

Laboratório Nacional de Biociências
Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais

Projeto para solicitação de bolsa PIBIC-CNPEM

**Caracterização da linhagem de camundongos
portadora da mutação Q93E da UBE2A**

Pesquisador responsável: Ângela Saito (LN Bio, CNPEM)

Campinas, 25 de abril de 2019

Introdução e Justificativa

Deficiência Intelectual (DI) é uma desordem do neurodesenvolvimento que é caracterizada por significantes limitações na função intelectual e comportamento adaptativo, os quais são aparentes antes dos 18 anos de idade. Sua prevalência é de 2 a 3% na população, com frequência elevada no sexo masculino (de Vries et al., 2005).

DI de herança ligada ao X do tipo Nascimento, também conhecida como síndrome da deficiência da enzima conjugadora de ubiquitina E2 A (UBE2A), foi reportada pela primeira vez em 2006 em 3 homens afetados da mesma família devido a uma mutação *nonsense* no gene da UBE2A (UBE2A) (Nascimento et al., 2006). UBE2A é uma enzima conjugadora de ubiquitina E2 A da via de ubiquitinação de proteínas, a qual exerce função importante para diversos processos incluindo regulação do reparo de DNA, degradação de proteínas e transcrição gênica (An et al., 2017; Cai et al., 2014; Chen et al., 2012; Game & Chernikova, 2009; Hoegge et al., 2002).

Uma nova mutação na UBE2A (mutação Q93E), localizada no sítio catalítico da enzima, foi recentemente identificada em irmãos com DI moderada. Estudos estruturais mostraram que esta mutação afeta a capacidade de poliubiquitinação da UBE2A e interfere na transferência de ubiquitina para a proteína alvo (de Oliveira et al., 2019). Para investigar o impacto desta nova mutação no desenvolvimento do sistema nervoso central e função da UBE2A, modelos de camundongos portadores da mutação *missense* no gene UBE2A foram gerados no LNBio-CNPEM utilizando a ferramenta de edição do genoma CRISPR/Cas9 e microinjeção pró-nuclear em embrião de camundongos (Wang et al., 2013).

Objetivos

O objetivo deste projeto é caracterizar a linhagem de camundongos portadora da mutação Q93E da UBE2A quanto à expressão de UBE2A e à quantidade de neurônios em regiões cerebrais comparando com o animal controle (selvagem). Especificamente iremos:

1 - Realizar a amplificação do cDNA+3'UTR de UBE2A murino a partir de biblioteca de cDNA de cérebro e clonagem em vetor pGEM-T Easy.

2 – Sintetizar as sondas de RNA *sense* e *antisense* através de transcrição *in vitro* e purificação.

3 - Realizar o ensaio de Hibridação de RNA *in situ* com cérebros de animais adultos selvagens e mutantes a fim de mostrar que o padrão de expressão de UBE2A não é alterada no animal mutante.

4 - Quantificar os neurônios totais de regiões cerebrais dissecadas (córtex, hipocampo, cerebelo e estrutura remanescentes) através da determinação da proporção de núcleos marcados com DAPI e positivos para o marcador neuronal NeuN.

Metodologia

Amplificação do cDNA+3'UTR de UBE2A e clonagem no vetor pGEM-T Easy

O cDNA de UBE2A, bem como uma parte de sua região 3'UTR, serão amplificados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando uma biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo, Taq DNA polimerase, dNTPs e os primers UBE2A probe F (5'- GAAGGGACCCCGTTTGAG-3') e UBE2A probe R (5'- TCCGAAACAGAATGCGCT-3'). Em seguida, os produtos de PCR serão observados em gel de agarose 1%, o DNA será purificado, clonado no vetor pGEM-T Easy e sequenciado.

Síntese das sondas de RNA *sense* e *antisense*

Os plasmídeos contendo o cDNA+3'UTR de UBE2A serão digeridos com enzimas de restrição localizadas a jusante ou a montante do inserto clonado. Em seguida, o vetor linearizado será utilizado na reação de transcrição *in vitro* para sintetizar as sondas de RNA *sense* e *antisense*. A transcrição *in vitro* será realizada à 37°C por 3 horas com 1 µg de DNA plasmideal linearizado, 2 µL de tampão de transcrição 10x, 1 µL de DTT 100 mM, 1 µL de mix contendo digoxigenina-11-UTP, 0,5 µL de Rnasin e 2 µL de T7 ou Sp6 RNA polimerase.

Hibridação de RNA *in situ*

Camundongos adultos selvagens e da linhagem UBE2A Q93E serão perfundidos transcardialmente com paraformaldeído (PFA), os cérebros coletados e pós-fixados através de imersão em PFA 4%. Em seguida, serão desidratados em bateria de metanol (25%, 50%, 75% e 2x100%). Pode-se armazenar em -20°C por tempo indeterminado. No primeiro dia da *in situ*, será realizado a etapa de hidratação em bateria metanol (75%, 50%, 25% e 2xPBS(T)). "Bleach" com H₂O₂ (clarear o tecido), seguida por lavagens, permeabilização com Proteinase K 10 µg/mL (tempo de incubação de acordo com o tamanho do tecido), seguida por lavagens, pós-fixação com PFA 4%, glutaraldeído 0,2%, pré-hibridação com solução Hyb solution em câmara úmida a 65°C por 3h. Por fim, será feita a Hibridação da sonda (desnaturada e diluída em solução hyb) por 16 horas a 65°C. No segundo dia, será feita a lavagem quente com solução de formamida, SSC e SDS para aumentar a estringência de ligação da sonda com o mRNA, lavagem pós-hibridação com MAB(T)-levamisole para inativar a fosfatase alcalina endógena, bloqueio com BBR (minimiza ligações inespecíficas). A incubação do anticorpo antidigoxigenina conjugado com fosfatase alcalina será realizada durante 16 horas a 4°C. No outro dia, o material será lavado e revelado com BMPurple. Após a hibridação de RNA *in situ*, os cérebros de camundongo serão incluídos em gelatina 20% (2 banhos de 1 hora cada, a 55°C) e cortados em vibrátomo TPI Series 3000, com espessura de 70 µm cada corte.

Quantificação de neurônios totais de regiões cerebrais

Camundongos adultos selvagens e da linhagem UBE2A Q93E serão perfundidos transcardialmente com paraformaldeído (PFA), os cérebros coletados e pós-fixados através de imersão em PFA 4%. As estruturas cerebrais (córtex, hipocampo, cerebelo e estruturas remanescentes) serão dissecadas em PBS1x e pesadas. As células serão lisadas em solução de dissociação (citrato de sódio 40 mM e Triton X-100 em água) utilizando um homogeneizador Douncer. Em seguida, uma fração dos núcleos será marcada com corante DAPI por 5 min a temperatura ambiente. Os núcleos serão contados em câmara de Newbawer e, em seguida, serão marcados com anticorpo anti-NeuN-Alexa488. Por fim, os núcleos positivos para NeuN serão contados e a proporção de neurônios é calculada segundo a equação: (% núcleos NeuN (+) * Número total de células)/100 (Herculano-Houzel & Lent, 2005).

Referência

- An, H., Yang, L., Wang, C., Gan, Z., Gu, H., Zhang, T., ... Sun, F.-L. (2017). Interactome Analysis Reveals a Novel Role for RAD6 in the Regulation of Proteasome Activity and Localization in Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 37(6), MCB.00419-16.
- Cai, F., Chen, P., Chen, L., Biskup, E., Liu, Y., Chen, P.-C., ... Chen, S. (2014). Human RAD6 promotes G1-S transition and cell proliferation through upregulation of cyclin D1 expression. *PloS One*, 9(11), e113727.
- Chen, S., Wang, D.-L., Liu, Y., Zhao, L., & Sun, F.-L. (2012). RAD6 regulates the dosage of p53 by a combination of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 576–587.
- de Oliveira, J. F., do Prado, P. F. V., da Costa, S. S., Sforça, M. L., Canateli, C., Ranzani, A. T., ... Franchini, K. G. (2019). Mechanistic insights revealed by a UBE2A mutation linked to intellectual disability. *Nature Chemical Biology*, 15(1), 62–70.
- de Vries, B. B. A., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D. A., Vissers, L. E. L. M., Janssen, I. M., ... Veltman, J. A. (2005). Diagnostic genome profiling in mental retardation. *American Journal of Human Genetics*, 77(4), 606–616.
- Game, J. C., & Chernikova, S. B. (2009). The role of RAD6 in recombinational repair, checkpoints and meiosis via histone modification. *DNA Repair*, 8(4), 470–482.
- Herculano-Houzel, S., & Lent, R. (2005). Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2518–2521.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419(6903), 135–141.
- Nascimento, R. M. P., Otto, P. A., de Brouwer, A. P. M., & Vianna-Morgante, A. M. (2006). UBE2A, Which Encodes a Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Is Mutated in a Novel X-Linked Mental Retardation Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 79(3), 549–555.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–918.