

Ana Carla Batissoco

**A conexina 26 e sua relação com
outras proteínas no órgão de Corti**

São Paulo
2011

Ana Carla Batissoco

A conexina 26 e sua relação com outras proteínas no órgão de Corti

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia
Mingroni Netto

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana
Amaral Haddad

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

Batissoco, Ana Carla

A Conexina 26 e sua relação com outras
proteínas no órgão de Corti

181 pp.

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

1. *GJB2*
2. Conexina 26
3. Surdez hereditária
4. órgão de Corti
5. precipitação por afinidade de proteínas
6. células progenitoras
7. células de suporte

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a).Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a).Dr(a).

Prof(a). Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

*Aos amores da minha vida;
Alé e Urko.*

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, por sua dedicação, confiança e conselhos valiosos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad, por toda orientação técnica e científica e pela grande disposição em me ajudar em todos os momentos desse estudo.

Aos meus pais, Luiz e Zulmira, e meus irmãos, Miguel e Graça, aos quais devo tudo o que sou.

Ao Alê pelo amor e apoio integral, ao Urko por ser a fonte de toda minha energia e a Ori, por todos os momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Paulo Otto, por ter me apresentado ao Laboratório de Genética Humana.

À Profa. Dra. Angela Vianna Morgante, pelo uso das dependências do laboratório de Genética Humana.

Ao Dr. Ignacio del Castillo pela amostra controle cedida para a triagem da deleção de 200Kb localizada nas proximidades do gene *GJB6* e pelas análises de MLPA.

Ao diretor da DERDIC (Divisão de Reabilitação dos Distúrbios da Comunicação, PUC-SP), Dr. Alfredo Tabith Jr. e ao diretor clínico Dr. Mauro Spinelli (*in memoriam*) e todos os demais membros do corpo profissional pelas inúmeras avaliações clínicas e audiológicas realizadas nos pacientes e seus familiares.

Aos amigos Faculdade de Medicina da USP, Jeanne, Luiz e Karina, pela amizade, pelo companheirismo e parceria na pesquisa e pelas ótimas discussões científicas e não científicas.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Genética Humana, de Genômica Funcional e de Oxidações Biológicas em Leveduras, que contribuíram de alguma forma para que eu realizasse este projeto. Em especial, agradeço à Maraísa pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Genética Humana, Dayane, Magnólia, Renata e Vítor. Agradeço em especial a Lilian e a Maria Teresa pelo apoio técnico, científico e pela amizade. E também ao “agregado” Gustavo. E as ex-alunas Daniela e Renata Thiele.

Aos meus amigos mais do queridos Deborah e Fernando, e também Crys, Larissa e Juliana por todo o apoio durante as aventuras e “desventuras” da vida acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e do Centro de Estudos do Genoma Humano pelo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Alberto A. G. F. C. Ribeiro, por ter permitido o acesso ao seu laboratório de Biologia Celular e Microscopia Eletrônica e em especial ao técnico Waldir Caldeira, por todos os longos períodos de captura de imagens.

À Ana Lucia Garippo, do núcleo de microscopia confocal/fluorescência Rede Multiusuários do Sistema FMUSP/HC pela captura de imagens e pelas valiosas dicas de imunofluorescência.

Aos nosso colaboradores internacionais, Prof. Stefan Heller (Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery and Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University School of Medicine, Stanford, Califórnia, USA) e Prof. Azel Zine (Institute for Neurosciences of Montpellier and Institute for Research in Biotherapy, University of Montpellier I, Montpellier, France) por todo o treinamento oferecido a nossa equipe de pesquisa em células-tronco/progenitoras do órgão de Corti.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bento, pela coordenação dos projetos INCT-CNPq (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Células-Tronco) e RNTC-FAPESP (Rede Nacional de Terapia Celular), cujos recursos financeiros permitiram parte das pesquisas aqui apresentadas.

À Profa. Dra. Mayana Zatz, pela coordenação dos projetos PRONEX-CNPq, CEPID-FAPESP, Centro de Estudos do Genoma Humano e INCT-CNPq, cujos recursos financeiros permitiram a execução da maioria das pesquisas aqui apresentadas

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, pela infra-estrutura.

À FAPESP e CNPq pelos auxílio financeiro.

Aos nossos pacientes com deficiência auditiva e às suas famílias, pela enorme paciência em colaborar com nossas pesquisas.

A todos os animais sacrificados que contribuíram para esse estudo.

SUMÁRIO

Apresentação	1
Resumo	4
Abstract	6
Capítulo 1	9
1. Revisão bibliográfica	9
1.1.Introdução	9
1.2.Fisiologia da audição	10
1.2.1.O órgão de Corti	11
1.2.1.1.Desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular no órgão de Corti	13
1.2.1.2.A regeneração das células ciliadas como indicativo da presença de células-tronco na orelha interna	17
1.3.Surdez de etiologia genética	19
1.4.Surdez não-sindrômica	20
1.5.Surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva e o locus DFNB1	21
1.6.As proteínas conexinas	26
1.6.1.Expressão e estrutura das conexinas	26
1.6.2.Funções das conexinas	28
1.6.3.Biossíntese das conexinas	30
1.6.4.Interação entre conexinas e outras proteínas	33
Capítulo 2. Objetivos	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
Capítulo 3. Pesquisa de novos alelos patogênicos no locus DFNB1 relacionados à surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva	36
3.1.Introdução	36
3.2.Objetivo	37
3.3.Casuística e Métodos	38
3.3.1.Pacientes	38
3.3.2.Amostra controle	39

3.3.3.Métodos	39
3.3.3.1.Sequenciamento das regiões de código, promotora e de <i>splicing</i> do gene <i>GJB2</i>	40
3.3.3.2.Triagem da deleção de 200kb localizada nas proximidades do gene <i>GJB2</i>	43
3.3.3.3.Pesquisa de variações no número de cópias nos exons dos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> , <i>GJB3</i> e <i>WFS1</i> por MLPA	45
3.4.Resultados	52
3.4.1.Sequenciamento das regiões de código, promotora e doadora de <i>splicing</i> do intron 1 do gene <i>GJB2</i>	52
3.4.2.Triagem da deleção de 200kb a a 130kb da região 5' do gene <i>GJB6</i>	53
3.4.3.Pesquisa de variações no número de cópias por MLPA e por PCR em tempo real quantitativa	56
3.5.Discussão	59
3.5.1.Sequenciamento das regiões de código, promotora e doadora de <i>splicing</i> do intron 1 do gene <i>GJB2</i>	59
3.5.2.Triagem da deleção de 200kb localizada a 130kb da região 5' do gene <i>GJB6</i>	61
3.5.3.Pesquisa de variações no número de cópias por MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>) e por PCR em tempo real quantitativa	62
3.6.Conclusão	65
<hr/>	
Capítulo 4. Estabelecimento de culturas primárias de células neuro-epiteliais do órgão de Corti de cobaias e camundongos	66
<hr/>	
4.1.Introdução	66
4.2.Objetivo	68
4.3.Animais e Métodos	68
4.3.1.Animais	68
4.3.2.Métodos	69
4.3.2.1.Dissecção do órgão de Corti de cobaias e camundongos neonatos	70
4.3.2.2.Cultura em suspensão de células progenitoras do órgão de Corti	70
4.3.2.3.Caracterização fenotípica das células em cultura	73
4.3.2.4.Contagem celular	75
4.3.2.5.Análises estatísticas	75
4.4.Resultados	75
4.5.Discussão	85
4.6.Conclusão	90
<hr/>	

Capítulo 5. Pesquisa e identificação de proteínas que interagem com a Cx26	91
5.1.Introdução	91
5.2.Objetivo	93
5.3.Animais e Métodos	94
5.3.1.Animais	94
5.3.2.Métodos	95
5.3.2.1.Clonagem e expressão de uma proteína com a sequência codificadora para a região C-terminal da Cx26 em fusão com GST	95
5.3.2.2.Obtenção de proteínas recombinantes em condições solúveis ou insolúveis	98
5.3.2.3. Ensaio de precipitação por afinidade entre a proteína de fusão recombinante (GST-Cx26) e proteínas do lisado celular	100
5.3.2.4.Identificação proteica por espectrometria de massas	102
5.3.2.5.Análises <i>in silico</i>	104
5.4. Resultados	105
5.4.1. Clonagem e expressão de uma proteína com a sequência codificadora para a região C-terminal da Cx26 em fusão com GST	105
5.4.2.Ensaio de precipitação por afinidade entre as proteínas recombinantes e proteínas do lisado celular	111
5.4.3.Análises das proteínas identificadas por espectrometria de massas	112
5.5.Discussão	127
5.6. Conclusão	142
Referências Bibliográficas	144
Anexos	165

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema representando o aparelho auditivo humano: orelha externa (E), orelha média (M) e orelha interna (I).	12
Figura 1.2. Secção transversal de um dos giros da cóclea, mostrando sua divisão em três compartimentos longitudinais: as escalas vestibular, timpânica e média ou duto coclear.	12
Figura 1.3. Esquema ampliado do órgão de Corti, mostrando as células ciliadas internas e externas e as células de suporte.	13
Figura 1.4. Diferenciação das células progenitoras em células ciliadas e de suporte.	16
Figura 1.5. Representação esquemática dos genes <i>GJB2</i> e <i>GJB6</i> .	23
Figura 1.6. Representação esquemática da região do locus DFNB1, 13q12-11, onde estão presentes os genes <i>GJB2</i> e <i>GJB6</i> e das deleções descritas nessa região e associadas a surdez não-sindrômica de herança autossômica recessiva.	25
Figura 1.7. Representação esquemática da estrutura das conexinas, dos conexons e dos canais de junção do tipo fenda.	29
Figura 1.8. Representação esquemática da reciclagem dos íons potássio na cóclea.	31
Figura 1.9. Representação esquemática da síntese, montagem e degradação dos canais comunicantes do tipo fenda.	32
Figura 3.1. Representação esquemática do gene <i>GJB2</i> e das suas regiões de código, promotora e doadora de <i>splicing</i> do intron 1 e da extensão das regiões sequenciadas nesse trabalho.	42
Figura 3.2. Exemplo de curva de dissociação específica mostrando um único pico máximo entre 80-84°C.	49
Figura 3.3. Exemplo das curvas de amplificação das diluições seriadas utilizadas para a construção das curvas padrão e cálculo da eficiência dos pares de iniciadores quanto a sequência alvo.	52
Figura 3.4. Nova mutação p.L76P(c.C227T) no gene <i>GJB2</i> .	53
Figura 3.5. Resultados da genotipagem de SNPs com o <i>MegaBace SNUPe Genotyping Kit</i> da nova mutação p.L76P (c.C227T).	54
Figura 3.6. Triagem da deleção de 200kb localizada a 130kb da região 5' do gene <i>GJB6</i> .	54

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

