J, et al (1996) Regional and cellular expression of the Machado-Joseph disease gene in brains of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 40: 776-781.
- Nuber S, Petrasch-Parwez E, Winner B, et al (2008) Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28: 2471-2484.
- Nucifora FC, Sasaki M, Peters MF, et al (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291: 2423-2428.
- Ohh M, Kim WY, Moslehi JJ, et al (2002) An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* 3: 177-182.
- Ohtsubo T, Kamada S, Mikami T, et al (1999) Identification of NRF2, a member of the NF-E2 family of transcription factors, as a substrate for caspase-3(-like) proteases. *Cell Death Differ* 6: 865-872.
- Okazawa H (2003) Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell Mol. Life Sci* 60: 1427-1439.
- Orr H, Chung M-Y, Banfi S, et al (1993) Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4: 221-226.
- Osaka F, Saeki M, Katayama S, et al (2000) Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J* 19: 3475-3484.
- Ou CY, Lin YF, Chen YJ, Chien CT (2002) Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cull1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev* 16: 2403-2414.
- Ozanne SE, Constancia M (2007) Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 539-546.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54: 581-618.

- Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, et al (2004) Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene* 23: 1985–1997.
- Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, et al (1996) Amyloid h peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates Bax expression in human neurons. *J Neurosci* 16: 7533–7539.
- Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, et al (1998) Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* 18: 1009–1019.
- Paschen W, Hedreen JC, Ross CA (1994) RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in human brain tissue. *J Neurochem* 63: 1596-1602.
- Paulson HL (1998) Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. In Rubinsztein DC and Hayden MR (eds) *Analysis of Triplet Repeat Disorders*. Bios, Oxford, pp 129-144.
- Paulson H, Subramony SH. Spinocerebellar ataxia 3-Machado-Joseph disease (SCA 3). In: Pulst SM. *Genetics of Movement Disorders*. Academic Press, Amsterdam, 2003, p. 57-70.
- Perry VH, Bolton SJ, Anthony DC, Betmouni S (1998) The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. *Res Immunol* 149: 721–725.
- Perutz MF, Windle AH (2001) Cause of neural death in neurodegenerative diseases attributable to expansion of glutamine repeats. *Nature* 412: 143-144.
- Pietrobon D (2002) Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 25: 31-50.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26.
- Pociot F, Mølviig J, Wogensen L, et al (1992) A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 22: 396-402.
- Pozzi C, Valtorta M, Tedeschi G, et al (2008) Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 30: 190-200.
- Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Silveira I, et al (2008) Machado-Joseph disease enhances genetic fitness: a comparison between affected and unaffected women and between MJD and the general population. *Ann Hum Genet* 72: 57-64.

- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, et al (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14: 269-276.
- Radvany J, Avila JO, Gabbai AA, Bacheschi LA (1988) Doença de Machado-Joseph: as duas primeiras famílias relatadas no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr* 46 (Suplemento, Resumo): p. 152.
- Radvany J, Fonseca NC, Camargo CHP (1990) Doença de Machado-Joseph: descrição da terceira família no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr* 48B (Suplemento, Resumo), p. 423.
- Radvany J, Camargo CHP, Costa ZM, et al (1993) Machado-Joseph disease of Azorean ancestry in Brazil: The Catarina Kindred. Neurological, Neuroimaging, Psychiatry and Neuropsychological findings in the largest known family, the "Catarina" kindred. *Arq Neuropsiquiatr* 51: 21-30.
- Ranum LP, Day JW (2002) Dominantly inherited, non-coding microsatellite expansion disorders. *Curr Opin Genet Dev* 12: 266-271.
- Razin A, Shemer R (1995) DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 4: 1751-1755.
- Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415-1430.
- Richards RI (2001) Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic diseases. *Hum Mol Genet* 10: 2187-2194.
- Robakis NK (2003) An Alzheimer's disease hypothesis based on transcriptional dysregulation. *Amyloid* 10: 80-85.
- Robert A Saul, Jack C Tarleton. FMR1-Related Disorders. *GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource* [database online]. University of Washington, Seattle, last revision 08/05/08, www.geneclinics.org
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Coutinho P, Bay C (1978) Joseph's disease: an autosomal dominant neurological disease in the Portuguese of the United States and the Azores Islands. *Adv Neurol* 21: 33-57.
- Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: 10-17.
- Rosser MF, Washburn E, Muchowski PJ, et al (2007) Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 282: 22267-22277.
- Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S (1996) Cytokines and their receptors in the CNS: physiology, pharmacology and pathology. *Pharmacol Ther* 69: 85-95.

- Rothwell N, Allan S, Toulmond S (1997) Perspective series: cytokines and the brain. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest* 100: 2648-2652.
- Rüb U, Brunt ER, Deller T (2008) New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 21: 111-116.
- Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, et al (1997) Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3872-3876.
- Rujano MA, Kampinga HH, Salomons FA (2007) Modulation of polyglutamine inclusion formation by the Hsp70 chaperone machine. *Exp Cell Res* 313: 3568–3578.
- Ryu H, Lee J, Hagerty SW, et al (2006) ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19176–19181.
- Sachdev HS, Forno LS, Kane CA (1982) Joseph disease: a multisystem degenerative disorder of the nervous system. *Neurology* 32: 192-195.
- Saegusa H, Wakamori M, Matsuda Y, et al (2007) Properties of human Cav2.1 channel with a spinocerebellar ataxia type 6 mutation expressed in Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 34: 261-270.
- Sakahira H, Breuer P, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2002) Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16412-16418.
- Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, Rossant J (1987) Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev* 1: 1039–1046.
- Sanpei K, Takano H, Igarashi S, et al (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 14: 277-284.
- Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, et al (2005) Nedd9 Protein, a Cas-L Homologue, Is Upregulated After Transient Global Ischemia in Rats. Possible Involvement of Nedd9 in the Differentiation of Neurons After Ischemia. *Stroke* 36: 2457–2462.

- Sato N, Amino T, Kobayashi K, et al (2009) Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)_n. *Am J Hum Genet*: 544-557.
- Schelhaas HJ, Ippel PF, Beemer FA, Hageman G (2000) Similarities and differences in the phenotype, genotype, and pathogenesis of different spinocerebellar ataxias. *Eur J Neurol* 7: 309-314.
- Schöls L, Szymanski S, Peters S, et al (2000) Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia. *Hum Genet* 107: 132-137.
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, et al (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3: 291-304.
- Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, et al (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51: 302-310.
- Schmitt I, Linden M, Khazneh H, et al (2007) Inactivation of the mouse *Atnx3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 734–739.
- Schmitz-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, et al (2006) Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology* 66: 1717–1720.
- Scrabble H, Stambrook PJ (1997) Activation of the lac repressor in the transgenic mouse. *Genetics* 147: 297–304.
- Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122: 1-29.
- Sharp AH, McPherson PJ, Dawson TM, et al (1993) Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodinesensitive Ca²⁺ release channels in rat brain. *J Neurosci* 13: 3051–3063.
- Shuang M, Liu J, Jia MX, et al (2004) Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 131: 48–50.
- Singh M, Cowell L, Seo S, et al (2007) Molecular basis for HEF1/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional co-ordinator of invasion, apoptosis and cell cycle. *Cell Biochem Biophys* 48: 54-72.

- Siyanova EY, Mirkin SM (2001) Expansion of trinucleotide repeats. *Mol Biol* 35: 168-182.
- Smith TC, Wang LY, Howe JR (1999) Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature cerebellar granule cells. *J Physiol* 517: 51–58.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, et al (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413: 739-743.
- Steinbach P, Glaser D, Vogel W, et al (1998) The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *Am J Hum Genet* 62: 278-285.
- Stevanin G, Broussolle E, Streichenberger N, et al (2005) Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25). *Cerebellum* 4: 58-61.
- Stoevring B, Frederiksen JL, Christiansen M (2007) CRYAB promoter polymorphisms: influence on multiple sclerosis susceptibility and clinical presentation. *Clin Chim Acta* 375: 57-62.
- Street VA, Bosma MM, Demas VP, et al (1997) The type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene is altered in the opisthotonos mouse. *J Neurosci* 17: 635–645.
- Surmeier DJ (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 6: 933–938.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, et al (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1: 397–400.
- Swartz BE, Burmeister M, Somers JT, et al (2002) A form of inherited cerebellar ataxia with saccadic intrusions, increased saccadic speed, sensory neuropathy, and myoclonus. *Ann NY Acad Sci* 956: 441-444.
- Takahashi JL, Giuliani F, Power C, et al (2003) Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol* 53: 588–595.
- Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al (1995) Evidence for intergenerational instability in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Molec Genet* 4: 1137-1146.
- Takiyama Y, Sakoe K, Nakano I, Nishizawa M (1997) Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the ATXN3 gene. *Neurology* 49: 604-606.

- Tait D, Riccio M, Sittler A, et al (1998) Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet* 7: 991–997.
- Tanaka K, Suzuki T, Chiba T (1998) The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Mol Cells* 8: 503–512.
- Tang TS, Tu H, Chan EY, et al (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39: 227–239.
- Tang TS, Guo C, Wang H, et al (2009) Neuroprotective effects of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor C-terminal fragment in a Huntington's disease mouse model. *J Neurosci* 29: 1257-1266.
- Tateishi K, Omata M, Tanaka K, Chiba T (2001) The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol* 155: 571–579.
- Taylor JP, Taye AA, Campbell C, et al (2003) Aberrant histone acetylation, altered transcription, and retinal degeneration in a *Drosophila* model of polyglutamine disease are rescued by CREB-binding protein. *Genes Dev* 17: 1463–1468.
- Teive HA, Arruda WO, Trevisol PC (1991) Doença de Machado-Joseph: descrição de cinco membros de uma família. *Arq Neuropsiquiatr* 49: 172-179.
- Tetzlaff JE, Putchá P, Outeiro TF, et al (2008) CHIP Targets Toxic α -Synuclein Oligomers for Degradation. *J Biol Chem* 283: 17962–17968.
- Trott A, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML, et al (2006) Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet* 70: 173-176.
- Trouillas P, Takayanagi T, Hallett M, et al (1997) International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *Journal of the Neurological Sciences* 145: 205–211.
- Turek-Plewa J, Jagodzinski PP (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 10: 631-647.
- Turker MS (1999) The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin Cancer Biol* 9: 329–337.
- van Alfen N, Sinke RJ, Zwarts MJ, et al (2001) Intermediate CAG repeat lengths (53, 54) for MJD/SCA 3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol* 49: 805-808.

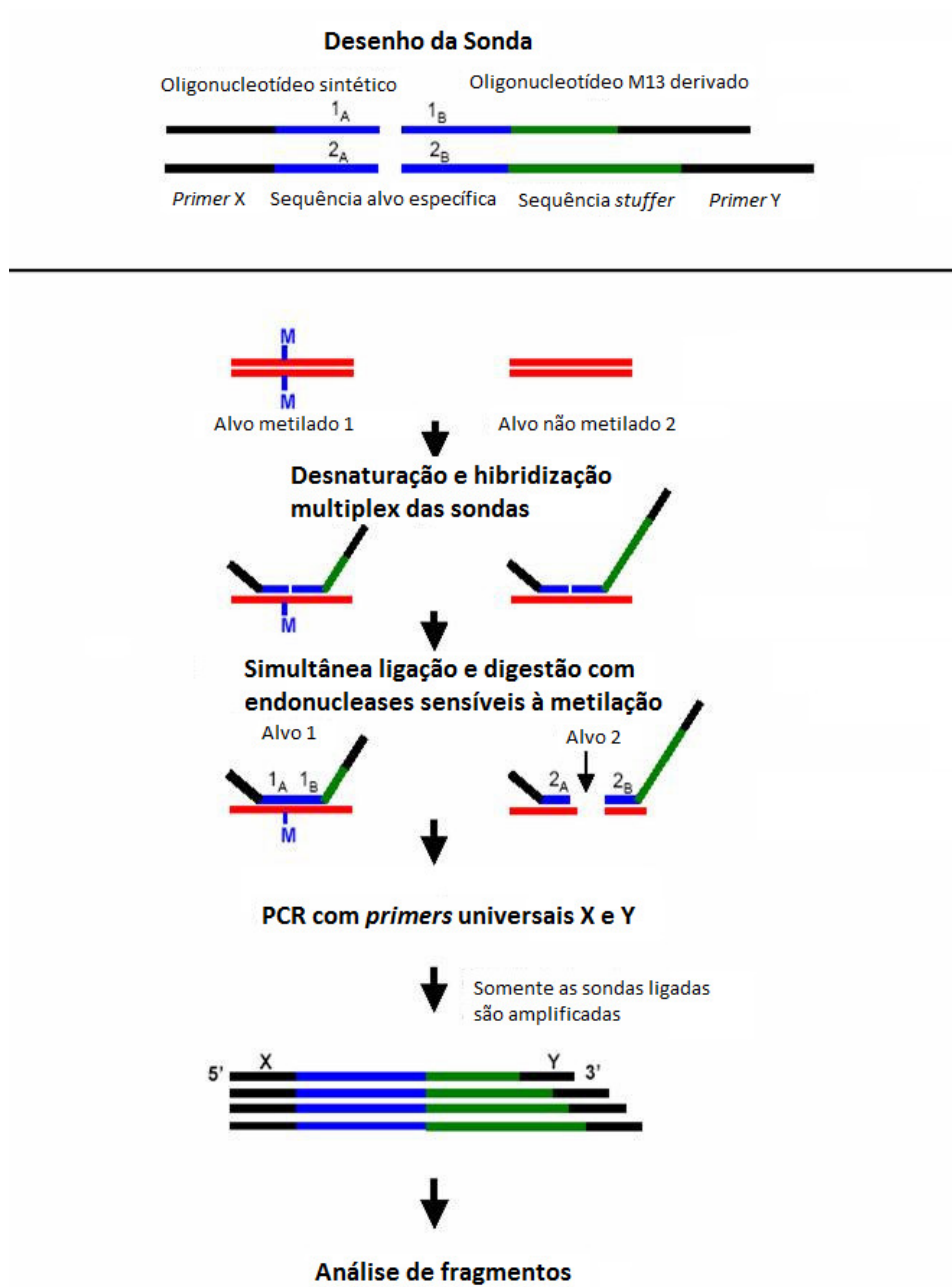
- van de Leemput J, Chandran J, Knight MA, et al (2007) Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS Genet* 3: e108.
- van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC (2002) Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58: 702-708.
- van Schaik IN, Jöbssis GJ, Vermeulen M, et al (1997) Machado-Joseph disease presenting as severe asymmetric proximal neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 534-536.
- van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM (2003) A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 72: 191-199.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Venugopal R, Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14960–14965.
- Verbeek DS, Schelhaas JH, Ippel EF, et al (2002) Identification of a novel SCA locus (SCA19) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21. *Hum Genet* 111: 388-393.
- Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Wesseling P, et al (2004) Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3. *Brain* 127: 2551-2557.
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C (2000) ‘Inflammatory’ cytokines: neuromodulators in the normal brain? *J Neurochem* 74: 457–471.
- Vogel T, Ahrens S, Büttner N, Kriegelstein K (2009) Transforming Growth Factor {beta} Promotes Neuronal Cell Fate of Mouse Cortical and Hippocampal Progenitors In Vitro and In Vivo: Identification of Nedd9 as an Essential Signaling Component. *Cereb Cortex* 20: 661-671.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068.
- Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, et al (2002) A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol* 52: 666-670.
- Waggoner D (2007) Mechanisms of disease: Epigenesis. *Semin Pediatr Neurol* 14: 7-14.

- Walden H, Podgorski MS, Huang DT, et al (2003) The structure of the APPBP1–UBA3–NEDD8–ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol Cell* 12: 1427–1437.
- Wang J, Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Oldreld EH (1994) Intrastriatal implantation of interleukin-1: reduction of parkinsonism in rats by enhancing neuronal sprouting from residual dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain. *J Neurosurg* 80: 484-490.
- Wang S-C, Oelze B, Schumacher A (2008) Age-Specific Epigenetic Drift in Late-Onset Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 3: e2698.
- Warrick JM, Chan HYE, Gray-Board YH, et al (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 23: 425–428.
- Warrick JM, Morabito LM, Bilen J, et al (2005) Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell* 18: 37–48.
- Watanabe G, Kato S, Nakata H, et al (2009) AlphaB-crystallin: A novel p53-target gene required for p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* 100: 2368-2375.
- Watase K, Barrett CF, Miyazaki T, et al (2008) Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant CaV2.1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11987-11992.
- Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, et al (2006) Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet* 38: 447-451.
- Weinhold B (2006) Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect* 114: 160-167.
- Williams AJ, Knutson TM, Gould VFC, Paulson HL (2009) In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis. *Neurobiol Dis* 33: 342-353.
- Woods BT, Schaumburg HH (1972) Nigro-spinal-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J. Neurol Sci* 17:149-166.

- Worth PF, Giunti P, Gardner-Thorpe C, et al (1999) Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3. *Am J Hum Genet* 65: 420-426.
- Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, et al (1998) Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 18: 1363– 1373.
- Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, et al (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118: 83–97.
- Yang X, Yan L, Davidson NE (2001) DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8: 115-127.
- Yang TT, Hsu CT, Kuo YM (2009) Cell-derived soluble oligomers of human amyloid-beta peptides disturb cellular homeostasis and induce apoptosis in primary hippocampal neurons. *J Neural Transm* 116: 1561-1569.
- Yeh ET, Gong L, Kamitani T (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248: 1–14.
- Yu GY, Howell MJ, Roller MJ, et al (2005) Spinocerebellar ataxia type 26 maps to chromosome 19p13.3 adjacent to SCA6. *Ann Neurol* 57: 349-354.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, et al (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15: 62-69.
- Zijlstra MP, Rujano MA, Van Waarde MA, et al (2010) Levels of DNAJB family members (HSP40) correlate with disease onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Eur J Neurosci* [Epub ahead of print].
- Zoghbi HY (2000) Spinocerebellar ataxias. *Neurobiol Dis* 7: 523-527.

7. ANEXOS

ANEXO I – Estratégia utilizada pela técnica MS-MLPA



Adaptado de <http://www.mrc-holland.com>

ANEXO II – Sequência de nucleotídeos do promotor do gene *ATXN3*

| | |
|--|-------|
| TGCTACCTCCCCGTCTCCACAAATTTATGGGACTTCTAAGTTCCCTCTAAAGGGTCCGAACACCTACA | -1020 |
| CTGGTAAACAAGCCACCTGGATTGAATCCTGGCAAGACAATTACTATCTGACCTTGGACATTGTGCTGT | -950 |
| TCTTAACCTCTCCGTGCCTCGGTTTCCTCATGTGTATGAATAACATCAACACCTACATCAAAGTTTGCTG | -880 |
| TATTAAATTTGATAATAATATGCAAAGCATTAGAAAAGTGCCTAGCTCATAGAAAGCCTTATGTAAATAT | -810 |
| TAATATCAATTTTTTTCTTTTTGGGGTGGTGGGGGAGGGGTTTCGCTTTTGTGGCCAGGCTGGCGTG | -740 |
| CAATGGCACGATCTCGGCTCACCACAACCTCGGCCTCCGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGGCTCC | -670 |
| CGAGTACCTGGGATTACAGGCATGCACCACCACGCCCGGTAATTTTGTATTTTGTAGTGAGACGGGGTT | -600 |
| TCTCCATGTTTGGTCAGGCTGATCTCAAACCTCCGACCTCAGGTGATCCGCCCGCCTCGGCCTCCAAAGT | -530 |
| GTCGGGATTACAAGCGTGAAGCACCTCGCCCGCCTAGCTATCATTTTTATACAAGTGTGGGTTTGGG | -440 |
| AGAATGTAATGATGGCTTTTTTCTTACTAACTTTTCAGTGCAGGAGGAGGAGAAAGAAAGTAAATAGTTA | -390 |
| TATGAACACAGTAGAAAGTCAAAGTGGAACAAAGAAAGAACATAGAACCAGGTGAGCGGTCCAGACCTC | -320 |
| CCCCAGAAACCTAAGAATCCATAGAAATGGGTGGGAAGCGGAGAAGATCCTCCAGACAGCAGGTGGCGA | -250 |
| TGTAGCATCCCCAGAAGGCCCGCTAACAGAAGCTAGGAGGACCGTACCAAGGTCACGTGTCCCGGC | -180 |
| GTTCACTCGCTTTCGCTTCACGACACTCGCATCCTCACGGGTGATTGGTCTGCGTGCAGGACGTGGGGC | -110 |
| GGGTACCGGGCGGGCCCGGGGAGGGGCGGGTGGGCGGAGGAGAGGGGCAGGGGGCGGAGCTGGAGGGG | -40 |
| TGGTTCGGCGTGGGGCCGTTGGCTCCAGACAAATAACA | +1 |

As duas ilhas CpG estão indicadas pelos quadrados. Os dinucleotídeos CpG estudados neste trabalho estão indicados pela linha contínua. A repetição Alu está marcada pela linha pontilhada acima. O ponto de início da transcrição está na posição -89 e o primeiro nucleotídeo do códon iniciador está designado como +1.

ANEXO III - Sondas MS-MLPA para o promotor do gene *ATXN3*

| Nome da sonda | Oligonucleotídeos da sonda esquerda | |
|---------------|--|--------------------------------------|
| | Sequência complementar ao primer direito | Sequência de hibridização |
| 1 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | GCGTGAAGCACCTCGCCCCGGCCT |
| 2 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | GGAGAAAGATCCTCCAGACAGCAGGTGGCGA |
| 3 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | GAAAGCTAGGAGGACGGCGCTACCA |
| 4 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | CACGGGTGATTGGTCTGGGTGGGCACGTGGGC |
| Controle 1 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | GCAGGTGGAAAACCATGAATTCCTTGTAA |
| Controle 2 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | GGATCTGATTCCTCTGAAAGATACCGTTAATAAGGC |
| Controle 3 | GGGTTCCCTAAGGGTTGGA | CTATGAAAGGAAGCGGTTCCGAAGCTGCTA |

| Nome da sonda | Oligonucleotídeos da sonda direita | |
|---------------|--|------------------------|
| | Sequência de hibridização, 5' fosforilada | Sequência "stuffer" |
| 1 | AGCTATCATTTTATACAAATGCTGGGTTTTGGGAGAAATGT | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |
| 2 | TGTAGCATCCCCAGAAAGCCCGCTAACAGAAAGCTAGGAG | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |
| 3 | AGGTCAAGTGTCCCCGGGTTCACTCGCTCTTCGGCTT | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |
| 4 | GGGGTACCGGGGGGGCCGGGAG | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |
| Controle 1 | AACCTTCAATTGATCCTAAATCTCAGTGAATTAAGAGAAATAAT | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |
| Controle 2 | AACTTATTGCAGGTGAGTCAAAGAGAACCTTTGTCTATGA | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |
| Controle 3 | GTCTGAGCTCCCTGAACTCCTCAGAGTCAAGACAAAAGACCAGGAC | TCTAGATTGGATCTTGTGGCAC |

ANEXO IV – Características dos SNPs analisados neste trabalho

| Gene | Localização cromossômica | dbSNP ID | Localização genômica | Localização gênica | Sequência da sonda (fluoróforo [VIC/FAM]) |
|--------------|--------------------------|------------|----------------------|--------------------|---|
| <i>BAX</i> | 19q13.3-q13.4 | rs1805419 | g.21727322A>G | intron 3 | GGAGCTGCAGAGGTTGTGGGCCCTG[A/G]GGACCCAGAAAGTCCAGCCACTGGGC |
| <i>CRYAB</i> | 11q23 | rs14133 | g.15345113G>C | região promotora | TCTGAGCCGGCCAGTGACTTGTCA[T/C/G]GTCCTTGTTCAGCTTCTGTCTCC |
| <i>GRIK2</i> | 6q16.3 | rs2227281 | g.6672653C>T | intron 14 | CTTGAAA TACTTAACATAACCTCT[C/T]TTCTTAGGTTCTCCATATCGAGAC |
| <i>IL1B</i> | 2q14 | rs16944 | g.3343530A>G | região promotora | TACCTGGGTGCTGTTCTCTGCCT[C/G/A]GGAGCTCTCTGTCAAATTGCCAGGAGC |
| <i>ITPR1</i> | 3p26-p25 | rs17786144 | g.4769575T>C | intron 48 | CGAGTCTACCCACCAGTAGCAAATAG[C/T]CTTAGTAAAAGGTTTCAAAAAGATGAA |
| <i>NEDD8</i> | 14q12 | rs2144487 | g.5696785C>T | intron 1 | AAAAATTAGATCTTATAAAAAGGACCA[C/T]GTAATTTTAAATGACTCTAAAAGAAAT |
| <i>NEDD9</i> | 6p25-p24 | rs760678 | g.11274654C>G | região promotora | ATTAACCTGAATTTGTACAAAATCGGG[C/G]AAGATAAGGGTGCCTGTTTCTC |
| <i>CHIP</i> | 16p13.3 | rs12599315 | g.669831C>T | região promotora | CGTTACCGCCAGGGGCGGAGGCGG[C/T]GGCTGGGGCGGGCCCTCTGCTGAT |
| <i>CHIP</i> | 16p13.3 | rs6597 | g.671725T>G | intron 3 | AATGTGGGGAAGTGTGGATGTTAGC[G/T]CTGAGATTGGGGTGTGGTCAAGACAT |
| <i>CHIP</i> | 16p13.3 | rs11558085 | g.670620A>G | éxon 1 | CCCCGAGCGCGCAGGAGCTCAAAGGAG[C/A/G]GGGCAATCGTCTGTTCGTGGGCGCA |
| <i>CHIP</i> | 16p13.3 | rs11861355 | g.671517C>T | éxon 3 | CTCTTCGAAATCGCGAAGAAGAAGCG[C/T]TGGAAACAGCATTGAGGAGCGGCGCA |
| <i>CHIP</i> | 16p13.3 | rs3204090 | g.672465G>A | éxon 7 | AGGTTATTGACCGCATTCACTCTGA[A/G]AATGGCTGGGTGGAGGACTACTGAG |

ANEXO V – Figura esquemática da fisiopatologia e da possível atuação dos genes candidatos a modificadores

