

Adriana Amorim Torres

**Validação do Camundongo Rodador como Modelo  
para Surdez Hereditária Humana**

Dissertação apresentada ao programa  
de Pós-Graduação em Genética do  
Departamento de Biologia Geral da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em  
Genética

**Orientação: Prof. Dra. Ana Lúcia  
Brunialti Godard**

Belo Horizonte  
2012

## Resumo

A mutação rodador é uma desordem monogênica, autossômica recessiva caracterizada por perda auditiva e disfunção de equilíbrio. Esta mutação foi isolada durante um projeto desenvolvido em parceria pelo Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas da UFVIG e o Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que objetivou a indução de diferentes mutações no genoma de camundongos, utilizando o agente mutagênico N-etil-N-nitrosourea (ENU). Onze mutantes com fenótipos de interesse médico foram selecionados neste projeto para mapeamento genético e clonagem posicional, com o intuito de gerar novos modelos animais para doenças genéticas humanas.

O camundongo rodador é caracterizado por realizar movimentos circulares e apresentar déficit auditivo e certo grau de desequilíbrio. Análises histológicas do aparelho vestibulo-coclear revelaram estereocílios anormais e a análise de ligação feita com animais recombinantes utilizando marcadores microssatélites mapeou a mutação no cromossomo 10, entre os marcadores D10Mit170 (29,0 cM) e D10Mit230 (49,0 cM). O estudo da região permitiu a seleção do gene da Protocaderina 15 (*Pcdh15*) como forte candidato para a mutação, uma vez que está envolvido com a função auditiva e modelos murinos descritos para este gene apresentam fenótipo muito semelhante ao rodador. A Protocaderina 15 é uma proteína de adesão celular dependente de cálcio, membro da superfamília das Caderinas. É expressa nas células mecano-sensórias do ouvido interno, sendo componente dos filamentos extracelulares que controlam a morfogênese e a função dos estereocílios. Quarenta e um éxons do gene *Pcdh15*, incluindo regiões intrônicas flaqueadoras, foram sequenciados e uma transição AT-para-GC foi encontrada no Intron 23. A alteração observada levou à troca de um dinucleotídeo ApA para ApG em uma posição próxima ao sítio aceptor de splicing, criando um sítio criptico de splicing dentro do intron. O sequenciamento do cDNA comprovou a incorporação de 8 bases da região intrônica no mRNA como resultado do reconhecimento errôneo do sítio de splicing.

Testes de PCR em tempo real foram realizados para avaliar os níveis de transcrito do gene *Pcdh15* no cérebro de camundongos controle e rodador, e revelaram quantidade reduzida de transcrito nos camundongos mutantes, com valores estatisticamente significantes.

No homem, mutações no gene *PCDH15* causam perda auditiva e Síndrome de Usher tipo 1F. O camundongo rodador constitui um bom modelo para estudo de surdez humana, e pode contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na função auditiva e na patogênese dessa doença.

## Abstract

The mutation rodador is an autosomal recessive disorder characterized by hearing loss and balance dysfunction. It was isolated in a project developed by the Laboratory of Animal and Human Genetics (ICB/UFMG, Brazil) and the Biotechnology of Experiments of the Department of Immunology

(ICB/USP, Brazil) which aimed at inducing different mutations in the mouse genome using the mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Eleven mutants with phenotypes of interest were selected for genetic mapping and positional cloning, with the aim of generating new animal models for human genetic diseases. Rodador mice are characterized by circling locomotion, hearing loss and balance dysfunction. Histological analyses of the cochlea revealed abnormal stereocilia in the sensory hair cells, and linkage analysis performed in recombinant animals using microsatellite markers mapped the mutation to chromosome 10, between the markers D10Mit170 (29.0 cM) and D10Mit230 (49.0 cM). The characterization of the region allowed the selection of the gene Pcdh15 (Protocadherin 15)

as a strong candidate for the mutation, as it is involved with hearing function and mouse models reported for this gene present phenotypes similar to rodador. Protocadherin 15 is a calcium dependent cell adhesion protein, member of the cadherin superfamily. It is expressed in the mechanosensory hair cells in the inner ear and is a component of the extracellular filaments that control morphogenesis and function of stereocilia. Forty-one exons and intronic flanking regions of the gene Pcdh15 were sequenced and an AT-to-GC transition was found in intron 23. The detection led to the discovery of a dinucleotide ApA for an

ApG on a position close to the acceptor splice site, creating a cryptic splice site within the intron. cDNA sequencing confirmed the incorporation of 8 intronic bases into the mRNA as a result of the recognition of the mutated site by the spliceosome. Real Time PCR tests revealed significantly reduced Pcdh15 transcript levels in the brain of rodador mice, in comparison to control mice. In man, mutations in the gene PCDH15 cause hearing loss and Usher Syndrome type 1F. Rodador mouse might be a great model for hereditary hearing loss, and validation of the mutation will allow further studies on the mechanisms of hearing function and on the pathogenesis of the disease.