

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Investigação de variantes em genes da via de clivagem da ataxina-3 como  
fatores modificadores de fenótipo na Doença de Machado Joseph**

**Ana Carolina Martins**

Orientadora: Laura Bannach Jardim

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Porto Alegre, Março de 2020

## **INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Este trabalho teve como fontes financiadoras: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Foi desenvolvido no Laboratório de Identificação Genética (LIG) localizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao PPGBM/UFRGS.

## **Agradecimentos**

Quero agradecer à minha querida orientadora Dra. Laura Bannach Jardim por orientar minha trajetória durante o mestrado e, por tratar-me com afeto e compreensão em uma relação mui respeitosa. Não esperava encontrar tamanha fraternidade dentro de um ambiente tão tecnicista como a academia.

A minha outra mentora desde o início do mestrado: Mariana Rieck. Mari, não preciso nem dizer que sem você esse projeto não existiria. Obrigada pela ajuda durante toda a caminhada, pelos conselhos e por me tranquilizar tantas vezes. Obrigada por me ensinar inúmeras coisas com tamanha paciência, e por sempre estar disponível para minhas dúvidas repentinas.

A todo grupo de Neurogenética por me acolher e ensinar tanto. Os vínculos que criamos me deram força e segurança para sempre seguir em frente. Em especial, agradeço ao meu colega Lucas Sena por todas as vezes que mostrou como as minhas preocupações eram desnecessárias.

A todos os sujeitos que participaram e participam das pesquisas do nosso grupo: Vocês são o real motivo e motivação de minha paixão pela ciência.

A minha família e amigos por sempre estarem segurando minha mão e impulsionando minhas ações com palavras de amor e de respeito. Pai e mãe, a bondade e integridade de vocês sempre serviram de exemplo para mim.

*“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço”*

Paulo Freire

Dedico esta pesquisa a todos aqueles que resistem e lutam por uma Educação pública e de qualidade.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AO: Idade de Início (do inglês, *age at onset*)

CAG: Citosina-Adenina-Guanina

CAG<sub>exp</sub>: repetição expandida CAG

DRPLA: Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana (do inglês, *Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy*)

GWAS: Estudo de Associação Genômica Ampla (do inglês, *Genome-wide association studies*)

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HD: Doença de Huntington (do inglês, *Huntington's Disease*)

HSP: Proteína de choque térmico (do inglês, *heatshockprotein*)

MJD: Doença de Machado-Joseph (do inglês, *Machado-Joseph Disease*)

PoliQ: Trato de poliglutamina expandido

SBMA/SMAX1: Atrofia Muscular Bulbo-Espinal, ligada ao X tipo 1 (do inglês, *Spinal and Bulbar Muscular Atrophy, X-linked 1*)

SCA: Ataxia espinocerebelar (do inglês, *Spinocerebellar ataxia*)

SCA2: Ataxia espinocerebelar tipo 2 (do inglês, *Spinocerebellar ataxia type 2*)

SCA3: Ataxia espinocerebelar tipo 3 (do inglês, *Spinocerebellar ataxia type 3*)

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Polimorfismos de Nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphism*)

UIMs: Motivos de interação da ubiquitina (do inglês, *Ubiquitin-interacting Motif*)

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação do código genético e da tradução de proteínas em pessoas não afetadas (A) e em portadores de doenças poliglutamínicas (B)

**Figura 2.** Esquema representando o gene ATXN3, seus éxons e a localização das repetições CAG

**Figura 3.** Representação esquemática da proteína ATXN3 contendo um domínio catalítico Josefina e dois a três motivos de interação com ubiquitina

**Figura 4.** Idade de início versus o aumento do comprimento da repetição CAG

**Figura 5.** Predição da idade de início da ataxia de marcha (AOga) em pacientes sintomáticos do sul do Brasil utilizando o modelo preditivo proposto por Tezenas du Montcel *et al.* (2014).

**Figura 6.** Variabilidade do comprimento do CAG no alelo ATXN3 expandido e idade de início na SCA3/MJD

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1.** Doenças poliglutamínicas, seus respectivos genes e proteínas mutadas

**TABELA 2.** Frequência da SCA3 dentre todos os tipos de SCAs em diferentes países

## RESUMO

A proteólise mediada pelas calpaínas foi proposta como modulador da patogênese da ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3/MJD), um distúrbio devido à expansão repetida CAG (CAGexp) no gene *ATXN3*. A calpaína-2 (*CAPN2*) promove a translocação do ataxina-3 mutante para o núcleo e sua agregação. A calpastatina (*CAST*) é um inibidor endógeno da calpaína. Nosso objetivo foi investigar se os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) rs17599 no *CAPN2* e rs27852 e rs1559085 no *CAST* modulam a idade de início (AO - do inglês, *age at onset*) e a progressão da doença em indivíduos sintomáticos SCA3/MJD. A idade de início residual (RAO) - AO observada menos a AO prevista com base no CAGexp - foi usada para evitar o efeito relacionado ao CAGexp. A progressão da doença foi medida em um subgrupo pelas pontuações anuais do *Neurological Examination Score for Ataxia Spinocerebellar* (NESSCA). Trezentos e seis indivíduos com SCA3/MJD foram incluídos. Seis homozigotos GG<sup>rs1559085</sup> (de 6 famílias) iniciaram a doença mais tarde que os outros indivíduos - sua média (DP) de RAO foi de +4,32 (3,65) versus -1,39 (7,99) anos ( $p = 0,01$ ). Um haplótipo com SNPs no *CAST* foi construído: portadores e não-portadores de C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup> apresentavam RAOs de 0,34 (7,90) e -1,74 (7,93) anos ( $p = 0,065$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre as pontuações longitudinais do NESSCA de 16 portadores e 58 não-portadores de C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup>. Concluímos que o alelo G<sup>rs1559085</sup> no *CAST* está relacionado a variações na AO de indivíduos sintomáticos SCA3/MJD, independentemente dos efeitos do CAGexp. O efeito G<sup>rs1559085</sup> foi significativo no modelo recessivo, mas não podemos descartar um efeito gradiente relacionado à codominância.

**Palavras-chave:** Machado–Joseph disease; CAPN-2; CAST; rs17599; rs27852; rs1559085;



## ABSTRACT

Calpain-mediated proteolysis has been proposed to modulate the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3/MJD), a disorder due to a CAG repeat expansion (CAGexp) at *ATXN3*. Calpain-2 (*CAPN2*) promotes translocation of the mutant ataxin-3 to the nucleus and aggregation. Calpastatin (*CAST*) is an endogenous calpain inhibitor. We aimed to investigate if single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs17599 at *CAPN2*, and rs27852 and rs1559085 at *CAST* modulate the age at onset (AO) and disease progression in SCA3/MJD symptomatic subjects. The residual age at onset (RAO) - the observed AO minus the predicted AO based on the CAGexp - was used to avoid confounder effect related to CAGexp. Disease progression was measured in a subgroup by annual scores of the *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia* (NESSCA). Three hundred and six SCA3/MJD individuals were included. G<sup>rs1559085</sup> was a minor allele. Six GG<sup>rs1559085</sup> homozygotes (from 6 families) started the disease later than the other subjects – their mean (SD) RAO were +4.32 (3.65) versus -1.39 (7.99) years ( $p=0,01$ ). A haplotype with SNPs at *CAST* was built: carriers and non carriers of C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup> had RAOs of 0.34 (7.90) and -1.74 (7.93) years ( $p=0.065$ ). No significant differences were seen between longitudinal NESSCA scores of 16 carriers and 58 non-carriers of C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup>. We concluded that G<sup>s1559085</sup> allele at *CAST* is related to variations in the AO of symptomatic SCA3/MJD subjects, independent from the effects of the CAGexp. G<sup>s1559085</sup> effect was significant in the recessive model, but we cannot discard a gradient effect related to codominance.

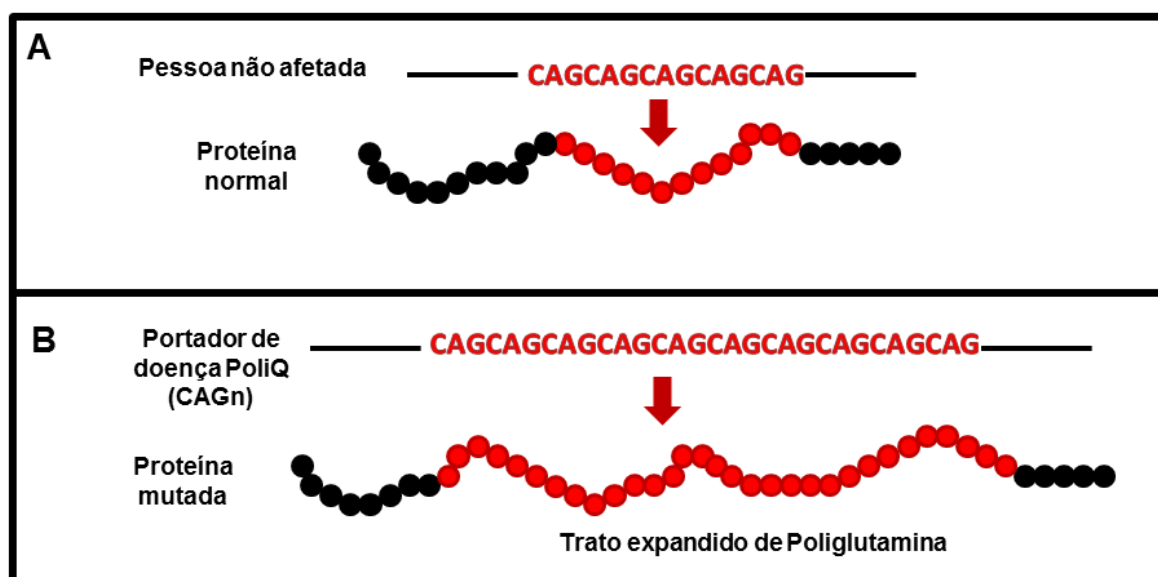
**Keywords:** Machado–Joseph disease; CAPN-2; CAST; rs17599; rs27852; rs1559085;

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Poliglutaminopatias

Poliglutaminopatias são doenças neurodegenerativas causadas por uma expansão da repetição trinucleotídica CAG (Citosina-Adenina-Guanina) na região codificadora de genes não relacionados entre si (Fan *et al.*, 2014). Durante a síntese proteica, a repetição CAG é traduzida em uma série de aminoácidos de glutamina - domínio conhecido como poliglutamina ou poliQ - na proteína recém traduzida. Em pacientes portadores de poliglutaminopatias, mutações de repetição levam à codificação de um trato anormalmente expandido da poliQ na respectiva proteína (**Figura 1**).

**Figura 1. Representação do código genético e da tradução de proteínas em pessoas não afetadas (A) e em portadores de doenças poliglutamínicas (B)**



Até o momento nove poliglutaminopatias foram identificadas, sendo elas: seis ataxias espinocerebelares (SCAs) tipo 1, 2, 3 (também conhecida como Doença de Machado-Joseph), 6, 7, 17; Doença de Huntington (HD); Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana (DRPLA); e Atrofia Muscular Bulbo-Espinal, ligada

ao X tipo 1 (SBMA/SMAX1). Todas estas doenças apresentam herança dominante, com exceção do SBMA. Estes nove distúrbios neurodegenerativos são diferentes entre si: cada subtipo de doença poliQ tem seu próprio gene causador e apresenta um número limite de repetições consideradas não patogênicas que lhe é peculiar (**Tabela 1**) (Fan *et al.*, 2014).

**Tabela 1. Doenças poliglutamínicas, seus respectivos genes e proteínas mutadas**

Poliglutaminopatia	Locus	Proteína	Repetições CAG	
			Normal	Patogênicas
SCA1	6p23	Ataxina-1	06-39	> 41
SCA2	12q24	Ataxina-2	14-32	> 34
SCA3/MJD	14q24-q31	Ataxina-3	12-45	> 51
SCA6	19p13	CACNA1A	14-18	> 21
SCA7	13p21-p12	Ataxina-7	07-18	> 38
SCA17	6p17	TBP	25-43	> 45
HD	4p16.3	Huntingtina	06-35	> 37
DRPLA	12p13	Atrofina-1	03-38	> 49
SBMA	Xq11-q12	Receptor de andrógeno	06-36	> 38

Adaptado de Fan *et al.*, 2014.

O mecanismo pelo qual as proteínas portadoras do trato poliQ expandido exercem seus efeitos ainda não é completamente conhecido. O que parece estar bem claro é que a presença de uma poliQ não modifica sobremaneira a função da proteína envolvida, mas que produz efeitos tóxicos. Ou seja, as poliglutaminopatias são condições autossômicas dominantes por ganho de efeito tóxico. Esse efeito varia de acordo com o contexto proteico e pode incluir comprometimento da via da ubiquitina-proteassoma, formação de agregados de proteínas mutantes (envolvendo o sequestro de proteínas), desregulação da transcrição - diretamente ou como resultado da formação de agregados -, e disfunção mitocondrial (Watson *et al.*, 2012).

## 1.2 Doença de Machado-Joseph

### 1.2.1 Histórico da Doença

A Doença de Machado-Joseph (SCA3/MJD) foi primeiramente descrita em 1972 em Massachusetts, em um relato de caso de ataxia de marcha em descendentes da família de William Machado, um nativo da Ilha açoriana de São Miguel (Nakato *et al.*, 1972). Posteriormente, outras famílias de origem açoriana foram reportadas nos Estados Unidos (Woods & Schaumburg, 1972; Romanul *et al.*, 1977). Em 1976, Rosenberg e colaboradores publicaram um artigo sobre uma doença autossômica dominante, encontrada na família de Antone Joseph, açoriano da Ilha de Flores, que residia na Califórnia (EUA) (Rosenberg *et al.*, 1976). No ano de 1977, pesquisadores estudaram 15 famílias da Ilha dos Açores que apresentavam ataxia de marcha progressiva, autossômica dominante, associada com outros fenótipos piramidais (Coutinho *et al.*, 1977). Evidências sugeriram que as descrições estavam relacionadas a uma mesma mutação genética com uma expressão de fenótipos variáveis de paciente para paciente. Nos anos 80, o epônimo Doença de Machado-Joseph foi sugerido em homenagem às primeiras famílias descritas (Donis, 2015). Somente em 1994, Kawaguchi e colaboradores identificaram uma mutação comum no gene *ATXN3* como causa da Doença de Machado-Joseph (Kawaguchi *et al.*, 1994).

As famílias SCA3/MJD residentes no Rio Grande do Sul (RS) começaram a ser descritas em 2001 (Jardim *et al.*, 2001b). Desde então, um grande número de sintomáticos são diagnosticados e acompanhados pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Estes pacientes são conhecidos como "Rio Grande do Sul cohort" (Souza *et al.*, 2016). A história da colonização do RS pode explicar esse "concentrado" geográfico de SCA3/MJD nesta região. Até 1750, o RS quase não tinha habitantes: os poucos ameríndios que viviam nesta região eram caçadores-coletores. Dois a cinco mil açorianos pessoas foram enviadas ao RS pela coroa portuguesa de 1750 a 1770 (Piazza, 1992) - caracterizando a entrada de europeus no sul do Brasil. Como a coorte SCA3/MJD do RS possui ascendência açoriana

(Jardim *et al.*, 2001c), é bem estabelecida o efeito fundador oriundo dessa imigração (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2020).

### 1.2.2 Caracterização e Epidemiologia

A SCA3/MJD (OMIM #109150) é uma condição neurodegenerativa autossômica dominante de início tardio, sendo que os pacientes tendem a começar a apresentar sintomas perto dos 40 anos (Sequeiros & Coutinho, 1993). Indivíduos saudáveis portam de 12 a 44 repetições trinucleotídicas CAG no gene *ATXN3*, enquanto expansões de mais de 51 CAGs (CAGexp) são observadas em indivíduos portadores da doença. Alelos com 45 a 51 repetições CAG são considerados alelos como um “vazio epidemiológico”. Por ser uma doença dominante, a presença de somente um alelo mutado é suficiente para a manifestação dos sintomas. Porém, alguns indivíduos, geralmente nascidos de uniões consanguíneas, podem ser homozigotos para a doença.

A SCA3/MJD é a forma mais prevalente de ataxia no mundo (Schöls *et al.*, 2004; Sequeiros *et al.*, 2012). A frequência relativa varia entre países e a **Tabela 2** mostra que o Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) é um dos locais com maior frequência relativa do mundo, representando 78% de todas as ataxias espinocerebelar locais (de Castilhos *et al.* 2014). Estima-se que a prevalência da doença no Estado do Rio Grande do Sul seja de 7/100.000 (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2020).

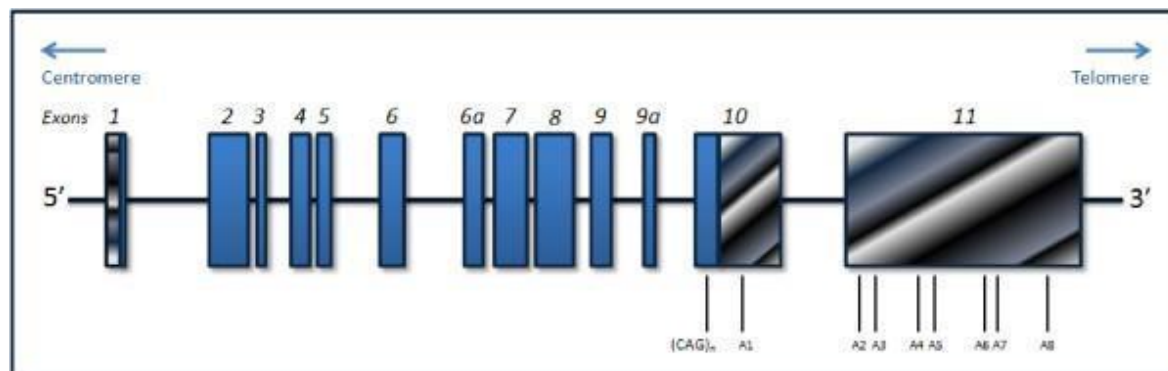
**Tabela 2. Frequência da SCA3 dentre todos os tipos de SCAs em diferentes países**

<b>País</b>	<b>Frequência SCA3</b>	<b>Referência</b>
Rio Grande do Sul (Brasil)	78%	Castilhos et al., 2014
Portugal	58%	Vale et al., 2010
Singapura	53%	Zhao et al., 2002
China	49%	Jiang et al., 2005
Holanda	44%	Van de Warrenburg et al., 2002
Alemanha	42%	Schols et al., 1997
Canadá	24%	Kraft et al., 2005
Estados Unidos	21%	Moseley et al., 1998
México	12%	Alonso et al., 2007
Austrália	12%	Storey et al., 2000
África do Sul	4%	Bryer et al., 2003
Índia	3%	Faruq et al., 2009
Itália	1%	Brusco et al., 2004

### 1.2.3 Aspectos Moleculares

O gene apresenta 48.070 pares de bases (pb) e está dividido em 13 éxons, conforme mostra a **Figura 2**.

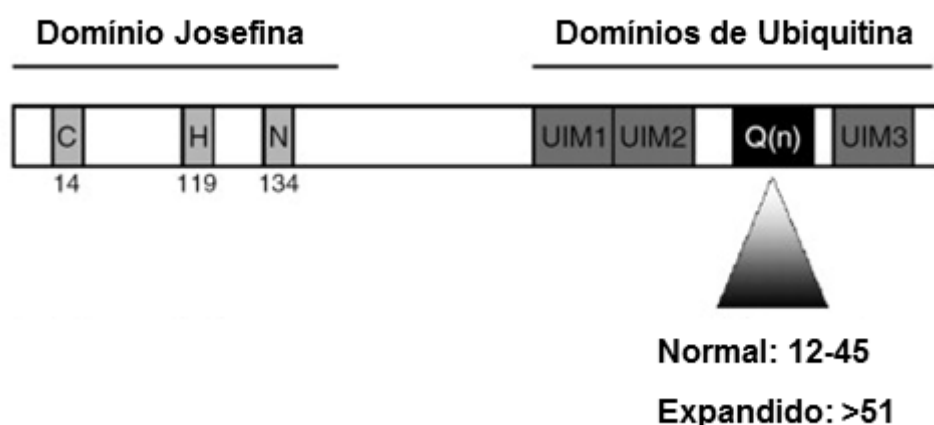
**Figura 2. Esquema representando o gene ATXN3, seus éxons e a localização das repetições CAG**



O gene *ATXN3* codifica para a proteína ataxina-3, uma proteína de 42-kDa que contém um domínio Josefina, dois motivos de interação com ubiquitina e uma sequência de poliglutaminas (Berke *et al.*, 2005) (**Figura 3**). Ataxina-3 é amplamente expressa no Sistema Nervoso Central (SNC) e em outras partes do corpo (Paulson, 2007).

Dependendo da isoforma, a proteína ataxina-3 pode ter dois ou três domínios de interação com ubiquitina (UIMs), além de um domínio N-terminal denominado de Josefina (Burnett *et al.*, 2003; Todi *et al.*, 2010; Kuiper *et al.*, 2017). O domínio Josefina compreende o sítio catalítico da ataxina-3, centrado em um aminoácido cisteína na posição 14 da proteína e em dois sítios de ligação à ubiquitina. A configuração desse domínio é típica de um grupo de enzimas da classe cisteína protease conhecidas como deubiquitilases (DUBs), que funcionam como enzimas editoras de cadeias de poli-ubiquitina (Burnett *et al.*, 2003). As DUBs removem ubiquitinas de proteínas alvo, regulando assim suas taxas de degradação via proteassomo.

**Figura 3. Representação esquemática da proteína ATXN3 contendo um domínio catalítico Josefina e dois a três motivos de interação com ubiquitina**



Adaptado de Paulson, 2006

Os mecanismos celulares da doença são complexos. Em resumo, a poliQ parece induzir alterações conformacionais na ataxina-3 que afetam muitas de suas propriedades, incluindo sua estabilidade e degradação (Boeddrich *et al.*, 2006), sua

localização subcelular (Schmidt *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2002), suas interações com outras proteínas (Li *et al.*, 2002; Evert *et al.*, 2006a; Evert *et al.*, 2006b; Araújo *et al.*, 2011) e sua propensão a formar oligômeros tóxicos e agregados insolúveis no núcleo, no citosol e nos axônios dos neurônios (Chai *et al.*, 2002; Costa & Paulson, 2012).

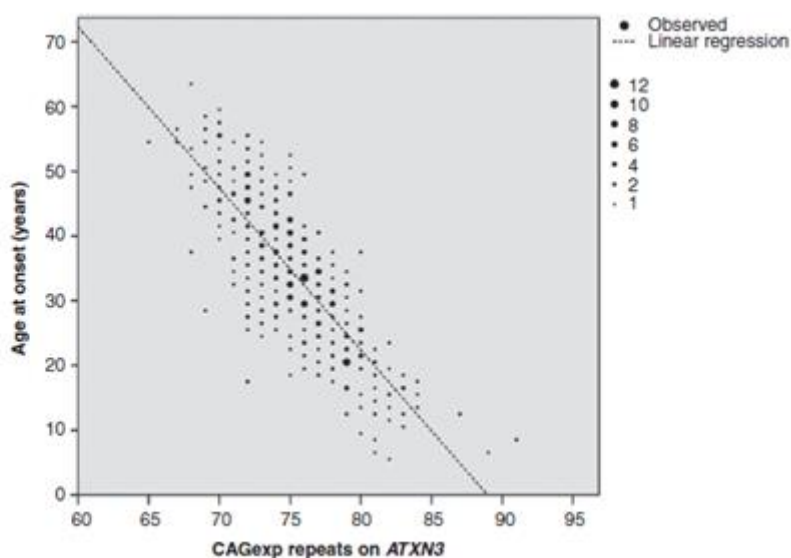
#### **1.2.4 Aspectos Clínicos**

A ataxia de marcha é o primeiro sintoma mais comumente reportado, seguido de diplopia, disartria e marcha espástica (Jardim *et al.*, 2001a). Há uma heterogeneidade no modo como o seu início é conceituado: alguns autores consideram o momento em que o primeiro sintoma é observado (Jardim *et al.*, 2001a; França *et al.*, 2009; Jardim *et al.*, 2010), enquanto outros definem como o momento em que a ataxia de marcha aparece (Jacobi *et al.*, 2011; Reetz *et al.*, 2013). Em todo o caso, a idade de início média varia entre 34-40 anos, com extremos entre 4 e 78 anos (Maciel *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2008).

Observa-se uma importante correlação negativa entre o tamanho da expansão e a idade de início (**Figura 4**). Quanto maior a expansão da repetição CAG, mais cedo a idade de início da doença.



**Figura 4. Idade de início versus o aumento do comprimento da repetição CAG**



Correlação entre idade de início e comprimento de *ATXN3* CAGexp em 427 pacientes SCA3/MJD acompanhados no ambulatório de Neurogenética do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS). A linha pontilhada representa o modelo de regressão linear ( $R^2 = 0,651$ ). Quanto mais cedo a idade de início da doença, maior é a repetição de CAGexp em *ATXN3*. O tamanho dos pontos representa a densidade individual de acordo com a escala apresentada. Adaptado de *Saute & Jardim, 2015*.

Outras manifestações clínicas incluem: a ataxia cerebelar, que afeta a marcha, os movimentos apendiculares e oculares, a articulação da fala e a deglutição; uma síndrome piramidal, com hiperreflexia e espasticidade; uma oftalmoplegia externa progressiva; sinais extrapiramidais; alterações sensoriais devidas à neuropatia periférica; perda de peso e distúrbios do sono, entre outros (*Jardim et al., 2001a*). Dificuldade para urinar, fasciculações da face e da língua e problemas com o sistema nervoso autônomo também são relatados na literatura (*Saute & Jardim, 2015*).

Uma classificação bem historicamente aceita da SCA3/MJD divide os pacientes em quatro sub-fenótipos baseados na idade de início e nos achados neurológicos (*Coutinho & Andrade, 1978; Sequeiros & Coutinho, 1993*). Posteriormente, outros subtipos foram propostos na literatura, com significado ainda não bem estabelecido (*Saute & Jardim, 2015*). Os subtipos mais aceitos são os seguintes:

**Tipo I:** início precoce, geralmente entre 15-20 anos. Caracterizado por manifestações piramidais e distônicas importantes;

**Tipo II:** o mais comum começa frequentemente ao redor dos 30-37 anos, e é praticamente limitado aos sinais cerebelares e oculares habituais;

**Tipo III:** início tardio da doença, entre 37 e 47 anos, e progride com perdas sensoriais, amiotrofias e fasciculações (Coutinho & Andrade, 1978);

**Tipo IV:** início em idade variável e sintomas parkinsonianos e neuropatia.

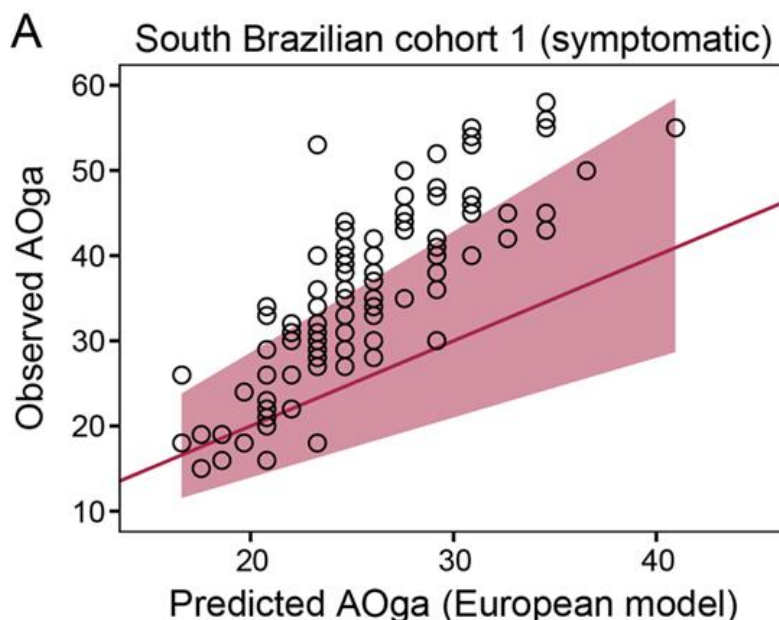
A variabilidade de sintomas na SCA3/MJD é objeto de muitos estudos que visam ao estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo entre determinadas variações genéticas e manifestações clínicas específicas (Mattos *et al.*, 2018a). Por exemplo, Siebert e colaboradores (2012) identificaram uma maior frequência de mutações em heterozigose no gene GBA, responsável pela doença de Gaucher, em pacientes com SCA3/MJD com sintomas parkinsonianos (tipo IV), em relação a pacientes com os tipos I, II e III (Siebert *et al.*, 2012).

A doença progride inexoravelmente, levando o paciente à dependência funcional e à retirada social. A sobrevida média após o aparecimento do primeiro sintoma é de 21,18 anos (95% IC 19,85-22,51) (Kieling *et al.*, 2007). Não há tratamento conhecido que interrompa ou reverta a neurodegeneração.

### 1.2.5 Fatores moduladores da idade de início

Uma metanálise realizada por Mattos *et al.* (2018b) identificou, que em média, o tamanho da CAG expandida (CAGexp) explica 55,2% (IC 95%: 50,8-59,0;  $p < 0,001$ ) da variabilidade da idade de início (AO, de *age at onset*). Por conta dessa correlação, a previsão da idade de início da ataxia de marcha (ou AOga, de *age at onset of gait ataxia*) já foi estimada, usando como base populacional os portadores sintomáticos e assintomáticos do consórcio europeu EUROSCA (Tezenas du Montcel *et al.*, 2014). Surpreendentemente, as previsões feitas com os dados europeus cometem subestimativas importantes na previsão da AOga dos portadores de SCA3/MJD na coorte do Rio Grande do Sul, objeto do nosso estudo (**Figura 5**).

**Figura 5. Predição da idade de início da ataxia de marcha (AOga) em pacientes sintomáticos do sul do Brasil utilizando o modelo preditivo proposto por Tezenas du Montcel *et al.* (2014).**

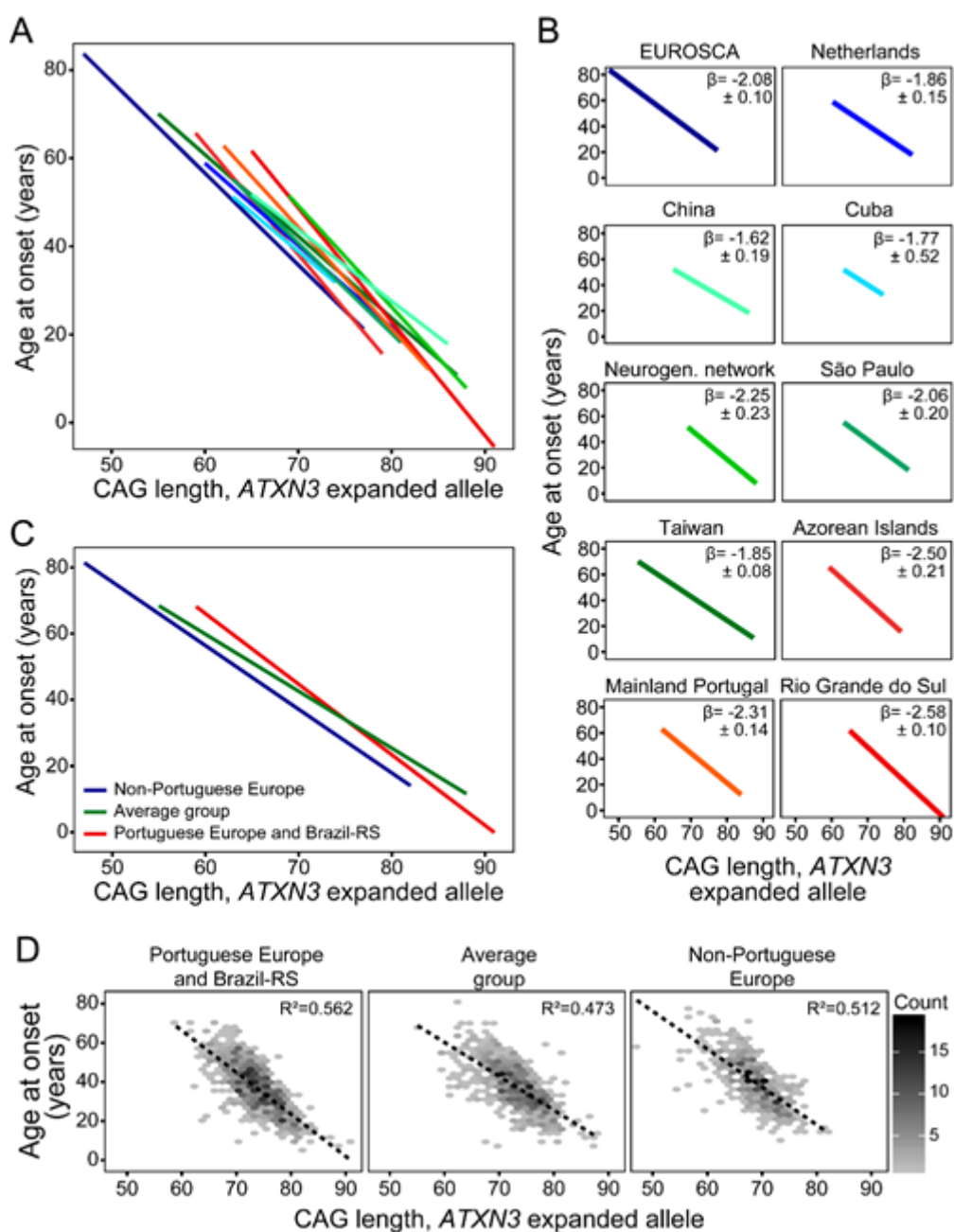


Mattos *et al.*, 2018a

Por isso, os mesmos autores desenvolveram equações para estimar tanto a AOga (Mattos *et al.* 2018a) como a idade de início do primeiro sintoma (ou AOfs, de *first symptom*), especificamente validadas para a população SCA3/MJD do Rio Grande do Sul (Mattos *et al.*, 2018a; Mergener *et al.*, 2019).

Se 55% da variabilidade na AOga ou AOfs é devida às variações do tamanho do CAGexp, os restantes 45% devem ser causados por outros moduladores, ainda apenas suspeitados. A metanálise já citada identificou, por exemplo, que a origem geográfica, está associada a 8,3% da variação da AO em SCA3/MJD - sejam esses fatores ambientais ou genéticos. Em todo o caso, ficou evidente a existência de um ou mais fatores protetores entre as populações SCA3/MJD de origem portuguesa e, em especial, na população gaúcha (**Figura 6**), pois nessas, a AO para cada tamanho de CAGexp é significativamente maior do que a AO de outras populações.

**Figura 6. Variabilidade do comprimento do CAG no alelo *ATXN3* expandido e idade de início na SCA3/MJD**



Os dados sobre o comprimento do CAG no alelo *ATXN3* expandido (A) e a idade de início (B) são mostrados para os dez coortes originais de participantes individuais selecionados para a meta-análise (Mattos *et al.*, 2018a).

Por conta da quase ausência de replicações de estudos de candidatos a modificadores na literatura, poucos candidatos a modificadores puderam ser

submetidos à metanálise já citada. Mesmo assim, um gene foi decididamente implicado na modulação da AO. Alelos grandes ainda na faixa normal (chamados de intermediários na literatura) do *ATXN2* (27-33 repetições CAG) - gene que quando mutado causa a Ataxia Espinocerebelar do tipo 2 (SCA2) - correlacionaram-se com a AO mais precoce.

A busca por fatores modificadores da idade de início têm dominado parte da investigação sobre a SCA3/MJD - ainda que, como já dissemos pouquíssimos candidatos tenham sido objeto de mais de uma publicação. Um estudo demonstrou a associação com o estado de metilação de uma ilha CpG do promotor do *ATXN3*, observação feita pelo presente grupo de pesquisa (Emmel *et al.*, 2011). Quanto mais metilada a ilha CpG, mais tardio foi o início da doença. Podem também ser citados os polimorfismos nos genes *APOE* (Bettencourt *et al.*, 2011), *GRIK2*, *IL1B*, *NEDD8* e *NEDD9* (Emmel *et al.*, 2010) e os níveis da *heatshockprotein* (proteína de choque térmico, HSP) *DNAJB1* em fibroblastos de pacientes (Zijlstra *et al.*, 2010). Outro candidato a modificador, a chaperona molecular *DNAJB6* (Kakkar *et al.*, 2016), não teve efeito significativo em estudos funcionais realizados em fibroblastos de sujeitos *outliers* para a idade de início (Mattos *et al.*, 2018b). Recentemente, Mergener e colaboradores (2019) observaram uma variação polimórfica (rs3512) no gene do sistema de reparo de DNA (*FAN1*) agindo como um modificador adicional da idade de início dos pacientes portadores de SCA3/MJD.

Além disso, estudos levantaram evidências significativas de interação entre a ataxina-3 e a rota de degradação que, por ser objeto da presente pesquisa, será descrita em detalhe a seguir.

### **1.3. Vias de Clivagem: Calpaínas, calpastatina e a hipótese do fragmento tóxico**

A clivagem proteolítica foi proposta como um evento chave na patogênese molecular de várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (De Strooper, 2010), a doença de Parkinson (Xilouri *et al.*, 2013) e as poliglutaminopatias (o grupo de condições causadas por depósito de poliQ) (Weber

*et al.*, 2014). Este processamento pós-traducional constitui a fonte de fragmentos derivados de proteínas. Quando as proteínas são mutantes, seus fragmentos ou derivados podem exibir características citotóxicas, associadas ou não à propensão para agregação, levando à morte celular e a neurodegeneração. A descoberta deste mecanismo levou à formulação da chamada "hipótese do fragmento tóxico" (Wellington & Hayden, 1997).

A presença de produtos de degradação proteolítica com potencial papel patogênico tem sido relatada para todas as doenças poliQ, e foi intensamente investigado na SCA3/MJD. Evidências sugerem que, nas poliglutaminopatias, a clivagem citoplasmática da proteína mutada leva à translocação dos fragmentos contendo o trato poliQ para o núcleo (Schöls *et al.*, 2004; Antony *et al.*, 2009). Outros estudos revelaram uma toxicidade aumentada e uma maior propensão de agregação das proteínas poliQ truncadas, bem como de seus fragmentos (Ross *et al.*, 1999; Ross & Poirier, 2004). Desde então, as enzimas responsáveis pela fragmentação das proteínas envolvidas tornaram-se um dos focos da investigação, uma vez que representam um potencial alvo para tratamentos farmacológicos dessas doenças incuráveis (Tarlac & Storey, 2003).

A ataxina-3 é substrato para duas principais famílias de proteases: caspases e calpaínas (Wellington *et al.*, 1998; Berke *et al.*, 2004; Haacke *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2011; Hübener *et al.*, 2013). Caspases são cisteíno proteases que normalmente clivam após um resíduo de aspartato C-terminal e são conhecidas por estarem envolvidas nas vias apoptóticas e inflamatórias, desempenhando um papel crucial na proliferação, diferenciação e migração celular (Li & Yuan, 2008; McIlwain *et al.*, 2013). As calpaínas, uma classe de cisteíno proteases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , apresentam uma complexidade maior para o reconhecimento do sítio de clivagem e são especializadas na modulação da estrutura, localização e atividade dos seus substratos (Sorimachi *et al.*, 2011; Smith & Schnellmann, 2012). Embora ambos os grupos de enzimas sejam supostamente ativos no processamento da ataxina-3, as pesquisas mais recentes têm se concentrado nas calpaínas, uma vez que sua sensibilidade intrínseca ao  $\text{Ca}^{2+}$  liga diretamente essas proteases com a desregulação da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$

observada na SCA3/MJD e em outras doenças neurodegenerativas (Chen *et al.*, 2008; Bezprozvanny, 2009; Koch *et al.*, 2011)

A clivagem da ataxina-3 pelas proteases calpaína-1 e calpaína-2 foi demonstrada em modelos animais de SCA3/MJD, linhagens celulares e tecido cerebral post-mortem de pacientes SCA3/MJD (Hübener *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2017). Os estudos indicam que a degradação da ataxina-3 com CAGexp pelas calpaínas aparenta ser mais eficiente do que o da ataxina-3 sem a expansão, e que este aumento da atividade proteolítica resulta em um fenótipo neurológico progressivo mais grave e acelerado (Hübener *et al.*, 2013). Dessa forma, se sugere que o sistema das calpaínas represente uma importante etapa na patogênese da SCA3/MJD.

Nos neurônios especificamente, a calpaína-1 (gene *CAPN1*; 11q13.1) e calpaína-2 (gene *CAPN2*; 1q41) são os representantes da família das calpaínas mais bem caracterizados, juntamente com o seu inibidor calpastatina (gene *CAST*; 5q15) (Goll *et al.*, 2003). Um controle fino sobre a ativação das calpaínas é necessário, visto que esse é um processo irreversível. A calpastatina se liga de forma reversível ao sítio de ação das calpaínas, inibindo-as (Hanna *et al.*, 2008). Goll e colaboradores (2003) propuseram que a calpastatina age como um regulador contra a clivagem proteica indesejada quando da ativação de calpaínas.

Camundongos nocautes e heterozigotos para calpastatina apresentam um aumento na contagem de inclusões nucleares, demonstrando que um alelo ausente basta para o aumento da agregação de ataxina-3 clivada (Hübener *et al.*, 2013). A inibição de calpaínas através da superexpressão de calpastatina, em modelo animal de SCA3/MJD, não apenas reduziu a proteólise de ataxina-3, mas também diminuiu sua agregação e mediou uma neuroproteção (Simões *et al.*, 2012). A administração oral do inibidor de calpaína BDA-410 exerceu efeitos benéficos semelhantes sobre a fragmentação, a agregação e a neurodegeneração em camundongos (Simões *et al.*, 2014).

As evidências científicas relatadas sugerem que uma regulação alterada da fragmentação da ataxina-3 pelas calpaínas pode desempenhar um papel crucial na patogênese de SCA3/MJD, levantando o questionamento se teriam uma influência na determinação da idade de início da doença.

### 1.3.1 Variantes polimórficas dos genes CAPN1, CAPN2 e CAST

Até o presente momento e até onde sabemos, nenhum estudo investigando a associação de polimorfismos dos genes CAPN1, CAPN2 e CAST com doenças poliQ foi publicado. Dois estudos GWAS reportaram associação dos polimorfismos intrônicos rs27852 e rs1559085 no gene CAST com a doença de Parkinson (Fung *et al.*, 2006; Allen & Satten, 2010); esses achados não foram replicados em uma população chinesa (Zhang *et al.*, 2013). Nenhum GWAS apontou potenciais associações entre variantes dos genes CAPN1 e CAPN2 e doenças neurodegenerativas.

Os genes CAPN2 e CAST - mas não o CAPN1 - apresentam alguns polimorfismos com baixa frequência e potencial patogênico, pela análise *in silico* (ver o Artigo, na seção Métodos e Resultados dessa Dissertação).

## 2. JUSTIFICATIVA

A variabilidade na idade de início, os achados neurológicos complexos e heterogêneos, bem como a existência de diferentes tipos clínicos, indicam que a SCA3/MJD é modulada por fatores modificadores ainda não entendidos completamente. O primeiro e melhor fator modificador estudado foi o próprio comprimento de repetição do CAGexp. A idade de início demonstrou estar negativamente correlacionada com o número de repetições de CAGexp (Kawaguchi *et al.*, 1994; Maruyama *et al.*, 1995; Maciel *et al.*, 1995; Jardim *et al.*, 2001b). Porém, o número de repetição do CAGexp explica apenas parte do fenótipo SCA3/MJD, sugerindo que outros fatores genéticos também estejam envolvidos.

Há evidências bastante robustas sobre o papel dos fragmentos peptídicos anômalos na neurodegeneração da SCA3/MJD em modelos celulares e animais, e de que a modulação da clivagem da ataxina-3 pode mudar a taxa de progressão da citotoxicidade. Nossa hipótese é a de que fatores genéticos que modifiquem a



funcionalidade da calpaína 2 e de sua inibidora, a calpastatina, possam repercutir na modulação do fenótipo da SCA3/MJD.

Como o estado do Rio Grande do Sul apresenta um número elevado de casos de SCA3/MJD, o número de amostras de sujeitos SCA3/MJD com dados clínicos confiáveis à disposição no laboratório de Neurogenética Translacional (NEUROGET, CPE HCPA) permite realizar estudos de associação entre esses polimorfismos e variações fenotípicas na SCA3/MJD. Pretendemos averiguar a potencial associação entre os polimorfismos selecionados e a modulação da SCA3/MJD ao testarmos possíveis correlações entre os SNPs e (a) a idade de início e (b) a velocidade de progressão da doença.

Estudos identificando polimorfismos capazes de modificar a expressão de genes candidatos e/ou afetar sua proteína são de extrema relevância para compreensão dos mecanismos patológicos moleculares não apenas da SCA3/MJD, mas das doenças poliQ como um todo. Como visto, uma hiperexpressão de calpaínas e/ou hipoexpressão de calpastatina podem aumentar a taxa de fragmentação da ataxina-3, potencialmente acelerando o início da doença. A hipótese de que variantes genéticas dos genes capn1, CAPN2 e CAST possam estar influenciando no curso da SCA3/MJD ainda não foi investigada em humanos.

Desvendar os mecanismos genéticos desses possíveis modificadores pode auxiliar em uma predição mais apurada do início da doença e também indicar possíveis alvos terapêuticos, para essa doença ainda sem tratamento.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo investigar se variantes nos genes CAPN2 e CAST associam-se a variações no fenótipo da SCA3/MJD.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Identificar se alelos e genótipos de variantes polimórficas nos genes CAPN2 e CAST estão associados a idades de início diferenciais e assim, possam ser indicadores de modulação do início dos sintomas;
- Identificar se alelos e genótipos das mesmas variantes polimórficas nos genes CAPN2 e CAST estão associados a velocidades de progressão das manifestações neurológicas diferenciais e assim possam ser indicadores de modulação da progressão da doença.

ARTIGO PUBLICADO

*Journal of Molecular Neuroscience* (2021) 71:1906–1913



# Variants in Genes of Calpain System as Modifiers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 Phenotype

Ana Carolina Martins<sup>1,2</sup> · Mariana Rieck<sup>2</sup> · Vanessa Bielefeldt Leotti<sup>3,4</sup> · Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,2,5,6</sup> · Laura Bannach Jardim<sup>1,2,5,7</sup>

Received: 4 May 2021 / Accepted: 21 June 2021 / Published online: 30 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

## Abstract

Calpain-mediated proteolysis has been proposed to modulate the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3, also known as Machado-Joseph disease (SCA3/MJD), a disorder due to a CAG repeat expansion (CAGexp) at *ATXN3*. We aimed to investigate if single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at calpain gene *CAPN2* and at calpastatin gene *CAST* modulate the age at onset (AO) and disease progression in SCA3/MJD. A total of 287 SCA3/MJD symptomatic subjects (151 families) were included. AO was analyzed and controlled by the CAG repeat length of expanded allele and family. Candidate polymorphisms were chosen based on the literature and on a priori criteria. The CAG repeat length and SNPs were genotyped according to standard methods. AO of carriers of AA and AG + GG<sup>rs1559085</sup> genotypes in *CAST* and with the median value of 75 repeats at the expanded allele were 34.23 (33.07–35.38) and 36.42 years (34.50–38.34), respectively ( $p=0.049$ , mixed model treating the expanded CAG repeat size as fixed effect and family as random effect). Carriers of haplotype C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup> had mean AO of 37.23 (12.76) and 33.42 years (12.20) ( $p=0.047$ , Student's *t* test). Our data suggest an association between allele G<sup>rs1559085</sup> and haplotype C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup> at *CAST* and variations in the AO of SCA3/MJD subjects, independent from the effects of the CAGexp and family. The present results support the potential role of calpain cleavage pathway over modulation of SCA3/MJD phenotype.

**Keywords** Age at onset · Calpain system · *CAPN2* · *CAST* · Machado–Joseph disease · Spinocerebellar ataxia type 3

✉ Laura Bannach Jardim  
ljardim@hcpa.edu.br

- 1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- 2 Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
- 3 Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- 4 Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- 5 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre 90035-003, Brazil
- 6 Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- 7 Departamento de Medicina Interna, FAMED, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

## Introduction

Machado–Joseph disease, also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3/MJD), is caused by a dominant expansion of a CAG repeat tract (CAGexp) at exon 10 of *ATXN3* gene, located at chromosome 14q32.1. Normal alleles have up to 44 CAG repeats while SCA3/MJD patients carry an allele with more than 51 repeats. The mutant gene translates into an ataxin-3 protein with an abnormally long polyglutamine (polyQ) sequence. PolyQ-expanded ataxin-3 is related to neuronal toxicity and degeneration (Matilla-Dueñas et al. 2014; McLoughlin et al. 2020).

SCA3/MJD is the most prevalent form of hereditary ataxia worldwide (Sequeiros et al. 2012). There is a relatively large SCA3/MJD population in our region, where prevalence of symptomatic carriers reaches up to 7:100,000 inhabitants (Rodríguez-Labrada et al. 2020). Local SCA3/MJD subjects are known as the Rio Grande do Sul cohort (Souza et al. 2016).

There is a well-established negative correlation between the CAGexp length and the age at onset (AO) of symptoms that explains around 55.2% of the variation in AO, in this disease (de Mattos et al. 2018). The remaining variability in AO has motivated many studies in search of other genetic and/or environmental factors that would modulate the onset of symptoms.

Ataxin-3 fragments are among the peptides extracted from intranuclear inclusions from patient brain samples (Goti et al. 2004), and the expression of polyQ-expanded ataxin-3 fragments in cellular models resulted in increased aggregation and toxicity as compared to the full-length protein (Ikeda et al. 1996; Paulson et al. 1997; Warrick et al. 1998). Due to that, proteolytic cleavage has been proposed as a key event in the molecular pathogenesis of SCA3/MJD. Two main families of proteases are related to ataxin-3 cleavage: caspases and calpains. Calpain-mediated proteolysis promotes ataxin-3 translocation to the nucleus, aggregation, cell injury, and neurodegeneration. Calpain-1 (*CAPN1*; 11q13.1) and calpain-2 (*CAPN2*; 1q41) are the most characterized calpains in neurons. Increasing the calpain proteolysis was related to a more severe and accelerated progressive neurological phenotype (Hübener et al. 2013). Over-expression of calpastatin (gene *CAST*; 5q15), an endogenous calpain inhibitor, reduced the fragmentation, aggregation, and nuclear toxicity of mutant ataxin-3 (Simões et al. 2012).

Given these evidences, our aim was to analyze whether polymorphic variants in calpain-2 (*CAPN2*) and calpastatin (*CAST*) genes could be associated with modulation of the SCA3/MJD phenotype.

## Methods

### Population

Symptomatic SCA3/MJD subjects followed up in our institution since 1998 were included in this study, provided that they lived in our state and belonged to the Rio Grande do Sul cohort (RS cohort). AO was defined as the age when the first symptom—usually gait ataxia—was noticed by the patient or his/her relatives (Souza et al. 2016). Neurological manifestations were longitudinally evaluated in a subgroup of subjects by the Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia (NESSCA): results were published elsewhere (Jardim et al. 2010). NESSCA covers most of the neurological manifestations present in SCAs, such as ataxia, eye movement disorders, pyramidal and extrapyramidal findings, sensory losses, and symptoms such as dysphagia and sphincter dysfunction. Disease duration (DD) was calculated as the difference between the patient's age at examination at each NESSCA score obtained and the AO of the first symptom. Subjects—or their relatives, when individuals were

already deceased—were contacted and gave their informed consent to participate in this study. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) by the number CAAE 81431517.1.0000.5327, GPPG 2018–0294.

### Genotyping Analysis of CAG tract at ATXN3

DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using standard methods. The CAG repeat length analysis was performed by the polymerase chain reaction (PCR) using fluorescent-labeled primers flanking the CAG repeat tract at *ATXN3*, followed by capillary electrophoresis into the genetic analyzer ABI3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Results were analyzed through GeneMapper® ID v 3.2 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Analysis of Polymorphisms at CAPN2 and CAST Genes

Two different approaches were used to choose candidate polymorphisms: (1) filtering variants through the genome browser Ensembl and (2) literature search for SNPs already associated with neurodegenerative diseases. In order to be included in the first approach, a SNP should (i) be present in transcripts most expressed in the cerebellum, according to information obtained from the Genotype-Tissue Expression portal (GTEx); (ii) represent missense variants; (iii) be predicted to be harmful by at least one effect protein prediction algorithm (SIFT or Polyphen); (iv) present the minor allele frequency (MAF) between 0.1 and 0.5 (Supplemental Material 1). Literature search found two candidate SNPs at *CAST* gene: variants at positions rs27852 (A > C/A > G/A > T) (Chr 5 [NC\_000005.10]: 96,710,335 bp) and rs1559085 (A > G) (Chr 5 [NC\_000005.10]: 96,742,998 bp), located 32.7 Kb away from each other in chromosome 5 (GRch38.p12). Although intronic, they were included in our analysis. In silico filtering selected only one variant, present in *CAPN2*: rs17599 (A > C), located on chromosome 1:223,766,378. Of note, both literature and in silico searches did not detect any candidate in *CAPN1*; this gene was then not included in the present study.

SNP genotyping was performed using specific TaqMan™ SNP Genotyping Assays for each SNP as follows: C\_\_\_8855461\_1\_ for rs17599 (A > C), C\_\_\_794701\_20 for rs27852 (A > C), and C\_\_\_7446997\_10 for rs1559085 (A > G). Reaction was carried out in a final volume of 7 µL containing 2 ng of DNA. Amplification was performed in the ABI System® equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as follows: one cycle of 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 92 °C for 15 s, and 60 °C for 1 m 30 s.

## Analyses

The SNPs frequencies were estimated using one individual drawn by family.

SNP alleles and genotypes were considered the candidate markers under study. The main outcome under study was AO. The CAG repeat length of expanded alleles and family was controlled as other determinants of variations in AO. The distribution of AO between carriers of different alleles/genotypes at *CAPN2* and *CAST* was obtained and described. Firstly, comparisons between the three possible genotypes for each SNP were done, trying to detect allele dosage or recessive effects, while comparisons between two groups of genotypes would detect dominant effects of a given allele, i.e., AA versus AG + GG would detect dominant effects of G.

Later, we compared the proportion of *CAPN2* and *CAST* genotypes in unrelated individuals (those index-cases sorted by family) who were highly discordant for AO after correction for the expanded CAG repeat length, as previously described (Pulst et al. 2005). Two groups were built for comparison: the premature and the delayed onset groups consisted of subjects who were at one standard deviation from the predicted AO. The proportion of *CAPN2* and *CAST* genotypes obtained was then compared by Fisher's exact test.

Loci rs27852 and rs1559085 at *CAST* are totally linked ( $D' = 0.999923$ , linkage disequilibrium calculator) and *CAST* haplotypes rs27852/rs1559085 were built, using PHASE v2.1.1 program (Stephens et al. 2001; Stephens and Scheet 2005).

Since all quantitative variables under study showed normal distributions, ANCOVA (or ANOVA with Bonferroni adjustments for multiple comparisons) and Pearson's correlation tests were used. Comparisons between AO of groups according to genotypes were controlled for CAGexp and family effects, using mixed models, treating CAGexp as fixed effect and family as random effect.

If a candidate showed promising results in the AO analysis, the effect of this candidate on NESSCA progression would also be tested, using linear growth curve models, i.e., mixed models with random intercepts and slopes, adjusted to model the relationship between NESSCA and DD for each patient. An unstructured covariance matrix was used for the random intercepts and slopes. Potential modifiers of NESSCA progression were included as fixed effects in the model as the main effect and an interaction between modifier and DD. The potential modifiers of interest were CAGexp length and the variant of interest. Models were fitted in R software (version 3.6.2) using the "lme4" package. p-values were obtained through t tests with Kenward-Roger's approximation using the "lmerTest" package.

All other statistical analyses were made using Predictive Analytics Software—PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).  $P < 0.05$  was chosen for attribute significance to results.

## Results

Two hundred eighty-seven SCA3/MJD patients from 151 families were included. Table 1 describes subjects under study, and Fig. 1 compares the minor allele frequencies obtained in the present index cases (one individual sorted per family) with frequencies found in normal populations from Europe, Africa and Latin America. The distribution of allele frequencies is displayed in Supplemental Material 2.

The expanded CAG repeat length had mean (SD) and median (IQR) values of 75.7 (3.7) and 75 (4) respectively, varying from 65 to 91 repeats and correlated with AO ( $r = -0.767$ ,  $p < 0.0001$ , Pearson). Each additional CAG repeat was associated with a reduction of  $-2.06$  years in AO.

### CAPN2 and CAST Variants Versus AO in the Overall Group

Mean (SD) AO obtained in each genotypic group is presented in Table 2. One allele or genotype presented interesting results: allele G or genotype GG at *CAST* rs1559085 ( $G^{rs1559085}$  or  $GG^{rs1559085}$  from now on). After adjusting for CAGexp and family effects, a trend ( $p = 0.081$ ) to relate  $GG^{rs1559085}$  to later AO was obtained with this recessive model.

Dominant effects were then tested, according to the direction of effect seen in Table 2. The comparison of carriers of genotype  $AA^{rs1559085}$  with carriers of genotypes  $AG^{rs1559085} + GG^{rs1559085}$  searched for a dominant effect of allele G  $s^{1559085}$ . After adjustments, the AO of carriers of  $AA^{rs1559085}$  and of carriers of  $AG + GG^{rs1559085}$  genotypes were 34.23 (33.07–35.38) and 36.42 years (34.50–38.34), respectively ( $p < 0.049$ , mixed model treating CAGexp as fixed effect and family as random effect) (Table 2).

As said before, the r and R-squared between the AO and the CAGexp alone were 0.767 and 0.589, respectively. In comparison, the adjusted R-squared including the presence of at least one  $G^{rs1559085}$  was 0.594, i.e., presence of one  $G^{rs1559085}$  added 0.5% to the explained variance of AO.

The other *CAST* SNP under study (rs27852) did not show any significant association in this analysis. Additive effects between rs1559085 and rs27852 genotypes were also not detected (data not shown).

### CAPN2 and CAST Genotypes in Individuals Who Were Highly Discordant for AO

The distribution of *CAPN2* and *CAST* genotypes between the unrelated subjects with highly discordant adjusted AO were then compared. Unrelated subjects who were at one standard deviation (7.77 years) or more than the mean AO comprised the premature and the delayed onset groups.

**Table 1** General characteristics of the individuals included in the overall group and in the subset studied for NESSCA progression

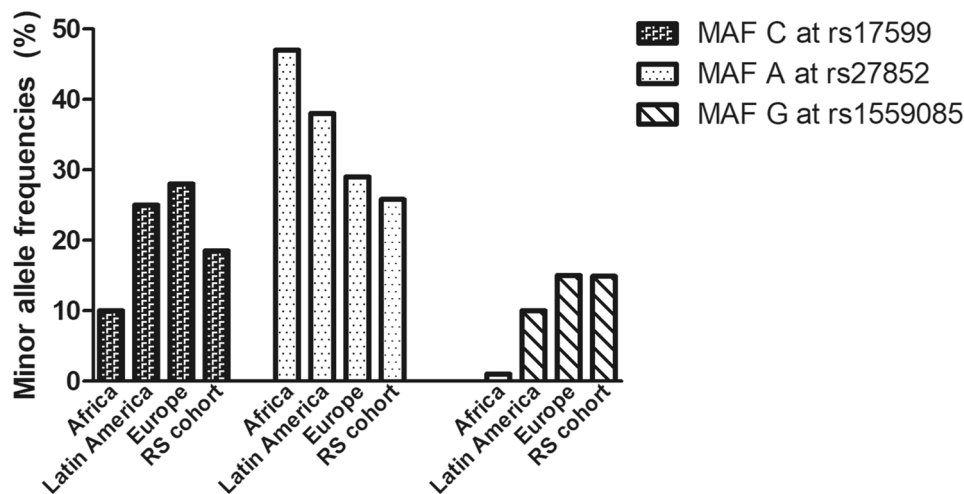
	Overall group: study on AO	Study on NESSCA pro- gression	p
Total (females)	287 (143)	74 (32)	0.19*
Number of subjects per family Mean (range)	1.87 (1–9)	1.3 (1–3)	0.32*
AO, in years Mean (SD)	34.54 (12.33)	33.38 (10.39)	0.47**
CAG length of the expanded allele Mean (SD)	75.70 (3.52)	75.12 (3.63)	0.11***
CAG length of the normal allele Mean (SD)	22.18 (5.27)	22.54 (5.02)	0.25***
Disease duration since first symptom, at the first visit Mean (SD)	–	6 (3)	–
NESSCA at the first visit Mean (SD)	–	15 (6)	–
Number of NESSCA observations per subjects Mean (SD)	–	2.46 (0.86)	–
NESSCA variation per year Mean (SD)	–	1.24 (0.12)	–

p-value tested by: \*chi-square test, \*\*Student's t-test, \*\*\*Mann–Whitney U test

No significance was found in *CAPN2* SNP (data not shown). Genotypes at rs27852 showed distributions significantly different, suggesting later AO for homozygous individuals for the major allele C<sup>rs27852</sup>. This grouping failed to get homozygotes for the minor allele G<sup>rs1559085</sup> and to detect differences related to the rs1559085 (Table 3).

### Haplotype Analysis of the Overall Group

Different directions of associations were obtained in the former analyses—alleles related to protection or reduced risk were C, the common allele in rs27852, and G, the rare allele in rs1559085. Due to that, haplotype analysis



**Fig. 1** Minor allele frequencies of rs17599, rs27852 and rs1559085 variants in different populations and in the present unrelated SCA3/MJD index-cases from Rio Grande do Sul (Brazil). Minor allele frequencies (%) per population according to 1000Genome Project and gnomAD browser. African controls includes samples from African Caribbean in Barbados, African Ancestry in Southwest USA, Esan in Nigeria, Gambia, Kenya and Sierra Leone (allele count n=1,322).

Latinoamerica subpopulation includes controls from Medellin (Colombia), Mexican Ancestry in Los Angeles - California (EUA), Lima (Peru) and Puerto Rico (allele count n=694). Europeans are represented by Utah residents with Northern and Western European ancestry, Finland, British in England and Scotland, Iberian populations in Spain and Toscani in Italy (allele count n=1,006)

**Table 2** Ages at onset (AO) according to genotypes at *CAPN2* and *CAST*

<b>rs17599 (<i>CAPN2</i>)</b>				
	<b>AA</b>	<b>AC</b>	<b>CC</b>	<b>p</b>
N	181	89	17	–
AO mean (SD), in years	34.30 (12.32)	34.31 (12.47)	33.94 (13.72)	–
AO mean (95% CI), after adjusting for the 75 CAGexp and for family effects	34.61 (33.38–35.85)	35.32 (33.60–37.04)	33.69 (29.85–37.53)	0.674
<b>rs27852 (<i>CAST</i>)</b>				
	<b>AA</b>	<b>AC</b>	<b>CC</b>	<b>p</b>
N	21	104	162	–
AO mean (SD), in years	32.33 (10.92)	34.63 (11.79)	34.31 (13.00)	–
AO mean (95% CI), after adjusting for the 75 CAGexp and for family effects	33.77 (30.34–37.20)	34.49 (32.76–35.96)	35.16 (33.87–36.44)	0.613
<b>rs1559085 (<i>CAST</i>)</b>				
	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>p</b>
N	218	63	6	–
AO mean (SD), in years	33.40 (12.24)	36.48 (12.50)	43.17 (13.21)	–
AO mean (95% CI), after adjusting for the 75 CAGexp and for family effects	34.23 (33.08–35.38)	36.08 (34.08–38.08)	39.76 (33.43–46.09)	0.081
	<b>AA</b>	<b>AG + GG</b>		<b>p</b>
N	218	69		–
AO mean (SD), in years	33.40 (12.24)	37.06 (12.61)		–
AO mean (95% CI), after adjusting for the 75 CAGexp and for family effects	34.23 (33.07–35.382)	36.42 (34.50–38.34)		0.049

p-value tested by ANOVA with Bonferroni adjustments for multiple comparisons

was performed. The obtained haplotypes included A<sup>rs27852</sup>/A<sup>rs1559085</sup>, A<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup>, C<sup>rs27852</sup>/A<sup>rs1559085</sup>, and C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup>, among all possible combinations. As expected, C<sup>rs27852</sup>/A<sup>rs1559085</sup> was the most frequent. Due to the results of the former section, the C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup> haplotype was

hypothesized as being related to a protective effect. After controlling for the CAG expanded repeat and for family effects, carriers and non-carriers of at least one haplotype C<sup>rs27852</sup>/G<sup>rs1559085</sup> had mean AO of 37.23 (12.76) and 33.42 years (12.20) (p = 0.047, Student’s t test).

**Table 3** Proportion of *CAST* genotypes in unrelated individuals who were highly discordant for AO after correction for the expanded CAG repeat length

	rs27852 genotypes at <i>CAST</i>				p*
	AA	AC	CC	Total	
Premature onset, ≤ -7.76 years from the mean AO	2 (10.5%)	9 (47.4%)	8 (42.1%)	19 (100.0%)	0.033
Delayed onset, > 7.77 years from the mean AO	1 (4.2%)	4 (16.7%)	19 (79.2%)	24 (100.0%)	
Total	3 (7%)	13 (30.2%)	27 (64.6%)	43 (100.0%)	
<b>rs1559085 genotypes at <i>CAST</i></b>					
	AA	AG	GG	Total	
Premature onset, ≤ -7.76 years from the mean AO	13 (68.4%)	6 (31.6%)	0 (0%)	19 (100.0%)	1
Delayed onset, > 7.77 years from the mean AO	16 (66.7%)	8 (33.3%)	0 (0%)	24 (100.0%)	
Total	29 (67.4%)	14 (32.6%)	0 (0%)	43 (100.0%)	

\*Fisher’s exact test



## CAST Haplotypes Versus NESSCA Progression Rate

Two hundred and sixteen longitudinal observations of NESSCA score were obtained from 74 out of 287 subjects included in the overall group (Table 1). In these 74 subjects, NESSCA increased 1.24 (SEM = 0.12) points per year of DD. Each additional CAG repeat at the expanded allele was associated with an increase of 0.11 (SEM = 0.03) points in NESSCA changes after 1 year ( $p = 0.0006$ ). Both the progression rate and the CAGexp effect over this progression were very similar to those obtained in the original study [13].

CAST haplotypes were used to test the effect of this gene over disease progression. Sixteen out of 75 subjects with NESSCA scores carried at least one  $C^{rs27852}_G^{rs1559085}$  CAST haplotype, and six carriers and 37 non-carriers of this haplotype had more than one NESSCA observation. NESSCA increased 1.55 (SEM = 0.25) and 1.17 (SEM = 0.11) points per year ( $p = 0.92$ ) among carriers and non-carriers of the  $C^{rs27852}_G^{rs1559085}$ .

The same analysis was performed, grouping subjects according to presence of  $G^{rs1559085}$ , only; no significant differences were found (data not shown).

## Discussion

To our knowledge, this was the first study about genetic variants of CAST in a polyQ disorder. Our results suggested that CAST can be related to variations in the AO of symptomatic SCA3/MJD subjects, independent from the effects of the CAGexp. Although the underlying effect could be related to a gene dosage, the best results were those obtained with a dominant model that related presence of  $G^{rs1559085}$  or of haplotype  $C^{rs27852}_G^{rs1559085}$  with later onset of disease.

Determinants of disease onset in SCA3/MJD include a still unknown number of genetic and/or nongenetic risk factors that together have varying effects on disease phenotype. The length of the expanded CAG repeat is not only the best studied but also the factor with the largest effect size (de Mattos et al. 2018). Research on factors that determine AO in SCA3/MJD goes in the same way of studies addressing common quantitative traits: postulate that several additive, dominance, and epistatic variances are working together with nongenetic components (Abney et al. 2001). The main limiting factor for this kind of question and design is that SCA3/MJD is a rare disease. For the purpose of testing several factors simultaneously, relatively small sample sizes can be a challenge, making the candidate gene approach yet one of the best alternatives. In addition, many scholars reminded us to expect fewer susceptibility alleles in populations with restricted gene pools and, for this reason, recommended founder populations for quantitative-trait mapping (Schork

and Lander 1994; Shifman and Darvasi 2001). The present RS cohort includes people who are probably descended from a few ancestors who arrived in Southern Brazil 250 years ago and have been characterized as a founder SCA3/MJD population, turning this cohort into a promising group to detect modifier genes.

Several studies showed the important role played by cleavage protein pathways using the knocking out and/or overexpression method in SCA3/MJD mutant mouse models (Hübener et al. 2013; Simões et al. 2012; Nobrega et al. 2013). Regarding calpastatin, knockouts and heterozygous mice showed an increase in the count of nuclear inclusions, demonstrating that an absent allele is sufficient to increase cleaved ataxin-3 aggregation (Hübener et al. 2013). The inhibition of calpains through overexpression of calpastatin, in an animal model of SCA3/MJD, not only reduced ataxin-3 proteolysis, but also decreased its aggregation and mediated neuroprotection (Simões et al. 2012). Oral administration of the calpain inhibitor BDA-410 had similar beneficial effects on fragmentation, aggregation, and neurodegeneration (Simões et al. 2014). Similarly, the calpain inhibitor calpeptin decreased levels of ataxin-3 cleavage fragments and prevented the early MJD zebrafish motor phenotype (Watchon et al. 2017). These evidences support calpastatin as an important candidate factor for modulation of SCA3/MJD phenotype. As far as we are aware, analyses of CAST (calpastatin coding gene) were not reported yet in SCA3/MJD patients. We then selected the present CAST SNPs according to positive results described in Parkinson's disease (PD) (Pankratz et al. 2009; Allen and Satten 2010).

The presence of  $G^{rs1559085}$  had a small neuroprotective effect over disease onset in the present cohort. While the CAGexp explained 58.9%, presence of at least one  $G^{rs1559085}$  added another 0.5% to the explanation of the AO of this cohort. When we moved to the ancillary comparison of subjects with highly discordant AO after correction for familial and CAGexp effects, we disclosed a neuroprotective effect of  $C^{rs27852}$ , more frequent among the 23 delayed onset than among the 19 premature onset subjects. The consequent solution was the haplotype approach, which indeed related  $C^{rs27852}/G^{rs1559085}$  to a later onset with effect similar to the effect with  $G^{rs1559085}$ . Given that the neuroprotective effect over AO was small, the lack of association between haplotype  $C^{rs27852}/G^{rs1559085}$  and the progression rate of NESSCA scores might be either real or nondetectable in a small sample size such as ours.

$A^{rs27852}$  and  $G^{rs1559085}$  are the minor alleles in their SNPs, with similar frequencies in European and Latin American populations, according to public databases, as well as in RS cohorts (Fig. 1). They are intronic variants, located quite far away from coding regions and might not be functional. We propose that they should be considered markers only. This perspective is supported by previous results relating

rs1559085 with other neurodegenerative disease, PD. The  $G^{rs1559085}$  at *CAST* was associated with PD in two studies from USA (Pankratz et al. 2009; Allen and Satten 2010), meaning that the allele  $A^{rs1559085}$ , and not  $G^{rs1559085}$ , tagged a “neuroprotective” effect in the North-American setting. Of note,  $G^{rs1559085}$  was virtually absent in the Han population, which might explain the lack of association of rs1559085 with PD in Chinese patients (Zhang et al. 2013). The opposite directions of the apparent effects of  $G^{rs1559085}$  according to the neurodegenerative disease under study—increasing neuroprotection in SCA3/MJD versus decreasing neuroprotection in PD—suggest that  $G^{rs1559085}$  might be only a marker, linked to another functional variation of calpastatin, undetected in the SCA3/MJD and PD populations studied so far.

In the light of the discussion presented here, interpreting both SNPs in *CAST* as probably markers and probably not truly functional, it is clear that not including other types of variants in our in silico filtering was a limitation of our evaluation. We suggest that positions within and around the consensus splice site and other types of variants in *CAST* should be evaluated in the further studies.

Limitations of power have been recurrent in studies of candidate modifiers of AO in SCA3/MJD and resulted from a confluence of two rarities—minor variants in a candidate gene within a necessarily small population of SCA3/MJD subjects (de Mattos et al. 2018; Mergener et al. 2019). These repetitive “double rarity” in SCA3/MJD studies might be overcome by collaborative efforts where larger samples can be achieved, provided that population stratification is controlled. However, not only sample sizes but the study design can also impact power. A recent genome-wide association study evaluated 700 SCA3/MJD symptomatic carriers, which is a large sample size for this disease (Akçimen et al. 2019). No association signal met genome-wide significance ( $p < 5 \times 10^{-8}$ , the genome-wide Bonferroni-corrected significance threshold), leading the authors to report on suggestive associations only. Due to that, we think that studies of candidate genes, especially if carried out in populations with a restricted gene pool carrying the variant of interest, can overcome the limitations of effect size and the multiple statistical tests that seem to prevent the discovery of important proteins for the modulation of AO in SCA3/MJD.

In conclusion, our results are in agreement with the hypothesis that *CAST* variants have a role in the modulation of AO of SCA3/MJD. This association should be tested in other cohorts, since the calpain system is a very promising candidate pathway to future pharmacological modulation of this neurodegenerative disease.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01877-9>.

**Acknowledgements** The authors thank all the subjects who agreed to participate in this study.

**Author Contribution** ACM, MR, and LBJ contributed to the conception and design of the study; ACM, MR, VBL, MLSP, and LBJ contributed to the acquisition and analysis of data; ACM, MR, VBL, MLSP, and LBJ contributed to the drafting of the text and preparing the figures.

**Funding** This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), grant number 18–0294. ACM, MLSP, and LBJ were supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

**Data Availability** All data is available upon request.

## Declarations

**Ethics Approval** The study was approved by the Institutional Ethics Committee (Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) by the number CAAE 81,431,517,100,005,327, GPPG 2018–0294.

**Consent to Participate** Consent to participate was obtained from subjects or from the family of dead patients.

**Conflict of Interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Abney M, McPeck MS, Ober (2001) Broad and narrow heritabilities of quantitative traits in a founder population. *Am J Hum Genet* 68:1302–1307
- Akçimen F, Martins S, Lian Calwing et al. (2019) Genome-wide association study identifies genetics factors that modify age at onset in Machado-Joseph disease. *bioRxiv* 834754; <https://doi.org/10.1101/834754>
- Allen AS, Satten GA (2010) SNPs in *CAST* are associated with Parkinson disease: a confirmation study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:973–979. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31061>
- de Mattos EP, Musskopf MK, Torman VL, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB (2018) Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90:203–210
- Goti D, Katzen SM, Mez J et al (2004) A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci* 24:10266–10279. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-04>
- Hübener J, Weber JJ, Richter C, Honold L, Weiss A, Murad F, Breuer P, Wullner U, Bellstedt P, Paquet-Durand F et al (2013) Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet* 22:508–518. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds449>
- Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13:196–202. <https://doi.org/10.1038/ng0696-196>
- Jardim LB, Hauser L, Kieling C, Saute JAM, Xavier R, Rieder CRM, Monte TL, Camey S, Torman VBL (2010) Progression rate of

- neurological deficits in a 10-year cohort of SCA3 patients. *Cerebellum* 9:419–428. <https://doi.org/10.1007/s12311-010-0179-4>
- Matilla-Dueñas A, Ashizawa T, Brice A et al (2014) Consensus paper: pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 13:269–302
- McLoughlin, Hayley S, Moore Lauren R, Paulson Henry L (2020) Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases *Neurobiol Dis* 134–104635. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104635>
- Mergener R, Furtado GV, de Mattos EP et al (2019) Variation in DNA repair system gene as an additional modifier of age at onset in spinocerebellar ataxia Type 3/Machado-Joseph disease. *NeuroMol Med*. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08572-4>
- Nóbrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I et al (2013) Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS ONE* 8(1):e52396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052396>
- Pankratz N et al (2009) Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet* 124(6):593–605. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0582-9>
- Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS et al (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19:333–344. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80943-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80943-5)
- Pulst SM, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velazquez L, Figueroa KP (2005) Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 128 10:2297–2303
- Rodríguez-Labrada R, Martins AC, Magana JJ (2020) Founder effects of spinocerebellar ataxias in the American continents and the Caribbean. *The Cerebellum*. <https://doi.org/10.1007/s12311-020-01109-7>
- Schork NJ, Lander ES (1994) Genetic dissection of complex traits. *Nature* 265 <https://doi.org/10.1126/science.8091226>
- Sequeiros J, Martins S, Silveira I (2012) Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. *Handbook of Clinical Neurology* 227–251
- Shifman S, Darvasi A (2001) The value of isolated populations *Nat Genet* 28, 309–310. <https://doi.org/10.1038/91060>
- Simões AT, Gonçalves N, Koeppen A, Déglon N, Kügler S, Duarte CB, Pereira de Almeida L (2012) Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain* 135:2428–2439. <https://doi.org/10.1093/brain/aws177>
- Simões AT, Gonçalves N, Nobre RJ, Duarte CB, Pereira de Almeida L (2014) Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 23:4932–4944. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu209>
- Souza GN, Kersting N, Krum-Santos AC, Santos ASP, Furtado GV, Pacheco D, Gonçalves TA, Saute JA, Schuler-Faccini L, Mattos EP et al (2016) Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions. *Clin Genet* 90:134–140. <https://doi.org/10.1111/cge.12719>
- Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 76:449–462
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989
- Warrick JM, Paulson HL, Gray-Board GL et al (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* S0092–8674(00):81200–81203
- Watchon M, Yuan KC, Mackovski N, Svahn AJ (2017) Calpain inhibition is protective in Machado-Joseph disease zebrafish due to induction of autophagy. *Neurobiol Dis* 37(32):7782–7794
- Zhang L, Ding H, Wang D-H, Zhang YL, Baskys A, Chan P, Zhong Y, Cai YN (2013) Calpastatin gene (CAST) is not associated with late onset sporadic Parkinson’s disease in the Han Chinese population *PLoS One* 8 e70935 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070935>

**Publisher’s Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 4. DISCUSSÃO

Dadas as fortes evidências que o sistema de clivagem proteolítica tem um papel importante na patogênese da SCA3/MJD - comprovadas em modelos celulares e animais não humanos -, este trabalho se propôs a fazer uma abordagem desta hipótese através de uma investigação de base epidemiológica, feita diretamente em portadores da doença. A busca de modificadores do fenótipo na sequência do DNA, apesar de ser informativa, é somente o primeiro passo. Metodologias como avaliação da expressão do mRNA e da tradução proteica, e depois o uso de modelos celulares mais complexos para se averiguar como se sucedem as vias funcionais, devem dar seguimento à busca desses modificadores. No extremo dos modelos de doença mais sofisticados, vislumbro o uso dos chamados “mini-cérebros” - estruturas organóides cerebrais - para se investigar em profundidade as vias fisiopatológicas da SCA3/MJD. Tal como já acontece na doença de Parkinson e em algumas doenças causadas por príons, o uso do modelo organóide cerebral humano, ao diferenciar tecido neuronal humano tridimensional de células-tronco pluripotentes (Grosveman et al., 2020), representará uma oportunidade de avanço significativo no entendimento dos mecanismos celulares subjacentes à SCA3/MJD. Nesses modelos, o verdadeiro papel da clivagem da ataxina-3 será esclarecido diretamente, sem a dependência de existirem SNPs informativos, eventualmente bastante erráticos e distantes da real cadeia de eventos que estamos buscando estudar. Não é impossível que assim se esclareça se o papel das calpaínas é ou não fundamental no desencadeamento da doença, e se elas serão um alvo preferencial de futuros modelos terapêuticos dessa condição.

A análise de SNPs apresentada aqui consiste em um trabalho exploratório, principalmente por ter sido pioneiro na literatura. Sabemos que a confirmação de uma associação depende da repetição do seu achado em uma coorte confirmatória, e de fato aguardamos que isso venha a acontecer a partir de outros grupos de estudo. No entanto, a SCA3/MJD é uma doença bastante rara e nossos resultados de fato servirão como mais um elemento para a confirmação do papel da via de clivagem proteica - neste caso especialmente a calpastatina - na

SCA3/MJD. Os resultados apresentados são importantes no panorama geral da doença. Trata-se de mais uma contribuição ao conhecimento da SCA3/MJD que a coorte do Rio Grande do Sul propicia. Com uma prevalência de 7:100.000 pessoas sintomáticas e de aproximadamente 14:100.000 sujeitos em risco (ou 1500 sujeitos em risco, em números absolutos) (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2020), o aporte de conhecimento a partir de estudos que dependam de amostras relativamente grandes de sujeitos não só é mais factível no nosso estado do que em muitas outras regiões do mundo, como esse conhecimento repercutirá mais importantemente aqui também. Muitos são os afetados gaúchos e o estudo continuado da SCA3/MJD trará sempre alguma mitigação do impacto dessa condição, entre nós.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antony PMA, Mantele S, Mollenkopf P, Boy J, Kehlenbach RH, Riess O and Schmidt T (2009) Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis* 36:280–292. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.020;
- Allen AS and Satten GA (2010) SNPs in CAST are associated with Parkinson disease: a confirmation study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:973–979. doi: 10.1002/ajmg.b.31061;
- Araújo J, Breuer P, Dieringer S, Krauss S, Dorn S, Zimmermann K, Pfeifer A, Klockgether T, Wuellner U and Evert BO (2011). FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet* 20:2928–2941; doi:10.1093/hmg/ddr197
- Araújo S. (2012) Geographic profiling of Machado-Joseph disease: a health geographic pilot-study in the Azores. Master theses;
- Bauer, P. O.; Nukina, N. (2009) The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J. Neurochem.* 110(6):1737–1765;
- Berke SJS, Chai Y, Marrs GL, Wen H and Paulson HL (2005). Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J Biol Chem* 280:32026–32034. doi: 10.1074/jbc.M506084200;
- Berke SJS, Schmied FAF, Brunt ER, Ellerby LM and Paulson HL (2004) Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3. *J Neurochem* 89:908–918. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02369.x;
- Bettencourt C, Raposo M, Kazachkova N, Cymbron T, Santos C, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P, Donis KC, Saraiva-Pereira ML et al (2011) The APOE ε2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 68:1580–1583. doi: 10.1001/archneurol.2011.636;
- Bezprozvanny I. (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 15:89–100. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.001;
- Boeddrich A, Gaumer S, Haacke A, Tzvetkov N, Albrecht M, Evert BO, Müller EC, Lurz R, Breuer P, Schugardt N et al (2006) An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. *EMBO J* 25:1547–1558; doi: 10.1038/sj.emboj.7601043
- Burnett B, Li F and Pittman RN (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 12:3195–3205; doi: 10.1093/hmg/ddg344
- Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU and Speck-Martins CE (2008) Homozygosity Enhances Severity in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Pediatr Neurol* 38:296–299. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.006;
- Chafekar, S. M.; Duennwald, M. L (2012) Impaired heat shock response in cells expressing full-length polyglutamine expanded huntingtin. *PLoS One* 7(5):e37929;

Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A and Paulson HL (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9310–9315; doi: 10.1073/pnas.152101299

Chen X, Tang T-S, Tu H, Nelson O, Pook M, Hammer R, Nukina N and Bezprozvanny I (2008) Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 28:12713–12724. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3909-08;

Costa M do C and Paulson HL (2012) Toward understanding Machado– Joseph disease. *Prog Neurobiol* 97:239–257; doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.11.006

Coutinho P and Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28:703–709; doi:10.1212/wnl.28.7.703

Coutinho P, Calheiros JM, Andrade C (1977). Sobre uma doença degenerativa do sistema nervoso central transmitida de modo autossômico dominante e afetando familiares originários dos Açores. *O Médico*. 82,446-448.

Coutinho P, Ruano L, Loureiro JL, Cruz VT, Barros J, Tuna A, Barbot C, Guimarães J, Alonso I, Silveira I et al (2013) Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia in Portugal. *JAMA Neurol* 70:746–755;

de Castilhos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, Pedroso JL, Salarini DZ, Vargas FR, de Lima MA de FD et al (2014). Spinocerebellar ataxias in Brazil-frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum* 13:17–28; doi: 10.1007/s12311-013-0510-y

De Strooper B. (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90:465–494. doi: 10.1152/physrev.00023.2009;

Donis, Karina Carvalho. História Natural da Ataxia Espinocerebelar tipo 3/ Doença de Machado-Joseph com início na Infância (2015). Dissertação (Mestrado) - Unidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS.

Emmel V, Alonso I, Jardim L, Saraiva-Pereira M and Sequeiros J (2011) Does DNA methylation in the promoter region of the ATXN3 gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients? *Clin Genet* 79:100–102. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01508.x;

Emmel VE, Pereira MLS and Jardim LB (2010) Análise de modificadores genéticos do fenótipo da ataxia espinocerebelar tipo 3. Tese de Doutorado <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/28478>;

Evert BO, Araújo J, Vieira-Saecker AM, de Vos RAI, Harendza S, Klockgether T and Wüllner U (2006a) Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci* 26:11474–11486; doi:10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006

Evert BO, Schelhaas J, Fleischer H, de Vos RAI, Brunt ER, Stenzel W, Klockgether T and Wüllner U (2006b) Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* 25:272–281;

Fan HC, Ho Li, Chi CS et al. (2014) Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments. *Cell Transplant*. doi: 10.3727/096368914X678454.

França MC, D'Abreu A, Nucci A, Cendes F and Lopes-Cendes I (2009) Progression of ataxia in patients with Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 24:1387–1390. doi: 10.1002/mds.22627;

Furtado, Gabriel Vasata (2018) Biomarcadores na Doença de Machado-Joseph. Tese (Doutorado) - Unidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, BR-RS;

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W and Cong J (2003) The Calpain System. *Physiol Rev* 83:731–801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002;

Groveman BR, Walters R, Haigh CL (2020) Using our mini-brains: cerebral organoids as an improved cellular model for human prion disease. *Neural Regen Res*;15:1019-20.

Haacke A, Hartl FU and Breuer P (2007) Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem* 282:18851–18856. doi: 10.1074/jbc.M611914200.

Hanna RA, Campbell RL and Davies PL. (2008) Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* 456:409–412. doi: 10.1038/nature07451;

Hübener J, Weber JJ, Richter C, Honold L, Weiss A, Murad F, Breuer P, Wüllner U, Bellstedt P, Paquet-Durand F et al (2013) Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet* 22:508–518. doi: 10.1093/hmg/ddt449;

Jacobi H, Bauer P, Giunti P, Labrum R, Sweeney MG, Charles P, Dürr A, Marelli C, Globas C, Linnemann C et al. (2011) The natural history of spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6: a 2-year follow-up study. *Neurology* 77:1035–1041. doi: 10.1212/WNL.0b013e31822e7ca0;

Jardim LB, Hauser L, Kieling C, Saute JAM, Xavier R, Rieder CRM, Monte TL, Camey S and Torman VBL (2010) Progression rate of neurological deficits in a 10-year cohort of SCA3 patients. *Cerebellum* 9:419–428; doi: 10.1007/s12311-010-0179-4

Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)<sub>n</sub> (2001a). *Arch Neurol* 58:899–904; doi:10.1001/archneur.58.6.899

Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001b). Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol Scand* 104:224–231; doi: 10.1034/j.1600-0404.2001.00020.x

Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Do Céu Moreira M, et al (2001c). A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*.248(10):870–6. doi:



10.1007/s004150170072

Jung J, Xu K, Lessing D and Bonini NM (2009) Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a *Drosophila* model of SCA3. *Hum Mol Genet* 18:4843–4852. doi: 10.1093/hmg/ddp456;

Kakkar V, Månsson C, de Mattos EP, Bergink S, van der Zwaag M et al (2016) The S/T-Rich Motif in the DNAJB6 Chaperone Delays Polyglutamine Aggregation and the Onset of Disease in a Mouse Model. *Mol Cell* 62:272–283. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.017;

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M et al. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.* 8: 221-228; <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>

Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML and Jardim LB (2007) Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72:543–545. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00910.x;

Kieling C, Rieder CRM, Silva ACF, Saute JAM, Cecchin CR, Monte TL and Jardim LB (2008) A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol* 15:371–376. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02078.x;

Koch P, Breuer P, Peitz M, Jungverdorben J, Kesavan J, Poppe D, Doerr J, Ladewig J, Mertens J, Tüting T et al. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* 480:543–546. doi: 10.1038/nature10671;

Kuiper EFE, de Mattos EP, Jardim LB, Kampinga HH and Bergink S (2017) Chaperones in Polyglutamine Aggregation: Beyond the Q-Stretch. *Front Neurosci* 11:145; doi: 10.3389/fnins.2017.00145

Li F, Macfarlan T, Pittman RN and Chakravarti D (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 277:45004–45012; 2002. doi: 10.1074/jbc.M205259200

Li J and Yuan J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27:6194–6206. doi: 10.1038/onc.2008.297;

Maciel P, Costa MC, Ferro A, Rousseau M, Santos CS, Gaspar C, Barros J, Rouleau GA, Coutinho P and Sequeiros J (2001) Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58:1821–1827; doi: 10.1001/archneur.58.11.1821

Mattos, Eduardo et al. (2018a) Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* DOI: 10.1136/jnnp-2018-319200;

Mattos, Eduardo et al. (2018b) Age at onset prediction in spinocerebellar ataxia type 3 changes according to population of origin. *European Journal of Neurology* DOI: 10.1111/ene.13779;

McIlwain DR, Berger T and Mak TW. (2013) Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008656–a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656;

- Mergener R, Furtado G V, de Mattos E P et al (2019). Variation in DNA Repair System Gene as an Additional Modifier of Age at Onset in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *NeuroMolecular Medicine* doi.org/10.1007/s12017-019-08572-4.
- Nakano K K, Dawson D M, Spence, A (1972) Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22: 49-55. doi: 10.1212/wnl.22.1.49.
- Paulson HL (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 27:133-142; doi: 10.1055/s-2007-971172
- Piazza WF. A epopeia açóricico-madeirense 1748–1756. Florianópolis: Editora da UFSC, 1992.
- Reetz K, Costa AS, Mirzazade S, Lehmann A, Juzek A, Rakowicz M, Boguslawska R, Schöls L, Linnemann C, Mariotti C et al. (2013) Genotype-specific patterns of atrophy progression are more sensitive than clinical decline in SCA1, SCA3 and SCA6. *Brain* 136:905–917. doi: 10.1093/brain/aws369
- Rodríguez-Labrada R, Martins A C, Magana J J (2020) Founder Effects of Spinocerebellar Ataxias in the American Continents and the Caribbean. *The Cerebellum*; doi.org/10.1007/s12311-020-01109-7
- Romanul, F. C. A., Fowler, H. L., Radvany, J., Feldman, R. G., Feingold, M (1977) Azorean disease of the nervous system. *New Eng. J. Med.* 296: 1505-1508; doi: 10.1056/NEJM197706302962606
- Rosenberg R N, Nyhan W L, Bay C, Shore P (1976) Autosomal dominant striato-nigral degeneration: a clinical, pathologic and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* 26: 703-714;
- Ross CA & Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10:S10–S17. doi: 10.1038/nm1066;
- Ross CA, Wood JD, Schilling G, Peters MF, Nucifora FC, Cooper JK, Sharp AH, Margolis RL and Borchelt DR (1999) Polyglutamine pathogenesis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 354:1005–1011. doi: 10.1098/rstb.1999.0452;
- Saute J A M and Jardim L B (2015) Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. *Expert Opin Orphan Drugs* 3:517–535. doi: 10.1517/21678707.2015.1025747;
- Schmidt T, Landwehrmeyer GB, Schmitt I, Trottier Y, Auburger G, Laccone F, Klockgether T, Völpel M, Epplen JT, Schöls L et al (1998) An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* 8:669–679; doi: 10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T and Riess O (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3:291–304. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00737-9;
- Schols, L., Vieira-Saecker, A. M. M., Schols, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Riess, O (1995) Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and

occurs most frequently in German SCA patients. *Hum. Molec. Genet.* 4: 1001-1005;

Sequeiros J and Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease (1993). *Adv Neurol* 61:139–153;

Sequeiros J, Martins S, Silveira I. (2012) Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. *Handbook of clinical neurology.* pp 227–251;

Siebert M, Donis K C, Socal M et al. (2012) Glucocerebrosidase gene variants in parkinsonian patients with Machado Joseph/spinocerebellar ataxia 3. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012 Feb;18(2):185-90. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.09.024.

Simões AT, Gonçalves N, Koeppen A, Déglon N, Kügler S, Duarte CB and Pereira de Almeida L. (2012) Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain* 135:2428–2439. doi: 10.1093/brain/aws177;

Simões AT, Gonçalves N, Nobre RJ, Duarte CB and Pereira de Almeida L. (2014) Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 23:4932–4944. doi: 10.1093/hmg/ddu209;

Smith MA and Schnellmann RG. (2012) Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc Res* 96:32–37. doi: 10.1093/cvr/cvs163;

Solans, A.; Zambrano, A.; Rodriguez, M.; Barrientos, A (2006) Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Hum. Mol. Genet.* 15(20):3063–3081;

Sorimachi H, Hata S and Ono Y. (2011) Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87:287–327;

Souza GN, Kersting N, Krum-Santos et al. (2016) Spinocerebellar ataxia type 3/Machado–Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions. *Clinical Genetics*: <https://doi.org/10.1111/cge.12719>

Stoyas, C; Spada, A. R (2018) The CAG–polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiologic nosology. Chapter 11 - *Handbook of Clinical Neurology.* Volume 147, Pages 143-170;

Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S et al. (1993) The gene for Machado–Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4:300– 304. doi: 10.1038/ng0793-300;

Tarlac V and Storey E. Role of proteolysis in polyglutamine disorders (2003) *J Neurosci Res* 74:406–416. doi: 10.1002/jnr.10746;

Tezenas du Montcel S, Durr A, Rakowicz M, Nanetti L, Charles P, Sulek A, Mariotti C, Rola R, Schols L, Bauer P et al. (2014) Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2,

3 and 6. *J Med Genet* 51:479–486. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102200;

Todi S V, Scaglione KM, Blount JR, Basrur V, Conlon KP, Pastore A, Elenitoba Johnson K and Paulson HL (2010). Activity and cellular functions of the deubiquitinating enzyme and polyglutamine disease protein ataxin-3 are regulated by ubiquitination at lysine 117. *J Biol Chem* 285:39303–39313; doi: 10.1074/jbc.M110.181610

Watson LM, Scholefield J, Greenberg LJ, Wood MJA (2012) Polyglutamine disease: From pathogenesis to therapy. *SAMJ, S. Afr. med. j.* vol.102 n.6 Cape Town Jun doi: 10.7196/samj.5690

Weber JJ, Golla M, Guaitoli G, Wanichawan P, Hayer SN, Hauser S, Krahl A-C, Nagel M, Samer S, Aronica E et al (2017) A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain* 140:1280–1299. doi: 10.1093/brain/awx039;

Weber JJ, Sowa AS, Binder T and Hübener J (2014) From pathways to targets: understanding the mechanisms behind polyglutamine disease. *Biomed Res Int* 2014:701758. doi: 10.1155/2014/701758;

Wellington CL and Hayden MR (1997) Of molecular interactions, mice and mechanisms: new insights into Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* 10:291–298. doi: 10.1097/00019052-199708000-00003

Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M et al. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 273:9158–9167; doi: 10.1074/jbc.273.15.9158

Woods, BT, Schaumburg, HH (1972) Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J. Neurol. Sci.* 17: 149-166; doi: 10.1016/0022-510x(72)90137-2

Xilouri M, Brekk OR and Stefanis L (2013)  $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol Neurobiol* 47:537–551. doi: 10.1007/s12035-012-8341-2;

Zeng, S., Zeng, J., He, M., Zeng, X., Zhou, Y., Liu, Z., Jiang, H., Tang, B., Wang, J. (2015) Chinese homozygous Machado-Joseph disease (MJD)/SCA3: a case report. *J. Hum. Genet.* 60: 157-160;

Zhang L, Ding H, Wang D-H, Zhang Y-L, Baskys A, Chan P, Zhong Y and Cai Y-N. (2013) Calpastatin Gene (CAST) Is Not Associated with Late Onset Sporadic Parkinson's Disease in the Han Chinese Population. *PLoS One* 8:e70935. doi: 10.1371/journal.pone.0070935;

Zijlstra MP, Rujano M a, Van Waarde M a, Vis E, Brunt ER and Kampinga HH (2010) Levels of

DNAJB family members (HSP40) correlate with disease onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Eur J Neurosci* 32:760–770. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07352.x;

Zoghbi, H. Y.; Orr, H. T.(1999) Polyglutamine diseases: Protein cleavage and aggregation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(5): 566–570;