

## RESUMO

A ataxia espinocerebelosa tipo 14 (SCA14) é uma doença neurodegenerativa, com modo de transmissão autossómico dominante, causada por mutações no gene *PRKCG* que codifica a enzima PKC $\gamma$ . Caracteriza-se clinicamente pela apresentação de ataxia progressiva da marcha e dos membros, disartria e alteração dos movimentos oculares.

O presente trabalho teve por objectivo o rastreio de mutações na sequência codificante do gene *PRKCG*, bem como de parte das respectivas sequências intrónicas flanqueantes, numa série de doentes portugueses com ataxia espinocerebelosa. Este é o primeiro estudo da totalidade da sequência do gene, constituído por 18 exões, num grupo de indivíduos portugueses.

Dos 60 doentes estudados, nos quais tinha sido excluída a presença de uma expansão CAG nos *loci* SCA 1, 2, 3/MJD, 6, 7, 17 e DRPLA, responsável pela maioria dos casos de ataxia espinocerebelosa, 54 correspondem a casos índice de famílias com ataxia cerebelosa com transmissão dominante (ADCA) e, os restantes 6 casos não possuem, aparentemente, história familiar da doença.

A pesquisa de mutações foi realizada por PCR e sequenciação directa dos produtos amplificados.

Em três dos casos índice familiares foram identificadas novas mutações na região reguladora, uma no exão 3 (no sub-domínio C1A da PKC $\gamma$ ) e duas no exão 4 (em C1B). As mutações *missense* c.234C>A (p.His78Gln), c.319A>G (p.Ser107Gly) e c.349T>A (p.Cys117ser) são descritas, pela primeira vez, neste trabalho.

Embora a análise de co-segregação da mutação com a doença nas famílias ainda não tenha sido concluída, para duas destas mutações foi possível confirmar a sua segregação noutra elemento afectado da família. A avaliação da causalidade das alterações detectadas, pela utilização de diversas ferramentas bioinformáticas, sugere um efeito patogénico para as três mutações. Clinicamente, todos os casos identificados com mutações no gene *PRKCG* detectadas neste estudo apresentam ataxia cerebelosa progressiva pura, com início tardio da doença.

O facto de 3 dos 54 casos de ataxia cerebelosa com transmissão dominante apresentarem mutações no gene *PRKCG* sugere que no diagnóstico diferencial se efectue o rastreio da SCA14 em doentes com ADCA, nos quais não foram detectadas as mutações responsáveis pelas SCAs mais frequentes.

Os resultados obtidos confirmam o domínio regulador C1 da PKC $\gamma$  (com 80,6% do total de mutações descritas) mas, especialmente, o C1B (64,5% do total) como um *hot-spot* mutacional. A pesquisa de mutações no gene *PRKCG* deverá ser efectuada de forma sequencial, de acordo com a distribuição das mutações descritas no gene, iniciando-se pelo

rastreamento dos exões 4 e 5 (sub-domínio C1B), sendo depois alargada aos exões 1, 2 e 3 (sub-domínio C1A e pseudo-substrato), exões 10 (motivo rico em resíduos de glicina no domínio cinase C3) e 18 (domínio AGC-cinase C-terminal) e, caso não sejam detectadas mutações, aos restantes exões do gene.

Palavras chave: Ataxia espinocerebelosa; Diagnóstico genético; Neurodegeneração

## ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder, caused by mutations in the *PRKCG* which encodes the PKC $\gamma$  enzyme. It is clinically characterized by progressive gait and limb ataxia, dysarthria and abnormal eye movements.

The objective of this work was to screen mutations in the coding as well the intronic flanking sequences of the *PRKCG* gene in a series of portuguese patients presenting spinocerebellar ataxia. This is the first study of the complete coding sequence of the gene, composed by 18 exons, in a group of of Portuguese patients.

In the series of 60 portuguese patients studied, negative for the presence of an expansion at the SCAs 1, 2, 3 (MJD), 6, 7, 17 and DRPLA *loci*, responsible for the majority of the spinocerebellar ataxia cases, 54 are index cases of families with spinocerebellar autosomal dominant ataxia (ADCA) and 6 cases had no apparent family history for the disease.

Mutations were screened by PCR and sequencing analysis of the amplified products.

Three index familial cases presented new mutations at the regulatory region, one in exon 3 (at PKC $\gamma$  C1A sub-domain) and two in exon 4 (at C1B). The *missense* mutations reported for the first time in this work are c.234C>A (p.His78Gln), c.319A>G (p.Ser107Gly) and c.349T>A (p.Cys117ser).

Though the analysis of co-segregation of the mutation and the disease in the families is not concluded, two of these mutations have been confirmed in an additional patient from the family. Several bioinformatic software's suggested a pathogenic effect for the mutations detected in our research. Clinically, all the cases presented progressive pure cerebellar ataxia and late onset of the disease.

The fact that 3 of 54 of the family cases presented mutations at the *PRKCG* gene suggests that SCA14 test should be performed in the differential diagnosis of ADCA patients, already tested for the most common SCA types.

These results confirm the C1 regulatory region of PKC $\gamma$  (where 80,6% of the total mutation described locate), specially, C1B (64,5% of the total) as a mutational hot-spot. Mutation screening of the *PRKCG* gene should begin with the study of exons 4 and 5 (C1B sub-domain), followed by exons 1, 2 and 3 (C1A sub-domain), then 10 (glycine rich motif in the C3 kinase domain) and 18 (AGC-kinase C-terminal domain) and, subsequently, the remaining exons of the gene.

Keywords: Spinocerebellar ataxia; Genetic diagnosis; Neurodegeneration

## **Agradecimentos**

Ao Professor Jorge Sequeiros, por me ter dado a possibilidade de fazer investigação na UnIGENE.

À Professora Doutora Manuela Alvarez por todo o apoio, disponibilidade e incentivo, sempre demonstrados ao longo deste tempo, especialmente importantes nas alturas mais complicadas do trabalho e escrita.

À Doutora Isabel Alonso por me ter permitido trabalhar num tema fascinante, as ataxias espinocerebelosas, em especial a SCA14, e pela disponibilidade e ajuda prestadas, não só durante o trabalho prático, mas também durante a fase de escrita desta dissertação.

Ao Dr. Pinto-Basto pelo apoio na selecção dos doentes estudados.

Aos meus colegas na UnIGENE e CGPP, pelos bons momentos passados em conjunto.

Aos meus colegas de mestrado, pela ajuda mas, sobretudo, pela boa recordação dos tempo de estudante em Coimbra.

Aos meus familiares em Coimbra e na Lousã, por me terem sempre acolhido com carinho nas minhas deslocações à Universidade de Coimbra. Recordo com imensa saudade as gargalhadas desses tempos.

Aos meus amigos, pela paciência, preocupação e incentivo, pelo riso e os bons momentos.

Aos meus queridos pais, por tudo.

# ÍNDICE

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
Agradecimentos .....	4
Índice.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABELAS .....	8
ABREVIATURAS.....	8
1. Introdução.....	11
1.1. Ataxia e cerebelo.....	11
1.1.1 Cerebelo, córtex cerebeloso e células de Purkinje .....	11
1.1.2. Etiologia da ataxia cerebelosa .....	14
1.1.3 Ataxias espinocerebelosas .....	14
1.2. Ataxia espinocerebelosa do tipo 14.....	15
1.2.1. Caracterização da doença .....	15
1.2.2. Do gene PRKCG à estrutura e função da proteína cinase C $\gamma$ .....	17
1.2.2.1 Mapeamento do gene PRKCG .....	17
1.2.2.2 Estrutura da proteína cinase C $\gamma$ (PKC $\gamma$ ).....	18
Domínio regulador.....	19
i.Pseudo-substrato .....	19
ii.Domínios C1A e C1B.....	19
iii.Domínio C2.....	23
Domínio catalítico.....	24
i.Domínio cinase C3/C4.....	24
ii.AGC-cinase C-terminal.....	24
1.2.2.3 Ciclo de vida da PKC $\gamma$ : maturação, activação e degradação .....	25
1.2.2.4 Variantes descritas no gene PRKCG.....	27
1.2.2.5. Função da PKC $\gamma$ e hipóteses para a patogénese na SCA14 .....	30
2. Objectivos do trabalho .....	37
3. Amostras e metodologia .....	37
3.1. Amostras estudadas.....	38
3.2. Rastreio de mutações no gene PRKCG .....	39
3.2.1. Extração do DNA genómico.....	39
3.2.2. Estratégia para sequenciação do gene <i>PRKCG</i> .....	39
3.2.2.1. Amplificação por PCR .....	39
Definição dos amplicões.....	39
Desenho dos <i>primers</i> .....	40
Condições de amplificação por PCR.....	41
Confirmação da amplificação por PCR.....	42
3.2.2.2. Purificação das cadeias amplificadas.....	42
3.2.2.3. Reacção de sequenciação .....	42
Purificação dos produtos sequenciados .....	43
Electroforese .....	43
3.2.3. Análise dos resultados.....	43
3.3. Estudo bioinformático das alterações detectadas .....	43

3.3.1.	Avaliação da possível patogenicidade das substituições não-sinónimas .....	43
3.3.2.	Avaliação da possível alteração no mecanismo de <i>splicing</i> do mRNA.....	47
3.4.	Estudo haplotípico .....	48
4.	Resultados.....	49
4.1.	Análise molecular do gene <i>PRKCG</i> .....	49
4.1.1.	Novas mutações <i>missense</i> identificadas .....	49
4.1.1.1.	Descrição das mutações, história familiar e clínica dos doentes portadores .....	49
	Família 1 – c.234C>A/ p.His78Gln .....	49
	Família 2 - c.319A>G/ p.Ser107Gly.....	51
	Família 3 - c.349T>A/ p.Cys117Ser .....	52
4.1.1.2	Avaliação da patogenicidade por análise bioinformática .....	53
4.1.1.3	Aspectos evolutivos: conservação dos resíduos substituídos .....	57
4.1.2.	Mutações silenciosas observadas .....	59
4.1.2.1.	Descrição e frequência observada na série de doentes estudada.....	59
4.1.2.2.	Análise bioinformática .....	60
4.1.3.	Mutações intrónicas identificadas .....	60
4.1.3.1 –	Variantes descritas anteriormente .....	61
4.1.3.2.	Novas variantes .....	62
4.1.3.2.1	Descrição das três novas variantes intrónicas identificadas e frequências observadas.....	62
	i.c.285+38dup.....	62
	ii.c.397+55G>A .....	62
	iii.c.1575+28C>T .....	63
4.1.3.2.2.	Análise bioinformática das novas variantes intrónicas observadas.....	63
4.2.	Análise haplotípica .....	64
5.	Discussão .....	67
5.1.	Previsão da patogenicidade das mutações <i>missense</i> identificadas: análise bioinformática, conservação e função dos resíduos mutados, e sua localização na estrutura da PKC $\gamma$ .....	67
5.2.	Relação genótipo-fenótipo.....	75
5.3.	Hipóteses sobre os mecanismos patogénicos das novas mutações <i>missense</i> identificadas.....	77
5.4.	Análise haplotípica .....	83
5.5.	Considerações finais e perspectivas futuras .....	85
6.	Bibliografia.....	88
ANEXOS.....		96

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1- Plano sagital mediano do cérebro humano.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 2 - Estrutura do córtex cerebeloso.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3 - Estrutura das proteínas cinases C (PKC) convencionais, novel e atípicas (A) e respectivos activadores (B).....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4 - Estrutura do domínio C1B da PKC<math>\gamma</math>.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5 - Modelo do domínio C1B da PKC<math>\gamma</math> complexado com o éster de forbol PMA.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6 - Ciclo de vida da PKC<math>\gamma</math>.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 7 - Localização das mutações causadoras de SCA14 na proteína (A) e no cDNA (B).....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 8 - Localização das mutações descritas nos sub-domínios C1A e C1B da PKC<math>\gamma</math>, responsáveis pela SCA14.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 9 - Hipótese para a patogénese na SCA14 sugerida por Adachi et al. (2008).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 10 - Localização e tamanho dos 18 exões no gene PRKCG e dos 14 fragmentos de amplificação.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 11 - Árvore genealógica da família com ataxia espinocerebelosa, em que foi detectada a mutação c.234C&gt;A (p.His78Gln) no gene PRKCG. O caso índice está indicado com uma seta. Os símbolos preenchidos a negro indicam os elementos afectados, e a cinzento, os elementos em que há suspeita clínica da doença.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 12 - Electroferograma representativo da sequência do exão 3 do gene PRKCG (c.234C&gt;A/ p.His78Gln).....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 13 - Árvore genealógica da família com ataxia espinocerebelosa, em que foi detectada a mutação c.319A&gt;G (p.Ser107Gly) no gene PRKCG.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 14 - Electroferograma representativo da sequência do exão 4 do gene PRKCG (c. c.319A&gt;G/ p.Ser107Gly).....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 15 - Árvore genealógica da família com ataxia espinocerebelosa, em que foi detectada a mutação p.Cys117Ser na PKC<math>\gamma</math>.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 16 - Electroferograma representativo da sequência do exão 4 do gene PRKCG (c349T&gt;A/ p.Cys117Ser).....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 17 - Alinhamento do domínio C1A da PKC<math>\gamma</math> humana com as restantes isoformas PKC (fig.A) e proteínas ortólogas (fig.B).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 18 - Alinhamento do domínio C1B da PKC<math>\gamma</math> humana com as restantes isoformas PKC (fig.A) e proteínas ortólogas (fig.B).....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 19 - Electroferograma representativo da sequência intrónica a juzante do exão 3 do gene PRKCG (c.285+38dup).....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 20 - Electroferograma representativo da sequência intrónica 4 do gene PRKCG (c.397+55G&gt;A).....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 21 - Electroferograma representativo da sequência intrónica 14 do gene PRKCG (c.1575+28C&gt;T).....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 22 - Localização das mutações descritas até ao momento nos sub-domínios C1A (resíduos 36-85) e C1B (aminoácidos 101-150) da PKC<math>\gamma</math>, responsáveis pela SCA14.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 23 - Estrutura 3D da PDB id 2e73 (bem como do sub-domínio C1A da PKC<math>\gamma</math>)......</i>	<i>71</i>
<i>Figura 24 - Estrutura do domínio C1B da PKC<math>\gamma</math>.....</i>	<i>72</i>

## ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Mutações no gene PRKCG descritas, até ao momento, como responsáveis pela SCA14.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 2 - Primers e fragmentos para amplificação do gene PRKCG e respectivas sequências intrónicas flanqueantes .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 3 - Análise bioinformática dos 26 nsSNPs descritos no gene PRKCG responsáveis pela SCA14 e previsão da possível patogenicidade da PKC<math>\gamma</math> mutante.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 4 - Análise bioinformática dos 11 nsSNPs descritos no gene PRKCG, não associados a SCA14, e previsão da possível patogenicidade da PKC<math>\gamma</math> mutante.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 5 - Frequências alélicas dos SNPs sinónimos nos doentes estudados .....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 6 - Frequências alélicas das variantes intrónicas nos doentes estudados .....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 7 - Frequências alélicas para as mutações intrónicas descritas neste trabalho.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 8 - Estimativa do número de haplótipos obtido através do programa PHASE 2.1, para os grupos considerados e número diferente de iterações.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 9 - Estrutura do haplótipo mais frequente estimado pelo programa PHASE, para o total de doentes estudados .....</i>	<i>65</i>

## ABREVIATURAS

AD	doença de Alzheimer
ADCA	ataxia cerebelosa autossómica dominante
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina tri-fosfato
APTXN	proteína aprataxina
ATXN	proteína ataxina
Ca <sup>2+</sup>	ião cálcio
cDNA	DNA complementar
cPKC	proteína cinase C convencional
Cx	proteína conexina
DAG	1,2-diacil-sn-glicerol
Db	base de dados
DH	doença de Huntington
DK	cinase de diacilglicerol
DMJ/MJD	doença de Machado-Joseph
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	trifosfatos de desoxinucleótidos
DRPLA	atrofia dentatorrubropalidoluisiana
EA	ataxia episódica
ERK	cinase regulada por sinais extracelulares
ESE	sequência exónica activadora de <i>splicing</i>
ESS	sequência exónica silenciadora de <i>splicing</i>

FRDA	ataxia de Friedreich
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
HM	motivo hidrofóbico
HSP	proteína de choque térmico
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	receptor do inositol-1,4,5-trifosfato
ISE	sequência intrónica activadora de <i>splicing</i>
ISS	sequência intrónica silenciadora de <i>splicing</i>
MAP	proteína activada por mitogénios
MARCKS	substrato da cinase C rico em alanina miristoilada
min	minuto
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	alvo da rapamicina de mamífero
mTORC2	complexo 2 do alvo da rapamicina de mamífero
NCBI	centro nacional para a informação em biotecnologia
nPKC	proteína cinase C <i>novel</i>
nsSNP	SNP não-sinónimo
PAF	polineuropatia amiloidótica familiar
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	ésteres de forbol
PHLPP	domínio homólogo da pleckstrina da proteína fosfatase rico em repetições de leucina
PIP <sub>2</sub>	fosfotidilinositol-4,5-bifosfato
PIP <sub>3</sub>	fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC	proteína cinase C
PKC $\gamma$	proteína cinase C gamma
PLC	fosfolipase C
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PNP	polineuropatia periférica
<i>PRKCG</i>	gene que codifica a PKC $\gamma$
RE	retículo endoplasmático
Rictor	companheiro de mTOR insensível à rapamicina
s	segundo(s)
SCA	ataxia espinocerebelosa
Sin1	proteína de interação com as cinases MAP activadas pelo stress, tipo 1
SNC	sistema nervoso central
SNPs	polimorfismos de variação de um nucleótido
cSNP	SNP codificante
TBP	proteína de ligação à caixa TATA
TRPC	receptor canónico de potencial transiente
TM	<i>turn motif</i>
Tm	temperatura de emparelhamento
UPS	sistema ubiquitina-proteossoma
UTR	região não traduzida
Zn <sup>2+</sup> /Zn	zinco

## Aminoácidos

Ala / A	Alanina
Arg / R	Arginina
Asn / N	Asparagina
Asp / D	Aspartato
Cys / C	Cisteína
Phe / F	Fenilalanina
Gly / G	Glicina
Gln / Q	Glutamina
Glu / E	Glutamato
His / H	Histidina
Ile / I	Isoleucina
Leu / L	Leucina
Lys / K	Lisina
Met / M	Metionina
Pro / P	Prolina
Ser / S	Serina
Thr / T	Treonina
Tyr / Y	Tirosina
Trp / W	Triptofano
Val / V	Valina

## 1. Introdução

A ataxia espinocerebelosa do tipo 14 (SCA14) é uma ataxia hereditária em que ocorre atrofia do cerebelo por degenerescência das células de Purkinje. Assim, esta introdução iniciar-se-á com uma breve descrição da estrutura do córtex cerebeloso, de forma a localizar as células de Purkinje e identificar os tipos de células ou estruturas com os quais estabelecem contactos.

Em seguida irá fazer-se um pequeno resumo das ataxias espinocerebelosas (SCAs), grupo de doenças ao qual a SCA14 pertence, e que, embora partilhem muitas das características clínicas apresentadas, podem ser causadas por diferentes tipos de mutações em genes distintos. Por fim, descrevem-se e localizam-se as mutações observadas, até ao momento, no gene *PRKCG*, bem como as hipóteses colocadas por diversos autores para explicar a sua patogenicidade.

### 1.1. Ataxia e cerebelo

O termo ataxia deriva da palavra Grega τάξις (*taxis*) que significa ordem, à qual foi adicionada o prefixo ά, que indica ausência ou negação. Assim, άταξία em Grego, ou ataxia, corresponde a um sintoma, em que o movimento é desordenado ou descoordenado. Na maioria dos casos, a ataxia deve-se a disfunção no cerebelo, por lesão ou atrofia desta estrutura cerebral (Smith *et al.*, 2004).

#### 1.1.1 Cerebelo, córtex cerebeloso e células de Purkinje

O cerebelo é uma estrutura cerebral globosa, localizada na metade posterior da fossa craniana posterior (Neto & Falavigna, 2003), atrás do tronco cerebral (bulbo raquidiano, mesencéfalo e protuberância ou ponte) ao qual se encontra ligado por três pares de pedúnculos cerebelosos.

Esta região do cérebro está envolvida na coordenação motora, articulação verbal, controlo dos movimentos oculares, do equilíbrio e das funções autonómicas, bem como no controlo de algumas funções cognitivas (Bugalho *et al.*, 2006).

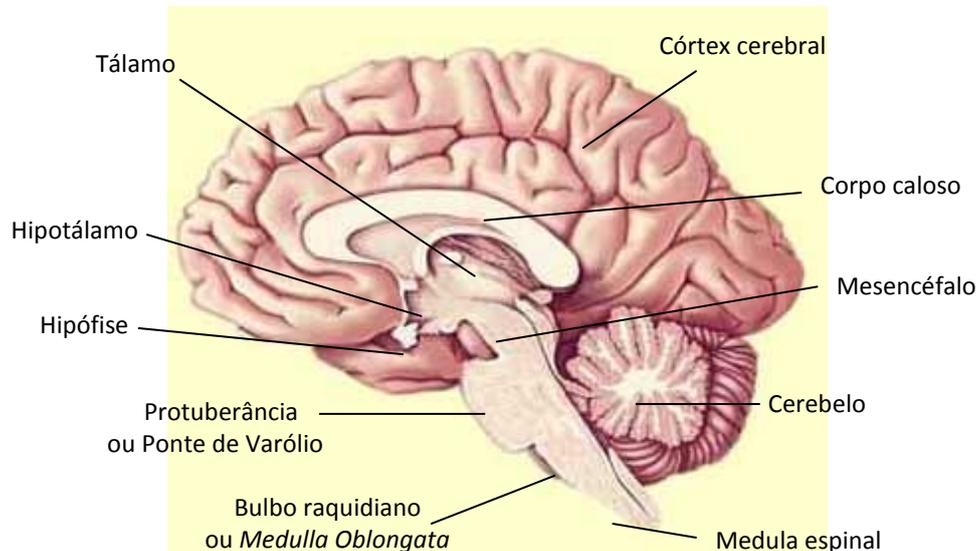


Figura 1- Plano sagital mediano do cérebro humano  
(Adaptado do sítio da internet "The brain from top to bottom", <http://thebrain.mcgill.ca>)

As células de Purkinje e as células granulares são os principais neurónios do córtex cerebeloso, que é constituído por três camadas: granular, Purkinje e molecular.

A camada granular, adjacente à substância branca, é constituída, principalmente, pelos corpos celulares das células granulares e, em menor número, das células de Golgi (Tavares, 1985). Entre as camadas granular e molecular situa-se a camada de Purkinje, onde se encontram os corpos celulares das células de Purkinje, enquanto que as suas dendrites formam uma rede espessa, que se localiza na camada molecular. Esta camada, adjacente à pia máter, apresenta também células estreladas e as dendrites das células de Golgi.

As *climbing fibers* (fibras trepadoras) e as *mossy fibers* (fibras musgosas) constituem as principais fibras aferentes do córtex cerebeloso, *i.e.*, recebem e conduzem estímulos extra-cerebelosos que, directa ou indirectamente, convergem nas células de Purkinje, único sistema eferente desta estrutura cerebral (Tavares, 1985) (figura 2).

As *climbing fibers* são os terminais axónicos das fibras olivocerebelosas, neurónios cujo corpo celular se localiza no complexo olivar inferior (Szentágothai & Rajkovits, 1959; Fernandes, 1988; Woolsey *et al.*, 2003) do bulbo raquidiano. Cada *climbing fiber* enerva apenas uma célula de Purkinje mas pode estabelecer entre centenas a milhares de contactos sinápticos com as dendrites destas células (Fernandes, 1988).

As *mossy fibers*, com origem em diversas partes do tronco cerebral e corda espinal, estabelecem contactos sinápticos, na camada granular do córtex cerebeloso, com as dendrites das células granulares e, menos frequentemente, com as dendrites das células de Golgi (Tavares, 1985; Optican, 1998; Apps & Garwicz, 2005). Na camada molecular, os axónios das células granulares ramificam-se, adquirindo uma forma em T. As fibras paralelas, porção dos axónios das células granulares, dispõem-se perpendicularmente às arborizações dendríticas das células de Purkinje, estabelecendo contactos sinápticos, bem como com as arborizações dendríticas das células de Golgi, estreladas e em cesto (Tavares, 1985). Uma célula de Purkinje pode receber estímulos de múltiplas fibras paralelas.

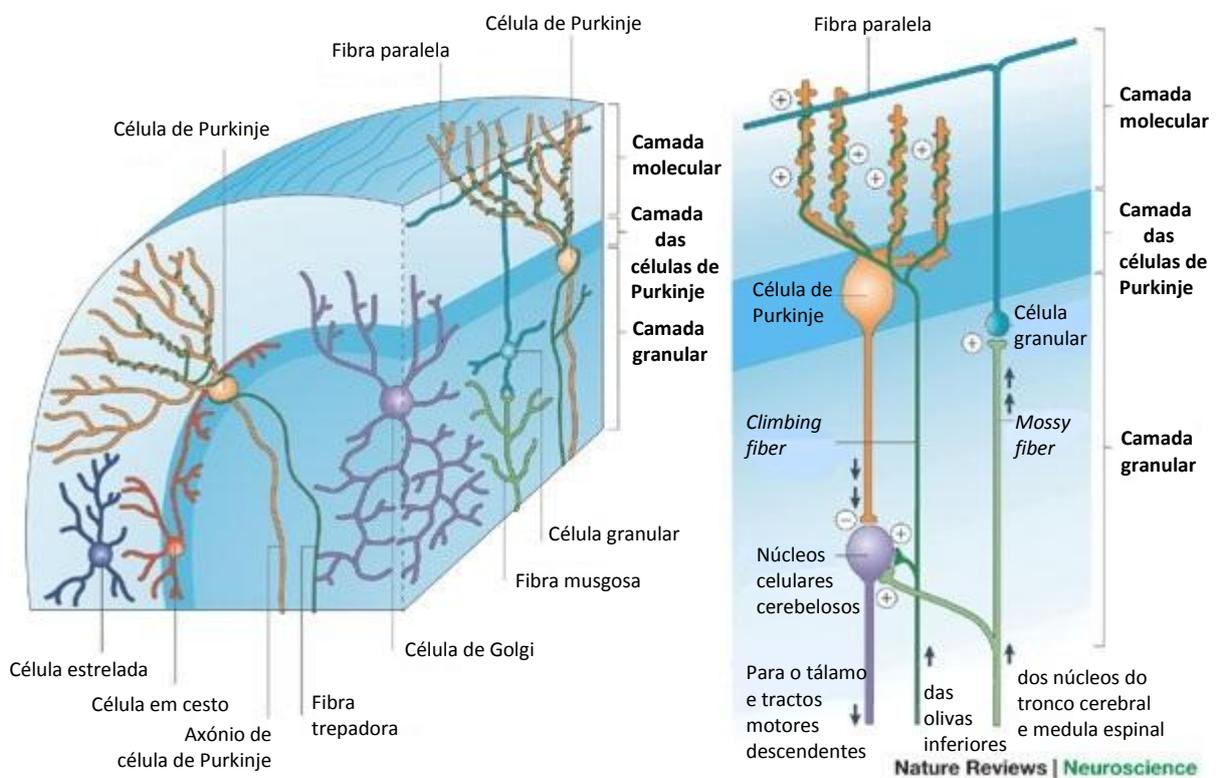


Figura 2 - Estrutura do córtex cerebeloso

(Adaptado de Apps & Garwicz, 2005)

### 1.1.2. Etiologia da ataxia cerebelosa

Consoante a sua etiologia, as ataxias podem designar-se adquiridas (ou esporádicas) ou hereditárias.

A ingestão de tóxicos (alcoól, drogas, metais pesados como o chumbo e mercúrio) e patologias tais como tumores, doença vascular, esclerose múltipla, doenças endócrinas, infecções, doenças auto-imunes ou deficiências vitamínicas podem ser responsáveis pela apresentação de ataxia. Este tipo de ataxia cerebelosa (esporádico ou adquirido) é o mais frequente (Fogel & Perlman, 2006; Klockgether, 2010; Durr, 2010) e pode ser revertido em algumas situações.

As ataxias hereditárias são raras e têm, na sua maioria, um modo de transmissão autossómico dominante. Este grupo de doenças tem a denominação de ADCA (*autosomal dominant cerebellar ataxias*) e é constituído pelas ataxias espinocerebelosas (SCAs), episódicas (EA tipo 1 a 6) e as ataxias espásticas autossómicas dominantes. Algumas ataxias hereditárias têm um modo de transmissão autossómico recessivo (como é o caso da ataxia de Friedreich ou FRDA), ligado ao cromossoma X ou mesmo, mitocondrial.

### 1.1.3 Ataxias espinocerebelosas

As ataxias espinocerebelosas (SCAs) são um grupo heterogéneo, clínica e geneticamente, de doenças neurodegenerativas de evolução progressiva, caracterizadas pela apresentação clínica de ataxia cerebelosa e modo de transmissão autossómico dominante (Durr, 2010).

Para além do lento processo de atrofia do cerebelo, ocorrem, frequentemente, alterações degenerativas do tronco cerebral, bem como de outras estruturas do sistema nervoso central e, também, embora menos comum, do sistema nervoso periférico (Taroni & DiDonato, 2004; Paulson, 2009). Assim, o quadro cerebeloso, composto por ataxia dos membros e da marcha, disartria, nistagmo, dismetria, tremor intencional e disdiadococinésia, pode ser acompanhado por sinais extracerebelosos, caso ocorra também alteração de outros sistemas neurológicos. Desta forma, podem, então, estar também presentes sinais piramidais (espasticidade, hiperreflexia, sinal de Babinsky), extra-piramidais (parkinsonismo, distonia, mioclonia e coreia), oculares (oftalmoparésia, diplopia, retinopatia pigmentar), corticais (demência e epilepsia) e sinais motores periféricos (atrofia, fraqueza muscular) (Teive, 2009; Marmolino & Manto, 2010).

As SCAs são classificadas consoante o gene mutado e numeradas de acordo com a ordem de identificação da doença. No entanto, para as 28 formas descritas até ao momento, foram apenas identificados 18 dos genes causadores de doença.

Consoante a alteração genética, as SCAs podem ser divididas em 3 classes: 1) causadas pela expansão de uma repetição nucleotídica, que codifica para uma sequência de poliglutaminas (repetições CAG), numa região codificante do genoma (SCA1, 2, 3/DMJ, 6, 7, 17 e DRPLA); 2) provocadas pela expansão de uma sequência nucleotídica repetida numa região não codificante (SCA8, 10 e 12); e 3) causadas por mutações convencionais (pontuais, deleções, inserções e duplicações) em determinados genes (SCA4, 5, 11, 13, 14, 15/16, 20 e 27). Ao contrário das restantes, as ataxias deste último grupo não alteram significativamente a qualidade de vida dos doentes (Durr, 2010). Para além do tratamento de algumas manifestações da doença, não existe, ainda, uma cura para as SCAs (Bird, 2011).

A idade de início das SCAs varia, em geral, entre os 30 e 50 anos, mas pode ser precoce, manifestando-se desde a infância, ou tardio, em indivíduos com mais de 60 anos (Hiramoto *et al.*, 2006; Teive, 2009; Durr, 2010).

A prevalência estimada para as SCAs é de 2-3 por 100 000 habitantes (Whaley *et al.*, 2011). As SCAs causadas pela expansão das poliglutaminas são mais frequentes que as restantes, sendo a SCA3/DMJ o subtipo mais comum (Schöls *et al.*, 2004; Durr, 2010).

Diferenças na prevalência de determinada SCA entre várias populações podem dever-se a um efeito fundador (Bird, 2011). Tal é o caso da Doença de Machado-Joseph, com origem asiática, o que pode explicar a prevalência da doença (26-63%), no total de casos de SCA, no Japão, de 49% na China, 58% em Portugal e, no Brasil, 69% (Durr, 2010).

## 1.2. Ataxia espinocerebelosa do tipo 14

### 1.2.1. Caracterização da doença

O cromossoma 19 é, de entre todos os cromossomas humanos, o que apresenta maior densidade de genes, estimando-se que 1461 codifiquem proteínas (Grimwood *et al.*, 2004). Mutações em muitos destes genes estão

associadas a doenças complexas ou multifactoriais, ou são directamente responsáveis pelo aparecimento de doenças monogénicas ou mendelianas, como é o caso da ataxia espinocerebelosa do tipo 14 (SCA14).

A SCA14 (*Online Mendelian Inheritance in Man ID 605361*) é causada por mutações no gene *PRKCG*, que se localiza no braço curto do cromossoma 19, e codifica a proteína cinase C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ).

Clinicamente, a ataxia espinocerebelosa do tipo 14 é caracterizada pelo aparecimento de ataxia lentamente progressiva, disartria e alteração dos movimentos oculares. Outros sintomas, tais como mioclonia, distonia, diminuição cognitiva, tremor, rigidez, perda de sensibilidade, disfagia e disartria podem, também, ser observados (Chen *et al.*, 2010). Tal como para as restantes ataxias, ocorre atrofia do cerebelo.

A idade de início varia entre os 3 e os 70 anos (Vlak *et al.*, 2006; Hiramoto *et al.*, 2006) mas, em geral verifica-se no início da idade adulta, com uma idade média de 33.8 anos (Chen *et al.*, 2011). A esperança média de vida é semelhante à de um indivíduo saudável. Para alguns dos casos descritos, parece haver um fenótipo mais grave, com apresentação de sintomas extrapiramidais tais como mioclonia axial, mioclonia multifocal ou miocimia, quando a idade de início da doença é mais precoce (Chen *et al.*, 2010).

A SCA14 é uma doença degenerativa rara, presente em apenas algumas famílias e casos isolados, distribuídos pela Alemanha, França, Holanda, Noruega, Portugal, Japão, Austrália e Estados Unidos da América (Chen *et al.*, 2003; Yabe *et al.*, 2003; van de Warrenburg *et al.*, 2003; Stevanin *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Fahey *et al.*, 2005; Klebe *et al.*, 2005; Seki *et al.*, 2005; Verbeek *et al.*, 2005; Dalski *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2006; Vlak *et al.*, 2006; Klebe *et al.*, 2007; Nolte *et al.*, 2007; Visser *et al.*, 2007; Wieczorek *et al.*, 2007; Asai *et al.*, 2009; Foncke *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2009; Rentschler, 2010; Koht *et al.*, 2011).

Quanto à prevalência da doença, em 2005 Klebe e colaboradores estimaram que esta ataxia seria responsável por cerca de 1,5% dos casos de ataxia cerebelosa autossómica dominante em França; na Holanda, um estudo realizado no mesmo ano, permitiu observar uma frequência de 4% de SCA14 no total das famílias com ADCAs (Verbeek *et al.*, 2005). Na população Japonesa da ilha de Hokkaido verificou-se que 1% dos casos de ADCA correspondiam a SCA14 (Basri *et al.*, 2007) e, recentemente, foi observada uma prevalência de SCA14 de 3,5% em doentes Noruegueses com ataxia dominante (Koht *et al.*, 2011).

O único estudo sobre esta ataxia em Portugal, em que o exão 4 do gene *PRKCG* foi rastreado em 103 casos índice de famílias com ataxia dominante, e 222 casos isolados, reportou a presença de uma mutação num caso com história familiar de ataxia (2005 por Alonso *et al.*).

Uma vez que foram observados portadores obrigatórios assintomáticos com 66 e 76 anos (Chen *et al.*, 2003; Yabe *et al.*, 2003), considera-se que a penetrância da doença é incompleta. Nas SCAs causadas pela expansão da repetição de glutaminas observa-se, por vezes, um fenómeno de antecipação da doença nas gerações seguintes devido ao aumento da expansão nos gâmetas. Embora causada por mutações convencionais, alguns autores sugerem a ocorrência de antecipação para a SCA14, em algumas das famílias afectadas (Chen *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Do gene *PRKCG* à estrutura e função da proteína cinase Cy

#### 1.2.2.1 Mapeamento do gene *PRKCG*

O cDNA da PKCy foi sequenciado em 1986 (Parker & Stabel, 1986; Coussens *et al.*, 1986; Saito & Shirai, 2002). Em 1993, Trask e colaboradores, com base em estudos de hibridização *in situ*, definiram a localização do gene *PRKCG* em 19q13.4. A ataxia espinocerebelosa do tipo 14 foi descrita, pela primeira vez, numa família Japonesa, tendo sido o *locus* responsável pela doença mapeado no cromossoma 19q13.4-qter (Yamashita *et al.*, 2000). Em 2002 foi descrita uma família norte-americana, de ascendência inglesa e holandesa, cujo *locus* da doença foi, igualmente, mapeado em 19q13.4-qter (Brkanac *et al.*, 2002). Um ano mais tarde, o mesmo grupo colocou a hipótese do *locus* para a SCA14 ser o do gene *PRKCG*, tendo identificado neste gene mutações causadoras da doença em duas famílias (uma das quais a família acima referida) e num caso esporádico (Chen *et al.*, 2003).

O gene *PRKCG* (NCBI RefSeq gene accession number NC\_00019.8) tem 25435 pares de bases (pb) e é constituído por 18 exões; codifica sete transcritos, um dos quais (NCBI RefSeq mRNA accession number NM\_002739.3), com 3143pb, é traduzido na proteína cinase Cy (NCBI RefSeq protein accession number NP\_002730.1), com 697 aminoácidos.

### 1.2.2.2 Estrutura da proteína cinase Cγ (PKCγ)

As proteínas cinase dependentes de AMPc (PKA), GMPc (PKG) e as proteínas cinase C (PKC) pertencem à superfamília de proteínas cinase AGC, constituída actualmente por 60 elementos (Pearce *et al.*, 2010). O domínio catalítico destas proteínas é muito semelhante, possuindo três locais de fosforilação conservados, um dos quais localizado no domínio cinase, e os restantes, no terminal carboxilo, designado por domínio AGC-cinase C-terminal (Parker & Parkinson, 2001; Newton, 2003; Mora *et al.*, 2004).

Por sua vez, as PKC, da qual a PKCγ é uma das 10 possíveis isoformas, constituem uma família de proteínas cinase de serina/treonina, cada uma desempenhando um papel crítico em vias de transdução de sinal, regulando diversos processos na célula, tais como a proliferação e diferenciação celulares, e a transmissão sináptica. (Tanaka & Nishizuka, 1994; Zeidman *et al.*, 1999).

Todas as PKC possuem um domínio regulador N-terminal e um domínio catalítico C-terminal. Esta família de proteínas subdivide-se em três classes, clássicas ou convencionais (PKCα, PKCβI/βII, PKCγ), *novel* (PKCδ, PKCε, PKCη, PKCθ) e atípicas (PKCξ, PKCζ/λ), consoante a estrutura da região reguladora e, conseqüentemente, os seus requisitos de activação (Mellor & Parker, 1998) (figura 3).

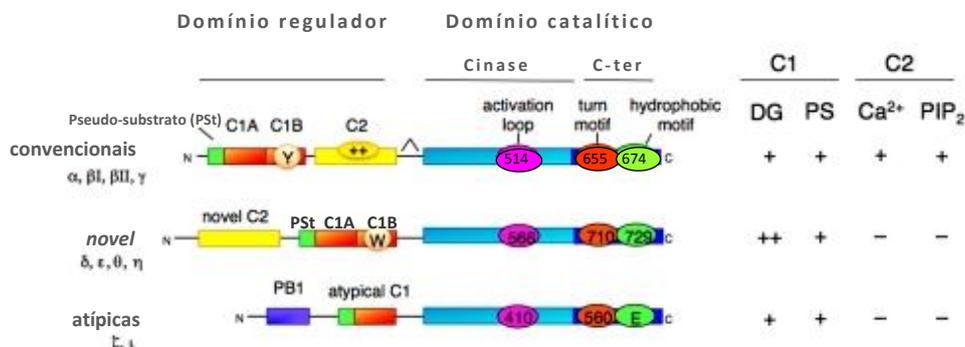


Figura 3 - Estrutura das proteínas cinases C (PKC) convencionais, *novel* e atípicas (A) e respectivos activadores (B) (adaptado de Newton, 2010). Os resíduos sujeitos a fosforilação indicados correspondem nas PKC convencionais aos da PKCγ, da PKCε nas *novel*, e aos da PKCζ nas atípicas. Pst, pseudosubstrato (rectângulo verde); PB1, domínio Phox e Bem 1; C-ter, domínio C-terminal das cinase AGC; DG, diacilglicerol; PS, fosfatidilserina; Ca<sup>2+</sup>, cálcio; PIP<sub>2</sub>, fosfoinositol-4,5-bisfosfato; E, Glu; Y, Tyr; W, Trp. No domínio C2 das cPKC encontra-se indicada a sequência que conduz à ligação ao PIP<sub>2</sub>.

A região reguladora da PKCγ, bem como das restantes PKC convencionais (cPKC), possui os domínios C1, C2 e a região do pseudo-substrato, enquanto que a região catalítica contém os domínios C3/C4 e AGC-cinase C-terminal. A disposição dos domínios C1 e C2 nas isoformas *novel* é inversa à apresentada pelas cPKC, e o seu domínio C2, designado de C2 *novel*, não possui resíduos para ligação ao Ca<sup>2+</sup> (Newton, 2010). O domínio regulador C2 está

ausente nas PKC atípicas e o único domínio C1, atípico, não tem capacidade de ligação ao DAG e PE, mas sim ao PIP<sub>3</sub> e à ceramida. O domínio PB1 (Phox e Bem 1) permite a ligação a proteínas *scaffold* contendo o mesmo domínio (Steinberg, 2008).

### **Domínio regulador**

#### *i.Pseudo-substrato*

O pseudo-substrato é uma pequena sequência peptídica situada no domínio regulador das cPKC, que as mantém num estado inactivo ao ocupar a cavidade destinada à ligação do substrato no domínio catalítico (Newton, 2010). Tal é devido à sua sequência, PLFCRKGALRQKV, semelhante à da região do substrato, com excepção de um resíduo, a alanina (A, a negrito na sequência). Este aminoácido localiza-se na mesma posição do resíduo de serina (Ser) ou treonina (Thr) no substrato, resíduo este que é sujeito a fosforilação pela PKC $\gamma$  (Pears & Parker, 1991).

#### *ii.Domínios C1A e C1B*

Para além das PKC, muitas outras proteínas de mamíferos apresentam domínios C1 (Cho *et al.*, 2005). A sequência destes domínios é conservada e a estrutura secundária apresentada é semelhante, contendo 5 *strands*  $\beta$  e uma hélice  $\alpha$ .

Os domínios C1 contêm um motivo do tipo *Zinc-finger* composto por um padrão conservado de resíduos de cisteína (Cys) e histidina (His), HisX<sub>12</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>n</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>4</sub>HisXys<sub>2</sub>CysX<sub>7</sub>Cys, em que X corresponde a qualquer aminoácido e n, a 13 ou 14. Este motivo é responsável pela coordenação de dois iões Zn<sup>2+</sup> e pela ligação ao 1,2-diacil-sn-glicerol (DAG) e aos ésteres de forbol (PE), seus análogos (Mellor & Parker, 1998). Os PE são compostos orgânicos naturais, produzidos por algumas plantas, que actuam como promotores tumorais.

O domínio C1 da PKC $\gamma$  possui duas regiões conservadas e homólogas, C1A e C1B, também designadas por, respectivamente, Cys1 e Cys2.

A razão da presença de dois domínios C1 na região reguladora das PKC convencionais e *novel*, bem como o seu papel na ligação à membrana citoplasmática e translocação da proteína, ainda não estão claros. Os resultados obtidos para a PKC $\gamma$  não têm sido consensuais e parecem haver, também, diferenças nestes processos entre as diferentes

PKCs convencionais e *novel*. Para Ananthanarayanan *et al.* (2003), a presença de dois domínios C1 permite à PKC $\gamma$  responder à dinâmica, em termos de espaço e tempo, do *turnover* do DAG.

Diversos estudos indicam que os sub-domínios C1A e C1B são ambos necessários para activação da PKC $\gamma$  pelo DAG (Asai *et al.*, 2009; Verbeek *et al.*, 2008; Ananthanarayanan *et al.*, 2003; Burns & Bell, 1991; Quest & Bell, 1994).

Proteínas contendo mutações em um dos dois sub-domínios C1A ou C1B apresentam, após translocação da PKC $\gamma$  para a membrana celular, tempos de retenção na membrana inferiores aos da proteína normal, com diminuição da actividade catalítica. Segundo Asai *et al.* (2009), tal sugere que ambos os domínios C1 sejam necessários à associação estável da PKC $\gamma$  com a membrana celular.

Nos estudos conduzidos por Ananthanarayanan *et al.*, em 2003, os domínios C1A e C1B apresentaram a mesma afinidade para o DAG e PE; os estudos de mutagénesis efectuados por este grupo indicaram idêntico envolvimento dos dois domínios na activação da PKC $\gamma$ ; e em culturas de células HEK293 observou-se rápida translocação para a membrana da PKC $\gamma$  em resposta ao DAG e Ca<sup>2+</sup>. Assim, foi colocada a hipótese de os domínios C1A e C1B se encontrarem expostos, e não restringidos a nível conformacional.

Devido à composição hidrofóbica do local de ligação do DAG/PE e da região em redor deste, e do facto destes locais se encontrarem expostos na proteína, os domínios C1, quando isolados e em solução, têm tendência a agregar (Cho *et al.*, 2003). Tal facto leva a que alguns autores afirmem que os domínios C1A e C1B deverão encontrar-se inacessíveis no interior da enzima, no estado inactivo. Segundo Oancea & Meyer (1998) a ligação da PKC $\gamma$  ao DAG é inicialmente impedida pelo gancho formado entre o pseudo-substrato e o domínio catalítico. Ao contrário da hipótese colocada por Ananthanarayanan *et al.* (2003), os domínios C1A e C1B apenas ficariam acessíveis para ligação ao DAG e PE por alteração da conformação da proteína (Oancea & Meyer, 1998; Medkova & Cho 1999; Stahelin & Cho, 2001; Bittova *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2005).

Segundo Giorgione *et al.* (2003) apesar de ambos os domínios C1 da PKC $\beta$ II (cPKC com grande homologia à PKC $\gamma$ ) possuírem potencial para interacção com a membrana, apenas um deles deverá interactuar com ligandos, em contextos fisiológicos. Com excepção da PKC $\gamma$ , todas as restantes cPKC revelaram maior afinidade do domínio C1B para os PE. Estudos de mutagénesis directa e de cristalografia do complexo forbol/Cys2-PKC $\delta$ , indicaram que seria este o domínio responsável pela ligação ao DAG (Kazanietz *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995).

Embora, até ao momento, não se conheça a estrutura tri-dimensional (3D) completa para a proteína PKC $\gamma$  humana, foram efectuados vários estudos de forma a determinar a estrutura terciária de cada um dos domínios C1. A

determinação destas estruturas possibilita inferir informações acerca do funcionamento da proteína, interação com outras moléculas, averiguar qual o efeito de mutações na estrutura e o seu possível efeito patogénico.

Em 2007, Tanabe e colaboradores, obtiveram a estrutura 3D (por ressonância magnética nuclear, RMN) de uma proteína que, na base de dados de estruturas das proteínas, PDB (*Protein DataBase*), se encontra designada por 2e73. Esta proteína é constituída por 77 aminoácidos, sendo 70 destes resíduos idênticos aos do domínio C1A da PKC $\gamma$  humana. A estrutura 3D do domínio Cys2 da PKC $\gamma$  de cérebro de rato foi obtida por Xu *et al.*, em 1997 por RMN. Esta proteína, denominada 1tbn, tem 66 aminoácidos e é 100% homóloga ao domínio C1B da PKC $\gamma$  humana.

Os dois locais de coordenação dos átomos de zinco parecem ser os responsáveis pela integridade da estrutura dos domínios C1 (Steinberg, 2008), essencial à interacção com a membrana e à translocação da proteína.

No motivo *Zn-finger* do sub-domínio C1A, que compreende os aminoácidos 36 ao 85 da PKC $\gamma$ , os resíduos His36, Cys66, Cys69 e Cys85 coordenam um dos átomos de Zn<sup>2+</sup>, enquanto que os resíduos Cys49, Cys52, His74 e Cys77 fazem a coordenação do segundo átomo.

Dado ter sido colocada a hipótese de que, tal como as restantes cPKC, o sub-domínio C1B da PKC $\gamma$  seria o responsável pela ligação ao DAG, foram realizados diversos estudos (Xu *et al.*, 1997; Hritz *et al.*, 2004) de forma que, actualmente, este sub-domínio se encontra melhor caracterizado que o C1A, quanto à sua interacção com o DAG e a membrana.

No sub-domínio C1B, o motivo *Zn-finger* é constituído pelos aminoácidos 101 ao 150. Os resíduos His101, Cys131, Cys134 e Cys150 constituem o primeiro local de coordenação do Zn<sup>2+</sup>, e os aminoácidos Cys114, Cys117, His139 e Cys142 são responsáveis pela coordenação do segundo átomo de zinco (figura 4). Com excepção da Cys150, as restantes Cys e His parecem ser essenciais para a alta afinidade da ligação da PKC $\gamma$  aos PE (e DAG) (Xu *et al.*, 1997). Neste subdomínio as 5  $\beta$  *strands* são constituídas, respectivamente, pelos resíduos 103-6, 112-14, 119-21, 128-31, e 136-37, e a hélice  $\alpha$ , pelos aminoácidos 142 ao 145 (Hritz *et al.*, 2004).

Os resíduos hidrofóbicos Phe103, Leu120, Met129, Met136 e Val138 contribuem para o carácter hidrofóbico do núcleo do *Zinc-finger* e, portanto, para o enrolamento ou *folding* geral deste sub-domínio (Kazanietz *et al.*, 1995).

As regiões 106-14 e 123-29, cada uma formando um *loop*, definem o local de ligação ao DAG/PE. A estrutura deste local é mantida por duas pontes de hidrogénio, uma entre os resíduos Thr112 e Leu121, e a segunda entre a His106 e a Gly128; a Gln127, que pode estabelecer ligações de hidrogénio com a Tyr108 e/ou com a Ser109, desempenha segundo Hritz *et al.* (2004) um papel muito importante na geometria deste local.

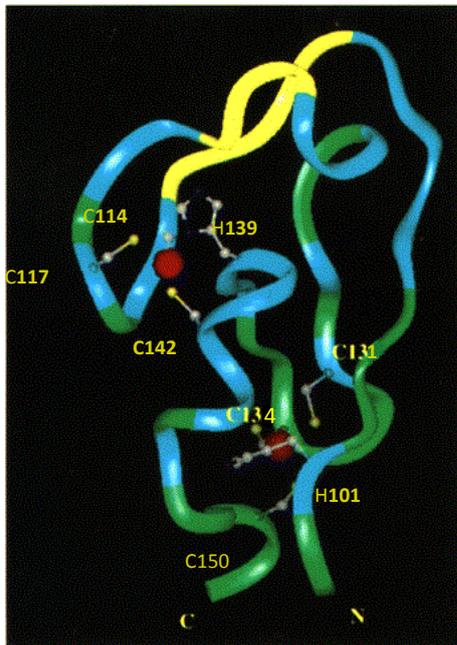


Figura 4 - Estrutura do domínio C1B da PKC $\gamma$  (adaptado de Xu *et al.*, 1997). A posição dos resíduos de cisteína (C) e histidina (H) (a amarelo) que coordenam os 2 átomos de zinco (círculos a vermelho) está assinalada. Os resíduos de ligação ao DAG estão indicados a amarelo na sequência, e os aminoácidos envolvidos na interacção com a membrana, a azul.

Embora os resíduos 101 ao 143 estejam envolvidos na ligação ao DAG/PE, apenas seis estabelecem interacções com estas moléculas, a Pro111, Thr112, Phe113, Leu121, Tyr122, Gly123 (Xu *et al.*, 1997; Hritz *et al.*, 2004). De acordo com o modelo de Hritz *et al.* (2004) a Ser 110, Thr112, Leu121 e Gly123 estabelecem pontes de hidrogénio com os PE e a Pro111 e Tyr122, interacções hidrofóbicas (figura 5). Para Xu *et al.* (1997) a Pro111 não está envolvida na ligação aos PE, ao contrário do que deverá acontecer com a Phe113. No entanto, a estrutura do domínio C1B não sofre, praticamente, alteração por ligação aos PE (Hritz *et al.*, 2004).

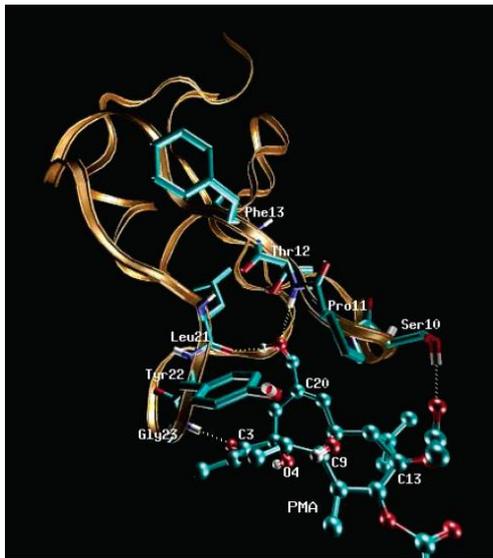


Figura 5 - Modelo do domínio C1B da PKC $\gamma$  complexado com o éster de forbol PMA (de Hritz *et al.*, 2004). Os resíduos que estabelecem ligação directamente ou através de pontes de hidrogénio com o PMA estão indicados na figura. (PMA - forbol-12-miristato-13-acetato). Os resíduos numerados na figura como Ser10, Pro11, Thr12, Ph13, Leu21, Tyr22 e Gly23 correspondem a, respectivamente, Ser110, Pro111, Thr112, Phe113, Leu121, Tyr122 e Gly123

Segundo Xu *et al.* (1997) apenas a metade superior da proteína, contendo o local de ligação ao DAG/PE, os resíduos hidrofóbicos expostos em seu redor e um dos dois locais de coordenação do zinco (local 2), possuem a capacidade e deverão inserir-se na membrana (figura 4).

Em 2004, Nguyen *et al.*, observaram que, no citoplasma, a PKC $\gamma$  se encontrava inactiva e ligada às proteínas 14-3-3 $\epsilon$ , tendo identificado dois locais de interacção no sub-domínio C1B. Cada um destes locais, possui uma de duas sequências de consenso para reconhecimento pelas proteínas 14-3-3 $\epsilon$  (ArgSerXpSerXPro ou ArgXTyr/PheXpSerXPro), em que X representa qualquer aminoácido, e pSer, um resíduo de serina fosforilado. Num dos locais de ligação da PKC $\gamma$  14-3-3 $\epsilon$ , correspondente aos resíduos 106–111, Lauer *et al.* (2010) foi identificada a serina sujeita a fosforilação (Ser109).

### *iii. Domínio C2*

O domínio C2 permite a ligação aos fosfolípidos de uma forma dependente do ião Ca<sup>2+</sup>. Neste domínio existem dois *loops* contendo resíduos conservados de aspartato (Asp187, 193, 246, 248 e 254) responsáveis pela ligação do cálcio (Steinberg, 2008). De entre os fosfolípidos, o domínio C2 apresenta preferência pela ligação ao fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) (Newton, 2010).

## **Domínio catalítico**

### *i. Domínio cinase C3/C4*

A estrutura do domínio catalítico é altamente conservada nas diferentes isoformas de PKC.

O núcleo catalítico da cinase apresenta dois lóbulos, N-terminal (ou domínio C3) e C-terminal (domínio C4). O domínio C3 apresenta uma sequência consenso rica em resíduos de glicina (Gly), GlyXGlyXXGly, (em que X corresponde a qualquer um dos aminoácidos), que compreende os aminoácidos 358 ao 363 da PKC $\gamma$ , onde ocorre a ligação do ATP (Steinberg, 2008). Este motivo permite, também, a interação com o co-chaperone Cdc37 (Terasawa *et al.*, 2006). Na posição 380 da PKC $\gamma$  encontra-se um resíduo de lisina, conservado, que estrutura a enzima para a transferência dos grupos fosfato para os substratos (Steinberg, 2008).

Em C4, para além da sequência de ligação ao substrato, na posição 460 da proteína existe um resíduo conservado de tirosina. Este resíduo permite a ligação a uma sequência presente no domínio AGC-cinase C-terminal (o que, por sua vez, possibilita a ligação dos chaperones HSP90 e Cdc37). Este lóbulo C-terminal contém, ainda, uma sequência conservada, o *activation loop*, sujeito a fosforilação na treonina (Thr) na posição 514, primeiro passo da maturação da enzima.

### *ii. AGC-cinase C-terminal*

Neste domínio localizam-se dois motivos conservados de fosforilação da PKC $\gamma$ , o motivo hidrofóbico (HM) e o *turn motif* (TM), onde ocorre fosforilação, respectivamente, nos resíduos de treonina Thr655 e Thr674.

Além destes motivos conservados, existe outro contendo uma sequência de consenso ProXXPro, em que X representa qualquer aminoácido (Kannan *et al.*, 2007), correspondente à sequência ProPheArgPro que se localiza na posição 630 à 633 da proteína. Este domínio forma um gancho molecular com o resíduo Tyr460 do domínio C3 da cinase, o que permite que os chaperones Hsp90 e Cdc37 se liguem à PKC $\gamma$  recém sintetizada, evento necessário ao processamento da proteína, por fosforilação (Gould *et al.*, 2008).

### 1.2.2.3 Ciclo de vida da PKC $\gamma$ : maturação, activação e degradação

Segundo Gould *et al.* (2008) o ciclo de vida das PKC é extremamente controlado através dos mecanismos de maturação, de retenção da activação das enzimas (num estado cataliticamente competente), e de degradação.

Após tradução, a PKC $\gamma$  é sujeita a processamento, através de vários passos de fosforilação sucessivos e rigorosamente encadeados, o que permite que esta adquira, na presença de mensageiros secundários (DAG e Ca<sup>2+</sup>) a conformação adequada à fosforilação dos substratos (Figura 6).

De acordo com os estudos desenvolvidos por Gould e colaboradores (2008) ao gancho formado entre o domínio AGC-cinase C-ter e o núcleo catalítico da PKC $\gamma$  recém-sintetizada e que se encontra associada a porção da membrana, ligam-se o chaperone HSP90 (proteína de *Heat-shock* 90) e o co-chaperone Cdc37 (*Cell division cycle* 37). Em seguida dá-se o primeiro passo, necessário ao processamento subsequente da proteína, que consiste na fosforilação do resíduo Thr514 do *activation loop*. Esta fosforilação, crucial para o enrolamento correcto da porção C-terminal e estabilidade da proteína, é catalizada pela proteína cinase-1 dependente de fosfatidilinositol (PDK1) que se liga à porção N-terminal da PKC $\gamma$  (Steinberg, 2008; Newton, 2010). Após, ocorre fosforilação do resíduo Thr655 do *turn motif* (TM). Esta reacção está dependente do complex mTORC2 (complexo 2 do alvo da rapamicina de mamífero) (Newton, 2010). Este complexo é constituído pela cinase mTOR (alvo da rapamicina de mamífero), Sin1 (*Stress-activated map kinase-interacting protein* 1), Rictor (*RPTOR independent companion of MTOR*) e mLST8, também designada proteína G  $\beta$ L (Kim *et al.*, 2003). O complex mTORC2 promove, igualmente, a fosforilação do resíduo Thr674 no *hidrofobic motif* (HM).

Em resultado destas reacções de fosforilação a proteína sofre alteração na sua conformação, e o pseudo-substrato passa a encontrar-se ligado ao sítio catalítico (Dutil *et al.*, 1998). Após estas modificações considera-se que a PKC $\gamma$  se encontra funcional para responder aos seus mensageiros secundários, o Ca<sup>2+</sup> e o DAG (Dutil *et al.*, 1998). Na ausência destes mensageiros esta proteína “madura”, encontra-se ligada às proteínas *scaffold* 14-3-3 $\epsilon$ , no citoplasma, que a mantêm num estado inactivo mas cataliticamente competente. As proteínas 14-3-3 $\epsilon$  regulam, assim, a actividade e localização da PKC $\gamma$  (Nguyen *et al.*, 2004).

Após um estímulo externo há activação da fosfolipase C (PLC) que vai clivar o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em DAG e inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Os receptores do inositol-1,4,5-trifosfato tipo 1 (IP<sub>3</sub>R1) que formam os canais de Ca<sup>2+</sup> no retículo endoplasmático vão interagir com o IP<sub>3</sub>, levando ao fluxo deste catião para o citoplasma.



A conformação aberta da proteína, ligada à membrana, é sensível à desfosforilação do HM pela fosfatase PHLPP (*pleckstrin homology domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase*), o que conduz a desfosforilações subsequentes e à sua degradação. Se o chaperone HSP70 se ligar ao TM desfosforilado, a proteína é re-fosforilada, tornando-se, de novo, cataliticamente competente (Newton, 2010).

Estes mecanismos de maturação e activação têm sido propostos não só para a PKC $\gamma$  como para as restantes cPKC. No entanto, apenas a PKC $\gamma$  é activada na ausência de Ca<sup>2+</sup>, quando sujeita a stress oxidativo, actuando, assim, como um sensor de stress (Barnett *et al*, 2007). Em células do epitélio do cristalino, verificou-se que, em condições oxidativas, os átomos de zinco são removidos dos domínios C1, levando ao estabelecimento de ligações dissulfureto entre os resíduos de cisteína e à alteração da conformação da proteína, de tal forma que esta se torna activa (Lin & Takemoto 2005).

#### 1.2.2.4 Variantes descritas no gene PRKCG

No gene *PRKCG*, encontravam-se descritas, no início desta dissertação, 28 mutações responsáveis pela SCA14. Destas, 26 são mutações *missense*; 25 resultam da substituição de um nucleótido por outro e, na outra mutação, após deleção de 2 nucleótidos de um codão, ocorre a inserção do mesmo número de bases, embora diferentes, com substituição do aminoácido original. Estão também descritas duas deleções que alteram o número (e constituição final) de resíduos na proteína mutada. Numa das deleções há remoção de 2 codões, sem alteração da grelha de leitura do mRNA e na outra, há remoção de uma região contendo o codão terminal, com substituição *missense* do último aminoácido da proteína e adição de 13 aminoácidos à extremidade C-terminal (Tabela 1).

Tabela 1 - Mutações no gene *PRKCG* descritas, até ao momento, como responsáveis pela SCA14

<b>Mutações no gene <i>PRKCG/ SCA14</i></b>				
<b>Transcrito</b>	<b>PKC<math>\gamma</math></b>	<b>Exão</b>	<b>Domínio da proteína</b>	<b>Referência</b>
c.62C>T	p.Arg21Lys	1	Pseudo-substrato do domínio regulador	Rentschler, 2010
c.122G>C	p.Arg41Pro	1	C1A do domínio regulador	Chen <i>et al.</i> , 2005
c.146G>T	p.Cys49Tyr	2	C1A do domínio regulador	Rentschler, 2010
c.188G>T	p.Gly63Val	2	C1A do domínio regulador	Nolte <i>et al.</i> , 2007
c.197G>A	p.Cys66Tyr	2	C1A do domínio regulador	Rentschler, 2010
c.229T>A	p.Cys77Ser	3	C1A do domínio regulador	Wieczorek <i>et al.</i> , 2007
c.del296-301acaac	p.Lys100-His101del	4	C1B do domínio regulador	Chen <i>et al.</i> , 2005
c.301C>T	p.His101Tyr	4	C1B do domínio regulador	Chen <i>et al.</i> , 2003
c.303C>G	p.His101Gln	4	C1B do domínio regulador	Alonso <i>et al.</i> , 2005
c.341G>A	p.Cys114Tyr	4	C1B do domínio regulador	Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.374A>C	p.His116Pro	4	C1B do domínio regulador	Rentschler, 2010
c.353G>A	p.Gly118Asp	4	C1B do domínio regulador	van de Warrenburg <i>et al.</i> , 2003
c.355T>C	p.Ser119Pro	4	C1B do domínio regulador	Chen <i>et al.</i> , 2003
c.356C>T	p.Ser119Phe	4	C1B do domínio regulador	Seki <i>et al.</i> , 2005
c.367G>A	p.Gly123Arg	4	C1B do domínio regulador	Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.368G>A	p.Gly123Glu	4	C1B do domínio regulador	Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.380A>G	p.Gln127Arg	4	C1B do domínio regulador	Yabe <i>et al.</i> , 2003
c.383G>A	p.Gly128Asp	4	C1B do domínio regulador	Chen <i>et al.</i> , 2003
c.391T>C	p.Cys131Arg	4	C1B do domínio regulador	Dalski <i>et al.</i> , 2006
c.392G>A	p.Cys131Tyr	4	C1B do domínio regulador	Klebe <i>et al.</i> , 2007
c.413T>A	p.Val138Glu	5	C1B do domínio regulador	Vlak <i>et al.</i> , 2006
c.417C>A	p. His139Gln	5	C1B do domínio regulador	Koht <i>et al.</i> , 2011
c.449,450gc>tt	p.Cys150Phe	5	C1B do domínio regulador	Fahey <i>et al.</i> , 2005
c.1078G>A	p.Gly360Ser	10	Cinase C3 do domínio catalítico	Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.1081A>G	p.Ser361Gly	10	Cinase C3 do domínio catalítico	Chen <i>et al.</i> , 2005
c.1927T>C	p.Phe643Leu	18	ACG-cinase C-terminal do domínio catalítico	Stevanin <i>et al.</i> , 2004
c.2075T>G	p.Val692Gly	18	Região variável V5 do domínio catalítico	Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.2089_2192del	p.Met697Ile_ex13	18	Região variável V5 do domínio catalítico	Asai <i>et al.</i> , 2009

Na figura 7A pode observar-se a localização das 28 mutações causadoras de SCA14 na proteína e, em 7B, no transcrito. Como se pode verificar, a maioria destas mutações localiza-se no no domínio regulador C1. De um total de 22 mutações observadas neste domínio, 5 foram descritas no sub-domínio C1A (a que correspondem os exões 1,2 e 3), e 17 mutações em C1B (exões 4 e 5).

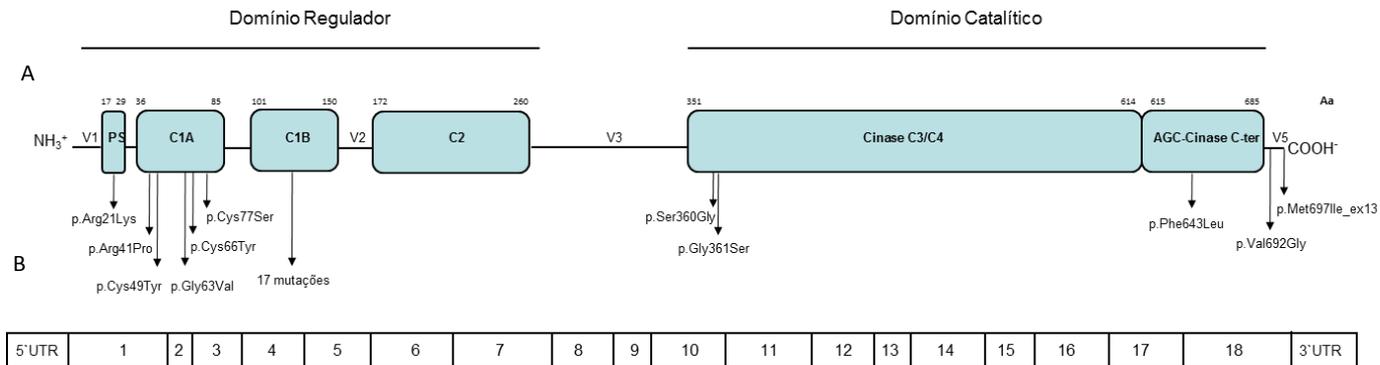
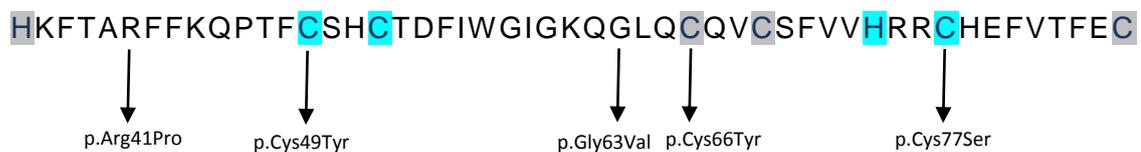


Figura 7 - Localização das mutações causadoras de SCA14 na proteína (A) e no cDNA (B)

A figura 8 indica a localização precisa dos resíduos onde foram observadas as mutações, nos sub-domínios C1A e C1B.

### Sub-domínio C1A



### Sub-domínio C1B

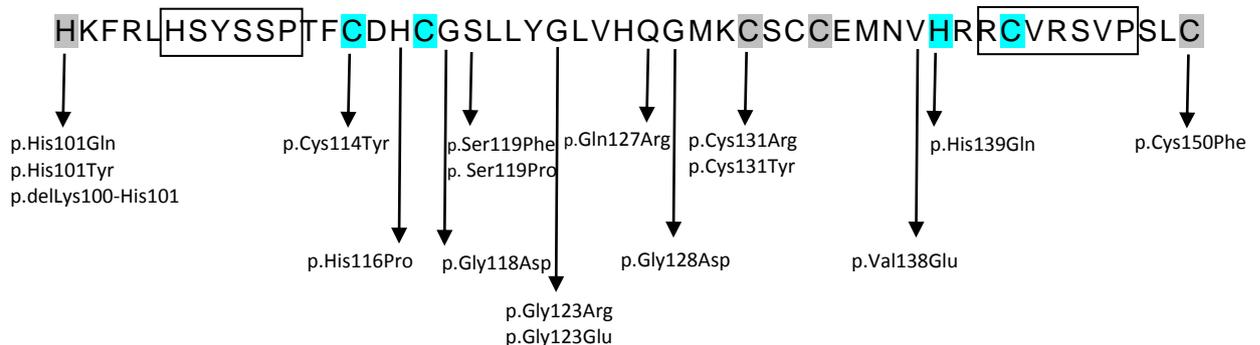


Figura 8 - Localização das mutações descritas nos sub-domínios C1A e C1B da PKCγ, responsáveis pela SCA14. A cinzento encontram-se assinaladas as Cys e His que coordenam um dos átomos de zinco e, a azul os resíduos que constituem o local 2 de coordenação do zinco. As caixas localizam no domínio C1B as sequências para ligação às proteínas 14-3-3ε.

Outros SNPs codificantes (p.Arg213Gln, p.Glu237Asp, p.Gly340Trp, p.Lys576Asn, Arg580Gln e Ser687Gly) foram observados em diversos estudos de sequenciação genómica de populações (NCBI dbSNP). O estudo do gene *PRKCG*, inicialmente associado a retinite pigmentosa tipo11 (RP11), em diversas famílias afectadas por esta doença, permitiu observar os SNPs p.Arg141Cys, p.His415Gln, Ala523Asp e Arg659Ser (Al-Magthteh *et al.*, 1998; Dryja *et al.*, 1999). As mutações Arg141Cys, His415Gln, Ala523Asp, para além de presentes em alguns dos doentes índice estudados não foram consideradas causadoras de doença dado estarem, também, presentes em familiares saudáveis (Al-Magthteh *et al.*, 1998). Recentemente, Koht *et al.* (2011) detectaram a mutação Lys335Arg num doente SCA14, não partilhada por outros dois elementos afectados da mesma família.

#### 1.2.2.5. Função da PKC $\gamma$ e hipóteses para a patogénese na SCA14

A PKC $\gamma$  é uma proteína específica do sistema nervoso central (SNC), nervos periféricos, retina e cristalino (Lin *et al.*, 2005; Doran *et al.*, 2008). No SNC, é expressa em grande quantidade nas células de Purkinje (Saito *et al.*, 1988; Sakai *et al.*, 2004), sendo a degeneração destas células responsável pela atrofia do cerebelo que se verifica, não só nos doentes com SCA14, mas também nas outras SCAs.

Seki *et al.* (2009) observaram um menor crescimento e ramificação dendrítica de células de Purkinje transfectadas com PKC $\gamma$  mutada. No entanto, os ratinhos *knockout* (KO) para o gene *PRKCG* apresentam células de Purkinje com dendrites maiores e mais ramificadas que as de tipo selvagem e, a nível fenotípico, apenas uma ligeira descoordenação e alteração na marcha. A atrofia do cerebelo e a perda das células Purkinje não se verifica, mas apenas uma persistência anormal de enervação das células de Purkinje pelas fibras trepadoras. A PKC $\gamma$  poderá ser, assim, responsável pela eliminação das fibras trepadoras durante o desenvolvimento do cerebelo (Abeliovich *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Kano *et al.*, 1995).

Pelo facto de a SCA14 ser uma doença dominante e de alguns dos doentes apresentarem um fenótipo mais grave que o dos ratinhos KO (que não apresentam atrofia do cerebelo), foi proposto por alguns autores, um ganho de função tóxica para as proteínas mutantes. No entanto, nos últimos anos, além de se manter esta proposta, têm sido reforçadas as hipótese de perda de função, por haplo-insuficiência da actividade da PKC $\gamma$ , bem como a de se verificar, ao mesmo tempo, um ganho de função da PKC $\gamma$  mutante e perda de função da proteína normal.

O resultado de alguns estudos funcionais desenvolvidos, têm permitido elaborar várias hipóteses para explicar a patogenicidade das mutações na SCA14. As hipóteses principais centram-se na alteração da capacidade fosforilativa das proteínas mutantes com consequente desregulação da homeostasia do cálcio, diminuição na capacidade de resistência ao stress oxidativo e/ou alteração nos restantes processos de sinalização celular; e a formação de agregados proteicos tóxicos para as células de Purkinje.

Em 2003, Chizhikov & Millen relacionaram a fosforilação alterada ao nível do cerebelo, com doenças neurológicas tais como o autismo, atraso mental, epilepsia e ataxias.

Tal como as restantes PKCs, a PKC $\gamma$  controla numerosas cascatas de sinalização por fosforilação de proteínas, tais como receptores de neurotransmissores, proteínas G e canais iónicos (Shibasaki *et al.*, 2009).

Ao estudar o efeito da mutação p.Met697Ile\_ex13, Asai e colaboradores (2009), verificaram que a proteína aprataxina (gene *APTX*), cuja ausência nas células é responsável por ataxia com apraxia ocular do tipo 1 (AOA1), seria também um substrato para a PKC $\gamma$ . Foi observado um aumento na actividade e cinase deste mutante, bem como nas proteínas contendo as mutações p.His101Tyr, p.Gly118Asp, p.Ser119Phe, p.Gln127Arg, p.Cys131Arg, p.Cys150Phe, p.Gly360Ser, p.Phe643Leu e p.Val692Gly, em relação à apresentada pela proteína normal. Tal facto teria como consequência a inibição da entrada da aprataxina no núcleo da célula, onde esta tem como função reparar o DNA. Assim, a fosforilação da aprataxina pelos mutantes PKC $\gamma$  inibiria a sua entrada no núcleo, conduzindo a um aumento do stress oxidativo, danos no DNA e morte celular. Não foi observado pelos autores um efeito dominante negativo das proteínas mutantes em relação à normal. Para determinação da actividade catalítica foram utilizados como substratos um péptido artificial e o substrato endógeno MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) em culturas de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

Lin *et al.* (2005) e Lin & Takemoto (2007) verificaram que mutantes PKC $\gamma$  em C1B (p.His101Tyr, p.Ser119Pro e p.Gly128Asp) também não possuíam capacidade de activação em resposta ao stress oxidativo com consequente aumento da apoptose das células epiteliais do cristalino (de coelho). No entanto, verificaram que a actividade catalítica basal (não estimulada por activadores) destes mutantes estava diminuída, e a sua presença impedia que a proteína normal fosse também activada (efeito dominante negativo). A ausência de fosforilação das proteínas conexina Cx43 e

Cx50 pela PKC $\gamma$ , levaria à existência de maior número de *gap junctions*, e em condições de stress oxidativo, a um efeito denominado *bystander effect*, em que os sinais apoptóticos passam de célula para célula (Lin & Takemoto, 2007).

Ueno *et al.* (2009), numa experiência muito semelhante, verificaram que as proteínas com as mutações p.Ser119Phe, p.Cys150Phe, and p.Phe643Leu apresentavam actividade catalítica superior à da proteína selvagem e que tanto esta, como as proteínas mutantes, apresentavam aumento da actividade por stress oxidativo. Assim, propõem que o stress oxidativo possa ser, igualmente, um mecanismo patogénico na SCA14.

Verbeek *et al.*, (2005) verificaram que PKC $\gamma$  contendo as mutações p.Gly118Asp e p.Cys150Phe, possuíam uma translocação do citoplasma para a membrana e actividade catalítica basal superior à da PKC $\gamma$  normal, utilizando como substrato um péptido sintético em culturas de células Cos-7 (células epiteliais renais de macaco).

Ao co-transfectar células HeLa (células epiteliais de carcinoma cervical humano) com plasmídeos contendo PKC $\gamma$  mutante (p.Gly118Asp p.Val138Glu e p.Cys142Ser) e normal, Verbeek *et al.* (2008) verificaram que, apesar da maior translocação apresentada pelas proteínas PKC $\gamma$  mutadas, a actividade catalítica apresentada revelou ser inferior à proteína normal. Estes resultados foram obtidos em condições fisiológicas, isto é, na presença dos activadores naturais da PKC $\gamma$ , por administração de histamina, dado que a activação dos receptores deste composto conduz à libertação de Ca<sup>2+</sup> pelo RE e à produção de DAG. A diminuição da actividade catalítica foi observada por utilização de um substrato sintético, ligado à membrana, bem como em substratos endógenos (MARCKS e ERK2 ou *extracellular signal-regulated kinase*). Também demonstraram que estas mutações em C1B alteram a conformação da proteína, tornando-a semelhante à apresentada por uma PKC $\gamma$  cujo pseudosubstrato foi removido ou que apresenta uma mutação nesta sequência auto-inibitória da proteína, ou seja, muito possivelmente adquirindo uma conformação aberta. O efeito dominante negativo das proteínas mutantes em relação à proteína normal observado seria devido à competição entre ambas pela ligação ao DAG (Verbeek *et al.*, 2008). Segundo Verbeek *et al.*, (2005, 2008) a transdução de sinal anómala seria, então, responsável pela SCA14.

No estudo efectuado por Alonso *et al.* (2005) foram observados níveis de proteína inferiores em células HEK transfectadas com plasmídeos contendo PKC $\gamma$  mutada (p.His101Gln) face aos obtidos por transfecção com a proteína normal. Os autores colocaram então as hipóteses de a proteína mutada possuir menor estabilidade relativamente à

normal, sendo degradada a uma taxa superior ou apresentar menor solubilidade sendo removida para agregados citoplasmáticos.

Da mesma forma, no trabalho desenvolvido por Verbeek *et al.* em 2005 verificou-se uma quantidade de proteína PKC $\gamma$  contendo a mutação p.Cys150Phe inferior à do mutante PKC $\gamma$ -p.Gly118Asp que, por sua vez, era idêntica à apresentada pela proteína de tipo selvagem.

Para as SCAs causadas por expansão da repetição de poliglutaminas, uma das hipóteses mais consensual para explicar a patogénese é a formação de agregados proteicos que causam disfunção celular.

Apesar da formação de agregados não ter sido observada no cérebro de um doente de SCA14 portador da mutação p.His101Tyr (Chen, 2003), as experiências conduzidas por Seki *et al.* (2005) sugeriram a formação de agregados citoplasmáticos, através de um efeito dominante negativo, em que as proteínas normais seriam, também, sequestradas nestas inclusões. Os agregados poderiam ser massivos ou apresentar a forma de ponto (*dot-like*). Estes agregados comprometeriam o normal funcionamento do sistema ubiquitina - proteossoma (UPS), conduzindo a stress do RE e, por fim, a apoptose em células CHO e SH-5SY (Seki *et al.* 2007), o que foi também confirmado em culturas primárias de células de Purkinje (Seki *et al.*, 2009). Para completar os estudos realizados em 2005, Seki *et al.* (2011) analisaram a agregação, solubilidade e citotoxicidade de outros 11 mutantes e concluíram que todas as mutações conduziam a toxicidade mas, com excepção das mutações Ser119Phe e p.Val692Gly, as restantes induziam a formação de agregados insolúveis em triton. Destes resultados, os autores concluíram que a agregação não seria o único mecanismo a induzir neurodegeneração.

Yamamoto *et al.* (2010) sugerem que os dois sistemas proteolíticos da célula, o sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) e a autofagia, sejam responsáveis pela degradação das proteínas mutadas mais rápida que a das normais, bem como pela eliminação dos agregados, cuja formação passaria a ser reversível. A idade de início tardia para SCA14 seria devida à diminuição da actividade destes sistemas de degradação de proteínas ao longo do tempo.

Em 2010, o mesmo grupo, propõe que a trealose, um dissacárido natural, actue como *chaperone* químico, inibindo a oligomerização e agregação da PKC $\gamma$  mutante (Seki *et al.* 2010). Tal reverteria as disfunções celulares causadas pelas mutações nas células de Purkinje, tal como já acontece noutras doenças causadas pela agregação das proteínas, como a doença de Huntington (DH) ou a doença de Alzheimer (AD). A vantagem da trealose como meio terapêutico seria o facto de, actualmente, já ser utilizado a nível alimentar.

O corante vermelho do congo possui a capacidade para inibir a formação de oligómeros e fibras de amilóide, compostos por proteínas com enrolamento incorrecto (*misfolded*). Em 2010 Seki *et al.* observam que este composto inibe a oligomerização e formação de agregados de PKC $\gamma$  mutante em culturas de células de neuroblastoma (SH-SY5Y) e culturas primárias de células de Purkinje; verificam também que a adição deste corante reverte o desenvolvimento anómalo das células de Purkinje, inibindo a apoptose. Assim, os autores sugerem que tal apoie a hipótese de, tal como noutras doenças neurodegenerativas, a proteína mutante (no caso da SCA14, a PKC $\gamma$ ) formar estruturas do tipo amilóide e ser essa a via patogénica comum para as SCAs.

Os resultados de Doran *et al.* (2008) utilizando a PKC $\gamma$  com diferentes mutações (p.His101Gln, p.Ser119Pro, p.Gly128Asp, p.Cys150Phe, p.Ser361Gly, p.Phe643Leu) e em diferentes tipos de células, sugerem que as proteína mutantes sejam sequestradas dentro de endossoma primários, responsáveis pela observação das inclusões *dot-like*. Assim, haploinsuficiência na função da PKC $\gamma$  faria com que as células apresentassem menor capacidade de resposta ao stress oxidativo. Estes autores propõem que as inclusões observadas (em especial no caso das mutações p.His101Gln, p.Ser119Pro e p.Cys150Phe) sejam devidas a problemas na via do endereçamento endossomal e que as inclusões patogénicas observadas por Seki *et al.* (2005, 2007 e 2009) sejam devidas à sobre-expressão das proteínas em condições experimentais, a níveis muito superiores aos endógenos.

Da mesma forma, os trabalhos de Asai *et al.* (2010) parecem indicar que o stress do RE, induzido pela formação de inclusões, pode não ser o principal mecanismo patogénico na SCA14.

As proteínas TRPC3 (*transient receptor potential canonical type3*), que formam canais na membrana celular responsáveis pelo influxo de Ca<sup>2+</sup> na célula, são reguladas por fosforilação da PKC $\gamma$ . Em 2008, Adachi *et al.* demonstraram que as proteínas PKC $\gamma$  contendo mutações no domínio C1, assim como as mutações p.Ser361Gly e p.Phe643Leu, possuíam uma actividade basal *in vitro* significativamente superior à da PKC $\gamma$  normal. No entanto, *in vivo*, os mutantes no domínio C1 tinham menor capacidade de se ligar ao DAG e ficarem retidos na membrana, não fosforilando os canais TRPC3, o que levaria ao influxo permanente de iões Ca<sup>2+</sup>. Os mutantes PKC $\gamma$ -p.Ser361Gly apresentaram hiper-fosforilação destes canais, enquanto que níveis de fosforilação semelhantes foram obtidos para a PKC $\gamma$ -p.Phe643Leu e a proteína de tipo selvagem. A actividade catalítica basal do mutante PKC $\gamma$ -Gly360Ser, inferior à da proteína normal é consistente com a menor fosforilação apresentada pelas proteínas TRPC3 e com a incapacidade em impedir o influxo de cálcio na célula. Os autores colocam a hipótese de que a alteração na homeostasia do Ca<sup>2+</sup> e

da sinalização mediada por este ião nas células de Purkinje possa contribuir para a neurodegeneração observada nos doentes SCA14.

De facto, tem sido sugerido que a alteração na homeostasia do  $Ca^{2+}$  é um passo importante na neurodegeneração (Selvaraj, 2010).

Em ratinhos *Moonwalker* (*Mwk*), com uma mutação em heterozigotia no gene *Trpc3*, observa-se desenvolvimento anormal das dentrites e degeneração das células de Purkinje, bem como ataxia cerebelosa (Becker *et al.* 2009). Sabe-se que a regulação da TRPC, essencial para a manutenção dos níveis de cálcio no citosol, RE e mitocôndria, é efectuada pela PKC $\gamma$  (Selvaraj *et al.*, 2010).

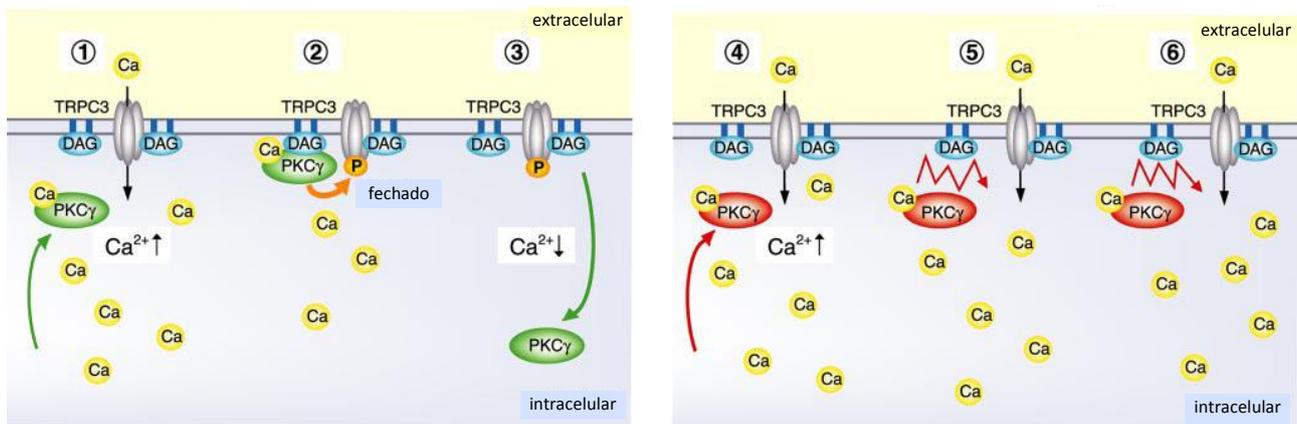


Figura 9 - Hipótese para a patogénese na SCA14 sugerida por Adachi *et al.* (2008)

Em resposta a estímulos fisiológicos há aumento de  $Ca^{2+}$  no citoplasma (por libertação do RE) e formação de DAG na célula (1,4). O DAG activa os canais TRPC3 e induz o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular que, por sua vez, se ligam à PKC $\gamma$ , induzindo a sua translocação. Nas proteínas normais ocorre ligação do domínio C1 ao DAG da membrana plasmática, tornando-se activa. A fosforilação do canal TRPC3 pela PKC $\gamma$  bloqueia o influxo de cálcio extracelular através destes canais (2). Devido ao decréscimo no cálcio intracelular há re-translocação rápida da PKC normal para o citosol (3). Por impossibilidade de se ligar ao DAG a PKC mutante não consegue fosforilar o canal TRPC3. Assim, o influxo de cálcio é mantido, e o mutante PKC ligado ao iões cálcio permanece mais tempo à membrana plasmática (5 e 6) (Adachi *et al.*, 2008).

Para além da SCA14 há outras ataxias cujos genes causadores estão envolvidos na sinalização pelo cálcio, como é o caso das SCA2 (*ATXN2*), SCA6 e EA2 (causadas por diferentes tipos de mutações no gene *CACNA1A*) e SCA15/16 (*ITPR1*) (Durr, 2010; Kasumu & Bezprozvanny, 2010). A hipótese de que a patogénese na SCA1 e SCA3 esteja, também, relacionada com a sinalização do cálcio tem sido, igualmente, colocada (Kasumu & Bezprozvanny, 2010).

Leitch *et al.* (2009) verificaram a perda de canais de cálcio no cerebelo de ratinhos mutantes *stargazer* (apresentando ataxia e epilepsia), e foi também observada diminuição de células Purkinje no vérmis do cerebelo do ratinho mutante *tottering* com ataxia (Sawada *et al.*, 2009). Estes mutantes possuem mutações em genes que codificam diferentes sub-unidades do canal de cálcio do tipo P/Q dependente de voltagem (Leitch *et al.* 2009; Sawada *et al.*, 2009).

A ataxia SCA15/16 resulta de deleções no gene *ITPR1*, que codifica o receptor do IP<sub>3</sub> tipo1 (IP<sub>3</sub>R1), que funciona como canal de cálcio no RE, como já referido anteriormente. Este gene é expresso em níveis elevados nas células de Purkinje. Quanto à SCA2 é proposto que a proteína ATXN2 expandida se associe ao IP<sub>3</sub>R1 dos canais do Ca<sup>2+</sup> do RE, causando a sua desregulação. O fluxo permanente deste catião do RE para o citoplasma iria provocar, por sua vez, sobrecarga nos níveis de Ca<sup>2+</sup> na mitocôndria e, por fim, indução da morte das células de Purkinje (Kasumu & Bezprozvanny, 2010)

Não só as ataxias apresentam alterações no metabolismo do cálcio, mas também outras doenças neurológicas. Mutações nas proteínas presenilina 1 e 2 e na proteína precursora amilóide, responsáveis pela doença de Alzheimer familiar, conduzem a um aumento da libertação de cálcio, que só é revertido pela inibição da fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, controla a síntese das PKCs, incluindo a PKC $\gamma$  (Dehvari *et al.*, em 2007).

Lim *et al.*, (2006) propõem a existência de uma via biológica comum a todas as ataxias, crítica para a sobrevivência das células de Purkinje (Selvaraj *et al.*, 2010); Kasumu & Bezprozvanny (2010) argumentaram que a patogénese das SCAs seria resultado da disrupção na sinalização do cálcio nas células de Purkinje, que conduziria à disfunção cerebelosa e quadro clínico inicial e, eventualmente, à morte das células de Purkinje.

Apesar das várias hipóteses propostas, e como apresentando anteriormente, tem sido reforçada a idéia de que mais do que apenas um destes mecanismos possa estar implicado na patogénese da SCA14, bem como nas restantes SCAs.

## 2. Objectivos do trabalho

Este trabalho teve como objectivos:

- 1) Pesquisar mutações no gene *PRKCG* numa série de indivíduos portugueses com ataxia espinocerebelosa
- 2) Avaliar a sensibilidade de vários programas bioinformáticos na previsão do efeito de mutações *missense* no gene *PRKCG*, por estudo das mutações descritas como responsáveis por SCA14 e de SNPs não associados à doença
- 3) Avaliar a patogenicidade das novas mutações identificadas (exónicas e/ou intrónicas), através de programas bioinformáticos. No caso das mutações *missense* os programas a utilizar foram os previamente validados pela abordagem anterior
- 4) Sugerir uma explicação para o efeito patogénico das mutações encontradas, bem como as já descritas, provavelmente causadoras de doença, e tentar relacionar o genótipo com o fenótipo apresentado
- 5) Determinar os possíveis haplótipos presentes na série de casos estudada e tentar inferir os haplótipos em que se encontram as novas mutações identificadas

## 3. Amostras e metodologia

### 3.1. Amostras estudadas

A série de indivíduos portugueses com ataxia espinocerebelosa, onde foi efectuado o rastreio de mutações no gene *PRKCG*, foi seleccionada de entre 332 casos de ataxia não especificada, cujas amostras foram recebidas no Centro de Genética Preditiva e Preventiva (CGPP) do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), da Universidade do Porto, para fins diagnóstico e/ou investigação, entre 1998 e 2010.

Dado o CGPP ser o laboratório de referência para o estudo das ataxias espinocerebelosas em Portugal, são recebidos pedidos de diagnóstico para as SCAs provenientes de todo o país. Também na Europa este é um centro de referência, sendo o responsável pela organização do esquema de qualidade externo (EQA) da EMQN (*External Molecular Quality Network*) para as SCAs.

Nos 332 doentes, de nacionalidade portuguesa, originários de todo o território nacional, tinha sido excluída anteriormente a presença das mutações responsáveis pelas SCAs de maior prevalência no país (SCA1, 2, 3/DMJ, 6, 7, 17 e DRPLA). Alguns indivíduos foram estudados, em contexto de investigação ou de diagnóstico, e feita a exclusão para outras ataxias dominantes tais como as SCA8, 10, 12, 28 e FHM/EA-2 (enxaqueca hemiplérgica familiar/ataxia episódica tipo 2). Em alguns casos, foram requisitados pelos médicos assistentes outros testes de diagnóstico tais como ataxia de Freidreich (FRDA), de transmissão autossómica recessiva, a doença de Huntington (DH) e a polineuropatia amiloidótica familiar (PAF), doenças com modo de transmissão autossómico dominante.

Uma vez que a SCA14 é uma doença transmitida de forma dominante, foram seleccionados do grupo inicial, 54 casos índice de famílias com ataxia espinocerebelosa, com ascendente(s) e/ou descendentes(s) directo(s) afectado(s), e cujo quadro clínico fosse compatível com a SCA14, não sugerindo outro tipo de patologia. Do grupo inicial foram também estudados 6 casos sem, aparentemente, história dominante de doença na família, por pedido específico do médico assistente. Destes, há 1 caso em que, de entre os familiares, a doença se manifestou apenas no irmão (na mesma geração), e 5 casos isolados, sem qualquer história de doença neurológica na família. A justificação para a inclusão destes indivíduos neste trabalho deve-se ao facto de haver casos de SCA14 de início muito tardio, a penetrância ser incompleta, e pela apresentação, em todos os casos, de um quadro clínico compatível com SCA14.

O estudo molecular dos doentes incluídos neste trabalho foi efectuado após o seu consentimento informado, para fins de diagnóstico genético e/ou de investigação.

No capítulo “Anexos” encontra-se uma descrição mais exaustiva do quadro clínico apresentado por cada um dos doentes estudados, bem como a idade de início da doença e os testes anteriormente realizados (tabela 10).

## 3.2. Rastreio de mutações no gene *PRKCG*

### 3.2.1. Extracção do DNA genómico

O DNA dos doentes foi isolado a partir dos leucócitos do sangue periférico através do método de extracção salina (Miller *et al.*, 1988), pelos técnicos responsáveis por este procedimento no CGPP, entre 1998 e 2010.

De forma a determinar a qualidade e a concentração do DNA extraído, foram realizadas leituras da absorvância a 230, 260 e 280nm em espectrofotómetro (1µl em espectrofotómetro Nanodrop da Thermo Scientific). Devido à sua qualidade, o DNA de 5 das 60 amostras foi purificado seguindo o protocolo do kit “illustra™ DNA and Gel Purification Kit” da *GE Healthcare*.

### 3.2.2. Estratégia para sequenciação do gene *PRKCG*

#### 3.2.2.1. Amplificação por PCR

#### **Definição dos amplicões**

De forma a estudar as sequências dos 18 exões, bem como das respectivas regiões intrónicas adjacentes, que constituem o gene *PRKCG* foram definidos 14 fragmentos de amplificação de acordo com o tamanho e distribuição dos exões no gene (Figura 3).

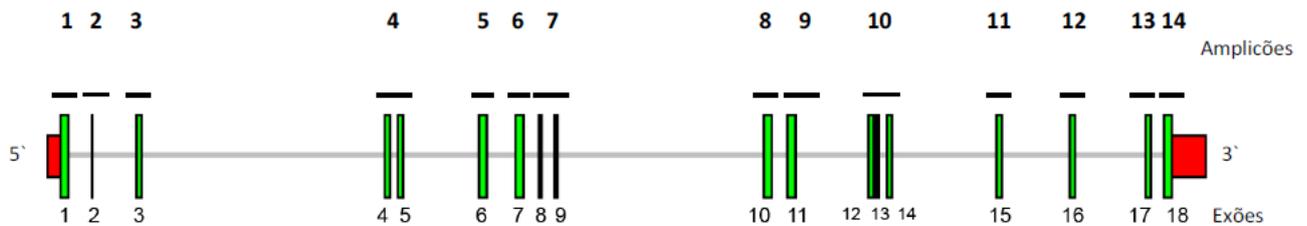


Figura 10 - Localização e tamanho dos 18 exões no gene *PRKCG* e dos 14 fragmentos de amplificação  
A figura (adaptada de atlasgeneticsoncology.org) não se encontra à escala.

### Desenho dos primers

Os primers para amplificação por PCR dos vários exões e respectivas regiões intrónicas adjacentes foram desenhados utilizando *software* informático apropriado. De acordo com a sequência do transcrito NM\_002739, foram pesquisados quais os pares de primers mais adequados para amplificação de cada um dos 14 fragmentos. As ferramentas bioinformáticas utilizadas foram o PrimerQuest SciTool, da IDT (Integrated DNA Technologies; <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>; Rozen & Skaletsky, 2000) e o Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Untergasser *et al.*, 2007). Os primers foram desenhados de forma a que as sequências intrónicas adjacentes a cada exão tivessem um tamanho mínimo de 50pb.

Após selecção dos pares de primers, foi realizado o PCR *In-Silico* através do *software* disponibilizado pelo UCSC Genome Browser, (UCSC In-Silico PCR; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>; Kent *et al.*, 2002). Este procedimento teve por objectivo garantir que não ocorressem amplificações inespecíficas, bem como excluir a possibilidade dos primers conterem SNPs, interferindo assim na eficiência de amplificação dos fragmentos, permitindo o “*allele drop-out*”, ou seja, que alelos presentes na amostra não fossem amplificados.

Os primers foram construídos de forma a possuírem na extremidade 5' uma sequência nucleotídica do fago M13 ( $\Phi$ M13). Aos primers *Forward* (F), que delimitam a jusante a sequência a amplificar, foi adicionada a sequência do  $\Phi$ M13 TGT AAA ACG ACG GCC AGT. A sequência a amplificar por PCR é delimitada a montante pelo primer *Reverse* (R). Os primers R foram construídos de forma a conter na sua extremidade 5' a sequência CAG GAA ACA GCT ATG ACC, do  $\Phi$ M13.

Tabela 2 - Primers e fragmentos para amplificação do gene *PRKCG* e respectivas sequências intrónicas flanqueantes

Amplificação	Exão	Nome	Sequência	Tam. do frag. Amplificado (pb) / Tamanho do exão (pb)
1	1	SCA14_E1F SCA14_E1R	5' TTTCCCTGTGGCTCCTTTG 3' 5' TCGGCGTGATAGGAGTCT 3'	343 / 172
2	2	SCA14_E2F SCA14_E2R	5' GGCTGAACTCCAGTCTAAGGGAAGAA 3' 5' ACCAGAGAACACGTGTGTCAAGCA 3'	317 / 32
3	3	SCA14_E3F SCA14_E3R	5' CCGCTCTCTCTTTCCAAT 3' 5' GAAATTGGGACGGACGCC 3'	249 / 83
4	4 e 5	SCA14_E4_5F SCA14_E4_5R	5' TAGAGAGCAAGGCAGGAGGAAA 3' 5' TGGGCGTGACCATAGAAAGA 3'	603 / 112 (exão 4) e 132 (exão 5)
5	6	SCA14_E6F SCA14_E6R	5' ATTCACAGGATGGTCTCGATCT 3' 5' CCAATCACTCTATTCCCTTTTCC 3'	500 / 157
6	7	SCA14_E7F SCA14_E7R	5' ACCTCCAGCACCAAGGATGG 3' 5' AGAGAGACCACACAGATGGAGA 3'	282 / 135
7	8 e 9	SCA14_E8_9F SCA14_E8_9R	5' TCTCTTCCATCTCTGTGTCCGT 3' 5' GGAATTGAAGACAGAAGTCAGAGG 3'	610 / 88 (exão 8) e 30 (exão 9)
8	10	SCA14_E10F SCA14_E10R	5' ATTCCTTATCGCTGTGTAAGGTCT 3' 5' GAAATCTGACCTCCCACAGACATCCTC 3'	270 / 153
9	11	SCA14_E11F SCA14_E11R	5' GTTTACAGATGTGGACTCTCCT 3' 5' CCACTCAGAGAGCACAAAGTT 3'	481 / 189
10	12, 13 e 14	SCA14_E12_13_14F SCA14_E12_13_14R	5' AACCTCCACGTCTGCTCCTGAGTGAT 3' 5' TGGACCATCAGCTACACCCTCTAA 3'	674 / 92 (exão 12), 63 (exão 13) e 139 (exão 14)
11	15	SCA14_E15F SCA14_E15R	5' AAAGCACTTAACGTGGGTAGCG 3' 5' CACTTTCTAACTGGCTCCTCCTGAGA 3'	263 / 81
12	16	SCA14_E16F SCA14_E16R	5' TGAGGAGGGTGTGGAAGTTT 3' 5' AGTGAATTCAGGAATGGGAGC A 3'	282 / 108
13	17	SCA14_E17F SCA14_E17R	5' ATCTGCCTGTCTGTCCCTCTTT 3' 5' GTGGGGGAGGGAAAGTTAAG 3'	468 / 141
14	18	SCA14_E18F SCA14_E18F	5' AGGAGACAGGAGATGAGACT 3' 5' TGCAGGATCTAGAATGGGACAG 3'	385 / 189

### Condições de amplificação por PCR

Os diferentes fragmentos foram amplificados numa mistura de reacção contendo HotStar Master Mix (Qiagen), 15pmol de cada primer e 30ng de DNA genómico num volume final de 12,5µl. Em cada reacção de amplificação foi utilizado um controlo negativo (branco).

A reacção de PCR foi realizada em termocicladores Uno (Biometra), segundo o programa de amplificação: desnaturação inicial de 5min (minutos) a 95°C, seguida de 30 ciclos de 45s (segundos) a 95°C, 1min à temperatura de

emparelhamento dos *primers* ou de *annealing* ( $T_m$ ), otimizada para cada par de *primers*, e 1 min a 72°C; o passo de extensão final foi de 10 min a 72°C. Para os exões 1, 3, 6, 4 e 5, 11, a  $T_m$  utilizada na amplificação foi de 55°C. Uma  $T_m$  de 58°C foi utilizada na amplificação dos exões 10 e 17, enquanto que para os restantes exões, foi utilizada uma temperatura de 60°C como  $T_m$ . Para algumas amostras, os fragmentos correspondentes aos exões 4 e 5, 11 e 17 foram amplificados utilizando 35 ciclos de amplificação, com emparelhamento de 1min15s e tempo de extensão de 1min30s, em cada ciclo.

### **Confirmação da amplificação por PCR**

Para confirmar a amplificação da reacção, bem como excluir a possibilidade de contaminação, uma amostra de cada reacção, bem como o respectivo branco, foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (Merck) numa concentração final de 0.5µg/ml. A electroforese decorreu durante 30-40min a 90Volts.

#### *3.2.2.2. Purificação das cadeias amplificadas*

Após PCR, a 4 µl de produto amplificado foi adicionado 1µl de Exo-SAP-IT (USB) de forma a remover o excesso de *primers* e dNTPs, e as cadeias simples de DNA. Após a reacção de digestão, que decorreu durante 15min a 37°C, as enzimas hidrolíticas constituintes do Exo-SAP-IT (Exonuclease I e Fosfatase alcalina de camarão), responsáveis pela digestão, foram inactivadas a 80°C durante 15min.

#### *3.2.2.3. Reacção de sequenciação*

A sequenciação é uma metodologia que permite detectar, de forma directa, alterações na sequência a estudar. Assim, as cadeias amplificadas, tanto as de sentido 5'-3' como as 3'-5' foram, submetidas a uma reacção de sequenciação, utilizando o Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Os *primers* utilizados na reacção de sequenciação são complementares à sequência nucleotídica do fago M13, (que se encontra em cada extremidade das cadeias amplificadas anteriormente por PCR). A 5pmol de cada um destes primers de sequenciação são adicionados 2µl de Premix Big Dye® (previamente diluídos 1:1 em tampão do kit de sequenciação) e 2,5µl de DNA amplificado, e água, até perfazer o volume final de 10µl. O programa de sequenciação é iniciado por uma desnaturação inicial de 5min a 95°C, seguida de 35 ciclos, cada um composto por 10s a 96°C, 5s a 50°C e 4 min a 60°C.

### **Purificação dos produtos sequenciados**

A totalidade do produto de amplificação foi colocado em placas *DyeEx 96 Kit* (QIAGEN), adaptadas a placas de 96 poços MicroAmp (*Applied Biosystems*), e sujeito a centrifugação. Ao passar através das colunas, os terminadores em excesso, em solução, vão ser removidos, de forma a não interferirem com a leitura das bases no sequenciador.

### **Electroforese**

Os fragmentos foram sujeitos a electroforese capilar no ABI 3130xl *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems* (polímero POP7, capillar de 36cm, 16s de injeção).

#### 3.2.3. Análise dos resultados

Os resultados foram analisados com o programa *Seqscape version 2.6* (*Applied Biosystems*).

As sequências amplificadas foram comparadas com a sequência consenso do cDNA do gene *PRKCG* (NM\_002739.3), através do programa informático *Seqscape version 2.6* (*Applied Biosystems*). A verificação de um valor de qualidade igual ou superior a 40 nas sequências das cadeias de sentido 5`-3` e 3`-5`, permitiu a validação da sequência respectiva.

### 3.3. Estudo bioinformático das alterações detectadas

#### 3.3.1. Avaliação da possível patogenicidade das substituições não-sinónimas

Na população humana é estimado existirem 67,000-200,000 SNPs não sinónimos (nsSNP), (Cargill *et al.*, 1999; Halushka *et al.*, 1999; Livingston *et al.*, 2004). Com a generalização da sequenciação, o número de nsSNPs conhecidos tem

aumentado, havendo necessidade de determinar o seu impacto na proteína. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas várias ferramentas bioinformáticas de forma a prever o efeito deste tipo de mutações.

Os programas de análise para previsão do efeito de mutações *missense* observadas baseiam-se na sequência e/ou estrutura da proteína, e/ou domínio funcional a que pertencem, tendo como fundamento as observações de que: 1) mutações causadoras de doenças ocorrem com maior probabilidade em posições conservadas ao longo da evolução (Miller *et al.*, 2001) ou, de acordo com Gribskov *et al.* (1987), aminoácidos conservados em proteínas relacionadas, com longo tempo de divergência, provavelmente serão críticos para o seu funcionamento; 2) substituições de aminoácidos, com efeito deletério, têm características estruturais distintas das substituições com efeito neutro (Sunyaev *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Ng & Henikoff, 2006); 3) substituições em resíduos que integram um dado domínio funcional, deverão provocar alteração na função da proteína (Ng & Henikoff, 2006).

Para avaliar a sensibilidade de 5 dos programas bioinformáticos mais utilizados (*Polyphen-2*, *PANTHER 7.0*, *SNPs3D*, *SIFT* e *PoPMuSiC*), em conjunto com a distância de Grantham, foram analisadas, inicialmente, as 26 mutações *missense* descritas até ao momento como causadoras de SCA14. Em paralelo, foram também analisadas as 10 mutações *missense* identificadas em populações controlo e em doentes com RP11, ou seja, não associadas a SCA14.

Após avaliação dos programas quanto à previsão do efeito das mutações *missense* no gene *PRKCG*, descritas até ao momento, as mutações identificadas neste trabalho foram, então, estudadas.

Em seguida apresenta-se uma breve descrição dos programas bioinformáticos utilizados:

*Polyphen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

O *Polymorphism Phenotyping v2.1.0 (Polyphen-2)* é um *software* criado pela Universidade de Harvard que prevê o possível impacto de substituições *missense* na estrutura e função de proteínas humanas. Esta previsão tem como base a sequência da proteína e as suas relações filogenéticas, bem como a informação estrutural do local onde ocorre a substituição (Adzhubei *et al.*, 2010), caso se encontre disponível. Para prever se, em comparação com a restante variação humana, as mutações podem ter um efeito drástico na proteína, estas foram testadas pelo *Polyphen-2* no modelo HumVar.

O *Polyphen-2* calcula a probabilidade (0-1) de uma dada mutação ser deletéria, sendo também classificada, de forma qualitativa como “benigna”, “possivelmente deletéria” ou “provavelmente deletéria” (Adzhubei *et. al.*, 2010).

O programa considerou as proteínas presentes nas bases de dados de proteínas UniProtKB/UniRef100 e as estruturas constantes na PDB/DSSP em Abril de 2011.

O *Polyphen-2* não apresentou resultados quanto à alteração da estrutura em C1 por efeito das mutações neste domínio, apesar de na base de dados considerada pelo software constarem os dados estruturais das proteínas 1tbn e 2e73. Também, como as mutações para as quais foram apresentados resultados, as proteínas para comparação não apresentavam 100% de homologia, optou-se por não considerar os resultados estruturais obtidos pelo programa *Polyphen-2*.

#### *PANTHER 7.0* (<http://www.PANTHERdb.org/>)

A ferramenta cSNP tools (<http://www.PANTHERdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>) do programa *PANTHER* (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) estima a probabilidade de um nsSNP causar impacto funcional na proteína. Esta probabilidade, subPSEC (*substitution position-specific evolutionary conservation*), é calculada a partir do alinhamento de proteínas relacionadas evolutivamente (Thomas *et al.*, 2003; Thomas & Kejariwal, 2004; Thomas *et al.*, 2006), e pode ter um valor entre 0 (neutro) e -10 (muito provavelmente deletério). Sabendo-se que o ponto a partir do qual há impacto funcional é -3, foi determinado que este valor subPSEC seria equivalente a um Pdeletério de 0.5. O Pdeletério estima assim a probabilidade de uma dada mutação causar um efeito funcional deletério na proteína, podendo variar entre 0 e 1.

#### *SNPs3D* (<http://www.SNPs3D.org/>)

Neste programa, o impacto funcional de um nsSNP é calculado por 2 modelos elaborados de acordo com hipóteses distintas (Yue *et al.*, 2005, 2006; Yue & Moulton, 2006):

- 1) Modelo de estabilidade – utiliza vários factores da estrutura da proteína para determinar quais as substituições que destabilizam o *folding* (ou o enrolamento) da proteína. O resultado é obtido através de uma aplicação (*Support Vector Machine* (SVM)), que tem em consideração vários factores da proteína para prever qual o efeito de um dado nsSNP na sua estabilidade. Valores SVM positivos indicam variantes não-deletérias, e valores negativos, variantes deletérias

2) Modelo de Perfil – baseia-se na homologia de sequências, e calcula a extensão e natureza da conservação de um aminoácido na sequência (através do software SVM).

O *SNPs3D* calculou apenas os valores SVM perfil para as mutações *missense* do gene *PRKCG*, não apresentando valores para a estabilidade da estrutura.

#### *SIFT* ([http://SIFT.jcvi.org/www/SIFT\\_seq\\_submit2.html](http://SIFT.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html))

O algoritmo do programa *SIFT* (*Sorting Tolerant From Intolerant*) baseia-se na homologia entre sequências para prever o efeito de todas as substituições possíveis na sequência da proteína (Ng & Henikoff, 2001, 2002, 2003; Kumar *et al.*, 2009). O valor de probabilidade obtido para cada substituição é normalizado pela probabilidade do aminoácido mais frequente e convertido num valor *SIFT*; se este *SIFT score* se encontrar abaixo de um certo valor residual (0.05), a substituição deverá afectar a função da proteína.

#### *PoPMuSiC v2.1* (<http://babylone.ulb.ac.be/PoPMuSiC/>)

O programa informático *PoPMuSiC* (*Prediction of Protein Mutant Stability Changes*) permite avaliar a estabilidade de uma dada proteína ou péptido por introdução de uma mutação *missense*, com base na estrutura da proteína (Dehouck *et al.*, 2009, 2010). Este software calcula a alteração da energia livre ( $\Delta\Delta G$ ) de enrolamento entre a proteína (ou péptido) normal e a mutada. Valores negativos de  $\Delta\Delta G$  sugerem que a mutação seja estabilizadora.

Dado não se conhecer a estrutura 3D completa para a PKC $\gamma$ , as estruturas PDB 2e73 e PDB 1tbn foram utilizadas para estudar o efeito das mutações nos sub-domínios C1A e C1B, respectivamente. Ao contrário destas proteínas, cujas sequências são idênticas às dos sub-domínios referidos, para as sequências dos domínios onde estão descritas as restantes 6 mutações, não se encontram descritas estruturas 3D. Assim, foram apenas estudadas as mutações *missense* observadas no domínio C1.

#### *Distância de Grantham*

A distância de Grantham reflecte a diferença química (composição, polaridade e volume molecular) entre dois aminoácidos. Segundo Grantham (1974) a fixação de mutações entre aminoácidos dissemelhantes é, geralmente, rara, ou

seja, quanto maior for a distância química entre os resíduos, menor é a probabilidade para que um substitua o outro na proteína, por mutação.

Consoante a distância de Grantham entre o aminoácido original e o mutante, as substituições podem classificar-se em: 1) conservadora (0-50), 2) moderadamente conservadora (51-100), 3) moderadamente radical (101-150) ou radical ( $\geq 151$ ) (Li *et al.*, 1984).

O alinhamento da PKC $\gamma$  humana com as restantes isoformas de PKC, e algumas das suas proteínas ortólogas, foi obtido pelo programa ClustalW2 ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalw2/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi)).

### 3.3.2. Avaliação da possível alteração no mecanismo de *splicing* do mRNA

A maioria das mutações patogénicas que afectam o mecanismo de *splicing* localizam-se de 1 a 10 nucleótidos da junção intrão-exão (Hellen, em 2009). No entanto, outras mutações, mais afastadas deste local, tanto nos exões, como nos intrões, podem criar novos locais de *splicing*, directa ou indirectamente, reprimindo ou activando sequências (ESE-*exonic splicing enhancers*; ESS - *exonic splicing silencers*; ISE- *intronic splicing enhancers*; ISS - *intronic splicing silencers*). Assim, para avaliação da alteração, directa e/ou indirecta, do normal mecanismo de *splicing*, as mutações foram analisadas por diversos programas bioinformáticos:

A) A avaliação das mutações missense descritas e identificadas, como passíveis de alterar o normal mecanismo de *splicing*, foi efectuada através do software ALAMUT™ (*Mutation Interpretation Software*) constituído pelos programas *Human Splicing Finder (HSF)*, *MaxEnt*, *NNSplice* e *GeneSplicer*.

B) A alteração do mecanismo de *splicing* pelas novas mutações intrónicas foi pesquisada pela utilização dos programas bioinformáticos, disponíveis e de livre acesso nos locais da internet indicados:

- *NNSplice* ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))
- *GeneSplicer* ([http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene\\_spl.shtml](http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml))
- *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)
- *Spliceport* (<http://Spliceport.cs.umd.edu/>)
- *Human Splicing Finder v.2.4.1* (<http://www.umd.be/HSF/>)

### 3.4. Estudo haplotípico

Dado não se dispôr do DNA dos progenitores foi utilizado o *software PHASE 2.1*, de forma a determinar a fase gamética para cada um dos doentes. Este programa informático, que permite a reconstrução de haplótipos e a obtenção de uma estimativa da taxa de recombinação a partir de dados populacionais (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003; Crawford *et al.*, 2004; Stephens & Scheet, 2005) pode ser obtido através da página da *internet* <http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>.

Para averiguar diferenças entre o número estimado de haplótipos na série estudada, e fases gaméticas possíveis para cada um dos doentes, foram elaborados 5 grupos:

- 1) total de indivíduos (60) considerando 16 SNPs (total de mutações intrónicas e exónicas, incluindo as novas mutações *missense*);
- 2) total de indivíduos (60) considerando 13 SNPs (mutações intrónicas e exónicas, sem as novas mutações *missense*);
- 3) doentes com história familiar autossómica dominante (54), considerando 16 SNPs (total de mutações intrónicas e exónicas, incluindo as novas mutações *missense*);
- 4) doentes com história familiar autossómica dominante (54), considerando 13 SNPs (mutações intrónicas e exónicas, excluindo as novas mutações *missense*);
- 5) total de doentes com ataxia não SCA14 (57) considerando as novas mutações *missense* como SNPs (total de mutações intrónicas e exónicas, incluindo as novas mutações *missense*).

Os 5 ficheiros foram sujeitos a análise pelo programa *PHASE 2.1*, com os parâmetros padrão (número de iterações 100, *thinning interval* 1, e *burn-in* de 100) e o algoritmo aplicado por 5x (para verificar a variabilidade entre os resultados obtidos em cada análise).

A aplicação do parâmetro *-X100*, para aumentar em 100 vezes o número de iterações para cada ficheiro, permitiu obter resultados um pouco diferentes dos iniciais, quanto ao número haplótipos e frequências dos pares gaméticos. A aplicação do parâmetro *-X1000* e *-X10000* conduziu a resultados idênticos aos obtidos por aplicação do parâmetro *-X100*, sendo, então, estes, os resultados finais considerados.

## 4. Resultados

### 4.1. Análise molecular do gene *PRKCG*

Na série de doentes Portugueses estudada foram detectadas, na região codificante do gene *PRKCG*, 3 novas mutações *missense* e 5 mutações silenciosas já descritas; na região intrónica flanqueante foram observados 10 SNPs (8 substituições, 1 inserção e 1 duplicação de um nucleótido), três dos quais ainda não descritos.

#### 4.1.1. Novas mutações *missense* identificadas

##### 4.1.1.1. Descrição das mutações, história familiar e clínica dos doentes portadores

Nos 60 doentes estudados não foi observada qualquer uma das 28 mutações descritas previamente como responsáveis pela SCA14. No entanto, foram identificadas novas mutações em três famílias:

#### Família 1 - c.234C>A/ p.His78Gln

Nesta família, com história de ataxia cerebelosa em três gerações sucessivas, existem, pelo menos, 5 indivíduos afectados pela doença, embora apenas para dois tenha sido possível obter DNA para os estudos moleculares (Figura 11).

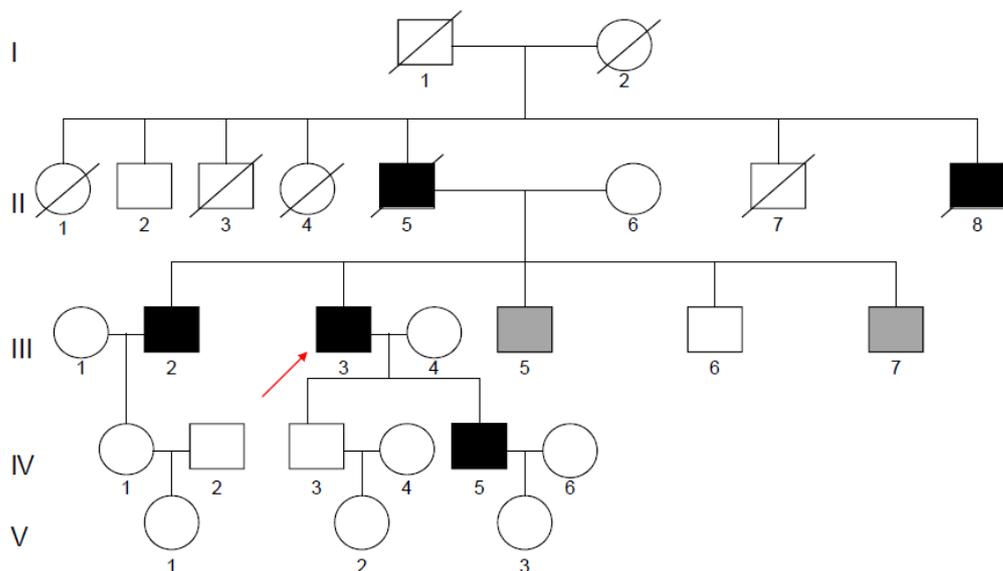


Figura 11 - Árvore genealógica da família com ataxia espinocerebelosa, em que foi detectada a mutação c.234C>A (p.His78Gln) no gene *PRKCG*. O caso índice está indicado com uma seta. Os símbolos preenchidos a negro indicam os elementos afectados, e a cinzento, os elementos em que há suspeita clínica da doença.

O caso índice desta família (III:3) apresentava, aos 68 anos de idade, um quadro clínico de ataxia cerebelosa progressiva pura (sem outros sinais extracerebelosos), com início aos 60 anos, tendo sido a disartria o sintoma inicial.

A doença foi clinicamente confirmada no pai (II:5) e tio por parte paterna (II:8), já falecidos, num dos irmãos (III:2) e no filho mais novo do doente (IV:5) que apresenta, desde os 40 anos, disartria e alteração do equilíbrio ligeiras. Alterações no exame neurológico dos indivíduos II:5 e II:7, também irmãos do doente índice, levaram à suspeita de que possam ser também afectados pela doença, embora se encontrem numa fase muito inicial. No pai do caso índice (II:5) a doença manifestou-se aos 60 anos de idade, tendo este vivido, no entanto, até aos 80 anos. Os pais deste indivíduo foram descritos como assintomáticos, tendo a mãe (I:2) falecido aos 95 anos e o pai, aos 50 (I:1), com carcinoma ocular.

Como se pode observar na figura 5, a sequenciação do exão 3 do gene *PRKCG* no caso índice desta família revelou, num dos alelos, uma substituição de uma citosina por uma adenina na posição 234 do transcrito (c.234C>A), resultando na substituição de uma histidina por uma glutamina na posição 78 da proteína (p.His78Gln). Esta mutação, nunca antes observada, localiza-se no sub-domínio C1A do domínio regulador da proteína, onde se encontram descritas, até ao momento, outras 5 mutações.

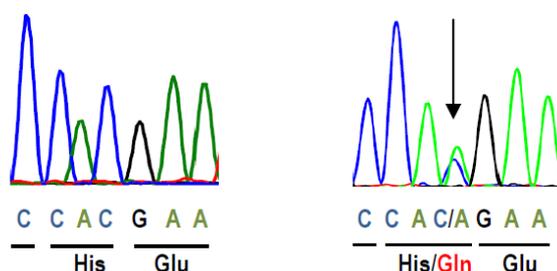


Figura 12 - Electroferograma representativo da sequência do exão 3 do gene *PRKCG* (c.234C>A/ p.His78Gln). Na figura da esquerda, encontra-se a sequência normal (observada em 59 dos doentes com ataxia estudados); à direita, a sequência observada no caso índice (bem como no seu filho afectado) onde, se pode verificar a substituição da citosina por uma adenina, na posição c.234 do transcrito, do que resulta, ao nível da proteína, na substituição de uma histidina por uma glutamina, na posição 78.

Após a identificação da mutação no doente, o DNA do filho afectado (IV:5) foi testado, tendo sido confirmada a sua presença. Embora a nível clínico todos os elementos estejam a ser acompanhados, ainda não foi possível realizar o estudo molecular para os restantes elementos (afectados e não afectados) desta família de forma a averiguar se se confirma a segregação da mutação com a doença.

### Família 2 - c.319A>G/ p.Ser107Gly

O caso índice desta família (figura 6; II:2), com 4 elementos afectados em 2 gerações seguidas, foi observado aos 65 anos de idade, apresentando um quadro de ataxia e disartria, com início aos 55 anos e evolução progressiva. O pai (I:3) e tio (I:1) por parte paterna são, igualmente, afectados pela doença.

Quanto ao indivíduo II:4, irmão do doente, com, aproximadamente, 20 anos já sentiria desequilíbrio da marcha; aos 53 anos, além deste sintoma, passa a também a apresentar dificuldades na escrita (ataxia dos membros superiores). Na última observação clínica, aos 65 anos, demonstrava marcha atáxica e síndrome cerebeloso estático, disartria, nistagmo (horizonto-rotatório), aumento dos reflexos, mas reflexos cutâneos normais (flexores), ou seja, não apresentava sinal de Babinsky. A ressonância magnética nuclear (RMN) efectuada revelou atrofia no cerebelo.

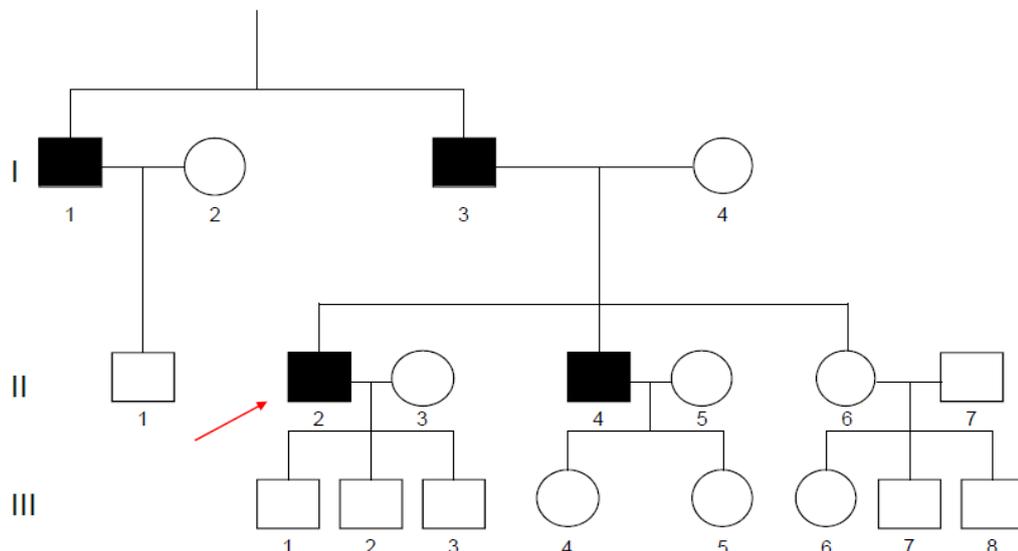


Figura 13 - Árvore genealógica da família com ataxia espinocerebelosa, em que foi detectada a mutação c.319A>G (p.Ser107Gly) no gene *PRKCG*.

O caso índice está indicado com uma seta. Os símbolos preenchidos a negro indicam os elementos afectados.

A sequenciação do exão 4 do gene *PRKCG* no caso índice (II:2) revelou, num dos cromossomas, a substituição de uma adenina por uma guanina na posição 319 do transcrito (c.319A>G) o que conduz à substituição de uma serina por uma glicina na posição 107 da PKC $\gamma$  (p.Ser107Gly), no sub-domínio C1B do domínio regulador da proteína (figura 7). A mutação foi, igualmente, observada em heterozigotia no irmão afectado (II:4). Além destes dois indivíduos, nenhum outro elemento da família foi estudado (a nível clínico e/ou molecular).

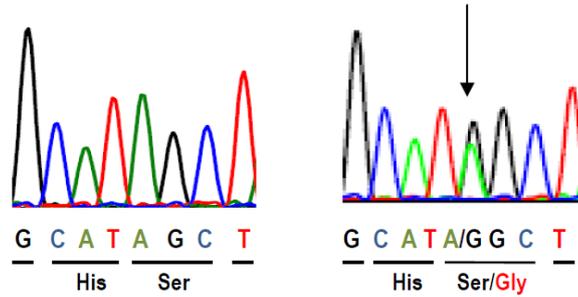


Figura 14 - Electroferograma representativo da sequência do exão 4 do gene *PRKCG* (c. c.319A>G/ p.Ser107Gly). À esquerda na figura, encontra-se a sequência normal (observada em 59 dos doentes com ataxia estudados); à direita, a sequência observada no caso índice (e no irmão afectado) onde, se pode verificar a substituição da guanina por uma adenina, na posição c.319 do transcrito, e na proteína, de uma serina por uma guanosina, na posição 107.

Embora, tenham sido observadas diversas mutações no exão 4 do gene *PRKCG*, estando descritas neste exão 17 das 28 mutações encontradas até à data, a mutação c.319A>G/ p.Ser107Gly não tinha sido observada anteriormente.

### Família 3 - c.349T>A/ p.Cys117Ser

O caso índice começou a apresentar sintomas da doença aos 70 anos de idade, tendo sido observado aos 82 anos, com um quadro acentuado de ataxia. Não foi possível ter acesso a uma descrição clínica mais exaustiva, sabendo-se apenas, a nível familiar, que o pai terá também sido afectado pela patologia (figura 8).

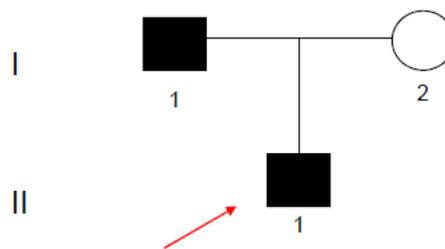


Figura 15 - Árvore genealógica da família com ataxia espinocerebelosa, em que foi detectada a mutação p.Cys117Ser na PKCγ. O caso índice está indicado com uma seta. Os símbolos preenchidos a negro indicam os elementos afectados.

Na sequenciação do exão 4 do gene *PRKCG* no doente (figura 9) observou-se, num dos alelos, uma mutação nunca antes descrita, a substituição de uma timina por uma adenina na posição 349 do transcrito (c.349T>A). Consequentemente, na posição 117 da proteína PKCγ (no sub-domínio C1B do domínio regulador) há substituição de uma cisteína por uma serina (p.Cys117Ser).

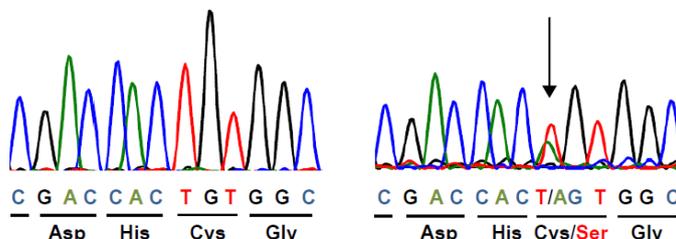


Figura 16 - Electroferograma representativo da sequência do exão 4 do gene *PRKCG* (c.349T>A/ p.Cys117Ser). À esquerda, encontra-se a sequência normal (observada em 59 dos doentes com ataxia estudados); à direita, a sequência observada no caso índice onde, se pode verificar a substituição da timina por uma adenina, na posição c.349 do transcrito correspondente à substituição no resíduo 117 de uma cisteína por uma serina.

Após a realização do presente trabalho, do total de 31 mutações conhecidas, 19 localizam-se no sub-domínio C1B. A este sub-domínio da proteína correspondem, ao nível gene *PRKCG*, os exões 4 e 5. Das mutações observadas em C1B, 16 localizam-se no exão 4, e 3 no exão 5.

Cada uma das três novas mutações tem uma frequência de 0,9% nos casos familiares (1/54) e 0,8% no total de doentes estudados (1/60). A frequência de SCA14 é de 5,6% nos casos familiares (3/54) e 5% no total de doentes (3/60).

#### 4.1.1.2 Avaliação da patogenicidade por análise bioinformática

De forma a avaliar a sensibilidade dos programas bioinformáticos *Polyphen-2*, *PANTHER 7.0*, *SNPs3D*, *SIFT sequence* e *PoPMuSiC* na previsão do efeito das novas mutações *missense* foi analisado o efeito previsto das 26 mutações descritas como causadoras de SCA14. A Distância de *Grantham* entre o resíduo original e o mutante foi, igualmente, averiguada para estas mutações (tabela 3).

Tabela 3 - Análise bioinformática dos 26 nsSNPs descritos no gene *PRKCG* responsáveis pela SCA14 e previsão da possível patogenicidade da PKC $\gamma$  mutante  
A vermelho encontram-se os valores obtidos para as mutações *missense* detectadas neste trabalho

Software	Polyphen-2		PANTHER 7.0		SNPs3D		SIFT sequence		PoPMuSiC v2.1		Distância de Grantham (0-215)
	Hum Var (0-1)	Efeito previsto	Pdeletério (0-1)	Efeito previsto	SVM perfil	Efeito previsto	Resultado (0-1)	Efeito Previsto	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Efeito Previsto	
p.Arg21Lys	0.996	provavelmente patogénica	0.974	deletério	-0.97	deletério	0.00	afecta função	Nd	Nd	conserv. (26)
p.Arg41Pro	1.000	provavelmente patogénica	0.958	deletério	nd	Nd	0.02	afecta função	1.33	destabilizador	± radical (103)
p.Cys49Tyr	1.000	provavelmente patogénica	0.988	deletério	nd	Nd	0.00	afecta função	1.09	destabilizador	radical (194)
p.Gly63Val	1.000	provavelmente patogénica	0.982	deletério	-3.02	deletério	0.00	afecta função	-0.12	neutro	± radical (109)
p.Cys66Tyr	0.988	provavelmente patogénica	0.990	deletério	-1.30	deletério	0.00	afecta função	1.69	destabilizador	radical (194)
p.Cys77Ser	1.000	provavelmente patogénica	0.672	deletério	-2.31	deletério	0.00	afecta função	1.38	destabilizador	± radical (112)
p.His78Gln	<b>0.996</b>	<b>provavelmente patogénica</b>	<b>0.934</b>	<b>deletério</b>	<b>-0.54</b>	<b>deletério</b>	<b>0.02</b>	<b>afecta função</b>	<b>0.58</b>	<b>destabilizador</b>	<b>conserv. (24)</b>
p.His101Gln	0.999	provavelmente patogénica	0.960	deletério	-2.50	deletério	0.00	afecta função	1.94	destabilizador	conserv. (24)
p.His101Tyr	0.999	provavelmente patogénica	0.985	deletério	-1,81	deletério	0.00	afecta função	0.70	destabilizador	± conserv. (83)
p.Ser107Gly	<b>0.301</b>	<b>benigna</b>	<b>0.911</b>	<b>deletério</b>	<b>-0.81</b>	<b>deletério</b>	<b>0.00</b>	<b>afecta função</b>	<b>0.80</b>	<b>destabilizador</b>	<b>± conserv. (56)</b>
p.Cys114Tyr	0.996	provavelmente patogénica	0.996	deletério	-3.32	deletério	0.00	afecta função	1.56	destabilizador	radical (194)
p.His116Pro	1.000	provavelmente patogénica	0.986	deletério	-2.34	deletério	0.00	afecta função	1.35	destabilizador	±conserv. (76)
p.Cys117Ser	<b>0.999</b>	<b>provavelmente patogénica</b>	<b>0.988</b>	<b>deletério</b>	<b>-3.05</b>	<b>deletério</b>	<b>0.00</b>	<b>afecta função</b>	<b>0.12</b>	<b>destabilizador</b>	<b>± radical (112)</b>
p.Gly118Asp	1.000	provavelmente patogénica	0.978	deletério	-1.44	deletério	0.00	afecta função	1.42	destabilizador	± conserv. (94)
p.Ser119Pro	1.000	provavelmente patogénica	0.932	deletério	0.33	não deletério	0.03	afecta função	1.69	destabilizador	± conserv
p.Ser119Phe	1.000	provavelmente patogénica	0.662	deletério	-0.70	deletério	0.02	afecta função	0.50	destabilizador	radical (155)
p.Gly123Glu	1.000	provavelmente patogénica	0.967	deletério	-2.38	deletério	0.00	afecta função	0.27	destabilizador	± conserv. (98)
p.Gly123Arg	1.000	provavelmente patogénica	0.960	deletério	-2.38	deletério	0.00	afecta função	0.27	destabilizador	± radical (125)
p.Gln127Arg	0.968	provavelmente patogénica	0.825	deletério	-1.45	deletério	0.01	afecta função	0.13	destabilizador	conserv. (43)
p.Gly128Asp	1.000	provavelmente patogénica	0.904	deletério	-1.80	deletério	0.00	afecta função	1.73	destabilizador	± conserv. (94)
p.Cys131Arg	1.000	provavelmente patogénica	0.977	deletério	-3.62	deletério	0.00	afecta função	2.44	destabilizador	radical (180)
p.Cys131Tyr	1.000	provavelmente patogénica	0.979	deletério	-3.28	deletério	0.00	afecta função	1.69	destabilizador	radical (193)
p.Val138Glu	0.988	provavelmente patogénica	0.921	deletério	-1.85	deletério	0.00	afecta função	3.68	destabilizador	± radical (121)
p.His139Gln	1.000	provavelmente patogénica	0.971	deletério	-2.67	deletério	0.00	afecta função	1.66	destabilizador	conserv. (24)
p.Cys150Phe	1.000	provavelmente patogénica	0.850	deletério	-3.32	deletério	0.00	afecta função	0.87	destabilizador	radical (204)
p.Gly360Ser	0.997	provavelmente patogénica	0.997	deletério	-2.49	deletério	0.00	afecta função	Nd	Nd	±conserv. (56)
p.Ser361Gly	0.989	provavelmente patogénica	0.838	deletério	-1.18	deletério	0.01	afecta função	Nd	Nd	±conserv. (56)
p.Phe643Leu	0.983	provavelmente patogénica	0.983	deletério	-2.67	deletério	0.00	afecta função	Nd	Nd	conserv. (22)
p.Val692Gly	0.006	benigna	0.107	não deletério	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	± radical (109)

Com excepção do resultado obtido pelo software *PoPMuSiC* para a mutação p.Gly63Val, pelo programa *SNPs3D* para a p.Ser119Pro, e os obtidos para a p.Val692Gly pelo *Polyphen-2* e *PANTHER*, as restantes mutações *missense* descritas até à data como causadoras de SCA14 obtiveram, para todos os programas, resultados que corroboram a sua patogenicidade.

Assim, considerando que as 26 mutações *missense* descritas são causadoras da doença, a percentagem de resultados falsos negativos obtidos pelo software *SIFT* foi de 0%, 3,8% (1/26) para os programas *Polyphen-2* e *PANTHER*, enquanto que o programa *SNPs3D* obteve 4,3% (1/23) e o *PoPMuSiC*, 4,8% (1/21).

Para comparação com os resultados anteriores, foi efectuada a análise das 11 mutações *missense* detectadas em populações controlo ou estudos de outras patologias, *i. e.*, à partida consideradas como não causadoras de SCA14 (tabela 4).

Tabela 4 - Análise bioinformática dos 11 nsSNPs descritos no gene *PRKCG*, não associados a SCA14, e previsão da possível patogenicidade da PKCγ mutante

Software	Polyphen-2		PANTHER 7.0		SNPs3D		Distância de Grantham	SIFT sequence		PoPMuSiC v2.1	
	HumVar (0-1)	Efeito previsto	Pdeletério (0-1)	Efeito previsto	SVM perfil	Efeito previsto		resultado (0-1)	Efeito previsto	ΔΔ G (Kcal/mol)	Efeito Previsto
p.Arg141Cys	0.938	provavelmente patogénica	0.965	deletério	-1.10	deletério	radical (180)	0.01	afecta função	0.00	neutra
p.Arg213Gln	0.005	benigna	0.448	não deletério	1.11	não deletério	conserv. (43)	0.02	não afecta função	0.03	neutra
p.Glu237Asp	0.000	benigna	Nd	nd	2.90	não deletério	conserv. (45)	1.00	não afecta função	0.40	neutra
p.Lys335Arg	0.004	benigna	0.807	deletério	1.77	não deletério	conserv. (26)	0.51	não afecta função	Nd/nd	Nd
p.Gly340Trp	0.513	possivelmente patogénica	0.905	deletério	1.05	não deletério	radical (184)	0.07	não afecta função	Nd/nd	Nd
p.His415Gln	0.052	benigna	0.722	deletério	- 2.46	deletério	conserv. (24)	0.19	não afecta função	Nd/nd	Nd
p.Ala523Asp	1.000	provavelmente patogénica	0.995	deletério	-3.47	deletério	± radical (126)	0.00	afecta função	Nd/nd	Nd
p.Lys576Asn	0.974	provavelmente patogénica	0.780	deletério	0.00	não deletério	conserv. (23)	0.15	não afecta função	Nd/nd	Nd
p.Arg580Gln	0.322	benigna	0.722	deletério	0.35	não deletério	± conserv. (43)	0.07	não afecta função	Nd/nd	Nd
p.Arg659Ser	0.115	benigna	0.440	não deletério	2.00	não deletério	± radical (110)	0.38	não afecta função	Nd/nd	Nd
p.Ser687Gly	0.542	possivelmente patogénica	0.412	não deletério	Nd	nd	± conserv. (56)	0.06	não afecta função	Nd/nd	Nd

Os resultados obtidos para as mutações p.Arg213Gln, p.Glu237Asp, p.Arg580Gln e p.Ser687Gly, identificadas em diversos estudos populacionais de indivíduos controlo (NCBI dbSNP), são coerentes entre os diversos programas bioinformáticos, indicando que a proteína mutada resultante não terá um efeito patogénico. O mesmo se passa para a

mutação p.Lys335Arg, observada num doente SCA14, mas ausente em dois dos seus familiares afectados, e para a mutação Arg659Ser, identificada em doentes com retinite pigmentosa tipo11 (RP11).

As mutações p.Arg141Cys, p.His415Gln, p.Ala523Asp foram detectadas em doentes RP11, como em seus familiares saudáveis. O impacto das mutações p.Arg141Cys e p.Ala523Asp na proteína foi previsto como deletério pelo conjunto de programas utilizado. A análise bioinformática das mutações p.Gly340Trp, p.His415Gln, p.Lys576Asn conduziu a resultados contraditórios. Com excepção do programa *PANTHER*, os restantes indicaram um resultado não deletério (*SNPs3D* e *SIFT*) e apenas possivelmente deletério (*Polyphen-2*) para a mutação p.Gly340Trp, o que sugere que possa ser um polimorfismo. No entanto, tal não se pode afirmar para as mutações p.His415Gln e p.Lys576Asn, dado que metade dos programas indicaram um resultado patogénico, enquanto a outra metade, um efeito não-deletério.

De acordo com os resultados obtidos nas tabelas 3 e 4 (mutações causadoras de doença vs. SNPs “não-SCA14”) pode considerar-se o conjunto de programas informáticos utilizado como eficiente na previsão do efeito de mutações *missense* no gene *PRKCG*.

Os resultados da análise para as 3 novas mutações *missense* identificada (tabela 3), apesar do efeito (benigno) previsto para a mutação Ser107Gly pelo programa *Polyphen-2*, sugerem que terão, muito provavelmente, um efeito deletério.

A análise das 28 mutações *missense* (incluindo as 3 novas mutações descritas) através do *software* *ALAMUT*, que congrega em si os programas *Human Splicing Finder (HSF)*, *MaxEnt*, *NNSplice* e *GeneSplicer*, permitiu concluir que, muito provavelmente, as substituições nucleotídicas não criam novos locais dadores ou aceitadores de *splicing*, de tal forma que os locais originais deixem de ser os utilizados. Ou seja, não deverá ocorrer *splicing* alternativo do transcrito.

A possível activação ou inactivação de sequências, intrónicas ou exónicas, cuja função é a de activação (*enhancers*) ou silenciamento (*silencers*) de locais de *splicing*, em consequência das 3 novas mutações, foi estudada com recurso ao programa *HSF* (utilizado como *software* isolado). Os resultados obtidos não sugerem que as alterações nucleotídicas, resultante das mutações, interfiram no mecanismo normal de *splicing* do transcrito.

Assim, os resultados bioinformáticos obtidos, e a análise de segregação nos familiares disponíveis, sugerem que as três novas mutações *missense* no gene *PRKCG*, descritas no presente trabalho, são causadoras de ataxia espinocerebelosa tipo14 nestas famílias.

#### 4.1.1.3 Aspectos evolutivos: conservação dos resíduos substituídos

De forma a averiguar a conservação dos resíduos onde foram identificadas as mutações, foi feito o alinhamento da PKC $\gamma$  humana com as diferentes isoformas de PKC humanas, e algumas das suas proteínas ortólogas, através do programa ClustalW2 ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalw2/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi)).

As figura 17 e 18 correspondem ao alinhamento das sequências C1A e C1B, respectivamente, onde foram observadas as novas *missense* descritas.

No alinhamento do domínio C1A da PKC $\gamma$  (resíduos 36 ao 85) com as restantes isoformas PKC (Figura 17A) verifica-se que o resíduo His78 se apresenta conservado nas PKC convencionais e em algumas das isoformas *novel*.



Figura 17 - Alinhamento do domínio C1A da PKC $\gamma$  humana com as restantes isoformas PKC (fig.A) e proteínas ortólogas (fig.B) em boi (*Bos taurus*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), ratazana (*Rattus norvegicus*), ratinho (*Mus musculus*), mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) e nemátode (*Caenorhabditis elegans*). A vermelho está indicada a localização e conservação do resíduo His78, para o qual foi detectada a mutação p.His78Gln neste trabalho.

O alinhamento da sequência de C1A da PKC $\gamma$  humana com a correspondente em várias proteínas ortólogas presentes no boi, coelho, rato, ratinho, mosca da fruta e nemátode (Figura 17B), permite observar que a conservação destas sequências é superior à apresentada entre as isoformas da PKC humanas. A histidina na posição 78, apresenta 100% de conservação no sub-domínio C1A da PKC $\gamma$  entre as espécies consideradas.

No sub-domínio C1B, onde, neste trabalho, foram identificadas as mutações p.Ser107Gly e p.Cys117Ser, o motivo do tipo *zinc-finger* é constituído pelos aminoácidos compreendidos entre as posições 100 e 150 da PKC $\gamma$ .

Como se pode observar no alinhamento obtido pelo *software ClustalW* (figura 18A), o resíduo Cys117 é conservado entre as 10 isoformas de PKC. O aminoácido serina na posição 107 não é, no entanto, um resíduo conservado nesta família de proteínas, estando apenas presente na PKC $\alpha$ . As restantes cPKC apresentam na posição homóloga um resíduo de treonina (T), enquanto que as *novel* um resíduo de asparagina (N), e as PKC atípicas, o aminoácido arginina (R).

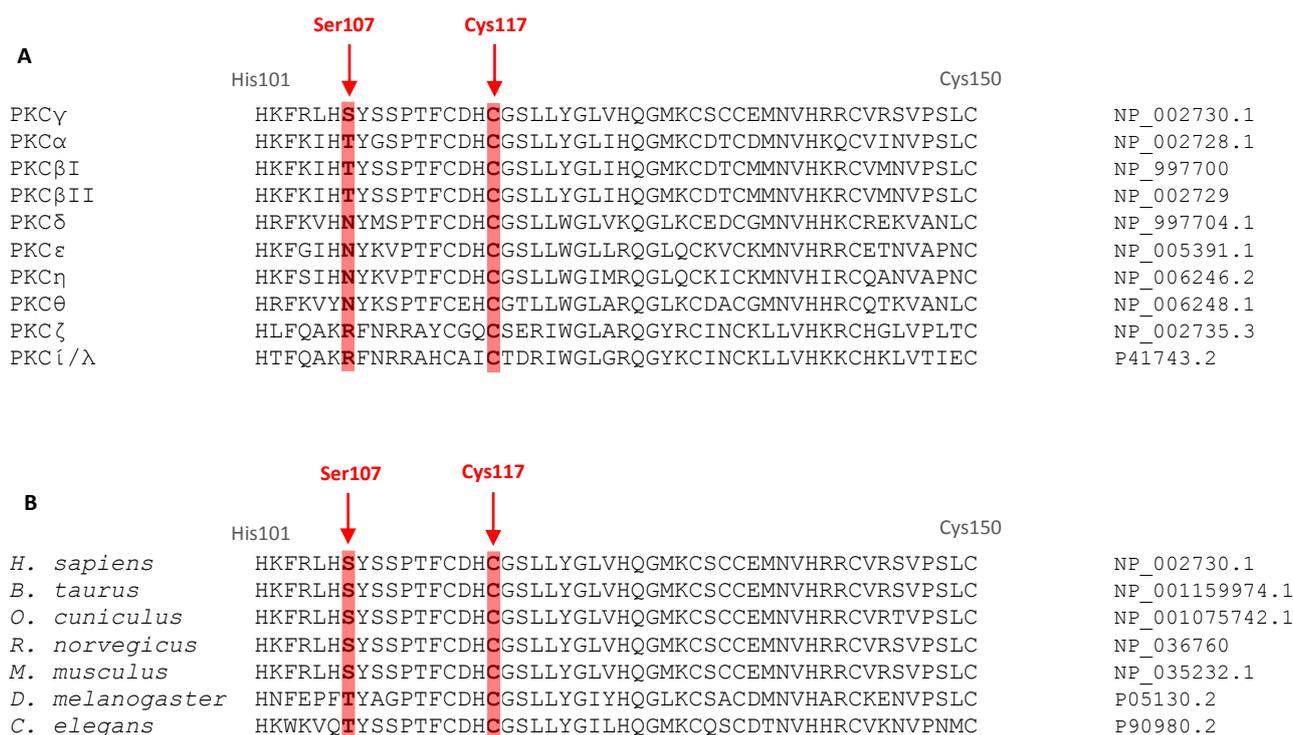


Figura 18 - Alinhamento do domínio C1B da PKC $\gamma$  humana com as restantes isoformas PKC (fig.A) e proteínas ortólogas (fig.B) ortólogas em boi (*Bos taurus*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), ratazana (*Rattus norvegicus*), ratinho (*Mus musculus*), mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) e nemátode (*Caenorhabditis elegans*); na fig.B a localização e conservação dos resíduo Ser107 e Cys117, nos quais foram detectadas as mutações p.Ser107Gly e p.Cys117Ser está indicada a vermelho

Na figura18B pode observar-se o alinhamento da sequência do domínio C1B da PKC $\gamma$  humana com a correspondente em proteínas ortólogas em várias espécies (boi, coelho, ratazana, ratinho, mosca da fruta e nemátode) verificando-se que o resíduo Cys117 é conservado entre as espécies consideradas, o que não acontece com a Ser107.

## 4.1.2. Mutações silenciosas observadas

### 4.1.2.1. Descrição e frequência observada na série de doentes estudada

Na tabela seguinte encontram-se as frequências alélicas das 18 mutações silenciosas descritas até ao momento no gene *PRKCG*, na série de doentes estudada.

Tabela 5 - Frequências alélicas dos SNPs sinónimos nos doentes estudados

Exão	Polimorfismo	Ref. SNP	Freq. alélicas noutras populações	Frequências alélicas na série de doentes estudada	
				doentes com transm. AD N=108 cromossomas	total de doentes N=120 cromossomas
1	c.72C>T/ p.Ala24Ala	rs2547362	0.043C/ 0.957T <sup>1</sup>	<b>0.074C/ 0.926T</b>	<b>0.083C/ 0.917T</b>
3	c.207C>T/ p.Cys69Cys	rs307955	0.983C/ 0.017T <sup>1</sup>	<b>0.991C/ 0.009T</b>	<b>0.992C/ 0.008T</b>
3	c.285C>T/ p.Asp95Asp	rs17854523	0.994C/ 0.006T <sup>1</sup>	<b>0.972C/ 0.028T</b>	<b>0.975C/ 0.025T</b>
4	c.297C>T/p.Asn99Asn	rs115666590	0.995C/ 0.005 <sup>2</sup>	1.000C/ 0.000T	1.000C/ 0.000T
6	c.567T>C/ p.Asn189Asn	rs3745406	0.598A/ 0.402G <sup>1</sup>	<b>0.606A/ 0.394G</b>	<b>0.617A/ 0.383G</b>
6	c.642G>A/ p.Thr214Thr	rs77550964	não determinado	1.000G/ 0.000A	1.000G/ 0.000A
8	c.897C>T/ p. Leu299Leu	rs114319337	0.995C/ 0.005T <sup>3</sup>	1.000C/ 0.000T	1.000C/ 0.000T
9	c.924C>G/ p. Pro308Pro	rs56387214	não determinado	1.000C/ 0.000A	1.000C/ 0.000A
11	c.1222C>A/ p.Arg408Arg	rs62637711	não determinado	1.000C/ 0.000A	1.000C/ 0.000A
13	c.1404C>G/ p.Leu468Leu	rs35079513	0.989C/ 0.011G <sup>1</sup>	1.000C/ 0.000G	1.000C/ 0.000G
14	c.1449G>A/ p.Leu483Leu	rs56184534	não determinado	1.000G/ 0.000A	1.000G/ 0.000A
14	c.1497T>C/ p.Phe499Phe	rs2242244	0.989T/ 0.011C <sup>1</sup>	<b>0.991T/ 0.009C</b>	<b>0.992T/ 0.008C</b>
14	c.1524C>A/ p.Pro508Pro	rs115736276	0.995C/ 0.005A <sup>4</sup>	1.000C/ 0.000A	1.000C/ 0.000A
16	c.1722C>T/ p.Tyr574Tyr	rs34616316	0.995C/ 0.005T <sup>5</sup>	1.000C/ 0.000T	1.000C/ 0.000T
17	c.1794G>A/ p.Leu598Leu	rs116220749	0.995G/ 0.005A <sup>6</sup>	1.000G/ 0.000A	1.000G/ 0.000A
17	c.1836C>T/ p.Gly612Gly	rs56211557	não determinado	1.000C/ 0.000T	1.000C/ 0.000T
18	c.1941C>T/ p.Phe647Phe	rs2242243	0.950G/ 0.050A <sup>3</sup>	1.000C/ 0.000T	1.000C/ 0.000T
18	c.2043G>C/ p.Val681Val	rs55803951	não determinado	1.000G/ 0.000C	1.000G/ 0.000C

Nota: As frequências alélicas indicadas correspondem às populações 1) pilot\_3\_CEU\_exon\_capture\_panel, 2) pilot\_3\_CHB\_exon\_capture\_panel 3) pilot\_3\_CHD\_exon\_capture\_panel, 4) pilot\_3\_YRI\_exon\_capture\_panel, 5) AGI-ASP e 6) pilot\_3\_LWK\_exon\_capture\_panel

Como se pode verificar na tabela, o SNP que apresenta maior heterozigotia é o c.567T>C (p.Asn189Asn), seguindo-se-lhe o c.72C>T (p.Ala24Ala). Ambos os alelos, tanto em c.567T>C (p.Asn189Asn) como em c.72C>T (p.Ala24Ala), são observados nos doentes em situação de heterozigotia e homozigotia. O SNP c.285C>T (p.Asp95Asp) foi detectado (em heterozigotia) em 3 dos doentes índice de famílias com ataxia. Cada uma das mutações silenciosas p.Cys69Cys e p.Phe499Phe foi observada, em heterozigotia, em apenas um doente. Os restantes 13 SNPs apresentam homozigotia para o alelo mais frequente.

#### 4.1.2.2. Análise bioinformática

De forma a prever qual o efeito da substituição nucleotídica no mecanismo de *splicing* do transcrito, os 5 SNPs sinónimos, que apresentaram heterozigotia na série de doentes estudada, foram analisados a nível bioinformático.

A variante c.285C>T, inicialmente descrita como patogénica, dado que a substituição de uma citosina por uma timina neste nucleótido, o último do exão 3, poderia interferir no mecanismo de *splicing*, foi entretanto detectada em 18 cromossomas de 70 indivíduos controlo do Norte de África (Klebe *et al.*, 2005), bem como em outros estudos de sequenciação em várias populações (dbSNP, NCBI). De acordo com a análise efectuada através do programa bioinformático *ALAMUT*, há uma ligeira diminuição na força deste local como dador de *splicing*. Não obstante, tal como os resultados obtidos para as mutações silenciosas p.Ala24Ala, p.Cys69Cys, p.Asn189Asn e p.Phe499Phe, a análise efectuada parece sugerir que, muito provavelmente, estes SNPs não criam novos locais dadores ou aceitadores, alternativos aos locais normais de *splicing*.

#### 4.1.3. Mutações intrónicas identificadas

Com excepção de 4 intrões (4, 8, 10 e 11) que, devido à sua reduzida dimensão, foram totalmente sequenciados, para os restantes, foram estudadas porções das sequências (contendo entre 62 a 239pb) que flanqueiam cada um dos exões. Nestas regiões intrónicas, encontravam-se descritas 13 variantes polimórficas (12 SNPs e uma inserção), já descritas na dbSNP do NCBI. Na série de doentes estudada, observou-se que 7 destas variantes eram polimórficas enquanto que as restantes apresentavam apenas o alelo mais frequente. Para além destes polimorfismos, foram observadas 3 novas variantes, 2 mutações pontuais e uma duplicação de um nucleótido, ainda não descritas à data deste estudo.

#### 4.1.3.1 – Variantes descritas anteriormente

Na tabela seguinte (tabela 6) encontram-se as frequências para as variantes alélicas das 13 mutações intrônicas, descritas nas sequências estudadas no âmbito deste trabalho, na série de doentes em estudo.

Tabela 6 - Frequências alélicas das variantes intrônicas nos doentes estudados

Intrão	Polimorfismo	Referência SNP/DIP	Frequências alélicas noutras populações	Frequências alélicas na série de doentes estudada	
				nº doentes com transm. AD	nº total doentes
				N=108 cromossomas	N=120 cromossomas
4_3'	c.286-66A>C	rs307945	0.982A/ 0.018C <sup>1</sup>	1.000A/ 0.000C	1.000A/ 0.000C
5_3'	c.398-40G>A	rs45459891	não determinado	1.000G/ 0.000A	1.000G/ 0.000A
5_5'	c.529+29G>A	rs73599970	não determinado	0.018G/ 0.982A	0.017G/ 0.983A
6_3'	c.530-112T>A	rs10418087	não determinado	1.000A/ 0.000T	1.000A/ 0.000T
6_5'	c.686+14T>G	rs3745405	0.345T/ 0.655G <sup>1</sup>	0.394T/ 0.606G	0.383T/ 0.617G
11_3'	c.1093-92G>C	rs41311973	0.017G/ 0.983C <sup>2</sup>	0.056G/ 0.944C	0.055G/ 0.950C
11_5'	c.1281+26G>T	rs41303043	0.042G/ 0.958T <sup>3</sup>	0.018G/ 0.982A	0.017G/ 0.983A
14_3'	c.1437-64T>C	rs2242245	0.987T/ 0.013C <sup>1</sup>	0.991T/ 0.009C	0.992T/ 0.008C
15_3'	c.1576-1A>G	rs59309543	não determinado	1.000G/ 0.000A	1.000G/ 0.000A
16_5'	c.1764+40_1764+41insT	rs72463754	não determinado	0.982 - / 0.018T	0.983 - / 0.007T
17_3'	c.1765-59T>G	rs45548139	0.983G/ 0.017T <sup>2</sup>	1.000G/ 0.000T	1.000G/ 0.000T
17_5'	c.1905+72G>C	rs73603631	0.767G/ 0.233C <sup>2</sup>	0.926G/ 0.074C	0.933G/ 0.067C
18_3'	c.1906-11G>A	rs12462083	1.000G/ 0.000A <sup>1</sup>	1.000G/ 0.000A	1.000G/ 0.000A

Nota: As frequências alélicas indicadas correspondem às populações 1) HapMap-CEU, 2) pilot\_1\_CEU\_low\_coverage\_panel e 3) pilot\_1\_CEU

De todos os polimorfismos, o SNP c.686+14T>G é o que apresenta maior percentagem de heterozigotia, tendo sido observados indivíduos heterozigóticos, bem como homozigóticos, para cada um dos alelos. O mesmo acontece para o SNP c.1905+72G>C, em que a maioria dos doentes é homozigótica para o alelo mais comum, mas 4 são heterozigóticos, e 2 doentes apresentam homozigotia para o alelo mais raro. No caso do SNP c.1093-92G>C, o alelo C é observado, em heterozigotia, em 6 doentes. Nas variantes c.529+29G>A, c.1281+26G>T e c.1764+40\_1764+41insT foi observado, para cada uma, o alelo menos frequente em 2 doentes, em heterozigotia. Apenas um alelo C é apresentado por um doente na posição c.1437-64 do genoma.

#### 4.1.3.2. Novas variantes

##### 4.1.3.2.1 Descrição das três novas variantes intrônicas identificadas e frequências observadas

###### *i.c.285+38dup*

No caso índice de uma das famílias com ataxia foi observada, pela primeira vez, a duplicação de uma timina na posição 38, num dos alelos, na sequência intrônica a juzante do exão 3 (porção 5' do intrão 3).

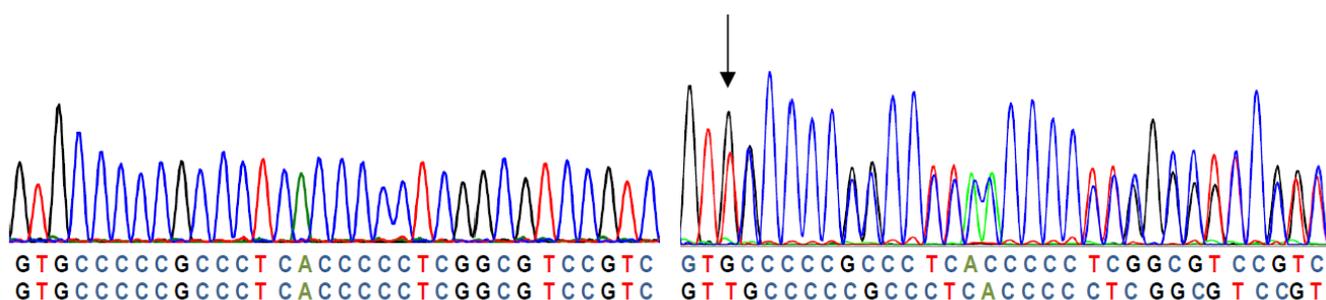


Figura 19 - Electroferograma representativo da sequência intrônica a juzante do exão 3 do gene PRKCG (c.285+38dup) à esquerda, a sequência normal observada em 59 dos doentes estudados; à direita, observa-se a duplicação da timina na posição 38 da porção 5' do intrão 3, num dos doentes estudados

###### *ii.c.397+55G>A*

A substituição de uma guanina por uma adenina, 55 nucleótidos a juzante do exão 4, foi observada no genoma do caso índice de uma família com ataxia, em heterozigotia. Esta é a primeira referência a este SNP.

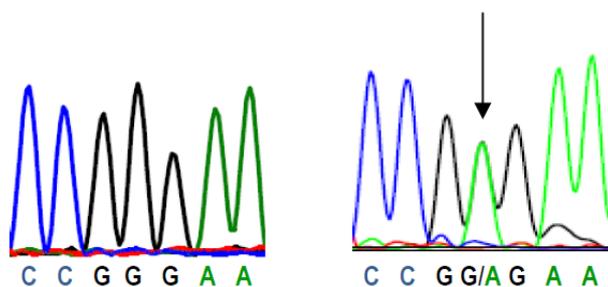


Figura 20 - Electroferograma representativo da sequência intrônica 4 do gene PRKCG (c.397+55G>A)

a sequência normal observada em 59 dos doentes estudados; à direita, pode observar-se a substituição da guanina por uma adenina, 55 nucleótidos a juzante do exão 4, num dos casos familiares de ataxia

*iii.c.1575+28C>T*

A substituição de uma citosina, no nucleótido 28 da porção 5' do intrão 14, por uma timina, foi observada em duas famílias, aparentemente não relacionadas por parentesco. Numa das famílias, a mutação foi também observada no irmão, igualmente afectado pela doença. Em todos os indivíduos, o novo SNP foi observado em heterozigotia (figura 24).

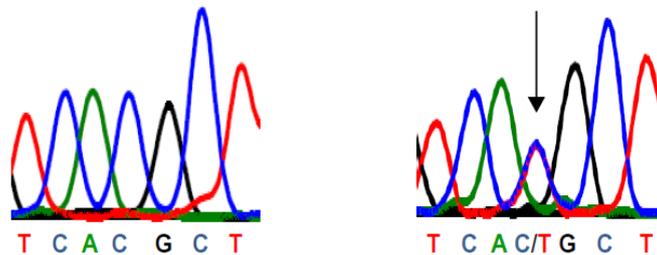


Figura 21 - Electroferograma representativo da sequência intrónica 14 do gene *PRKCG* (c.1575+28C>T)

À esquerda na figura, encontra-se a sequência normal observada em 58 dos doentes estudados; à direita, pode observar-se a substituição de uma citosina por uma timina, 28 nucleótidos a juzante do exão 14, em três doentes (de duas famílias com ataxia)

As frequências alélicas para os dois novos SNPs e duplicação intrónicas observadas nos doentes estudados encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Frequências alélicas para as mutações intrónicas descritas neste trabalho

Intrão	Polimorfismo	Frequências alélicas na série de doentes estudada	
		nº doentes com transm. AD N=108 cromossomas	nº total doentes N=120 cromossomas
3_5'	<b>c.285+38dup</b>	0.991 - / 0.009T	0.992 - / 0.008T
4_5'	<b>c.397+55G&gt;A</b>	0.991G/ 0.009A	0.992G/ 0.008A
14_5'	<b>c.1575+28C&gt;T</b>	0.982C/ 0.018T	0.983C/ 0.007T

**4.1.3.2.2. Análise bioinformática das novas variantes intrónicas observadas**

A possível patogenicidade das três novas mutações intrônicas foi pesquisada pela utilização dos programas bioinformáticos *NNSplice*, *GeneSplicer*, *NetGene2*, *Spliceport* e *Human Splicing Finder (HSF)*, este último contendo também o *software* para análise da criação ou eliminação de sequências ESE/ ESS/ ISE e ISS.

Para as variantes c.285+38dup e c.1575+28C>T todos os programas indicam que não deverá ocorrer qualquer alteração no *splicing* do transcrito.

A mutação c.397+55G>A altera a sequência descrita CCGGGAA para CCGAGAA (figura 11) criando um local críptico de *splicing* entre os exões 4 e 5, que distam apenas 136pb. Os programas *NNSplice* e *NetGene2* não previram qualquer alteração no mecanismo de *splicing* enquanto que os valores previstos pelos programas *GeneSplicer* e *Spliceport*, tanto para o local dador original (c.397, exão 4) como para o aceitador (c.398, exão 5), sofreram uma ligeira redução. O novo local aceitador passa a ter 64,4% mais probabilidade de ser reconhecido como aceitador, embora o valor continue a ser bastante inferior (73.87) ao obtido para o local original (97.97), de acordo com o programa *HSF*. Desta forma, conclui-se que, muito provavelmente, esta mutação não influencia o *splicing* normal do transcrito.

#### 4.2. Análise haplotípica

Apesar da possibilidade de existirem  $6,6 \times 10^{18}$  haplótipos possíveis para os 16 SNPs observados (8 intrônicos e 8 exônicos e, de entre estes últimos, 3 são não-sinónimos e 5 sinónimos) no total de doentes estudado, o programa *PHASE* 2.1 estimou a possibilidade de existirem, somente até 52 haplótipos. Ao serem considerados apenas os SNPs fenotipicamente “não deletérios”, foi estimado um número máximo de 45 haplótipos, sendo as 3 mutações associadas à doença, responsáveis pela possibilidade de se observarem os restantes 7 haplótipos (tabela 8). Dado que a análise pelo programa *PHASE* não permite considerar outras mutações que não as pontuais, e dado terem sido também observadas uma inserção e uma duplicação, o número de haplótipos possível deverá ser superior se se considerarem todas as variantes polimórficas observadas neste estudo (18).

Quando se aplica um número de iterações 100x superior ao *default* do programa *PHASE*, o número de haplótipos estimado para o total de doentes com SCA (60 elementos), casos familiares (54) e doentes com ataxia não-SCA14 (57), é

muito semelhante (tabela 8). A homogeneidade na série estudada, sugerida por estes resultados, pode ser devida ao facto de o número de doentes, em cada grupo, ser relativamente pequeno.

Tabela 8 - Estimativa do número de haplótipos obtido através do programa *PHASE* 2.1, para os grupos considerados e número diferente de iterações

Doentes		SNPs		Nº haplótipos estimado		
Nº estudado	Observações	Nº estudado	Observações	( <i>PHASE</i> ) 100 iterações	( <i>PHASE</i> ) 1x10 <sup>4</sup> iterações	( <i>PHASE</i> ) 1x10 <sup>6</sup> iterações
60	Total de doentes com SCA	16	Intrónicos + exónicos (sSNPs e nsSNPs)	51	<b>52</b>	<b>52</b>
54	Casos de SCA familiar	16	Intrónicos + exónicos (sSNPs e nsSNPs)	49	51	51
60	Total de doentes com SCA	13	Intrónicos + exónicos (sSNPs)	39	<b>45</b>	<b>45</b>
54	Casos de SCA familiar	13	Intrónicos + exónicos (sSNPs)	47	44	44
57	Doentes com ataxia não-SCA14	16 (=13)	Intrónicos + exónicos (sSNPs e nsSNPs)	42	43	43

A sequência TCCCATGGTGGTTTCG corresponde ao haplótipo mais frequente, estando presente em aproximadamente metade dos cromossomas estudados. A estrutura deste haplótipo pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9 - Estrutura do haplótipo mais frequente estimado pelo programa *PHASE*, para o total de doentes estudados

SNPs	Alelo na sequência consenso	Observações
<b>c.72C&gt;T/ p.A24A/</b>	T	alelo ancestral e mais frequente T
<b>c.207C&gt;T/ p.C69C</b>	C	alelo ancestral e mais frequente C
<b>c.234C&gt;A/ p.H78Q</b>	C	alelo A associado à doença (descrito neste estudo)
<b>c.285C&gt;T/ p.D95D</b>	C	alelo mais frequente C
<b>c.319A&gt;G/ p.S107G</b>	A	alelo G associado à doença (descrito neste estudo)
<b>c.349T&gt;A/ p.C117S</b>	T	alelo A associado à doença (descrito neste estudo)
<b>c.397+55G&gt;A</b>	G	novo SNP; alelo G (descrito neste estudo)
<b>c.529+29G&gt;A</b>	G	sem informação
<b>c.567T&gt;C/ p.N189N</b>	T	alelo ancestral A (T)
<b>c.686+14T&gt;G</b>	G	alelo ancestral C (G)
<b>c.1093-92G&gt;C</b>	G	sem informação
<b>c.1281+26G&gt;T</b>	T	alelo mais frequente C
<b>c.1437-64T&gt;C</b>	T	alelo ancestral G (C) mas menos frequente
<b>c.1497T&gt;C/ p.F499F</b>	T	alelo ancestral G (C) mas menos frequente
<b>c.1575+28C&gt;T</b>	C	novo SNP; alelo T (descrito neste estudo)
<b>c.1905+72G&gt;C</b>	G	alelo mais frequente G

Para 46 dos 60 doentes, foi estimado, com elevada probabilidade (99,9-100%), o haplótipo presente em cada um dos cromossomas. Dos restantes, em 8 doentes há um genótipo com 80 a 99,8% de probabilidade de ser observado.

## 5. Discussão

### 5.1. Previsão da patogenicidade das mutações *missense* identificadas: análise bioinformática, conservação e função dos resíduos mutados, e sua localização na estrutura da PKC $\gamma$

A previsão do efeito na proteína PKC $\gamma$  nos dois conjuntos de mutações *missense* descritos no gene *PRKCG* (mutações associadas a SCA14 *versus* não associadas) permitiu avaliar, e validar, a eficiência dos programas bioinformáticos utilizados neste trabalho.

Das 26 mutações *missense* descritas até ao momento como causadoras de SCA14, apenas para uma, p.Val692Gly, o efeito foi previsto como não deletério. Esta mutação localiza-se numa posição não conservada do domínio variável V5, na extremidade amina da proteína, após o domínio AGC-cinase C-terminal. Este resíduo não está presente em nenhuma das proteínas cinase C humanas homólogas da PKC $\gamma$ , bem como na maioria das suas ortólogas noutras espécies. Devido a este facto, apenas para dois dos programas, *Polyphen-2* e *PANTHER*, foi possível obter uma previsão quanto ao efeito desta mutação. Dado que a análise destes programas se baseou na conservação dos resíduos em sequências homólogas, o resultado terá indicado, como seria de esperar, um efeito não patogénico.

De acordo com os resultados das experiências realizadas para a proteína mutante (actividade enzimática e concentração de Ca<sup>2+</sup> semelhantes às da proteína do tipo selvagem), Adachi e colaboradores (2008) propõem que nos doentes afectados, portadores da p.Val692Gly, haja outra mutação responsável pelo fenótipo SCA. Na base de dados de SNPs da NCBI há indicação que os 2 alelos deste SNP codificante (rs78437096) foram observados numa população controlo, embora as frequências alélicas não estejam indicadas. No entanto, noutra população controlo, de origem norte-americana, em que foram estudados 4172 cromossomas, foi apenas observado o alelo normal (dbSNP, NCBI) e os resultados de dois estudos funcionais sugerem um efeito patogénico para a mutação. Asai *et al.* (2008) observaram uma actividade catalítica aumentada para a p.Val692Gly, em relação à proteína normal, e Seki *et al.* (2011) verificaram que embora não induzissem a formação de agregados, estas proteínas mutantes causavam toxicidade celular.

Assim, com excepção desta mutação, que é a que mais suscita dúvidas quanto ao facto de ser causadora de SCA14, para as restantes, a previsão do efeito pelos programas utilizados revelou ser coerente quanto a um efeito deletério.

No grupo das mutações não associadas a SCA14, 4 dos 6 SNPs observados em estudos de genotipagem de várias populações controlo (dbSNPs, NCBI), o SNP identificado numa família com SCA14 por Koht e colaboradores (2011) e uma das quatro mutações observadas em famílias RP11 (Al-Maghteh *et al.*, 1998), obtiveram resultados inequívocos, e congruentes entre os diferentes programas, quanto a um efeito não patogénico.

Três mutações obtiveram, no entanto, resultados não coerentes entre os vários programas, embora para uma (p.Gly340Trp), observada numa população controlo, seja possível colocar a hipótese de o seu efeito não ser deletério. Os resultados incongruentes obtidos para as outras duas mutações (p.His415Gln e p.Lys576Asn) não permitem concluir quanto ao seu efeito. Para as mutações p.Arg141Cys e p.Ala523Glu, detectadas em famílias RP11, tanto em doentes como em familiares saudáveis, foi previsto um impacto deletério na proteína por todos os programas. Tal sugere a necessidade de realizar outros estudos, de forma a esclarecer quanto à patogenicidade destas mutações.

Dado a SCA14 ser uma doença rara, de início tardio e penetrância incompleta, foi inicialmente colocada a hipótese de alguma das mutações *missense* deste grupo de SNPs poder ter um efeito deletério e causar SCA14. No entanto, tal como esperado, a maioria destas “mutações não-SCA14” deverá corresponder a polimorfismos.

Assim, após validação da eficácia dos programas bioinformáticos utilizados nestes dois grupos de SNPs, os resultados obtidos para as três novas mutações *missense* do gene *PRKCG* (c.234C>A/ p.His78Gln, c.319A>G/ p.Ser107Gly, c.349T>A/ p.Cys117Ser) identificadas neste trabalho, sugerem que estas são, muito provavelmente, patogénicas, e a causa da ataxia espinocerebelosa observada nos indivíduos portadores.

A análise bioinformática de novas mutações *missense*, no caso do gene *PRKCG*, recorrendo à combinação de programas utilizado, deverá conduzir a uma previsão fiável quanto à sua patogenicidade. Esta necessidade é especialmente importante aquando da detecção de uma mutação *missense* no âmbito de um teste de diagnóstico, sobretudo quando o nsSNP não se encontra descrito e não puder ser efectuado um estudo de segregação familiar da doença e mutação, ou quando o resultado deste estudo for inconclusivo.

Outra forma de averiguar quanto à patogenicidade das novas mutações seria a realização de estudos funcionais, e populacionais (de uma amostra controlo representativa da população), ambos morosos. Assim, poderá, recorrer-se ao

conjunto de programas bioinformáticos utilizado, para previsão do efeito da mutação, de forma a dar ao doente uma resposta não só rápida mas, sobretudo, fiável.

Para além da análise bioinformática, poderá ser útil localizar o resíduo na estrutura e observar a sua conservação em proteínas homólogas, averiguar o domínio funcional a que pertence e se está localizado em alguma sequência com significado funcional.

No caso da mutação p.Ser107Gly, dos cinco programas, apenas o algoritmo utilizado pelo *software Polyphen-2* não sugere um efeito patogénico. Este resultado dever-se-á, muito provavelmente, à conservação do resíduo de serina nesta posição da proteína apenas entre as PKC $\gamma$  de mamíferos, não sendo observado nas restantes proteínas ortólogas e nas outras isoformas de PKC humanas. No entanto, em vez de ser apenas considerado um resíduo não conservado evolutivamente, este facto pode indicar uma especificidade da PKC $\gamma$  nos mamíferos como talvez, por exemplo, a sua localização numa das sequências de consenso do domínio C1B de ligação às proteínas 14-3-3 $\epsilon$ . Esta mutação é, até ao momento, e tal como referido anteriormente, a única mutação identificada nestas sequências consenso.

Não só a mutação p.Ser107Gly, mas todas as restantes mutações observadas no gene *PRKCG*, muito provavelmente causadoras de SCA14, se localizam em locais estrutural e/ou funcionalmente importantes para a proteína.

A maioria das mutações descritas localiza-se no domínio regulador da proteína (83,9% ou 26 do total de 31) e, neste, apenas no domínio C1 (6 mutações em C1A e 19 em C1B) e na região do pseudo-substrato (1 mutação). No domínio cinase C3, AGC-cinase C-terminal e região variável V5, encontram-se descritas as restantes 5 mutações no gene *PRKCG*, associadas a SCA14.

Ao observar a sequência dos domínios homólogos C1A e C1B verifica-se que 21 dos 50 resíduos que os constituem são conservados (figura 15). Dos 14 resíduos em que se localizam as 19 mutações de C1B, 11 podem ser observados na mesma posição no domínio C1A, e 4 das 6 mutações de C1A localizam-se em resíduos conservados nos 2 domínios. Cerca de metade das mutações observadas nos dois domínios homólogos C1 (12 de 25) localiza-se nos resíduos de His e Cys conservados dos motivos *Zn-finger*.



básico) pela glutamina (aminoácido polar neutro) seja conservada, o programa *PoPMuSiC* prevê que esta seja destabilizadora para o domínio C1A (tabela 3). Tal pode ter como consequência, a alteração da conformação da hélice e comprometer, assim, esta estrutura de coordenação dos átomos de  $Zn^{2+}$ .

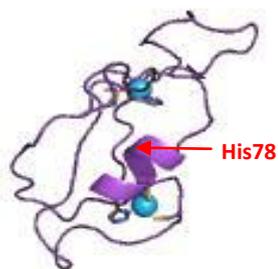


Figura 23 - Estrutura 3D da PDB id 2e73 (bem como do sub-domínio C1A da PKC $\gamma$ ).

Na figura encontra-se assinalada a hélice  $\alpha$  e, nesta, a localização do resíduo His78. Os círculos a azul correspondem aos átomos de  $Zn^{2+}$ , coordenados na estrutura. (Figura adaptada de PDBsum, *Protein Data Bank*)

No domínio C1B da PKC $\gamma$  os resíduos His101, Cys131, Cys134 e Cys150 coordenam um dos átomos de  $Zn^{2+}$ , enquanto que os aminoácidos Cys114, Cys117, His139 e Cys142 são responsáveis pela coordenação do outro átomo. Com exceção da Cys150, as restantes Cys e His parecem ser essenciais para a alta afinidade da ligação da PKC $\gamma$  aos PE (e DAG) (Xu *et al.*, 1997). Estes resíduos parecem, de facto, desempenhar um papel importante para o funcionamento normal da PKC $\gamma$ , pois estão, até agora, descritas 9 mutações em 6 destes 8 aminoácidos: p.Cys117Ser, identificada no presente estudo; p.His101Gln, p.His101Tyr e p.Lys100-His101del; p.Cys114Ser; p.Cys131Arg e p.Cys131Tyr; p.His139Gln e p.Cys150Phe. As mutações p.Cys114Tyr e p.Cys131Tyr em C1B deverão ser equivalentes em termos de localização no *Zinc-finger*, respectivamente, às mutações p.Cys49Tyr e p.Cys77Ser em C1A.

O resíduo Cys117, onde foi identificada uma das mutações no presente estudo, p.Cys117Ser, deverá ser, então, essencial para a estrutura de um dos núcleos de coordenação do zinco em C1B. De acordo com a distância de Grantham entre a cisteína e a serina, a substituição entre estes aminoácidos é considerada moderadamente radical, e o efeito no domínio C1B, destabilizador, como previsto pelo software *PoPMuSiC* (tabela 3). Assim, a mutação p.Cys117Ser poderá alterar a conformação da estrutura de um dos núcleos de coordenação do zinco, no domínio C1B (figura 21). Muito provavelmente, a mutação descrita no resíduo adjacente His116 deverá, também, influenciar a ligação do átomo de zinco neste núcleo de coordenação.

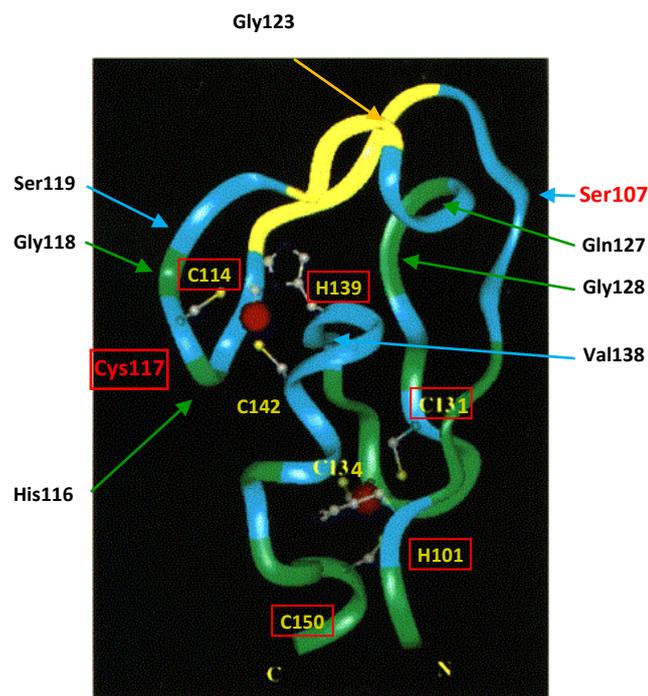


Figura 24 - Estrutura do domínio C1B da PKC $\gamma$

(adaptado de Xu *et al.*, 1997). A posição dos resíduos de cisteína (C) e histidina (H) (a amarelo) que coordenam os 2 átomos de zinco (círculos a vermelho) está assinalada. Os resíduos de ligação ao DAG estão indicados a amarelo na sequência, e os aminoácidos envolvidos na interacção com a membrana, a azul. A localização dos resíduos Ser107 e Cys117 está indicada na estrutura, a vermelho. A localização dos resíduos onde se encontram descritas as restantes mutações está assinalada na estrutura em C1B, embora numa caixa a vermelho se encontrem os resíduos envolvidos na coordenação do zinco.

Segundo Kazanietz *et al.*, (1995) os aminoácidos Phe103, Leu120, Met129, Met136 e Val138 contribuem para o carácter hidrofóbico do núcleo do *Zinc-finger* e *fold*ing do domínio C1B. De facto, a fenilalanina e a valina encontram-se, também, nas posições homólogas em C1A, respectivamente Phe38 e Val72. Quanto aos resíduos Leu120, Met129 e Met136, embora não conservados em C1A, nas posições homólogas podem encontrar-se aminoácidos neutros não-polares, ou seja, possuindo as mesmas características. Este facto sugere, igualmente, que estes resíduos desempenhem a mesma função nos dois domínios. De entre estes resíduos, está descrita uma mutação no domínio C1B, na valina da posição 138 da PKC $\gamma$  (p.Val138Gly).

Dois *loops* em C1B (resíduos 106-114 e 123-129) estão envolvidos na estrutura do “bolso de ligação” ao DAG embora apenas 7 destes resíduos estabeleçam interacções intramoleculares que permitem a formação e manutenção

desta estrutura (Xu *et al.*, 1997; Hritz *et al.*, 2004). Destes, 3 são conservados em C1A e C1B: a treonina nas posições 47 e 112, a glutamina 62 e 127 e a glicina nas posições 63 de C1A e 128 de C1B. De facto, estão descritas mutações nas Gly63 e 128 que ocupam posições homólogas nos dois domínios C1, bem como na Gln127. Apesar dos restantes 4 aminoácidos de C1B não serem conservados em C1A, apresentam características semelhantes. Assim, pode colocar-se a hipótese de a mutação na Arg41 estar também implicada na manutenção da estrutura do local de ligação ao DAG no sub-domínio C1A, tal como acontece com o aminoácido na posição homóloga em C1B (His106). Embora não responsáveis pelo estabelecimento de interações intramoleculares, os resíduos Ser107 e Cys114 onde foram, igualmente, identificadas mutações neste estudo, pertencem também a um dos *loops* acima referidos.

Novamente, ao considerar os 6 aminoácidos envolvidos na interacção com o DAG verifica-se que 4 são conservados entre os dois domínios (Pro46 e 111, Thr47 e 112, Phe48 e 113, Gly58 e 123) e os outros dois apresentam características semelhantes aos do seu homólogo no outro domínio (Ile56 e Leu121, Trp57 e Tyr122). Nestes 6 resíduos de ligação ao DAG, estão descritas duas mutações no resíduo Gly123, p.Gly123Asp e p.Gly123Glu.

Embora não localizados em nenhuma das sequências ou motivos acima referidos, os resíduos Gly118 e Ser119 parecem desempenhar uma função importante quanto ao enrolamento e estrutura do domínio C1B, de acordo com o padrão dos resíduos que interactivam com os fosfolípidos da membrana, como se pode verificar na figura 21. Nestes 2 resíduos estão descritas 3 das mutações observadas em C1B.

A conservação da sequência dos domínios C1 e a localização das mutações em C1A e C1B estão em acordo com a hipótese de estes domínios serem redundantes, ambos essenciais para a ligação ao DAG e, conseqüentemente, para a activação da proteína. No entanto, a maioria das mutações localizam-se em C1B. Talvez a ligação deste domínio ao DAG permita à PKC $\gamma$  adquirir a conformação final, activa

Quanto às mutações nos restantes domínios, na pequena sequência consenso de 13 aminoácidos que constitui o domínio do pseudosubstrato foi descrita a mutação p.Arg21Lys, que se localiza próximo do resíduo Ala24, único resíduo diferente entre esta sequência e a do substrato. A integridade desta sequência permite que, após processamento pós-

traducional por fosforilação, esta se ligue ao domínio catalítico da enzima, inibindo a actividade da enzima, na ausência de agonistas, ou seja, é essencial para a correcta regulação da proteína.

No domínio catalítico foram observadas 5 das 31 mutações descritas, duas no núcleo catalítico C3 (p.Gly360Ser e p.Ser361Gly), uma no domínio AGC-cinase C-terminal (p.Phe643Leu), e duas mutações no domínio variável V5 (p.Val692Gly e p.Met697Ile\_ex13).

Ambas as mutações em C3 localizam-se no padrão conservado GlyXGlyXXGly, do aminoácido 358 ao 363, cuja função é a ligação do ATP. A mutação p.Gly360Ser envolve uma das glicinas conservadas neste padrão, enquanto que o resíduo de serina na posição 361 pode corresponder a qualquer aminoácido. Não obstante este facto, o resíduo de serina é muito conservado entre as isoformas PKC. Este domínio permite, também, a ligação do co-chaperone Cdc37.

Por sua vez, a mutação p.Phe643Leu localiza-se entre duas regiões muito conservadas do domínio AGC-cinase C-ter, a sequência ProXXPro (aminoácidos 630-633), essencial à formação do gancho molecular com o núcleo catalítico, e a Thr655, sujeita a fosforilação no *turn-motif*. Neste domínio C-terminal das diferentes isoformas PKC, para além destes motivos e do motivo hidrofóbico, existem numerosos locais de interacção com outras proteínas (Steinberg, 2008). Ou seja, esta mutação poderá encontrar-se numa sequência cuja função ainda esteja por determinar na PKCγ.

Por fim, na região variável V5 encontram-se descritas as mutações p.Val692Gly e p.Met697Ile\_ex13. A possível patogenicidade da primeira é discutível, como foi já abordado. A mutação p.Met697Ile\_ex13 envolve a perda do codão stop e incorporação de 13 novos resíduos na extremidade carboxilo da proteína.

Em conclusão, as mutações descritas parecem localizar-se em sequências essenciais para a proteína. Estas mutações podem conduzir à alteração em sequências de reconhecimento ou interacção com outros átomos ou moléculas e/ou na estrutura (enrolamento ou *folding*) de um dado domínio, ou mesmo, da proteína.

Assim, um teste de diagnóstico de SCA14 deverá iniciar-se pelo rastreio de mutações na sequência correspondente ao domínio C1 (exões 1 a 5). Em seguida, poderão ser estudadas sequências tais como o pseudo-substrato (exão 1), a sequência rica em glicinas localizadas em C3 (exão 10), e o domínio AGC-Cinase C-terminal, que contém o HM, o TM e

a sequência de prolinas (exão 18). Por fim, e dado que na proteína existem outros motivos conservados, deverão ser estudados os restantes exões do gene *PRKCG*.

## 5.2. Relação genótipo-fenótipo

Quanto aos doentes portadores das mutações observadas neste trabalho, localizadas no domínio C1 (p.His78Gln, p.Ser107Gly e p.Cys117Ser), verifica-se que apresentam, exclusivamente, sintomas cerebelosos. Quando à idade média de início da doença, pode considerar-se que as apresentadas para os indivíduos portadores das mutações p.His78Gln e p.Ser107Gly são comparáveis (aproximadamente 50 anos), enquanto que a apresentada pelo doente, portador da mutação p.Cys117Ser, é uma das mais tardias entre os doentes SCA14 descritos. Até ao momento, apenas doentes com as mutações p.Cys66Tyr e p.Ser119Pro na proteína PKC $\gamma$ , apresentam idades de início de 66 e 70 anos, respectivamente. É interessante verificar que a mutação homóloga de p.Cys66Tyr no domínio C1B, p.Cys131Tyr, conduz a um início mais precoce da doença, aos 18 e 50 anos, para os dois doentes afectados. No entanto, não é possível comparar os fenótipos dado que não se encontra disponível o quadro clínico e história familiar para o doente portador da mutação p.Cys66Tyr.

Mutações no mesmo resíduo, ou a mesma mutação em diferentes famílias, podem provocar diferentes quadros clínicos (Chen *et al.*, 2011). Não obstante, será feita uma tentativa para relacionar os genótipos dos doentes aos fenótipos por eles apresentado.

Como exposto no ponto anterior, as mutações no gene *PRKCG* não se distribuem, de forma homogénea, por todo o gene. Ao analisar o quadro clínico dos doentes portadores das diferentes mutações descritas (tabela 11, no capítulo “Anexos”), parece haver uma correspondência entre a localização das diferentes mutações e os sintomas apresentados, sendo possível definir 4 grupos:

A) Mutações na região do pseudo-substrato (1 mutação)

Embora não tenha sido apresentada a descrição clínica da mutação p.Arg21Lys, na região do pseudo-substrato, o doente analisado aos 15 anos, teria tido início dos sintomas aos 5, o que poderá indicar um quadro clínico grave da doença (Rentschler, 2010).

B) Mutações nos resíduos envolvidos na coordenação directa dos átomos de zinco, nos domínios C1 (14 no total)

Em C1A os resíduos são a Cys49, Cys66, Cys77 e a His78 e, em C1B, a His101, Cys114, His116, Cys117, Cys131, His139 e Cys150.

Os doentes portadores de mutações nestes resíduos apresentam síndrome cerebeloso (ataxia, disartria e, nalguns casos, alteração dos movimentos oculares e dismetria) e, raramente, tremor. A apresentação de outros sintomas é rara. O intervalo da idade de início da doença varia entre a infância e os 70 anos.

C) Mutações nos resíduos responsáveis pela geometria do local de ligação ao DAG, e interacção com este activador, bem como noutros resíduos envolvidos na geometria geral dos domínios C1 (13 no total)

Os resíduos correspondentes em C1A são a Arg41 e Gly63 e, no domínio C1B, a Ser107, Cys114, His116, Gly118, Ser119, Gly123, Gln127, Gly128, e Val138. Considerando os doentes com mutações nestes resíduos verifica-se que apresentam um quadro clínico mais heterogéneo que o do grupo anterior. No entanto, é interessante verificar que à excepção do resíduo Arg41 em C1A, mutações nos restantes conduzem ao aparecimento de um ou mais sintomas extrapiramidais (tremor, mioclonia, distonia e epilepsia). A mioclonia está presente em alguns doentes apresentando as mutações p.Gly118Asp, p.Gly123Glu, p.Gln127Arg e p.Val138Glu, em resíduos importantes em C1B para a estrutura do local de ligação ao DAG, bem como na interacção directa com este composto. O mesmo acontece em relação à distonia, associada a mutações em Gly118, e nos resíduos de glicina homólogos, nas posições 63 e 128, em C1A e C1B, respectivamente. A presença de um défice cognitivo está igualmente associada a mutações em alguns destes resíduos, Cys114, Ser119, Gly123 e Gly128.

A mutação p.Ser107Gly é a única descrita até ao momento nos resíduos de ligação às proteínas 14-3-3ε. No entanto, o fenótipo apresentado é semelhantes ao apresentado por algumas das mutação neste grupo, que também não causam sintomas extrapiramidais e/ou diminuição cognitiva.

Embora se possa dividir os resíduos dos sub-domínios C1A e C1B por localização/função, a nível fenotípico os resultados não parecem ser muito diferentes. No entanto, alterações mais drásticas na estrutura geral do domínio ou do local do DAG, ou substituição dos resíduos envolvidos na ligação a este composto, podem, talvez, conduzir a uma menor capacidade de fosforilação da proteína mutante (por incapacidade parcial ou total de ligação ao DAG) e/ou à sobrecarga mais rápida dos sistemas proteolíticos da célula. Desta forma, outros sistemas extracerebelosos podem ser afectados, observando-se nos doentes sintomas como a distonia, mioclonia, diminuição cognitiva, entre outros.

#### D) Mutações descritas no domínio catalítico (5 mutações)

Os doentes portadores destas mutações apresentam ataxia e disartria, e, em alguns casos, tremor. O intervalo de idades para início de idades varia entre a infância e os 60 anos. Mutações em alguns resíduos conduzem à apresentação de sintomas extrapiramidais, como é o caso do resíduo conservado Gly360 (tremor e fasciculações), Phe643 (tremor, miocimia facial e défice cognitivo) e Met697 (mioclonia). Talvez não seja possível considerar a mioclonia causada pela mutação p.Met697Ile\_ex13 dado ter sido observada num doente que apresentava esta mutação em homozigotia, com um fenótipo considerado grave. Os pais deste indivíduo são portadores assintomáticos e a doença manifestou-se na avó, que apresenta a mutação em heterozigotia, aos 60 anos de idade (Asai *et al.*, 2009).

Pode colocar-se a hipótese de que o efeito de uma dada mutação é tanto mais patogénico, quanto maior o número de sistemas extra-cerebelosos afectados, e logo mais diversos os sintomas apresentados, bem como a idade de início da doença.

### 5.3. Hipóteses sobre os mecanismos patogénicos das novas mutações *missense* identificadas

Ao gancho formado entre o domínio AGC-cinase C-ter e o núcleo catalítico da PKC $\gamma$ , recém-sintetizada, ligam-se os chaperones Hsp90 e Cdc37 (Newton, 2009); como o pseudo-substrato se encontra exposto, permite o acesso da PDK1 ao local de fosforilação do *activation loop* (Gao et al, 2001). Sabe-se que a inibição farmacológica da Hsp90 conduz à destabilização e à degradação, pela via ubiquitina-proteassoma, das suas proteínas “cliente” (Gould *et al.*, 2009; Whitesell

& Lindquist, 2005; Kamal *et al.*, 2004) e que mutações nas duas prolinas na sequência ProXXPro ou na Tyr na posição 460, impedem a fosforilação e a actividade da PKC (Gould *et al.*, 2009).

Assim, poderão as mutações num dos sub-domínios C1, alterar a estrutura da PKC $\gamma$  recém-sintetizada de tal forma que seja impossível a ligação ou dos chaperones Hsp90 e Cdc37? Sem ligação aos chaperones a PKC $\gamma$  seria, muito provavelmente, sujeita a degradação, pela via UPS. No entanto, este sistema pode não ser suficiente para remover estas proteínas recém-sintetizadas, com enrolamento incorrecto.

Segundo Seki *et al.* (2005), as proteínas mutantes C1 não fosforiladas (no *activation loop*, TM e HM) formam agregados massivos no citoplasma das células, insolúveis, que deverão ser degradados pelos sistemas de autofagia (lisosomal) e UPS (Seki *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2010). Outros autores, no entanto, não observam a formação destes agregados (Verbeek *et al.*, 2005, 2008) e Doran e colaboradores (2008) afirmam que os agregados massivos se devem à sobre-expressão das proteínas mutantes, a um nível superior ao endógeno.

Seki *et al.*, 2005, verificaram, igualmente, que proteínas contendo as mutações p.His101Gln p.Gly118Asp, p.Ser119Pro, p.Ser119Phe, p.Gln127Arg e p.Gly128Asp eram também sujeitas a fosforilação no *activation loop*, TM e HM, embora a níveis inferiores aos apresentados pelas proteínas normais. Ou seja, uma fracção das proteínas mutantes, poderá completar o processamento pós-traducional. Assim, para algumas proteínas deverá ocorrer ligação dos chaperones Hsp90, Cdc37, possibilitando a fosforilação pela PDK1 e, posteriormente, a ligação do complexo mTORC2. De facto, a Hsp90, tem como função facilitar o enrolamento das suas proteínas “cliente”, como é o caso das proteínas cinase, regulando o controlo de qualidade e o seu *turnover* de forma a manter a homeostasia (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Whitesell & Lindquist, 2005; Caplan, *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o stress oxidativo pode conduzir à activação da PKC $\gamma$ , devido ao estabelecimento de ligações dissulfureto entre as cisteínas que coordenam os átomos de zinco, nos domínios C1A e C1B. Esta alteração leva a que a PKC $\gamma$  adquira uma conformação aberta, com translocação para a membrana, ligando-se ao DAG e tornando-se cataliticamente activa (Lin *et al.*, 2007).

Mutações que impedem a capacidade de ligação dos iões zinco estão previstas conduzir a uma alteração na estrutura do domínio C1B, aproximando-a da estrutura apresentada sob stress oxidativo (Doran *et al.*, 2008); modelos das estruturas do domínio C1B contendo as mutações p.His101Tyr, p.Ser119Pro e p.Gly128Asp revelaram disrupção

dos *Zn-fingers* e colapso do local de ligação do DAG/PE, de forma a que os autores colocaram a hipótese de a gravidade dos efeitos das mutações estar relacionada com a extensão da perda da estrutura de C1B (Lin *et al.*, 2007). Da mesma forma, por estudos de FRET, Verbeek *et al.* (2008) verificaram que há alteração da conformação da PKC $\gamma$  contendo as mutações p.Gly118Asp, p.Val138Glu e p.Cys142Ser, para uma conformação muito provavelmente aberta. Estas proteínas, contendo mutações em C1B, apresentam uma taxa de translocação superior à da proteína normal. No entanto, a transfecção de, apenas, os domínios C1B contendo as mesmas mutações, não conduz à sua translocação para a membrana (Verbeek *et al.* 2008). Tal apoia a hipótese de os domínios C1A e C1B serem, de facto, redundantes, tal como sugerido por alguns autores (Verbeek *et al.*, 2008; Adachi *et al.*, 2008).

Numa proteína normal, após processamento pós-traducional, por fosforilação, o pseudo-substrato passa a ocupar o domínio catalítico. No entanto a alteração do sub-domínio C1A ou C1B (consoante a localização da mutação) faz com que a proteína passe a apresentar uma conformação aberta e ocorra translocação para a membrana sem necessidade de sinalização pelos mensageiros secundários. A ligação da proteína à membrana dever-se-á efectuar através do outro domínio C1, cuja estrutura não terá sido afectada mas, a não ligação ao DAG do domínio mutado, leva a que a conformação final da enzima não seja activa. A translocação constitutiva das proteínas mutantes deverá dificultar a ligação ao DAG por parte da proteína normal.

De acordo com Adachi *et al.*, 2008, os mutantes C1 possuem um tempo superior junto à membrana, face ao observado para a proteína normal, mas um tempo de retenção menor na membrana plasmática. Este facto, para além de poder estar relacionado com a concentração de cálcio (Adachi *et al.*, 2008), talvez também possa dever-se à dificuldade ou mesmo impossibilidade de, devido à sua conformação alterada, se ligarem ao DAG. Esta localização prolongada junto à membrana poderá levar ao seu sequestro em endossomas primários, tal como observado por Doran, em vesículas *dot-like*. Apesar de Seki *et al.* (2005) terem também observado estas vesículas, não conseguiram associá-las a marcadores do endossoma, lisosoma ou complexo de Golgi. No entanto, para alguns mutantes observaram um fenómeno que apoia a hipótese da formação de endossomas. Por re-translocação, algumas proteínas retornam ao citoplasma formando agregados *dot-like*.

Assim, tal como constatado por Adachi e Verbeek e previsto por Doran, a actividade catalítica dos mutantes diminuiria. Não só pode haver menor quantidade de proteína, como observado para as proteínas mutantes p.His101Gln

(Alonso *et al.*, 2005) e p.Cys150Phe (Verbeek *et al.*, 2005), como a que se encontra funcional, pode ter adquirido uma conformação em que a actividade catalítica é menor, ou mesmo, nula.

A haploinsuficiência da proteína pode, então, conduzir à alteração na homeostasia do cálcio, menor resposta ao stress oxidativo e desregulação de todos os processos de transdução de sinal em que a PKC $\gamma$  possa estar envolvida. No entanto, ao considerar os ratinhos KO para o gene *PRKCG*, e o seu fenótipo menos grave que o apresentado pelos doentes SCA14, pode considerar-se que para além da inexistência da proteína, responsável pela apresentação de alguns sintomas, nos doentes, deverá haver algum mecanismo patogénico adicional.

Assim, e como sugerido por Yamamoto e colaboradores, em 2010, devido à sua sobrecarga, pode ocorrer comprometimento dos sistemas de proteólise da célula a partir de dada altura, o que está de acordo com o facto de a SCA14 ser uma doença de início tardio. Idades de início da doença, bem como sintomatologia, diferentes para a mesma mutação podem estar relacionadas com diferentes capacidades do sistema proteolítico do indivíduo lidar com a sobrecarga de moléculas, neste caso, proteínas.

A favor desta hipótese encontra-se o facto da patogénese de muitas outras doenças neurológicas de início tardio se dever à sobrecarga das vias proteolíticas (sistemas ubiquitina-proteassoma e autofagossoma-lisossoma) ou defeitos em componentes destas vias (Mittal & Ganesh, 2010).

Portanto, para os mutantes em C1, como é o caso de duas das mutações identificadas neste trabalho, p.His78Gln e p.Cys117Ser, propõe-se que o conjunto de mecanismos acima descrito seja responsável pela SCA14, ou seja, possível formação de agregados (massivos ou do tipo *dot-like*) com sobrecarga dos sistemas proteolítico, stress do RE. A menor quantidade de proteína funcional teria, como consequência, desregulação das vias de sinalização da proteína, alteração na homeostasia do cálcio e incapacidade de lidar com o stress oxidativo.

Quanto à mutação p.Ser107Gly, identificada neste trabalho e também localizada em C1, mas desempenhando uma função de ligação às proteínas de scaffold 14-3-3 $\epsilon$ , poderão, talvez, suceder uma de duas situações. Se não alterar a estrutura do domínio e impedir apenas a ligação às proteínas 14-3-3 $\epsilon$ , a sua activação passa a ser constitutiva, assim como a fosforilação. No entanto, o programa *PoPMuSiC* indica que, muito provavelmente, é uma mutação destabilizadora do domínio C1 e assim deverá apresentar os mesmos mecanismos patogénicos que os restantes mutantes C1.

A localização das mutações em C1 e a proposta de um possível mecanismo patogénico faz com que se concorde com a afirmação de Verbeek et al (2008) para as mutações em C1B estudadas (p.Gly118Asp, p.Val138Glu e p.Cys142Ser), de que parecem afectar a activação da PKC $\gamma$  por vias diferentes, embora com resultados semelhantes.

A mutação p.Arg21Lys é a única descrita na região do pseudosubstrato. Dado ter sido reportada recentemente não há qualquer estudo funcional desta mutação (Rentschler, 2010).

Sabe-se que mutações nesta região dão origem a uma enzima cataliticamente constitutiva, *in vitro*. Na célula é provável que o efeito seja o mesmo. Assim, após processamento por fosforilação da proteína, o pseudosubstrato não se irá ligar ao domínio catalítico e a enzima irá adquirir, muito provavelmente, uma conformação aberta. Tal facto faz com que a proteína mutante não se ligue às proteínas *scaffold*, nem responda aos mensageiros secundários, mas esteja constitutivamente activa. Devido à integridade dos domínios C1 e C2, espera-se que a ligação da proteína à membrana e ao DAG se faça sem problemas e a proteína passa a apresentar fosforilação constitutiva, provavelmente superior à normal. Neste caso seria interessante verificar o que aconteceria quanto à formação de agregados, especialmente os *dot-like*, em que segundo a hipótese que se está a colocar, seria reduzida. De acordo com o efeito na alteração da estrutura da proteína, a formação de agregados do tipo massivo, poderia ser ou não observado, com todas as consequências que daí poderiam advir para a patogénese.

Duas das mutações descritas, p.Gly360Ser e p.Ser361Gly, localizam-se no motivo rico em resíduos de glicina de C3 que, não só possibilita a ligação do ATP, como a do co-chaperone Cdc37.

Como já referido anteriormente a mutação p.Gly360Ser incide numa das glicinas conservadas do motivo de ligação ao ATP. Assim, o grupo fosfato não é transferido da proteína para os substratos e a enzima é inactiva. Tal é constatado nas experiências de Adachi, em que as proteínas com esta mutação não possuem actividade, quer na fosforilação de substratos *in vitro*, quer na célula. A alteração na estrutura também pode conduzir à formação de agregados massivos e tal como os mutantes em C1, pode sofrer fosforilação. Este mutante pode completar a maturação, e até ligar-se às proteínas 14-3-3 no citoplasma, mas ao sofrer translocação para a membrana, após sinalização pelos mensageiros secundários, não conseguirá fosforilar os substratos. Embora a proteína não seja funcional, dado a integridade dos domínios C1, a ligação ao DAG far-se-ia sem problema. Esta ideia é confirmada por tempos de retenção na membrana

semelhantes para a proteína contendo a mutação p.Gly360Ser e a de tipo selvagem (Adachi et al, 2008). Esta enzima não funcional pode, tal como os restantes mutantes C1, ser sequestrada em endossomas primários por forma a proceder-se à sua degradação ou reciclagem.

A mutação p.Ser361Gly, embora também se localize neste motivo de ligação ao ATP, incide num dos resíduos não conservado. Assim, se esta mutação interferisse, tal como a anterior na capacidade de ligação do ATP, os resultados obtidos por Adachi *et al.* (2008) para estas 2 mutações seriam semelhantes, o que não se verificou. Neste estudo verificou-se que a actividade intrínseca da proteína contendo a mutação p.S361G é constitutiva tanto *in vitro*, como na célula. No entanto, caso esta mutação não permita ou dificulte a ligação do co-chaperone Cdc37 poderá não se formar o gancho intramolecular entre os resíduos ProXXPro (630 ao 633) e a Tyr460, deixando o sítio activo da proteína disponível para fosforilação dos substratos, dado que os resíduos de glicina estão intactos para ligação ao ATP. Devido à conformação aberta desta proteína mutante, a sua activação e translocação para o citoplasma seriam constitutivas, e assim, tal poderia explicar a observação de um nível de fosforilação superior deste mutante em relação à proteína normal. Doran *et al.* (2008) verificaram que se formam em número reduzido inclusões do tipo *dot-like*, ou seja, como a ligação dos domínios C1 ao DAG se deverá efectuar de forma correcta, não há formação de tantos endossomas para sequestro da proteína.

O resíduo de Phe643 encontra-se entre os motivos conservados, o motivo ProPheArgPro que se localiza na posição 630 à 633 da proteína, e o *turn motif* (TM) onde a Thr na posição 655 é fosforilada no segundo passo de processamento pós-traducional, por intermédio do complex mTORC2.

Caso a mutação p.Phe643Leu altere a conformação do *turn motif* (TM) e impeça a fosforilação da Thr655, a proteína não completa o seu processamento pós-traducional. Além da ausência da actividade enzimática, há provavelmente neste caso, uma enzima não funcional, fosforilada de forma incompleta e logo, instável, que será degradada pela célula. De facto, estas proteínas revelaram grande insolubilidade, com formação de agregados massivos no citoplasma.

Considerando a hipótese de a mutação interferir na formação do gancho intramolecular entre a sequência ProXXPro e a Tyr460 do domínio catalítico, o local catalítico poderia ficar disponível e logo, a fosforilação intrínseca da enzima seria superior ao normal, tal como constatado nos trabalhos de Adachi *et al.* (2008). De acordo com este trabalho estes mutantes apresentariam na célula uma actividade semelhante à do tipo normal. Tal seria possível se a menor quantidade

de proteína funcional fosse compensada por uma actividade constitutiva, superior à da proteína normal. Tal como para os mutantes p.S361G, a formação de vesículas *dot-like* é reduzida (Seki *et al.*, 2005), o que se pode, talvez, explicar pela integridade dos domínios C1 e correcta ligação ao DAG membranar.

De acordo com os mecanismos patogénicos, que parecem ser responsáveis pela SCA14, poderá ser vantajoso, de forma a impedir a progressão da doença, a terapêutica com anti-oxidantes e compostos, como a trealose, que permitam a degradação dos agregados de proteínas *misfolded*. Assim, para o tratamento desta doença a investigação poderá passar pela procura de outros compostos para degradação dos agregados, incluindo os de tipo amilóide (como Seki *et al.* (2010) propõem que sejam formados na SCA14); a adição de péptidos com sequência complementar à das de consenso para ligação das proteínas 14-3-3ε em C1B, de forma a “aprisionar” proteínas mutantes no citoplasma, com maior taxa de translocação que as proteínas normais, possibilitando maior ligação destas últimas à DAG membranar, como proposto por Lin & Takemoto (2007); a pesquisa de chaperones que impeçam a formação de agregados, e permitam que um maior número de proteínas adquira uma conformação que lhes permita serem sujeitas a processamento pós-traducional por fosforilação e, activas.

#### 5.4. Análise haplotípica

O haplótipo de maior frequência é constituído pelos alelos considerados ancestrais ou, caso não haja esta indicação, os alelos mais frequentes nas populações estudadas. Tal pode sugerir que este haplótipo seja partilhado pela maior parte das populações humanas.

Para as mutação p.His78Gln e p.Ser107Gly, embora o programa *PHASE* tenha indicado uma maior probabilidade de se encontrarem em determinados haplótipos, seria importante estudar outros elementos da família de modo a inferir a fase gamética.

No caso índice da família 1, existem 4 haplótipos possíveis onde a mutação c.234C>A/ p.His78Gln se pode localizar, embora dois tenham maior probabilidade de ocorrência. Em ambos os casos, a mutação c.234C>A/ p.His78Gln (a vermelho) encontra-se associada ao SNP c.207C>T (p.Cys69Cys, a verde), TTAACATGGCTGTTTCG e

TTACATGGTGGTTTCG. O primeiro indicado terá derivado do haplótipo mais frequente na série estudada, e assim, com maior probabilidade de ser o haplótipo onde terá ocorrido a mutação c.234C>A/ p.His78Gln (bem como o polimorfismo p.Cys69Cys).

Quanto à mutação c.319A>G/ p.Ser107Gly (a vermelho) poderá estar associada a um de 2 haplótipos, com probabilidade semelhante de ocorrer, TCCC**G**TGGCTGTTCC ou TCCC**G**TGGTGGTTCC. Para além deste último haplótipo ter uma probabilidade ligeiramente superior de ser observado, a mutação teria tido origem no haplótipo mais frequente.

No caso da mutação c.349T>A/ p.Cys117Ser (a vermelho) indentificada no caso índice da família 3, o nucleótido mutado possui 100% de probabilidade de ter surgido no haplótipo mais frequente, TCCCA**A**GGTGGTTTCG

Quanto às novas variantes intrónicas identificadas, o SNP c.397+55G>A foi observado em apenas um doente, existindo 100% de probabilidade de o haplótipo ser TCCCAT**A**GTGGTTTCG. Este SNP teria, também, tido origem no haplótipo com maior frequência entre os indivíduos estudados. O SNP c.1575+28C>T, observado em 2 doentes (e no irmão afectado de um deles), parece ter maior probabilidade de, nos 2 indivíduos, se encontrar no haplótipo CCCCATGGTGGTTTT**G**. Quanto à duplicação c.285+38dup, há 2 hipóteses quanto ao haplótipo onde esta possa ter ocorrido, TCCCA(**T**)TGGTGGTTTCG ou CCCCA(**T**)TGGTGGTTTCG. A nível de frequências, o primeiro haplótipo é cerca de 10x mais frequente, nos indivíduos estudados neste trabalho, o que representa uma maior probabilidade de a duplicação ter ocorrido neste haplótipo.

Assim, as novas mutações (exónicas e intrónicas) parecem ter sido originadas por mutação pontual de um dos SNPs do haplótipo mais frequente, com excepção da variante c.1575+28C>T. Nesta mutação, a hipótese de tal ter acontecido é baixa, mas possível. Caso venha a ser observado outro indivíduo portador de qualquer uma das novas mutações (bem como das restantes, para as quais foi feita a análise haplotípica) poder-se-á averiguar se se trata de uma mutação *de novo* ou se, eventualmente, poderá constituir uma mutação fundadora, por determinação do seu haplótipo.

Da mesma forma, para as variantes já descritas, verifica-se que o nucleótido T se encontra em 36 dos haplótipos mais frequentes observados para o SNP c.72C>T (p.Ala24Ala); quanto ao SNP c.285C>T (p.D95D) o nucleótido T está presente em 3 dos doentes estudados. Para dois dos doentes o haplótipo TCCTATG**A**TGGTTTCG é o mais frequente (o alelo menos frequente do SNP c.529+29G>A (a laranja), é, também, observado, e apenas, nestes dois doentes). Para o

outro doente, o haplótipo mais provável é o TCCTATGGTGGTTTCG. Este haplótipo existe também, como hipótese, nos 2 doentes acima embora com uma probabilidade de ocorrência muito baixa

As duas variantes com maior heterozigotia, c.567T>C (p.Asn189Asn) no exão 6, e c.686+14T>G, na porção 5' do intrão 6, encontram-se sempre em ligação (TG ou CT) em 118 cromossomas. Um doente, no entanto, possui a combinação CG num dos cromossomas e, outro, a associação TT. Tal deverá ter ocorrido por transversão de nucleótidos, quer na posição c.567, quer em c.686. No entanto, dado que a associação TG é mais frequente que CT, pode considerar-se que há maior probabilidade de, no primeiro doente ter ocorrido uma transversão e T>C na posição c.567, e no segundo caso, uma transversão G>T na posição c.687. A probabilidade de ter ocorrido um evento de recombinação, embora não seja nula, é extremamente reduzida pois estes dois SNPs distam entre si de apenas 134pb.

Embora o alelo C do SNP c.1093-92C>G seja observado em 6 doentes, para todos, o haplótipo mais provável de ocorrer é TCCCATGGCTCTTTCG. Dois doentes possuem o alelo menos frequente do SNP c.1281+26G>T (a verde), partilhando o haplótipo CCCCATGGTGGGTTTCG. Para além do SNP anterior, um dos doente apresenta, também, os SNPs c.1437-64 e c.1497T>C, sendo difícil inferir a fase gamética, e portanto, associá-los a determinado haplótipo. O alelo C, o menos frequente do SNP c.1905+72G>C, foi observado em 8 cromossomas de 6 doentes estando presente em 6 haplótipos diferentes, embora dois deles sejam mais frequentes que os restantes, TCCCATGGTGGTTTC e TCCCATGGCTGTTTC. Por fim, nos dois doentes que apresentam a mutação c.1764+40\_1764+41insT há um haplótipo (o mais frequente na série de indivíduos) partilhado entre os 2 indivíduos, no qual, provavelmente, terá ocorrido a inserção, TCCCATGGTGGTTTC(T).

##### 5.5. Considerações finais e perspectivas futuras

Este foi o primeiro trabalho em que a totalidade da sequência codificante do gene *PRKCG* foi estudada em indivíduos Portugueses. O efeito de todas as mutações descritas no gene, associadas ou não a SCA14, foi avaliado *In Silico*, tendo sido validada a previsão do efeito das ferramentas bioinformáticas utilizadas.

Os resultados deste trabalho são importantes na medida em que indicam que indivíduos com história familiar dominante de ataxia, com fenótipo enquadrável ao já reportados para casos de SCA14, e nos quais não foi detectada nenhuma das mutações responsáveis pelas ataxias mais frequentes, deverão ser testados para a SCA14.

De acordo com os resultados deste estudo e distribuição no gene *PRKCG* das mutações conhecidas, o rastreio das mutações poderá seguir uma ordem sequencial em que, inicialmente, se testem os exões 4 e 5 (correspondentes ao sub-domínio C1B), seguidos do estudo dos exões 1, 2 e 3 (sub-domínio C1A, incluindo a região do pseudosubstrato); o estudo passará depois pelo estudo do exão 10 (domínio C3) e 18 (domínio AGC-cinase C-terminal e região variável V5) e, por fim, o estudo dos restantes 10 exões (6 a 9 e do exão 11 ao 17), onde ainda não foram encontradas mutações associadas à SCA14.

Para as mutações descritas pela primeira vez neste trabalho e de forma a confirmar o efeito patogénico previsto pelos programas bioinformáticos, seria vantajoso realizar em seguida os seguintes estudos:

A) Estudos de genotipagem dos elementos das 3 famílias afectadas.

De forma a confirmar se há co-segregação da mutação com a doença, dever-se-á completar o estudo, por análise do DNA dos restantes elementos, doentes e saudáveis, das 3 famílias.

B) Estudos funcionais

Estes estudos, com vista à caracterização das PKC $\gamma$ -mutantes, já foram iniciados. O DNA plasmídico, onde foi inserido cDNA do gene *PRKCG* fundido com o *tag GFP*, foi sujeito a mutagénese dirigida. O DNA plasmídico contendo as mutações identificadas (p.His78Gln, p.Ser107Gly, p.Cys117Ser), mutações noutras domínios (p.His101Tyr, p.Ser361Gly, p.Phe643Leu) bem como contendo o cDNA normal serão transfectados em células HEK (que não expressam PKC $\gamma$ ).

A comparação da taxa de transcrição dos mRNAs, expressão das proteínas e determinação da actividade catalítica para as diferentes proteínas mutantes face à PKC $\gamma$  normal, irão ser realizadas. Poder-se-á também determinar a viabilidade celular face à presença de cada um dos tipos de proteínas. A localização da proteína poderá ser, também, estudada nas culturas de células, ao longo do tempo, com auxílio a microscopia, bem como a formação e localização de eventuais agregados proteicos.

C) Estudos populacionais

O rastreio das 3 mutações deveria ser efectuado numa série de indivíduos saudáveis, com características semelhantes às dos indivíduos estudados ou, numa população controlo representativa da população Portuguesa.

Uma vez que não há qualquer estudo nesse âmbito, e dado que há casos de doentes de SCA14 cujos sintomas se desenvolveram muito tardiamente, ou mesmo casos de portadores assintomáticos de idade avançada, seria interessante estimar a prevalência de mutações no gene *PRKCG* numa população controlo representativa da população Portuguesa. Quanto às novas variantes intrónicas observadas, este estudo poderia ajudar a confirmar ou excluir o seu possível efeito fundador, especialmente para o SNP c.1575+28C>T, em que foram observados 3 casos portadores da mutação, em 2 famílias.

## 6. Bibliografia

- Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva A, Stevens C & Tonegawa S. Modified hippocampal long-term potentiation in PKCgamma-mutant mouse. *Cell* 1993; 75:1253-1262.
- Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim J, Wehner J. & Tonegawa. PKCgamma mutant mice exhibit mild deficits in spinal and contextual learning. *Cell* 1993; 75:1263-1271.
- Adachi N, Kobayashi T, Takahashi H, Kawasaki T, Shirai Y, Ueyama T, Matsuda T, Seki T, Sakai N, Saito N. Enzymological analysis of mutant protein kinase Cgamma causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J Biol Chem* 2008; 283:19854–63.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; Apr;7(4):248-9.
- Al-Magthteh M., Vithana E.N., Inglehearn C.F., Moore T., Bird A.C., Bhattacharya S.S. Segregation of a *PRKCG* mutation in two RP11 families. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1248-1252.
- Alonso I, Costa C, Gomes A, Ferro A, Seixas AI, Silva S, Cruz VT, Coutinho P, Sequeiros J, Silveira I. A novel H101Q mutation causes PKCGamma loss in spinocerebellar ataxia type 14. *J Hum Genet* 2005; 50:523-9.
- Ananthanarayanan B, Vtahelin R, Digman M, Cho W. Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J Biol Chem* 2003; 278(47):46886-4698.
- Apps R & Garwicz M. Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci* 2005; Apr;6(4): 297-311.
- Asai H, Hirano M, Shimada K, Kiriya T, Furiya Y, Ikeda M, Iwamoto T, Mori T, Nishinaka K, Konishi N, Udaka F, Ueno S. Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. *Hum Mol Genet* 2009; 18(19):3533–43.
- Barnett ME, Madgwick DK, Takemoto DJ. Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal* 2007; 19(9):1820-9.
- Basri R, Yabe I, Soma H, Sasaki H. Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in Hokkaido, the northern island of Japan: a study of 113 Japanese families. *J Hum Genet* 2007; 52(10):848-55.
- Becker EB, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EM, Davies KE. A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; Apr 21;106(16):6706-11.
- Bell, R. & Burns, D. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 226:4661-4664.
- Bird TD. Hereditary Ataxia Overview . In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-1998 Oct 28 [updated 2011 Jul 21].
- Bittova L, Stahelin RV, Cho W. Roles of ionic residues of the C1 domain in protein Kinase C-alpha activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J Biol Chem* 2000; 11:11.
- Basri R, Yabe I, Soma H, Sasaki H. Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in Hokkaido, the northern island of Japan: a study of 113 Japanese families. *J Hum Genet* 2007; 52(10):848–55.
- Brkanac Z, Bylenok L, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Nochlin D, Raskind WH, Bird TD. A new dominant spinocerebellar ataxia is linked to chromosome 19q13.4. *Arch Neurol* 2002; 59:1291-1295.
- Burns DJ, Bell RM. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem* 1991; 266(27):18330-8.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C.R., Lim, E.P., Kalyanaraman, N., et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999; 22: 231-238.

- Chen DH, Raskind W, Bird T (2005a). Spinocerebellar Ataxia Type 14. Genereviews at Genetests: medical genetics information resource (database online). Disponível em: [www.genetests.org](http://www.genetests.org).
- Chen D, Cimino PJ, Ranum LP, Zoghbi HY, Yabe I, Schut L, Margolis RL, Lipe HP, Feleke A, Matsushita M, Wolff J, Morgan C, Lau D, Fernandez M, Sasaki H, Raskind WH, Bird TD. The clinical and genetic spectrum of spinocerebellar ataxia 14. *Neurology* 2005; 64:1258-1260.
- Chen D, Brkanac Z, Verlinde CLMJ, Tan X, Bylenoc L, Nochlin D, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird TD, Raskind WH. *Missense* mutations in the regulatory domain of PKC $\gamma$ : A new mechanism for dominant nonepisodic ataxia. *Am J Hum Genet* 2003; 72:839-849.
- Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, Tonegawa S. Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell* 1995; 83(7):1233-42.
- Chizhikov V, Millen KJ. Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol Genet Metab* 2003; 80(1-2):54-65.
- Cho W. Membrane Targeting by C1 and C2 domains. *J Biol Chem* 2001; 276(35):32407-32410.
- Cho W, Digman M, Ananthanarayanan B, Stahelin RV. Bacterial expression and purification of C1 and C2 domains of protein kinase C isoforms. *Methods Mol Biol.* 2003; 233:291-8.
- Chung HJ, Xia J, Scannevin RH, Zhang X, Haganir RL. Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* 2000; 20(19):7258-67.
- Coussens L, Parker P, Rhee L, Yang-Feng T, Chen E, Waterfield D & Ullrich A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science* 1986; 859-886.
- Crawford DC, Bhangale T, Li N, Hellenthal G, Rieder MJ, Nickerson DA, Stephens M. Evidence for substantial fine-scale variation in recombination rates across the human genome. *Nat Genet* 2004; 36(7):700-6.
- Dalski A, Mitulla B, Burk K, Schattenfroh C, Schwinger E, Zuhlke C. Mutation of the highly conserved cysteine residue 131 of the SCA14 associated *PRKCG* gene in a family with slow progressive cerebellar ataxia. *J Neurol* 2006; 253: 1111-2.
- Dehouck Y, Kwasigroch JM, Gilis D, Rooman M. *PoPMuSiC* 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:151.
- Dehouck Y, Grosfils A, Folch B, Gilis D, Bogaerts Ph, Rooman M. Prediction of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: *PoPMuSiC* 2.0. *Bioinformatics* 2009; 25:2537-2543.
- Dehvari N, Cedazo-Minguez A, Isacson O, Nilsson T, Winblad B, Karlström H, Benedikz E, Cowburn RF. Presenilin dependence of phospholipase C and protein kinase C signaling. *J Neurochem* 2007; 102(3):848-57.
- Doran G, Davies KE, Talbot K. Activation of mutant protein kinase C $\gamma$  leads to aberrant sequestration and impairment of its cellular function. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(3): 447-53.
- Dryja T.P., McEvoy J., McGee T.L., Berson E.L. No mutations in the coding region of the *PRKCG* gene in three families with retinitis pigmentosa linked to the RP11 locus on chromosome 19q. *Am J Hum Genet* 1999; 65:926-928.
- Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol.* 2010; 9(9):885-94.
- Dutil EM, Toker A, Newton AC. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol* 1998; 8(25):1366-75.
- Edwards A, Faux M, Scott J & Newton A. Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of PKC $\beta$ II. *J Biol Chem* 1999; 274:6461.
- Epand RM. Diacylglycerols, lysolecithin, or hydrocarbons markedly alter the bilayer to the hexagonal *PHASE* transition temperature of phosphatidylethanolamines. *Biochemistry* 1998; 37:12068.

- Fahey MC, Knight MA, Shaw JH, Gardner RJ, du Sart D, Lockhart PJ, Delatycki MB, Gates PC, Storey E. Spinocerebellar ataxia type 14: study of a family with an exon 5 mutation in the *PRKCG* gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:1720–2.
- Fogel BL, Perlman S. An approach to the patient with late-onset cerebellar ataxia. *Nat Clin Pract* 2006; 2: 629–35.
- Foncke EM, Beukers RJ, Tijssen CC, Koelman JH, Tijssen MA (2009) Myoclonus-dystonia and spinocerebellar ataxia type 14 presenting with similar phenotypes: Trunk tremor, myoclonus, and dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16(4):288-9.
- Fernandes CMRS (1988), *A Evolução do cerebelo. Dissertação de Doutoramento em Medicina, área de especialização em Ciências Morfológicas*. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 2010; 106(8):1319-31.
- Gould CM, Kannan N, Taylor SS, Newton AC. The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J Biol Chem*. 2009; 284(8):4921-35.
- Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974;185(4154):862-4.
- Gribskov M, McLachlan AD, Eisenberg D. Profile analysis: detection of distantly related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(13):4355-8.
- Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, Goodstein D, Couronne O, Tran-Gyamfi M, Aerts A, Altherr M, Ashworth L, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caenepeel S, Carrano A, Caoile C, Chan YM, Christensen M, Cleland CA, Copeland A, Dalin E, Dehal P, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Georgescu AM, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Ho I, Huang W, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Larionov V, Leem SH, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Malfatti S, Martinez D, McCready P, Medina C, Morgan J, Nelson K, Nolan M, Ovcharenko I, Pitluck S, Pollard M, Popkie AP, Predki P, Quan G, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, She X, Smith D, Slezak T, Solovyev V, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wagner M, Wheeler J, Wu K, Xie G, Yang J, Dubchak I, Furey TS, DeJong P, Dickson M, Gordon D, Eichler EE, Pennacchio LA, Richardson P, Stubbs L, Rokhsar DS, Myers RM, Rubin EM & Lucas SM. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 2004; 428:529-535.
- Halushka, M.K., Fan, J.B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., and Chakravarti, A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet*. 1999; 22: 239-247.
- Hellen B (2009), *Splice site tools, a comparative analysis report. Splice Site Tools Analysis Report*. Manchester:National Genetics Reference Laboratory.
- Hiramoto K, Kawakami H, Inoue K, Seki T, Maruyama H, Morino H, Matsumoto M, Kurisu K & Sakai N. Identification of a new family of spinocerebellar ataxia type 14 in the Japanese spinocerebellar ataxia population by the screening of *PRKCG* exon 4. *Mov Disord* 2006; 21:1355-1360.
- Hritz J, Ulicny J, Laaksonen A, Jancura D, Miskovsky P. Molecular interaction model for the C1B domain of protein kinase C-gamma in the complex with its activator phorbol-12-myristate-13-acetate in water solution and lipid bilayer. *J Med Chem* 2004; 47(26):6547-55.
- Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol Med*. 2004; 10(6):283-90.
- Kannan N, Haste N, Taylor SS, Neuwald AF. The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:1272–1277.
- Kano M, Hashimoto K, Chen C, Abeliovich A, Aiba A, Kurihara H, Watanabe M, Inoue Y, Tonegawa S. Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKC gamma mutant mice. *Cell*. 1995; 83(7):1223-31.
- Kasumu A, Bezprozvanny I. Deranged Calcium Signaling in Purkinje Cells and Pathogenesis in Spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2) and Other Ataxias. *Cerebellum* 2010 May 18. [Epub ahead of print]

- Kazanietz MG, Wang S, Milne GW, Lewin NE, Liu HL, Blumberg PM. Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1995; 270(37):21852-9.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12(6):996-1006,
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. G  $\beta$ L, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*. 2003; 11(4):895-904.
- Klebe S, Faivre L, Forlani S, Dussert C, Tourbah A, Brice A, Stevanin G, Durr A. Another mutation in cysteine 131 in protein kinase C $\gamma$  as a cause of spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol* 2007; 64: 913-4.
- Klebe S, Durr A, Rentschler A, Hahn-Barma V, Abele M, Bouslam N, Schols L, Jedynak P, Forlani S, Denis E, Dussert C, Agid Y, Bauer P, Globas C, Wullner U, Brice A, Riess O, Stevanin G. New mutations in protein kinase C $\gamma$  associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Ann Neurol* 2005; 58: 720-9.
- Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 1998; 95(1):41-53,
- Klockgether T. Sporadic ataxia with adult onset: classification and diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 2010; 9: 94-104.
- Kumar P, Henikoff S & Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 2009; 4:1073-81.
- Koh JY. Zinc and disease of the brain. *Mol Neurobiol* 2001; 24:99-106.
- Koht J, Stevanin G, Durr A, Mundwiller E, Brice A, Tallaksen CM. SCA14 in Norway, two families with autosomal dominant cerebellar ataxia and a novel mutation in the *PRKCG* gene. *Acta Neurol Scand*. 2011 Acta Neurol Scand. 2011 Mar 21. doi: 10.1111/j.1600-0404.2011.01504.x. [Epub ahead of print].
- Jaken S, Parker PJ. Protein C binding partners. *Bioessays* 2000; 22:245-254.
- Johnson JE, Edwards AS, Newton AC. A putative phosphatidylserine binding motif is not involved in the lipid regulation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; 272:30787-30792.
- Johnson JE, Zimmerman ML, Daleke DL, Newton AC. Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. *Biochemistry* 1998; 37:12020-12025.
- Johnson JE, Giorgione J, Newton AC. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 2000; 39:11360-11369.
- Lauer J, Banerjee D, Shanks D, Dai H, Gong YX, Prakash O & Takemoto D. NMR structure/function relationships of peptides corresponding to the C1B1 region of PKC. *Protein & Peptide Letters* 2010; 17:1-10.
- Leitch B, Shevtsova O, Guévremont D, Williams J. Loss of calcium channels in the cerebellum of the ataxic and epileptic stargazer mutant mouse. *Brain Res* 2009; 7;1279:156-67.
- Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol*. 1984; 21(1):58-71.
- Lin D & Takemoto DJ. Oxidative activation of protein kinase C $\gamma$  through the C1 domain. Effects on gap junctions. *J Biol Chem*. 2005; 280(14):13682-93.
- Lin D & Takemoto DJ. Protection from ataxia-linked apoptosis by gap junction inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 982-7.
- Lin D, Shanks D, Prakash O, Takemoto DJ. Protein kinase C  $\gamma$  mutations in the C1B domain cause caspase-3-linked apoptosis in lens epithelial cells through gap junctions. *Exp Eye Res* 2007; 85(1):113-22.

- Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabasi AL, Vidal M, Zoghbi HY. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006; 125:801-814.
- Livingston RJ, von Niederhausern A, Jegga AG, Crawford DC, Carlson CS, Rieder MJ, Gowrisankar S, Aronow BJ, Weiss RB, Nickerson DA. Pattern of sequence variation across 213 environmental response genes. *Genome Res.* 2004;14(10A):1821-31.
- Marmolino D & Manto M. Past, present and future therapeutics for cerebellar ataxias. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8(1):41-61.
- Medkova M & Cho W. Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *J Biol Chem* 1999; 274:19852-19861.
- Mellor H & Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 1998; 332:281-292.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- Miller MP, Kumar S. Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2319-28.
- Mittal S & Ganesh S. Protein quality control mechanisms and neurodegenerative disorders: Checks, balances and deadlocks. *Neurosci Res.* 2010; 68(3):159-66.
- Miura S, Nakagawara H, Kaida H, Sugita M, Noda K, Motomura K, Ohyagi Y, Ayabe M, Aizawa H, Ishibashi M, Taniwaki T. Expansion of the phenotypic spectrum of SCA14 caused by the Gly128Asp mutation in *PRKCG*. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111(2): 211-5.
- Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(2):161-70.
- Morita H, Yoshida K, Suzuki K, Ikeda S. A Japanese case of SCA14 with the Gly128Asp mutation. *J Hum Genet* 2006; 51: 1118-21.
- Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2):161-7.
- Newton AC & Johnson J. Protein kinase C: a paradigm for regulation by two membrane-targeting domains. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1376:155-172.
- Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.* 2003; 370(Pt 2):361-71.
- Newton AC. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298(3):E395-402.
- Ng PC & Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001; 11(5):863-74.
- Ng PC & Henikoff S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.* 2002; 12(3):436-46.
- Ng PC & Henikoff S. *SIFT*: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13):3812-4.
- Ng PC & Henikoff S. Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006; 7:61-80.
- Nguyen T, Takemoto L & Takemoto D. Inhibition of gap junction activity through the release of C1B domain of protein kinase Cgamma from 14-3-3: identification of PKCgamma-binding sites. *J Biol Chem* 2004; 279:52714-52725.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995; 9(7):484-96.
- Nolte D, Klebe S, Baron R, Deuschl G & Muller U. Codon 101 of *PRKCG*, a preferential mutation site in SCA14. *Mov Disord.* 2007; 22(12):1831-1832.

- Oancea E & Meyer T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*. 1998; 95(3):307-18.
- Nolte D, Landendinger M, Schmitt E, Müller U. Spinocerebellar ataxia 14: novel mutation in exon 2 of *PRKCG* in a German family. *Mov Disord*. 2007; 22(2):265-7.
- Optican LM. Low rates yield big returns. *Nat Neurosci*. 1998; 1(1):8-9.
- Parker PJ, Parkinson SJ. AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:860-3.
- Parker PJ, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A. The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science* 1986; 233(4766):853-9.
- Paulson HL. The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol*. 2009; 29(3):227-37.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(1):9-22.
- Pears CJ, Parker PJ. Domain interactions in protein kinase C. *J Cell Sci*. 1991; 100 (Pt 4):683-6.
- Yevseyenkov VV, Das S, Lin D, Willard L, Davidson H, Sitaramayya A, Giblin FJ, Dang L, Takemoto DJ. Loss of protein kinase Cgamma in knockout mice and increased retinal sensitivity to hyperbaric oxygen. *Arch Ophthalmol*. 2009; 127(4):500-6.
- Yue P, Li Z, Moulton J. Loss of Protein Structure Stability as a Major Causative Factor in Monogenic Disease. *J Mol Biol* 2005; 353(2):459-73.
- Yue P & Moulton J. Identification and Analysis of Deleterious Human SNPs. *J Mol Biol* 2006; 356(5):1263-74.
- Yue P, Melamud E, Moulton J. *SNPs3D*: Candidate Gene and SNP selection for Association Studies. *BMC Bioinformatics* 2006 Mar; 7(1):166.
- Quest AF, Bell RM. The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J Biol Chem* 1994; ;269(31):20000-12.
- Rentschler A (2010), *Mutationanalyse des PRKCG-(SCA14) und FGF 14-Genes (SCA27) mittels dHPLC bei Ataxie-Patienten. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin*. Reutlingen:Der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132:365-86.
- Saito N, Kikkawa U, Nishizuka Y, Tanaka C. Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. *J Neurosci*. 1988; 8:369-382.
- Saito N, Shirai Y. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem* 2002; 132(5):683-7.
- Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, Ohmori S, Shirai Y, Matsubayashi H, Chen J, Duman RS, Kasai H & Saito N. Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. *Genes Cells* 2004; 9(10):945-57.
- Sawada K, Kalam Azad A, Sakata-Haga H, Lee NS, Jeong YG, Fukui Y. Striking pattern of Purkinje cell loss in cerebellum of an ataxic mutant mouse, *tottering*. *Acta Neurobiol Exp* 2009; 69(1):138-45.
- Schrenk K, Kapfhammer JP, Metzger F. Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase Cgamma-deficient mice. *Neuroscience* 2002;110(4):675-89.
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004; 3:291-304.

- Seki T, Adachi N, Ono Y, Mochizuki H, Hiramoto K, Amano T, Matsubayashi H, Matsumoto M, Kawakami H, Saito N, Sakai N. Mutant protein kinase C $\gamma$  found in Spinocerebellar Type 14 is susceptible of aggregation and causes cell death. *J Biol Chem* 2005; 280(32):29096-106.
- Seki T, Takahashi H, Adachi N, Abe N, Shimahara T, Saito N, Sakai N. Aggregate formation of mutant protein kinase C gamma found in spinocerebellar ataxia type 14 impairs ubiquitin-proteasome system and induces endoplasmic reticulum stress. *Eur J Neurosci* 2007; 26(11):3126-40.
- Seki T, Shimahara T, Yamamoto K, Abe N, Amano T, Adachi N, Takahashi H, Kashiwagi K, Saito N, Sakai N. Mutant gamma PKC found in spinocerebellar ataxia type 14 induces aggregate-independent maldevelopment of dendrites in primary cultured Purkinje cells. *Neurobiol Dis* 2009; 33(2):260-73.
- Seki T, Abe-Seki N, Kikawada T, Takahashi H, Yamamoto K, Adachi N, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. The effect of trehalose on the properties of mutant PKC, which causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14), in neuronal cell lines and cultured Purkinje cells. *J Biol Chem* 2010; 285(43):33252-64.
- Seki T, Takahashi H, Yamamoto K, Ogawa K, Onji T, Adachi N, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. Congo red, an amyloid-inhibiting compound, alleviates various types of cellular dysfunction triggered by mutant protein kinase cy that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) by inhibiting oligomerization and aggregation. *J Pharmacol Sci* 2010; 114(2):206-16.
- Seki T, Adachi N, Abe-Seki N, Shimahara T, Takahashi H, Yamamoto K, Saito N, Sakai N. Elucidation of the molecular mechanism and exploration of novel therapeutics for spinocerebellar ataxia caused by mutant protein kinase C $\gamma$ . *J Pharmacol Sci* 2011; 116(3):239-47.
- Selvaraj S, Sun Y, Singh BB. TRPC channels and their implication in neurological diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9(1):94-104.
- Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKCgamma during short-term treatment with morphine. *Synapse* 2009; 63(5):365-8.
- Skinner PJ, Vierra-Green CA, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT. Altered trafficking of membrane proteins in purkinje cells of SCA1 transgenic mice. *Am J Pathol.* 2001; 159(3):905-13.
- Slater SJ, Ho C, Stubbs CD. The use of fluorescent phorbol esters in studies of protein kinase C-membrane interactions. *Chem Phys Lipids.* 2002; 116(1-2):75-91.
- Stevanin G, Hahn V, Lohmann E, Bouslam N, Gouttard M, Soumphonphakdy C, Welter ML, Ollagnon-Roman E, Lemainque A, Ruberg M, Brice A, Durr A. Mutation in the catalytic domain of protein kinase C gamma and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol.* 2004; 61(8):1242-8.
- Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 2008; 88(4):1341-78.
- Stephens M & Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(5):1162-1169.
- Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(4):978-89.
- Stephens M & Scheet P. Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(3):449-62.
- Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human nonsynonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet.* 2000; 16(5):198-200.
- Szentágothai J. & Rajkovits K. (1959). Über den Ursprung der Kletterfasern des Kleinhirns. *Z. Anat. EntwGesch.* 121, 130-141.
- Tanabe W. Solution structure of the phorbol esters/diacylglycerol binding domain of protein kinase C gamma. RIKEN structural genomics initiative (RSGI) Submetido (DEC-2007) ao banco de dados PDB

- Tanaka C, Nishizuka Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:551-67.
- Taroni F, DiDonato S. Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 2004 ;5(8):641-55.
- Tavares MADF (1985), *Alcoolização crônica e circuito cerebeloso do rato adulto. Estudo morfológico. Tese doutoramento.* Porto:Universidade do Porto.
- Teive HA. Spinocerebellar ataxias. *Arch Neuropsiquiatr* 2009; 67(4):1133-42.
- Terasawa K, Yoshimatsu K, Iemura S, Natsume T, Tanaka K, Minami Y. Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. *Mol Cell Biol* 2006; 26(9):3378-89.
- Thomas PD, Kejariwal A, Guo N, Mi H, Campbell MJ, Muruganujan A, Lazareva-Ulitsky B. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: W645-W650.
- Thomas PD, Kejariwal A. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(43):15398-403.
- Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A. *PANTHER*: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003 Sep;13(9):2129-41.
- Ueno S, Asai H, Ikeda M, Kiriya T, Horikawa H, Furiya Y, Hirano M (Kashihara JP). Oxidative stress increased activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for spinocerebellar ataxia type 14, leading to neuronal cell death. 19th Meeting of the European Neurological Society 20.06.2009 - 24.06.2009.
- Umahara T & Uchihara T. 14-3-3 proteins and spinocerebellar ataxia type 1: from molecular interaction to human neuropathology. *Cerebellum* 2010; 9(2):183-9.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 *Nucleic Acids Research* 2007; 35: W71-W74.
- van de Warrenburg BP, Notermans NC, Schelhaas HJ, van Alfen N, Sinke RJ, Knoers NV, Zwarts MJ, Kremer BP. Peripheral nerve involvement in spinocerebellar ataxias. *Arch Neurol* 2004; 61:257-61.
- van de Warrenburg BP, Verbeek DS, Piersma SJ, Hennekam FA, Pearson PL, Knoers NV, Kremer HP, Sinke RJ. Identification of a novel SCA14 mutation in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family. *Neurology* 2003; 61(12):1760-5.
- Verbeek DS, Goedhart J, Bruinsma L, Sinke RJ, Reits EA. PKC gamma mutations in spinocerebellar ataxia type 14 affect C1 domain accessibility and kinase activity leading to aberrant MAPK signaling. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 14):2339-49.
- Verbeek DS, Knight MA, Harmison GG, Fischbeck KH, Howell BW. Protein kinase C gamma mutations in spinocerebellar ataxia 14 increase kinase activity and alter membrane targeting. *Brain* 2005; 128(Pt 2):436-42.
- Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Hennekam FA, Dooijes D, Ippel PF, Verschuuren-Bemelmans CC, Kremer HP, Sinke RJ. Gly118Asp is a SCA14 founder mutation in the Dutch ataxia population. *Hum Genet.* 2005; 117(1):88-91.
- Visser JE, Bloem BR, van de Warrenburg BP. *PRKCG* mutation (SCA-14) causing a Ramsay Hunt phenotype. *Mov Disord* 2007; 22(7):1024-6.
- Vlak M, Sinke R, Rabelink G, Dremer B & van de Warrenburg B. Novel *PRKCG*/SCA14 mutation in a Dutch spinocerebellar ataxia family: expanding the phenotype. *Mov Disord* 2006; 21(7):1025-8.
- Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(2 Suppl):84-90.
- Ways DK, Cook PP, Webster C, Parker PJ. Effect of phorbol esters on protein kinase C-zeta. *J Biol Chem.* 1992; 267(7):4799-805.
- Whaley NR, Fujioka S, Wszolek ZK. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: A review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet J Rare Dis* 2011 May 28;6:33.

- Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005 Oct;5(10):761-72.
- Wieczorek S, Arning L, Gizewski ER, Alheite I, Timmann D. Benign SCA14 phenotype in a German patient associated with a missense mutation in exon 3 of the *PRKCG* gene. *Mov Disord* 2007; 22:2135–6.
- Woolsey, Thomas A, Hanaway, Joseph, Gado Mokhtar H (2003), *The brain atlas a visual guide to the human central nervous system (2nd ed.)*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Yabe I, Sasaki H, Chen DH, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Kikuchi S, Tashiro K. Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. *Arch Neurol* 2003; 60: 1749–51.
- Yamaguchi Y, Shirai Y, Matsubara T, Sanse K, Kuriyama M, Oshiro N, Yoshino K, Yonezawa K, Ono Y, Saito N. Phosphorylation and up-regulation of diacylglycerol kinase gamma via its interaction with protein kinase C gamma. *J Biol Chem* 2006; 281(42):31627-37.
- Yamamoto K, Seki T, Adachi N, Takahashi T, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. Mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is selectively degraded by autophagy. *Genes Cells*. 2010; 15(5):425-38.
- Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Fukazawa T, Nogoshi S, Komeichi K, Takada A, Shiraishi K, Takiyama Y, Nishizawa M, Kaneko J, Tanaka H, Tsuji S, Tashiro K. A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S205 on chromosome 19q13.4-qter. *Ann Neurol* 2000; 48: 156-163.
- Yue P, Li Z, Moulton J. Loss of Protein Structure Stability as a Major Causative Factor in Monogenic Disease. *J Mol Biol* 2005; 353(2):459-73.
- Yue P, Moulton J. Identification and Analysis of Deleterious Human SNPs. *J Mol Biol* 2006; 356(5):1263-74.
- Yue P, Melamud E, Moulton J. *SNPs3D*: Candidate Gene and SNP selection for Association Studies. *BMC Bioinformatics* 2006; 7(1):166.
- Xu R, Pawelczyk T, Xia T & Brown S. NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein micelle interactions. *Biochemistry* 1997; 36(35):10709-10717.
- Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* 1995; 81(6):917-24.
- Zeidman R, Löfgren B, Pählman S, Larsson C. PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 1999; 145(4):713-26

## A. Glossário médico

- Ataxia - má coordenação dos movimentos. A ataxia pode manifestar-se na posição de pé (ataxia estática), durante a marcha (ataxia da marcha) ou durante a execução de um movimento (ataxia cinética)
- Coreia - movimentos involuntários e irregulares, umas vezes rápidos outras vezes lentos, acompanhados por hipotonia muscular e perturbações da coordenação
- Diplopia - perturbação da visão caracterizada pela percepção de duas imagens de um só objecto; principal sintoma inicial da paralisia dos nervos oculomotores.
- Disartria - dificuldade da fala devida a perturbações motoras dos órgãos da fonação: língua, lábios, véu do paladar, etc., no caso de afecções bulbares e cerebelosas. (adj.: disártrico)
- Disdiacocinésia – perturbação na aptidão para executar rápida, voluntária e alternadamente uma série de movimentos sucessivos e antagónicos. *In* Infopédia. Dicionário de Termos Médicos da Porto Editora. 2003-2011 Porto Editora
- Disfonia – incapacidade ou dificuldade na fala. *In* McGraw-Hill Concise Dictionary of Modern Medicine. © 2002, The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Dismetria - perturbação da amplitude dos movimentos, visível sobretudo nos actos sob comando executados rapidamente (provas dedo-nariz e calcanhar-joelho). Esta perturbação encontra-se nas lesões das vias e centros cerebelosos. (adj.: disométrico)
- Distonia - perturbação do tónus muscular, da tonicidade de um órgão ou do equilíbrio neurovegetativo (com predominância do sistema simpático ou parassimpático). (adj.: distónico)
- Espasticidade - hipertonia exagerada dos músculos esqueléticos com rigidez e hiperreflexia osteotendinosa. *In* Infopédia. Dicionário de Termos Médicos da Porto Editora. 2003-2011 Porto Editora
- Fala escândida - diz-se do tipo de fala em que as sílabas são separadas por pausas prolongadas e que se encontra sobretudo nas afecções cerebelosas. Rítmica. *In* Infopédia. Dicionário de Termos Médicos da Porto Editora. 2003-2011 Porto Editora
- Fasciculação - Contração involuntária rítmica e indolor de um feixe muscular que não provoca movimento segmentar.
- Funções autonómicas – referente às funções do sistema nervosa autónomo
- Mialgia - dor muscular. *In* Infopédia. Dicionário de Termos Médicos da Porto Editora. 2003-2011 Porto Editora
- Miocimia - condição benigna, frequentemente familiar, caracterizada por contrações súbitas de fibras musculares que dão uma aparência ondulada à pele sobrejacente. *In* The American Heritage® Medical Dictionary Copyright © 2007, 2004 by Houghton Mifflin Company. Published by Houghton Mifflin Company.
- Mioclonia - contração breve, rápida e involuntária de um ou de vários músculos, que se repete com intervalos variáveis. Observa-se em diversas afecções nervosas. (adj.: mioclónico)
- Nistagmo - movimentos oculares involuntários; sucessão de movimentos rítmicos, involuntários e conjugados, dos globos oculares, constituída pela alternância de oscilações lentas e rápidas. Também pode ser unilateral. Define-se convencionalmente o nistagmo pelo sentido da oscilação rápida e pela sua direcção: nistagmo horizontal,

vertical, rotatório, multidireccional (misto). O nistagmo pode ser espontâneo (sinal de lesões do aparelho vestibular ou das vias nervosas centrais ou periféricas) ou provocado (por certas posições, por provas de exploração da função vestibular). (adj.: nistágmico)

Núcleo olivar inferior – pequeno conjunto de células nervosas colocadas postero-lateralmente às pirâmides, abaixo do nível da ponte (do tronco encefálico); fonte das fibras trepadoras cerebelosas *In Mosby's Medical Dictionary, 8th edition. © 2009, Elsevier.*

Oftalmoparésia – parésia ocular. Ver Parésia

Parésia - paralisia ligeira ou incompleta, que se traduz por diminuição da força muscular. (adj.: parético)

Parkinsonismo - tremor, hipocinesia, rigidez e instabilidade postural

Polineuropatia (sensitiva e autonómica) - afecção sistémica, bilateral e simétrica, dos nervos periféricos, motores e sensitivos, que se traduz por fraqueza e atrofas musculares progressivas, com arreflexia e perda da sensibilidade ao nível das extremidades. Nas formas graves, as perturbações podem estender-se à raiz dos membros, ao tronco e à cabeça. As causas das polineuropatias são diversas: toxiinfecções, perturbações metabólicas, avitaminoses, neoplasias. A etiologia também pode manter-se desconhecida

Tetraparésia – parésia nos 4 membros; ver Parésia

Tremor - agitação involuntária e rítmica do corpo ou de parte do corpo (cabeça, mãos, etc.) de intensidade, amplitude e rapidez variáveis. O tremor pode ser passageiro ou permanente

Tremor intencional - variedade de tremor cinético caracterizada por oscilações irregulares, que aparecem durante um movimento voluntário e cuja amplitude aumenta à medida que a acção se aproxima do fim. Este tremor é característico de uma lesão das vias cerebelosas

Sinal de Babinsky - extensão lenta do dedo grande do pé, associada por vezes à extensão dos outros dedos (sinal de leque), provocada pela excitação mecânica do bordo externo da planta do pé. Normalmente, esta excitação provoca a flexão dos dedos do pé (reflexo plantar). Patológico após os 18 meses de idade, o sinal de Babinski está relacionado com uma lesão do feixe piramidal. (Babinski, Josef François Félix, neurologista de Paris, 1857-1932)

Sistema nervoso autónomo – porção do sistema nervoso relacionado com a regulação da actividade do músculo cardíaco, dos músculos lisos, e glândulas, geralmente restritas aos sistemas nervosos simpáticos e parassimpáticos. *In Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers. © 2007 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.*

Sinal extrapiramidal – qualquer de um grupo de doenças marcadas por movimentos involuntários anormais, alterações no tónus muscular e perturbações posturais; o grupo inclui o parkinsonismo, coreia, atetose, entre outros.

Sinal piramidal - qualquer de vários sinais indicando uma condição patológica dos tractos piramidais, incluindo o sinal de Babinsky. *In The American Heritage® Medical Dictionary Copyright © 2007, 2004 by Houghton Mifflin Company. Published by Houghton Mifflin Company.*

Sistema extrapiramidal (ou tracto extrapiramidal) – unidade funcional, em vez de anatómica, que compreende os núcleos e fibras (excluindo os do tracto piramidal) envolvidos nas actividades motoras; controlam e coordenam especialmente os mecanismos posturais, estáticos, de suporte e locomotores. Inclui o corpo estriado, o núcleo subtalâmico, a substância nigra, e núcleos vermelhos, as interconexões com a formação reticular, cerebelo e cérebro; algumas autoridades incluem os núcleos cerebelosos e vestibulares. *In Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition. © 2003 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc.*

Sistema piramidal (ou tracto piramidal) – feixe massivo de fibras que têm origem no córtex motor e gyrus pós-central e emergem na superfície ventral da *medulla oblongata*. A maioria das fibras atravessa para o lado oposto na decussação das pirâmides e descem a corda espinhal para enervar os músculos das extremidades. *In* The American Heritage® Medical Dictionary Copyright © 2007, 2004 by Houghton Mifflin Company. Published by Houghton Mifflin Company.

Nota: Com excepção das entradas indicadas, as restantes têm como referência o *Glossário Médico* do portal Médicos de Portugal (<http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/glossario>)

## B. Sequências do mRNA da PRKCG e da proteína PKCγ

Comparação entre as sequências do mRNA da *PRKCG* (>gi|47132626|ref|NM\_002739.3| Homo sapiens protein kinase C, gamma (*PRKCG*), mRNA) e da proteína PKCγ, a negrito (>sp|P05129|KPCG\_HUMAN Protein kinase C gamma type OS=Homo sapiens GN=*PRKCG* PE=1 SV=3). A numeração respectiva encontra-se à direita das sequências (em cima encontra-se a numeração do aminoácido na proteína, e em baixo, a numeração das bases).

<b>M A G L G P G V G D S E G G P R P L</b>	<b>18</b>
ATG GCT GGT CTG GGC CCC GGC GTA GGC GAT TCA GAG GGG GGA CCC CGG CCC CTG	54
<b>F C R K G A L R Q K V V H E V K S H</b>	<b>36</b>
TTT TGC AGA AAG GGG GCC CTG AGG CAG AAG GTG GTC CAC GAA GTC AAG AGC CAC	108
<b>K F T A R F F K Q P T F C S H C T D</b>	<b>54</b>
AAG TTC ACC GCT CGC TTC TTC AAG CAG CCC ACC TTC TGC AGC CAC TGC ACC GAC	162
<b>F I W G I G K Q G L Q C Q V C S F V</b>	<b>72</b>
TTC ATC TGG GGT ATC GGA AAG CAG GGC CTG CAA TGT CAA GTC TGC AGC TTT GTG	216
<b>V H R R C H E F V T F E C P G A G K</b>	<b>90</b>
GTT CAT CGA CGA TGC CAC GAA TTT GTG ACC TTC GAG TGT CCA GGC GCT GGG AAG	270
<b>G P Q T D D P R N K H K F R L H S Y</b>	<b>108</b>
GGC CCC CAG ACG GAC GAC CCC CGG AAC AAA CAC AAG TTC CGC CTG CAT AGC TAC	324
<b>S S P T F C D H C G S L L Y G L V H</b>	<b>126</b>
AGC AGC CCC ACC TTC TGC GAC CAC TGT GGC TCC CTC CTC TAC GGG CTT GTG CAC	378
<b>Q G M K C S C C E M N V H R R C V R</b>	<b>144</b>
CAG GGC ATG AAA TGC TCC TGC TGC GAG ATG AAC GTG CAC CGG CGC TGT GTG CGT	432
S V P S L C G V D H T E R R G R L Q	162
AGC GTG CCC TCC CTG TGC GGT GTG GAC CAC ACC GAG CGC CGC GGG CGC CTG CAG	486
<b>L E I R A P T A D E I H V T V G E A</b>	<b>180</b>
CTG GAG ATC CGG GCT CCC ACA GCA GAT GAG ATC CAC GTA ACT GTT GGC GAG GCC	540
<b>R N L I P M D P N G L S D P Y V K L</b>	<b>198</b>
CGT AAC CTA ATT CCT ATG GAC CCC AAT GGT CTC TCT GAT CCC TAT GTG AAA CTG	594
<b>K L I P D P R N L T K Q K T R T V K</b>	<b>216</b>
AAG CTC ATC CCA GAC CCT CGG AAC CTG ACG AAA CAG AAG ACC CGA ACG GTG AAA	648
<b>A T L N P V W N E T F V F N L K P G</b>	<b>234</b>
GCC ACG CTA AAC CCT GTG TGG AAT GAG ACC TTT GTG TTC AAC CTG AAG CCA GGG	702
<b>D V E R R L S V E V W D W D R T S R</b>	<b>252</b>
GAT GTG GAG CGC CGG CTC AGC GTG GAG GTG TGG GAC TGG GAC CGG ACC TCC CGC	756
<b>N D F M G A M S F G V S E L L K A P</b>	<b>270</b>
AAC GAC TTC ATG GGG GCC ATG TCC TTT GGC GTC TCG GAG CTG CTC AAG GCG CCC	810
<b>V D G W Y K L L N Q E E G E Y Y N V</b>	<b>288</b>
GTG GAT GGC TGG TAC AAG TTA CTG AAC CAG GAG GAG GGC GAG TAT TAC AAT GTG	864
<b>P V A D A D N C S L L Q K F E A C N</b>	<b>306</b>
CCG GTG GCC GAT GCT GAC AAC TGC AGC CTC CTC CAG AAG TTT GAG GCT TGT AAC	918
<b>Y P L E L Y E R V R M G P S S S P I</b>	<b>324</b>
TAC CCC CTG GAA TTG TAT GAG CGG GTG CGG ATG GGC CCC TCT TCC TCT CCC ATC	972
<b>P S P S P S P T D P K R C F F G A S</b>	<b>342</b>
CCC TCC CCT TCC CCT AGT CCC ACC GAC CCC AAG CGC TGC TTC TTC GGG GCG AGT	1026
<b>P G R L H I S D F S F L M V L G K G</b>	<b>360</b>
CCA GGA CGC CTG CAC ATC TCC GAC TTC AGC TTC CTC ATG GTT CTA GGA AAA GGC	1080

<b>S F G K V M L A E R R G S D E L Y A</b>	<b>378</b>
AGT TTT GGG AAG GTG ATG CTG GCC GAG CGC AGG GGC TCT GAT GAG CTC TAC GCC	1134
<b>I K I L K K D V I V Q D D D V D C T</b>	<b>396</b>
ATC AAG ATC TTG AAA AAG GAC GTG ATC GTC CAG GAC GAC GAT GTG GAC TGC ACG	1188
<b>L V E K R V L A L G G R G P G G R P</b>	<b>414</b>
CTG GTG GAG AAA CGT GTG CTG GCG CTG GGG GGC CGG GGT CCT GGC GGC CGG CCC	1242
<b>H F L T Q L H S T F Q T P D R L Y F</b>	<b>432</b>
CAC TTC CTC ACC CAG CTC CAC TCC ACC TTC CAG ACC CCG GAC CGC CTG TAT TTC	1296
<b>V M E Y V T G G D L M Y H I Q Q L G</b>	<b>450</b>
GTG ATG GAG TAC GTC ACC GGG GGA GAC TTG ATG TAC CAC ATT CAA CAG CTG GGC	1350
<b>K F K E P H A A F Y A A E I A I G L</b>	<b>468</b>
AAG TTT AAG GAG CCC CAT GCA GCG TTC TAC GCG GCA GAA ATC GCT ATC GGC CTC	1404
<b>F F L H N Q G I I Y R D L K L D N V</b>	<b>486</b>
TTC TTC CTT CAC AAT CAG GGC ATC ATC TAC AGG GAC CTG AAG CTG GAC AAT GTG	1458
<b>M L D A E G H I K I T D F G M C K E</b>	<b>504</b>
ATG CTG GAT GCT GAG GGA CAC ATC AAG ATC ACT GAC TTT GGC ATG TGT AAG GAG	1512
<b>N V F P G T T T R T F C G T P D Y I</b>	<b>522</b>
AAC GTC TTC CCC GGG ACG ACA ACC CGC ACC TTC TGC GGG ACC CCG GAC TAC ATA	1566
<b>A P E I I A Y Q P Y G K S V D W W S</b>	<b>540</b>
GCC CCG GAG ATC ATT GCC TAC CAG CCC TAT GGG AAG TCT GTC GAT TGG TGG TCC	1620
<b>F G V L L Y E M L A G Q P P F D G E</b>	<b>558</b>
TTT GGA GTT CTG CTG TAT GAG ATG TTG GCA GGA CAG CCT CCC TTC GAT GGG GAG	1674
<b>D E E E L F Q A I M E Q T V T Y P K</b>	<b>576</b>
GAC GAG GAG GAG CTG TTT CAG GCC ATC ATG GAA CAA ACT GTC ACC TAC CCC AAG	1728
<b>S L S R E A V A I C K G F L T K H P</b>	<b>594</b>
TCG CTT TCC CGG GAA GCC GTG GCC ATC TGC AAG GGG TTC CTG ACC AAG CAC CCA	1782
<b>G K R L G S G P D G E P T I R A H G</b>	<b>612</b>
GGG AAG CGC CTG GGC TCA GGG CCT GAT GGG GAA CCT ACC ATC CGT GCA CAT GGC	1836
<b>F F R W I D W E R L E R L E I P P P</b>	<b>630</b>
TTT TTC CGC TGG ATT GAC TGG GAG CGG CTG GAA CGA TTG GAG ATC CCG CCT CCT	1890
<b>F R P R P C G R S G E N F D K F F T</b>	<b>648</b>
TTC AGA CCC CGC CCG TGT GGC CGC AGC GGC GAG AAC TTT GAC AAG TTC TTC ACG	1944
<b>R A A P A L T P P D R L V L A S I D</b>	<b>666</b>
CGG GCG GCG CCA GCG CTG ACC CCT CCA GAC CGC CTA GTC CTG GCC AGC ATC GAC	1998
<b>Q A D F Q G F T Y V N P D F V H P D</b>	<b>684</b>
CAG GCC GAT TTC CAG GGC TTC ACC TAC GTG AAC CCC GAC TTC GTG CAC CCG GAT	2052
<b>A R S P T S P V P V P V M *</b>	<b>698</b>
GCC CGC AGC CCC ACC AGC CCA GTG CCT GTG CCC GTC ATG TAA	2094

### C. Caracterização das amostras estudadas

Tabela 10 – Resumo do quadro clínico apresentado pelos doentes estudados.

Os doentes 1 a 54 possuem história de ataxia dominante; o doente 56 possui apenas um irmão afectado e os restantes não possuem outros elementos afectados na família. n/a, não disponível

Doente	Testes efectuados	Sintomas	Atrofia Cerebelosa	Idade Início
1	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8,10,12,17, DRPLA; FHM/EA-2; FRDA	Ataxia cerebelosa, tosse	sem informação	63
2	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8,10,12,17,DRPLA; FHM/EA-2; FRDA	Ataxia cerebelosa; alterações oculo-motoras; alterações extra-piramidais; tosse	sem informação	52
3	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Paraparésia espástico atáxica	sem informação	30
4	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8,10,12,17, 28, DRPLA	Disartria inicial; ataxia e desequilíbrio	sem informação	18
5	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8,12,17, 28, DRPLA	Disartria inicial; ataxia cerebelosa e desequilíbrio; enxaqueca	sem informação	20
6	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8,10,12,17, 28, DRPLA	Disartria inicial, ataxia	sem informação	40
7	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,12,17, 28, DRPLA	Disartria inicial, ataxia	sem informação	31
8	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa lentamente progressiva; sinais piramidais bilaterais	sem informação	~55
9	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa progressiva	Sim	~52
10	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8,10,12,17, 28, DRPLA; FHM/EA-2	Ataxia pura; tosse	sem informação	60-65
11	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa	sem informação	n/a
12	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Disartria inicial; ataxia cerebelosa progressiva pura	sem informação	60
13	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,8, 10,12,17, 28, DRPLA	Ataxia cerebelosa e desequilíbrio; disartria; tosse	Sim	67
14	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia acentuada	sem informação	70
15	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia nos membros superiores; diminuição força muscular nos membros inferiores e dificuldades na marcha	sem informação	40
16	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, 28, DRPLA; FHM/EA-2	Ataxia episódica; tosse	sem informação	4
17	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia e tremor de evolução progressiva	sem informação	50
18	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa progressive	sem informação	20
19	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia e disartria de evolução progressiva	sem informação	61
20	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Síndrome cerebeloso estático e cinético; dificuldades progressivas na marcha; tremor	sem informação	50
21	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, 28, DRPLA	Ataxia; nistagmo paroxístico; tremor distal das mãos	sem informação	44-45
22	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Desequilíbrio progressivo; polineuropatia sensitiva e autonómica; sem sinais piramidais	sem informação	49
23	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia da marcha; tetraparésia; mialgias	sem informação	63
24	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia axial	sem informação	67
25	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia e disartria de evolução progressiva	sem informação	~55
26	SCAs 1,2,3/DMJ,7,12,17, 28, DRPLA; FHM/EA-2	Ataxia; tosse	sem informação	n/a
27	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Síndrome cerebeloso puro, de predomínio nos membros inferiores	sem informação	57
28	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa acentuada; marcha atáxica; disartria ligeira; nistagmo	sem informação	28

29	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia appendicular	sem informação	56
30	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, 28, DRPLA	Tosse inicial; ataxia	sem informação	30
31	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Quadro cerebeloso de evolução progressiva	sem informação	30
32	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, 28, DRPLA	Disartria inicial; desequilíbrio da marcha de agravamento progressivo; perturbações de memória	sem informação	38
33	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia da marcha e disartria de agravamento progressivo	Sim	60
34	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa com desequilíbrio na marcha de agravamento progressivo	sem informação	51
35	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA; FRDA; DH	Ataxia da marcha, disartria, ligeiro défice cognitivo, movimentos coreicos da cabeça, de evolução progressiva	sem informação	51
36	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia; dismetria bilateral	Sim	40
37	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa, axial e apendicular; disartria; polineuropatia periférica axonal sensitiva	sem informação	50
38	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia da marcha e segmentar, de evolução progressiva; sem alterações piramidais	sem informação	53
39	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Disartria; disfagia; mioclonias	Sim	26
40	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia estática e cinética; tremor intencional	sem informação	20
41	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa; disartria	sem informação	60
42	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Sem informação	Sim	48
43	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Síndrome depressivo, dificuldade de concentração, ansiedade; disfunção urinária	Sim	n/a
44	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa de evolução progressiva	sem informação	n/a
45	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, 28, DRPLA; FHM/EA-2	Disartria inicial e desequilíbrio de instalação e evolução progressivas	sem informação	35
46	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa; sem atrofia óptica, alterações oculares ou deterioração cognitiva	sem informação	30
47	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia apendicular e marcha atáxica, de evolução progressiva; nistagmo; voz escândida	sem informação	40
48	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Ataxia da marcha; disartria cerebelosa ligeira; sem sinais piramidais	Sim	55
49	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Ataxia da marcha, disartria cerebelosa, sem nistagmo; tremor cefálico das mãos e pés, de evolução progressiva	sem informação	32
50	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,17, DRPLA	Ataxia; disartria ligeira; dismetria	sem informação	2
51	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Ataxia progressiva; disartria; espasticidade	sem informação	63
52	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa pura (ataxia segmentar e disartria), lentamente progressiva	sem informação	n/a
53	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA; PAF	Ataxia cerebelosa de evolução progressiva; polineuropatia sensitiva grave	sem informação	63
54	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10, 17, DRPLA	Alteração na sensibilidade dos membros; tremor	sem informação	n/a
55	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Desequilíbrio marcado com perturbações da marcha; voz escândida; tremor intencional	Sim	46
56	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10, 17, DRPLA	Ataxia axial e apendicular e disartria de evolução progressiva; diabetes	sem informação	54
57	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10, 17, DRPLA; FRDA	Ataxia axial; hipersensibilidade óptica	sem informação	n/a
58	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10, 17, DRPLA	Ataxia cerebelosa; polineuropatia	sem informação	n/a
59	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia cerebelosa, ataxia da marcha e nistagmo; polineuropatia sensitiva	Sim	52
60	SCAs 1,2,3/DMJ,6,7,10,12,17, DRPLA	Ataxia; nistagmo; tremor e parkinsonismo	sem informação	51

Tabela 11 – Mutações descritas (incluindo as identificadas neste trabalho) responsáveis pela SCA14. São apresentadas as localizações no transcrito e na proteína, idade de início da doença, principais sintomas, presença/ausência de atrofia cerebelosa e idade de portadores assintomáticos. (Legenda: n/a, não indicado; ?, dúvidas quanto à presença; nl, normal; + presença, - ausência; A, aumento; D, diminuição) (Adaptado de Chen *et al.*, 2011)

Mutações no gene <i>PRKCG</i> / PKCy		Exão	Dom. PKCy	Familiar (F)/ Esporádico (E)	Idade média de início	Ataxia	Disartria	Mov. anormal dos olhos	Mioclonia	Tremor/ Coreia	Diminuição da Sensibilidade	Défice Cognitivo	Sinais Adicionais/ Observações	Reflexos tendinosos	Atrofia cerebelosa	Portadores assintomáticos	Referência
Subst. Nucleot.	Subst. aa na PKCy																
c.62C>T	p.R21K	1	V1	F	5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Rentschler, 2010
c.122G>C	p.R41P	1	C1A	F	46 (29-58)	+	+	-	-	-	-	-	-	nl	+	66	Chen <i>et al.</i> , 2005
c.146G>T	p.C49Y	1	C1A	F	30	+	-	+	-	+	Ni	-	dificuldades de concentração	n/a	+	n/a	Rentschler, 2010
c.188G>T	p.G63V	2	C1A	F	Infância-50	+	3/5	1/5	-	-	Nd	-	1 distonia; 1 disfagia	A	+		Nolte <i>et al.</i> , 2007b
c.197G>A	p.C66Y	2	C1A	F	69	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Rentschler, 2010
c.229T>A	p.C77S	3	C1A	F	40 (26-56)	+	ligeira	ligeiro	-	-	S	-	dismetria	n/a	+		Wieczorek <i>et al.</i> , 2007
<b>c.234C&gt;A</b>	<b>p.H78Q</b>	<b>3</b>	<b>C1A</b>	<b>F</b>	<b>53 (40-60)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>n/a</b>	<b>-</b>	<b>disartria inicial</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>Este estudo</b>
c.del296-301acaac	p.Lys100-His101del	4	C1B	E	38	+	+	+	-	-	-	-	-	A	+	n/a	Chen <i>et al.</i> , 2005
c.301C>T	p.H101Y	4	C1B	F	31 (10-50)	+	+	+	-	-	-	-	-	A/D	+	20s	Chen <i>et al.</i> , 2003
					Adolescência		n/a	n/a	-	+	-	-	psicose	n/a	+		Nolte <i>et al.</i> , 2007a
c.303C>G	p.H101Q	4	C1B	F	32 (20-40)	+	+	4/6	-	-	-	-	3 dismetria; 2 disfagia; 1 disфонia	n/a	+	25, 26	Alonso <i>et al.</i> , 2005
<b>c.319A&gt;G</b>	<b>p.S107G</b>	<b>4</b>	<b>C1B</b>	<b>F</b>	<b>54</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>n/a</b>	<b>-</b>	<b>dificuldades na escrita</b>	<b>n/a</b>	<b>+</b>		<b>Este estudo</b>
c.341G>A	p.C114Y	4	C1B	F	29 (17-37)	+	+	2/5	-	2/5	-	1/5	reflexos extensores plantares	nl/A	+		Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.374A>C	p.H116P	4	C1B	F	32	n/a	+	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	disartria inicial	n/a	+?		Rentschler, 2010
<b>c.349T&gt;A</b>	<b>p.C117S</b>	<b>4</b>	<b>C1B</b>	<b>F</b>	<b>70</b>	<b>+</b>	<b>?</b>	<b>?</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>Este estudo</b>
c.353G>A	p.G118D	4	C1B	F	36 (3-59)	+	+	+	3/25	1/25	8/22	-	distonia	nl/A/D	+		van de Warrenburg, 2003; Verbeek, 2005; Visser, 2007; Foncke, 2009
c.355T>C	p.S119P	4	C1B	F	42 (35-51)	+	+	-	-	-	+	-	-	A	+		Chen <i>et al.</i> , 2003
c.356C>T	p.S119F	4	C1B	F	53 (14-70)	+	-	-	-	-	-	1/5	1/5 epilepsia	nl/A	+		Hiramoto <i>et al.</i> , 2006
c.367G>A	p.G123R	4	C1B	F	48 (40-60)	+	+/-	2/3	-	-	-	1/3	1 surdez	n/a	+		Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.368G>A	p.G123E	4	C1B	F	36 (24-48)	+	+/-	-	1/2	1/2	-	+	-	n/a	+		Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.380A>G	p.Q127R	4	C1B	F	28 (12-42)	+	+	+	5/11	-	-	-	dismetria	D	+	44, 70	Yabe <i>et al.</i> , 2003
c.383G>A	p.G128D	4	C1B	E	22,44	+	+	+	-	-	-	-	1 dificuldades na escrita	nl	+		Chen <i>et al.</i> , 2003;
				F	32 (20-49)	1/3	1/3	2/3	-	2/3	-	2/3	1 dificuld.escrita; 1distonia+vertigem	A	+	-	2006; Miura <i>et al.</i> , 2009
c.391T>C	p.C131R	4	C1B	F	Infância-50	+	+	-	-	+	-	-	-	n/a	+		Dalski <i>et al.</i> , 2006
c.392G>A	p.C131Y	4	C1B	F	18-50	+	+	-	-	-	-	-	-	A	+		Klebe <i>et al.</i> , 2007
c.413T>A	p.V138E	5	C1B	F	22 (3-45)	+	+/-	+	1/7	2/7	2/7	-	reflexos extensores plantares	nl/A	+		Vlak <i>et al.</i> , 2006
c.417C>A	p.H139Q	5	C1B	F	28 (10-45)	+	10+/-	6N/13	-	1S/13	6-/13	1?	-				Koht <i>et al.</i> , 2011
c.449,450 gc>tt	p.C150F	5	C1B	F	31 (19-44)	+	+/-	+	-	1/6	4/6	-	-	A	+		Fahey <i>et al.</i> , 2005
c.1078G>A	p.G360S	10	C3	F	36 (20-53)	+	+/-	-	-	+	-	-	fasciculações	n/a	+		Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.1081A>G	p.S361G	10	C3	F	28 (5-60)	+	+	-	-	-	-	-	-	nl	+		Chen <i>et al.</i> , 2005
c.1927T>C	p.F643L	18	ACG-cinase C-terminal	F	34 (Inf-60)	+	10+/-	10S/8N	Mc. facial	4/18	4/18	13/ 18	2 reflexos extensores plantares	A	+	-	Stevanin <i>et al.</i> , 2004;
					20		+	-	-	-	+	-	-	n/a			Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.2075T>G	p.V692G	18	V5	F	15	+	+	-	-	2/2	-	N/A	reflexos extensores plantares	A	+		Klebe <i>et al.</i> , 2005
c.2089_2192del	p.M697I_ex13	18	V5	F	Inf-60	+	n/a	n/a	1/3	+	n/a	-	-	D	+	45, 47	Asai <i>et al.</i> , 2009

D. Estrutura e frequências dos haplótipos estimados pelo programa PHASE na série de doentes estudada

Tabela 12 – Estrutura e frequências dos haplótipos estimados pelo programa PHASE, para o total de doentes estudados. A amarelo encontram-se os 7 haplótipos onde será possível encontrar os alelos com as mutações SCA14 (a vermelho)

Pos. GRCh37	SNPs																Freq. estimadas	Erro Padrão
	c.72C>T/ p.A24A	c.207C>T/ p.C69C	c.234C>A/ p.H78Q	c.285C>T/ p.D95D	c.319A>G/ p.S107G	c.349T>A/ p.C117S	c.397+55 G>A	c.529+29 G>A	c.567T>C/ p.N189N	c.686+14 T>G	c.1093-92 G>C	c.1281+26 G>T	c.1437-64 T>C	c.1497T>C/ p.F499F	c.1575+28 C>T	c.1905+72 G>C		
	Exão 1	Exão 3	Exão 3	Exão 3	Exão 4	Exão 4	Intrão 4 5'	Intrão 5 5'	Exão 6	intrão 6 5'	Intrão 11 3'	Intrão 11 5'	Intrão 14 3'	Exão 14	Intrão 14 5'	Intrão 17 5'		
1	T	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.4511	0.011
2	T	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	0.0222	0.005
3	T	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0012	0.003
4	T	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0024	0.003
5	T	C	C	C	A	T	G	G	T	G	C	T	T	T	C	G	0.0039	0.007
6	T	C	C	C	A	T	G	G	T	T	G	T	T	T	C	G	0.0084	0.001
7	T	C	C	C	A	T	G	G	C	G	G	T	T	T	C	G	0.0084	0.001
8	T	C	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	G	0.2801	0.010
9	T	C	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	C	0.0320	0.005
10	T	C	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	C	0.0005	0.002
11	T	C	C	C	A	T	G	G	C	T	C	T	T	T	C	G	0.0445	0.008
12	T	C	C	C	A	T	G	A	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0001	0.001
13	T	C	C	C	A	T	G	A	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0002	0.001
14	T	C	C	C	A	T	A	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0083	0.000
15	T	C	C	C	A	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0083	0.000
16	T	C	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	0.0042	0.004
17	T	C	C	C	G	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	C	0.0041	0.004
18	T	C	C	T	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0031	0.004
19	T	C	C	T	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	0.0014	0.003
20	T	C	C	T	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0016	0.003
21	T	C	C	T	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	C	0.0025	0.003
22	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0093	0.005
23	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	T	C	C	G	0.0010	0.002
24	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	C	T	C	G	0.0011	0.002
25	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0021	0.003
26	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0003	0.001
27	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	T	C	C	G	0.0002	0.001
28	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	C	T	C	G	0.0002	0.001
29	T	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0005	0.002
30	T	C	C	T	A	T	G	A	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0008	0.002
31	T	C	A	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0014	0.003
32	T	C	A	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0013	0.003
33	T	T	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0013	0.003
34	T	T	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0014	0.003
35	T	T	A	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0027	0.003
36	T	T	A	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0027	0.003
37	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0516	0.007
38	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	T	G	0.0146	0.004
39	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	C	C	G	0.0002	0.001
40	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	C	T	C	G	0.0002	0.001
41	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0003	0.001
42	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	T	T	C	G	0.0081	0.005
43	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0011	0.002
44	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	C	T	C	G	0.0010	0.002
45	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0022	0.003
46	C	C	C	C	A	T	G	G	T	G	C	T	T	T	C	G	0.0006	0.002
47	C	C	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	C	G	0.0016	0.003
48	C	C	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	T	T	T	G	0.0001	0.001
49	C	C	C	C	A	T	G	G	C	T	C	T	T	T	C	G	0.0008	0.002
50	C	C	C	C	A	T	G	A	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0000	0.000
51	C	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0001	0.000
52	C	C	C	T	A	T	G	A	T	G	G	T	C	C	C	G	0.0001	0.000