

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Genética



Dissertação de mestrado

Mapeamento Genético e estudo de genes candidatos para um modelo animal de doença neuromuscular

Daniel Almeida da Silva e Silva

Orientação: Ana Lúcia Brunialti Godard

Belo Horizonte
2012

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Genética

Daniel Almeida da Silva e Silva

**Mapeamento Genético e estudo de genes
candidatos para um modelo animal de doença
neuromuscular**

Dissertação de mestrado apresentada
no programa de pós-graduação em
Genética da Universidade Federal de
Minas Gerais

Orientação: Ana
Lúcia Brunialti
Godard

Belo Horizonte
2012

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e irmãos por todos os ensinamentos.

Agradeço a todos os amigos do LGAH. Todos que me acompanham desde 2007 até os dias atuais. Obrigado pela companhia e aprendizado.

Agradeço à minha orientadora Ana Lúcia por ter acreditado inicialmente naquele aluno inexperiente do segundo período de Ciências Biológicas. Agradeço por tantos conhecimentos passados e pela confiança ao longo de tantos anos.

Agradeço à Andrea que, mesmo fora do laboratório, continua quebrando muitos galhos e nos ajudando nas nossas tantas dúvidas.

Agradeço a todos os amigos pela companhia e distração.

Agradeço a Deus por tantas mudanças e pela força durante esse tempo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:	1
LISTA DE FIGURAS:	2
LISTA DE TABELAS:	3
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	6
Modelos animais	6
Caracterização funcional de um gene	8
Estudo de mutações	11
Mapeamento genético	12
Marcadores genéticos	12
Agentes mutagênicos	14
O camundongo como organismo modelo – Indução de novas mutações	15
Cruzamentos para obtenção de animais para o mapeamento	17
A mutação <i>fraqueza</i>	19
Busca do gene candidato	20
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVOS	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
Obtenção dos animais para o mapeamento	25
Extração de DNA	25
Eutanásia e coleta do material para extração de RNA	25
Extração de RNA	26
Síntese de cDNA	27
Mapeamento	27
Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	28
Análise de polimorfismos	29
Seleção de genes candidatos para a mutação	30
Caracterização dos genes candidatos	30
Desenho dos iniciadores	30

Amplificação dos fragmentos	31
Verificação da qualidade dos fragmentos em gel	31
Purificação por PEG.....	32
Purificação por coluna.....	32
Reação de sequenciamento.....	32
Precipitação e lavagem.....	33
Análise das sequências	33
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	43
Conclusão e Perspectivas	54
Referências Bibliográficas	55
Anexos	63
Anexo I.....	63

Lista de Abreviaturas e siglas

Actr1b - Actin-related protein 1 homolog B
Bpag1 - Bullous Pemphigoid Antigen 1
CC – coiled coil
cM – centimorgan
DNA – ácido desoxirribonucléico
Dst – dystonin/distonia
dt - dystonia musculorum
EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético
ENU- N-etil-N-nitrosourea
IFBD – domínio de ligação a filamentos intermediários
IKMC - International Knockout Mouse Consortium
i.p. – intra peritoneal
Kb - quilobases
LGAH – Laboratório de Genética Animal e Humana
Mpb – megabases
MGI – Mouse Genoma Informatics
NCBI – National Center for Biotechnology Information
pb – par de base
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEG – polietilenoglicol
PRD1 – domínio de repetição de plaquina/plequitina 1
PRD2 – domínio de repetição de plaquina/plequitina 2
RFLP - polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição
RNA – ácido ribonucléico
SNP – polimorfismo de nucleotídeo único
TRA – transporte retrógrado axonal

Lista de Figuras

Figura 1- Relações evolutivas entre os modelos mais utilizados em laboratório (Silver, 1995)	8
Figura 2- Gráfico representativo do número de mutantes murinos existentes para genes codificadores de proteína gerados por mutação dirigida a partir de células-tronco embrionárias (IKMC).	10
Figura 3- Esquema de cruzamento utilizado para o isolamento de mutações de herança recessiva em camundongos tratados com ENU.....	16
Figura 4- Árvore filogenética das linhagens isogênicas estabelecida a partir da análise de SNPs. As marcações nas figuras evidenciam a distância entre as duas linhagens utilizadas no cruzamento para a geração de polimorfismos.....	18
Figura 5- Esquema de cruzamento utilizado para a obtenção de camundongos <i>fraqueza</i> para o mapeamento	18
Figura 6- Aspecto comparativo entre animais controle e <i>fraqueza</i> (A) animal <i>fraqueza</i> (pelagem rarefeita) e animais normais com treze dias de idade; (B) à esquerda animal mutante <i>fraqueza</i> e à direita animal normal da mesma ninhada com cerca de quatro semanas; (C) contração dos membros posteriores contra o corpo quando suspenso pela cauda.....	19
Figura 7- Haplótipo resumido representando animais testados. Retângulos brancos indicam homozigose para BALB/c e retângulos preenchidos indicam homozigose para C57BL/6. Os retângulos semi-preenchidos representam camundongos heterozigotos para o marcador. Os números abaixo de cada coluna indicam a quantidade de animais com o respectivo haplótipo.....	35
Figura 8- Análise histológica de tecido nervoso em coloração HE em animais com 7 semanas.	45
Figura 9- Estrutura do gene <i>Bpag1</i> e suas diferentes isoformas tecido-específicas.	49

Figura 10- Diferentes porções N-terminal encontradas nas isoformas 1a e 1b.....	49
Figura 11- Rede de interações proteicas observada para o gene <i>Bpag1</i>	50
Figura 12- Complexo Dinactina-dineína.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1- Lista de marcadores microssatélites utilizados para a análise de ligação	28
Tabela 2- Protocolo para reação de PCR	28
Tabela 3- Reação de sequenciamento padrão para ABI 3130.....	32
Tabela 4- Tabela de prioridades: possíveis genes candidatos funcionais.	36

Resumo

Um projeto denominado *O camundongo como organismo modelo – Indução de novas mutações*, desenvolvido em parceria, pelo Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e o Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, objetivou a indução de diferentes mutações no genoma de camundongos, utilizando-se o agente mutagênico N-etil-N-nitrosourea (ENU). Neste projeto, foram obtidos 11 mutantes com fenótipos de interesse, selecionados para mapeamento genético e clonagem posicional, com o intuito de gerar modelos animais para patologias genéticas humanas. Dentre os 11 mutantes encontra-se o *fraqueza*.

A mutação *fraqueza* é herdada de forma autossômica recessiva e caracteriza-se por perda progressiva da força muscular na cauda e nas patas. O quadro é observado a partir da primeira quinzena de vida e o animal morre por volta da décima segunda semana.

Para fins do mapeamento genético, animais BALB/c, heterozigotos para a mutação *fraqueza*, foram cruzados com animais C57BL/6 normais gerando animais F1 que foram, em seguida, inter cruzados gerando animais recombinantes F2.

O presente trabalho teve como objetivo o mapeamento a média resolução do gene causador do fenótipo *fraqueza* por análise de ligação nos animais F2 recombinantes, e a caracterização dos genes Bullous Pemphigoid Antigen 1 (*Bpag1*) e Actin-related protein 1 homolog B (*Actr1b*), candidatos posicionais e funcionais para a mutação.

A análise de ligação foi realizada com os animais recombinantes através de marcadores microssatélites polimórficos para as duas linhagens (BALB/c e C57BL/6), e a mutação foi mapeada no cromossomo 1, entre os marcadores D1mit373 (10.92 cM) e D1mit320 (18.64 cM), delimitando uma região de 7.72 cM, região esta onde se encontram os genes *Bpag1* e *Actr1b*.

Espera-se com este trabalho identificar a mutação responsável pelo fenótipo *fraqueza* para que este modelo possa ser utilizado para futuros estudos em doenças neuromusculares e neurodegenerativas.

Abstract

A project called “The mouse as a model organism - Induction of new mutations”, developed in partnership by the Laboratory of Human and Animal Genetics (LGAH) Institute of Biological Sciences, UFMG and the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, USP, aimed at inducing of different mutations in the genome of mice using the mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). In this project, we obtained 11 mutants with phenotypes of interest were selected for genetic mapping and positional cloning in order to generate animal models for human genetic diseases. Among the 11 mutant is the *fraqueza* (*weakness*).

The *fraqueza* mutation is inherited as an autosomal recessive and is characterized by progressive loss of muscle strength and motor coordination in the tail and paws. The picture is observed from the first two weeks of life and the animal dies around the twelfth week.

For purposes of mapping genetic animal BALB / c mice heterozygous for the mutation weakness were crossed with C57BL / 6 normal generating F1 animals were then intercrossed generating recombinant animals F2.

The present work was aimed at the medium-resolution mapping of the gene causing the phenotype weakness for linkage analysis in recombinant F2 animals, and characterization of genes Bullous Pemphigoid Antigen 1 (*Bpag1*) and Actin-related protein 1 homolog B (*Actr1b*), candidates positional and functional mutation.

Linkage analysis was performed with the animals through recombinant polymorphic microsatellite markers for both strains (BALB / c and C57BL / 6), and the mutation was mapped on chromosome 1 between markers D1mit373 (10.92 cM) and D1mit320 (18.64 cM), defining a region of 7.72 cM region is where the genes and *Bpag1 Actr1b*.

It is hoped that this work was to identify the mutation responsible for the phenotype weakness so that this model can be used for future studies in neuromuscular and neurodegenerative diseases.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODELOS ANIMAIS

A experimentação animal é um componente essencial da ciência. Sua ampla contribuição nas pesquisas biomédicas e comportamentais promove ao longo dos anos um grande aumento no conhecimento científico. (Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research).

A principal vantagem dos modelos animais em relação às técnicas *in vitro* é o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo (Chorilli *et al*, 2007). Diversos animais são utilizados atualmente como modelo, e são escolhidos de acordo com os objetivos da pesquisa a ser realizada. Os animais mais utilizados para o estudo de doenças humanas são os camundongos, ratos, coelhos, cães, suínos e primatas. Dentre estes, os camundongos são os mais intensamente utilizados e os mais profundamente conhecidos do ponto de vista científico (Chorilli *et al*, 2007), existindo atualmente, diversos modelos murinos estabelecidos para diversas condições patológicas humanas.

O camundongo é membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Essa classificação é a mais aceita, entretanto, há controvérsias sobre espécies e subespécies criadas em laboratórios, devido à presença de cruzamentos especiais nos quais os animais apresentam alguns genes ou, até mesmo, cromossomos de espécies diferentes. Um exemplo é a linhagem isogênica C57BL/6, na qual 6,5% do genoma é originário de *Mus spretus* e não de *Mus musculus* (Franco, 2006).

No início do século XX, juntamente com a redescoberta dos trabalhos de Mendel, o camundongo tornou-se também um importante modelo experimental para os estudos genéticos (Chorilli *et al*, 2007). Em 1909, Clarence Cook Little iniciou a produção da primeira linhagem de camundongo geneticamente homogênea, a partir de experimentos para a observação da segregação da cor da pelagem. Através de acasalamentos entre irmãos por 20 gerações consecutivas, foi obtida a primeira linhagem consanguínea, chamada de DBA (*Dilute Brown Non-Agouti*) (Lee Silver, 1995).

A importância do camundongo na modelagem de doenças genéticas humanas se deve a algumas vantagens particulares que este animal apresenta. Além de ser pequeno

e de fácil manipulação em laboratório, o camundongo é bastante prolífico e possui um tempo de geração curto, 19 a 21 dias. Apesar da grande variação apresentada entre as linhagens isogênicas e heterogênicas, as fêmeas, em geral, podem carregar muitos embriões por gestação, e o filhote pode atingir a maturidade sexual em apenas 11 semanas. Além disso, é possível realizar cruzamentos controlados destes animais com o intuito de promover endogamia, de modo que podem ser criadas populações de camundongos extremamente homogêneas do ponto de vista genético (Godard, 2008). Essas populações são denominadas linhagens isogênicas (*inbred strains*) e são muito estáveis e geneticamente padronizadas: apresentam formas alélicas homocigotas para todos os loci do genoma (isogênicas) com o conjunto de alelos distribuídos de forma aleatória (Godard, 2008).

Uma linhagem isogênica é estabelecida através de um protocolo de cruzamentos entre irmãos e, após 20 gerações sucessivas, todos os indivíduos da linhagem serão idênticos, e terão cerca de 99,9% do seu genoma em homocigose (Panthier et al., 2003). Assim, os animais dentro de uma mesma linhagem apresentam uma uniformidade fenotípica, o que permite considerar que as variações experimentais encontradas são resultados apenas de fatores externos, sem comprometimento genotípico do animal (Benavides et al., 2004).

Quando comparada aos modelos mais utilizados na pesquisa científica, a distância evolutiva entre as espécies humana e murina é relativamente curta (cerca de 60 milhões de anos) (Figura 1). Assim, o camundongo apresenta desenvolvimento, plano corporal, fisiologia, comportamento e doenças muito semelhantes ao homem. Além disso, mais de 90% dos dois genomas podem ser alinhados em regiões de sintenia conservada entre as duas espécies, refletindo a organização estrutural do cromossomo no ancestral comum. Ainda em relação à semelhança genética entre os dois organismos, cerca de 99% dos genes do camundongo apresenta um homólogo no genoma humano, sendo que 75% destes são ortólogos, mantendo as funções ancestrais em ambas as espécies. (Austin *et al.*, 2004; Guénet, 2005).

A grande semelhança entre as duas espécies e, principalmente, a homologia da quase totalidade dos genes murinos no humano torna o camundongo um modelo para estudo de disfunções genéticas de enorme aplicabilidade, uma vez que a identificação de mecanismos, alelos e genes no camundongo pode ser facilmente extrapolada para o homem.

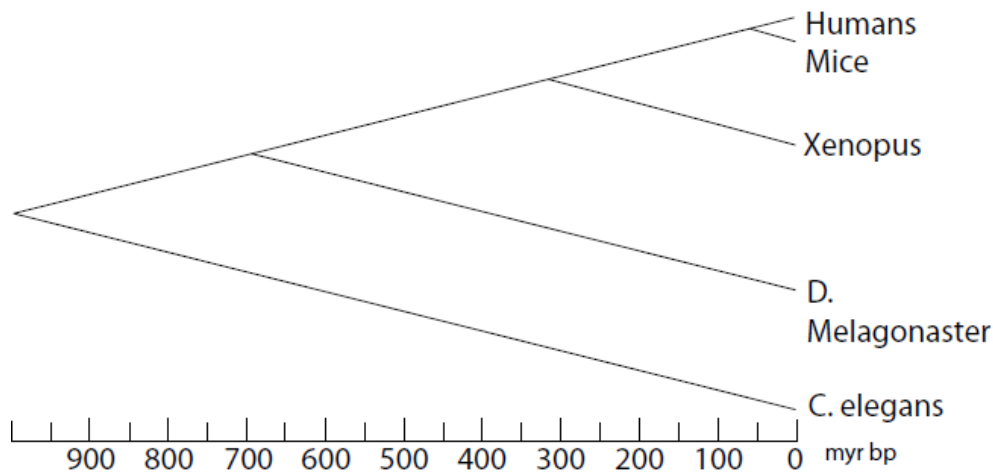


Figura 1: Relações evolutivas entre os modelos mais utilizados em laboratório. Os tempos aproximados em divergências evolutivas entre os organismos citados e seus ancestrais comuns estão indicados ao longo da linha do tempo, em uma escala de milhões de anos. Destaque para a divergência recente entre camundongos e humanos, há cerca de 60 milhões de anos. (Silver, 1995)

Outro aspecto também vantajoso para a utilização do camundongo em estudos genéticos é que o genoma deste animal suporta procedimentos de mutagênese (Austin, 2004). O avanço acelerado das técnicas de biologia molecular tem tornado comum o uso de camundongos transgênicos para estudos de doenças genéticas. De fato, o camundongo é a espécie geneticamente modificada mais utilizada nas pesquisas, representando cerca de 97% do total de animais geneticamente modificados que são utilizados (Chorilli et al, 2007).

O uso de animais com objetivos científicos é uma prática comum, mas para que seja moralmente aceitável e apresente resultados confiáveis, é fundamental ter-se a consciência de que o animal, como ser vivo, possui hábitos de vida próprios da sua espécie, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível a situações estressantes e à dor, razões que preconizam posturas éticas em todos os momentos do desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

1.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UM GENE

Existem duas estratégias que podem ser utilizadas para a identificação das funções dos genes e ambas consistem em um mesmo princípio básico baseado na ideia

de que a função dos genes pode ser inferida a partir do estudo das alterações fenotípicas provocadas pela presença de um alelo mutado não-funcional ou nulo.

A primeira estratégia é conhecida como “descendente” e consiste, basicamente, na utilização de técnicas de DNA recombinante para promover modificações em sequências codificadoras já conhecidas, de maneira à inativar um gene específico. Em geral essas modificações acarretam o aparecimento de um alelo nulo não-funcional e, por meio do estudo das características fenotípicas do mutante criado, pode-se compreender a função daquele gene. (Godard, 2008)

A alteração no genoma dos camundongos é feita *in vitro* por recombinação homóloga em células-tronco embrionárias e, uma vez induzida a mutação, os fenótipos são cuidadosamente estudados, no contexto do organismo inteiro (Massironi, 2006). Com o avanço nos estudos de células-tronco embrionárias, esta estratégia tem se tornado muito popular em vários laboratórios e milhares de camundongos transgênicos tem sido gerados. De acordo com o International Knockout Mouse Consortium (IKMC), existem hoje mutantes para 17855 genes codificadores de proteína gerados a partir da manipulação de células-tronco embrionárias, o que representa cerca de 64% do total em camundongos (IKMC, 16/Jun/2012) (Figura 2).

A produção de mutações dirigidas é uma abordagem direta para anotação gênica com relativamente poucas limitações. Pode-se dizer que, ao menos em teoria, qualquer sequência de DNA de função desconhecida pode ser alterada *in vitro* e podem ser produzidos embriões com a mutação em homozigose para estudo dos efeitos fenotípicos resultantes da alteração genética (Massironi, 2006). Com algum refinamento, podem ser produzidas, inclusive, mutações condicionais ou tecido-específicas.

O principal aspecto negativo deste tipo de estudo é a necessidade de que sejam geradas alterações observáveis para que o estudo seja efetivo. Ou seja, é necessário que a alteração fenotípica seja mensurável. Isto significa que, em muitos casos, o trabalho termina com fenótipos inconclusivos, principalmente para genes que, quando inativados, apresentam fenótipos muito sutis ou de difícil acesso, ou ainda, nenhuma alteração fenotípica (Massironi, 2006). Além disso, os genes muito pequenos, e especialmente aqueles com um único éxon, são difíceis de serem inativados por razões práticas (Massironi, 2006).

Mais ainda, a produção de mutações dirigidas no genoma requer experiência, habilidade e equipamentos sofisticados, e não constitui uma prática corriqueira nos laboratórios de Biologia Molecular.

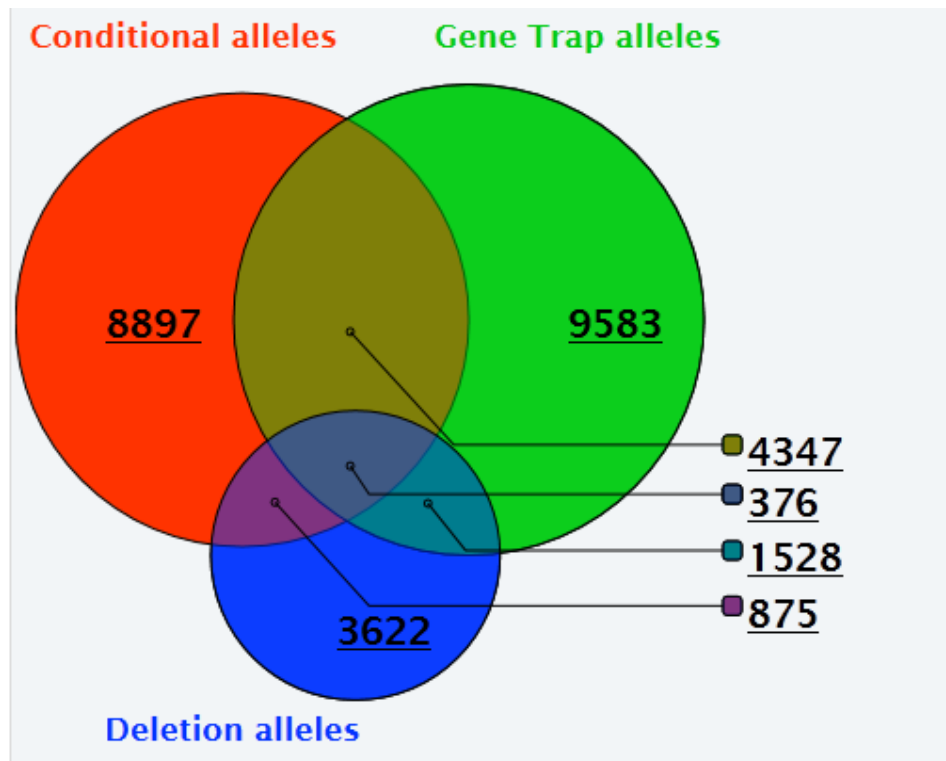


Figura 2: Gráfico representativo do número de mutantes murinos existentes para genes codificadores de proteína gerados por mutação dirigida a partir de células-tronco embrionárias (IKMC).

Já a segunda abordagem segue um caminho inverso e, por isso, é conhecida como “ascendente”, genética inversa ou clonagem posicional. Ao contrário da primeira, esta estratégia consiste na análise das variações fenotípicas em um dado modelo, seguida da identificação molecular do fator genético responsável. Por esta estratégia, uma mutação espontânea ou induzida em uma sequência previamente desconhecida, é selecionada para estudo por meio do fenótipo alterado que ela causa. A clonagem posicional permite identificar o gene onde se encontra a mutação e compreender sua função de acordo com o fenótipo causado por sua disfunção.

Embora seja laboriosa e demorada, a clonagem posicional apresenta a vantagem de ser realizada a partir de um fenótipo conhecido e de interesse biológico ou médico, o qual pode ser detalhadamente estudado, em seus aspectos morfológicos, fisiológicos, neurológicos, comportamentais e de desenvolvimento. Sendo assim, constitui uma estratégia interessante que possibilita que um animal de laboratório portador de uma mutação que resulte em um fenótipo muito semelhante a uma doença humana

geneticamente determinada, seja considerado um modelo para essa patologia (Godard, 2008).

Entretanto, essa estratégia apresenta a desvantagem de só permitir a identificação de um número minoritário de genes que, quando mutados, levam ao aparecimento de um fenótipo facilmente observado *ab útero* (Godard, 2008) e que não inviabilizam o desenvolvimento embrionário. Além disso, a clonagem posicional é, em geral, um empreendimento laborioso, que requer a criação de centenas de camundongos para reduzir a intervalo genético onde se localiza o *locus* mutado a um tamanho razoável. (Massironi, 2006).

Apesar de teoricamente opostas, as duas estratégias são complementares, embora com a peculiaridade que, enquanto a engenharia genética *in vitro* é universalmente aplicável, a clonagem posicional necessita de um fenótipo evidente disponível (Massironi, 2006).

1.3 ESTUDO DE MUTAÇÕES

Loci mutantes representam um recurso rico para a identificação de genes que afetam o desenvolvimento e a fisiologia. Os primeiros *loci* mutantes disponíveis para os geneticistas de camundongo para estudo foram importados de cortes imperiais do Japão, cujos imperadores cultivavam camundongos com características incomuns como coloração de pelo e comportamentos neurológicos, ou foram mutações espontâneas ocorridas em grandes colônias de produção, como as mantidas no The Jackson Laboratory em Bar Harbor, ME (Dietrich *et al.*, 1995). Posteriormente, a técnica de mutagênese de genes via radiação, químicos ou inserção de transgene tornou possível a criação de milhares de novas mutações não direcionadas. Mais recentemente, tecnologias de *knockout*, *knockin* e *knockdown* de genes tornaram possível a criação de mutações dirigidas em virtualmente qualquer gene do genoma murino.

A existência de uma ampla gama de mutações disponíveis para estudos genéticos propicia enormes avanços no campo de estudo da genética. De fato, a identificação de um alelo mutante não funcional em conjunto com a análise cuidadosa do fenótipo apresentado constitui uma forma valiosa e eficaz de se estudar as funções dos genes. (Guénet, 2005).

1.4 MAPEAMENTO GENÉTICO

De acordo com Boyd (1998), o mapeamento genético ou posicional de um gene, também conhecido como mapeamento por recombinação ou análise de ligação, envolve a construção de mapas a partir de dados obtidos pela análise de marcadores herdados.

O mapeamento de uma nova mutação necessita da elaboração de cruzamentos que permitam observar uma segregação conjunta entre vários marcadores genéticos polimórficos e o *locus* mutado. O sucesso do mapeamento depende tanto da quantidade de marcadores disponíveis na região a ser mapeada quanto do número de indivíduos informativos existentes.

Esse tipo de abordagem ganhou um lugar de destaque nos estudos genômicos ao longo do século XX e continua sendo hoje uma ferramenta de grande importância, devido ao seu enorme valor biológico. O camundongo é o melhor sistema modelo para estudo da genética e fisiologia de mamíferos e, devido à possibilidade da realização de cruzamentos controlados e à facilidade de manipulação do seu genoma, o mapeamento genético de camundongo tem recebido enorme atenção nos últimos anos (Dietrich *et al.*, 1995).

Inicialmente, o trabalho de mapeamento era lento devido às dificuldades técnicas e biológicas para organização de cruzamentos nos quais existisse segregação de mais de um marcador visível, entretanto, no final do século XIX, a crescente descoberta de novos marcadores genéticos e a compilação das informações relativas a estes marcadores em bancos de dados *online* aceleraram os estudos de clonagem posicional e fizeram o mapeamento genético de camundongos ascender no final do século XX.

1.5 MARCADORES GENÉTICOS

A partir da descoberta de que variações na sequência de DNA poderiam ser utilizadas como marcadores genéticos para fazer os traços de herança, os geneticistas de camundongos começaram a buscar formas de identificar tais polimorfismos (Dietrich *et al.*, 1995). Neste sentido, diversos laboratórios ao redor do mundo se empenharam em

descobrir novos marcadores genéticos, ou seja, marcadores moleculares que são herdados ao longo das gerações.

Os marcadores genéticos e os mapas de ligação desenvolvidos ao longo dos últimos anos estão hoje disponíveis em bancos de dados *online*. No estudo de camundongos, podemos citar o Mouse Genome Informatics (MGI - <http://www.informatics.jax.org/>) como banco de dados *online* que disponibiliza gratuitamente informações relativas aos milhares de marcadores genéticos já estabelecidos para esta espécie.

Dentre os diversos polimorfismos genéticos que são utilizados como marcadores, podemos citar os RFLPs, SNPs e os microssatélites. Os polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs) consistem em variações genéticas (em geral, trocas de nucleotídeos, mas também deleções e inserções) que resultam em alteração de sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e geram padrões variados de bandas. Desde a sua descoberta, os RFLPs se mostraram abundantes no genoma e aceleraram o mapeamento de vários genes.

Os SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) como o nome indica, envolvem a mudança em um único nucleotídeo, geralmente por uma substituição, mas também por deleção ou inserção. Já foram identificados mais de 10 milhões de SNPs distribuídos no genoma murino (MGI, 24/Jun/2012), podendo assim fornecer marcadores extremamente úteis para o mapeamento à alta resolução e também para os estudos de associação à procura de loci que conferem susceptibilidade a doenças comuns.

Os microssatélites são sequências de di, tri ou tetra nucleotídeos repetidas em tandem que apresentam variações de comprimento entre indivíduos e, portanto, são também chamados de polimorfismos de comprimento de sequência simples (SSLPs) ou *short tandem repeats* (STRs). O comprimento da repetição entre indivíduos e entre espécies aparentemente varia devido ao crossing over desigual e à derrapagem da DNA polimerase durante a replicação (Dietrich *et al.*, 1995).

A maioria dos microssatélites de camundongos foi desenvolvida com o auxílio do Whitehead Institute/ Massachusetts Institute of Technology (Whitehead/MIT) Center for Genome Research, dentro do Projeto Genoma Humano dos Estados Unidos (Dietrich *et al.*, 1995). Inicialmente, foram desenvolvidos como marcadores genéticos para humanos por Weber e May, mas começaram a ser utilizados em camundongos por Todd e colaboradores (Dietrich *et al.*, 1995).

Embora não apresentem o interesse de herança dos genes, estes marcadores tornam possível traçar herdabilidade em qualquer cruzamento (Dietrich *et al.*, 1995) e são altamente informativos em estudos de população, análises de pedigree e investigações forenses, pois são muito abundantes (existem mais de 100.000 microssatélites dispersos aleatoriamente ao longo do genoma de mamíferos), facilmente genotipados por PCR, polimórficos, codominantes e multialélicos (O'Brien, 1999).

1.6 AGENTES MUTAGÊNICOS

Uma vez que a taxa de aparecimento de mutações espontâneas no genoma é muito baixa, em torno de 5×10^{-6} por *locus* (Cordes, 2005), a estratégia de indução de mutações por agentes químicos ou radiação se mostra extremamente importante para a obtenção de um grande número de mutações para serem estudadas.

Mutagênicos conhecidos há muito tempo, os raios-X e o agente químico clorambucil já foram muito utilizados para induzir mutações para estudo e, de fato, são capazes de aumentar em mais de 20 a 1000 vezes a taxa de ocorrência de mutações. Entretanto, estes mutágenos causam uma grande variedade de rearranjos cromossômicos tais como inversões, deleções e translocações e, normalmente, afetam vários genes inviabilizando, assim, a clonagem posicional (Cordes, 2005).

Nos anos 1970, pesquisadores do Oak Ridge National Laboratory começaram a investigar o uso do mutágeno químico N-etil-N-nitrosourea (ENU) para a produção de novas mutações em camundongos e descobriram que este agente induz mutações pontuais nas células-tronco espermatogoniais dos animais tratados com uma frequência de aproximadamente 150×10^{-5} por *locus* (Cordes, 2005).

O ENU é um agente alquilante que causa, primariamente, mutações de ponto aleatórias por transferência direta de um grupo etil para o ácido nucleico. Este dano inicial gerado na base nitrogenada provoca um mal-pareamento entre as fitas de DNA e, caso não seja reconhecido pelo sistema de reparo, se fixará na forma de mutação no processo de replicação seguinte (Cordes, 2005).

Este agente não é somente mutagênico, mas também tóxico e, por esta razão, os tratamentos devem equacionar dose e tempo de exposição de forma a alcançar um equilíbrio entre a alta eficiência de mutação e a baixa toxicidade. O ENU é também um

potente carcinógeno, podendo originar vários tipos de tumores em camundongos (Flaherty, 1998).

Quando administrados em grandes doses, os agentes químicos podem causar esterilidade permanente. É de extrema importância que a dose e a frequência com que estes agentes são administrados sejam bem controladas, de forma a potencializar sua capacidade mutagênica sem causar infertilidade no animal (Flaherty, 1998).

O fato de causar principalmente mutações pontuais, ser de fácil administração e induzir uma esterilidade apenas temporária nos machos tratados (cerca de sete meses), torna o ENU um agente mutagênico especialmente interessante para estudos de clonagem posicional.

1.7 O CAMUNDONGO COMO ORGANISMO MODELO – INDUÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES

O recente avanço nas técnicas de sequenciamento genômico possibilitou um grande acúmulo de informações relativas à estrutura e organização do genoma de diversos organismos. Entretanto, apesar das análises computacionais serem de grande valia para a identificação gênica e de outras importantes regiões genômicas, ela não é capaz de revelar muito sobre suas funções. A partir dessa premissa, teve início um projeto denominado *O camundongo como organismo modelo – Indução de novas mutações*, desenvolvido por uma parceria entre o Laboratório de Genética Animal e Humana (LGAH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e o Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Com o intuito de gerar modelos animais para patologias genéticas humanas, o projeto objetivou a indução de diferentes mutações no genoma de camundongos e a seleção de fenótipos de interesse para mapeamento genético e clonagem posicional.

Neste projeto, o N-etil-N-nitrosourea (ENU) foi escolhido por ser de fácil administração e por gerar, principalmente, mutações pontuais aleatórias nas células-tronco espermatogoniais dos animais tratados. A linhagem escolhida foi a BALB/c, uma vez que tolera o tratamento com ENU melhor do que outras linhagens, e já foi utilizada com sucesso em diversos experimentos de mutagênese (Massironi, 2006). Além disso, se trata de uma linhagem fenotipicamente bem caracterizada e para a qual existem milhares de polimorfismos genéticos já descritos, o que facilita os estudos de ligação.

Camundongos BALB/c tratados com ENU foram cruzados com fêmeas da mesma linhagem tão logo se recuperaram do período de infertilidade de até 7 meses provocado pela ação do mutágeno. A prole (geração G1) foi analisada para a detecção de fenótipos divergentes do fenótipo clássico e a identificação de mutações recessivas foi feita a partir de um protocolo de cruzamentos: machos da geração G1 foram cruzados com fêmeas BALB/c normais e cruzados novamente com quatro fêmeas da prole gerada (geração G2). Pelo menos duas progênes das fêmeas da geração G2 foram cruzadas com o camundongo pai, da geração G1, e em seguida, foram estudadas as ninhadas G3 que alcançaram o número mínimo de 10 filhotes (Massironi, 2006) (Figura 3). Este protocolo foi realizado para otimizar a detecção da maioria das mutações recessivas induzidas pelo ENU, dado que facilita o aparecimento dos alelos mutados em homozigose.

Os camundongos que apresentaram fenótipo alterado foram selecionados para estudo e caracterizados do ponto de vista fenotípico, levando-se em consideração aspectos morfológicos, histopatológicos e de comportamento (Massironi, 2006). Neste trabalho foram isolados 11 animais mutantes, dentre eles o *fraqueza*.

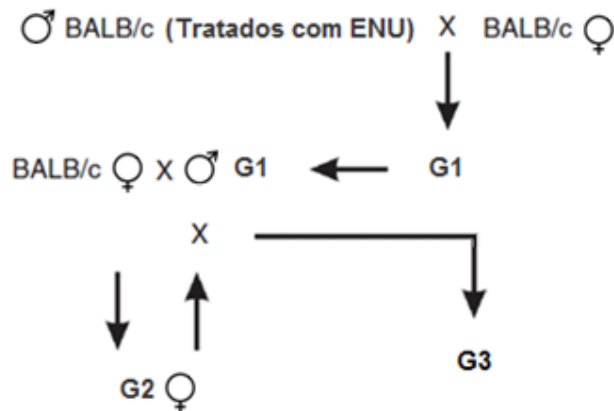


Figura 3: Esquema de cruzamento utilizado para o isolamento de mutações de herança recessiva em camundongos tratados com ENU. Na geração G1 é possível observar fenótipos relacionados a mutações com herança dominante, enquanto na geração G3 mutações com heranças recessivas são isoladas.

1.8 CRUZAMENTOS PARA OBTENÇÃO DE ANIMAIS PARA O MAPEAMENTO

O mapeamento de genes identificados apenas pelo fenótipo requer o estabelecimento de vários cruzamentos em que o fenótipo em questão segregue com o maior número possível de polimorfismos detectáveis ao nível de DNA (Massironi, 2006). Uma vez que a mutação *fraqueza* foi induzida em um *background* BALB/c, foi utilizada a linhagem C57BL/6 para a realização dos cruzamentos destinados ao mapeamento genético. Esta linhagem foi escolhida por ser uma linhagem filogeneticamente distante da BALB/c, o que aumenta a distribuição e a densidade de polimorfismos de todos os tipos ao longo do genoma (Massironi *et al.*, 2006) (Figura 4).

Basicamente existem dois tipos de cruzamentos, o retrocruzamento e o intercruzamento (GREEN, 1995), os quais são escolhidos, na maioria das vezes, por razões práticas.

Naqueles casos em que os animais homozigotos para determinada mutação se mostravam inviáveis ou inférteis, como o *fraqueza*, optou-se pelo intercruzamento de acordo com o seguinte protocolo: animais heterozigotos para o alelo mutante foram cruzados com fêmeas da linhagem C57BL/6 e a progênie F1 resultante foi intercruzada aleatoriamente. Apenas as progênies na qual o fenótipo foi encontrado segregando em F2 (aproximadamente 25%) foram selecionadas para a genotipagem (Figura 5). Neste tipo de cruzamento, apenas os animais com o fenótipo mutante são considerados, porém cada um deles possui duas meioses informativas.

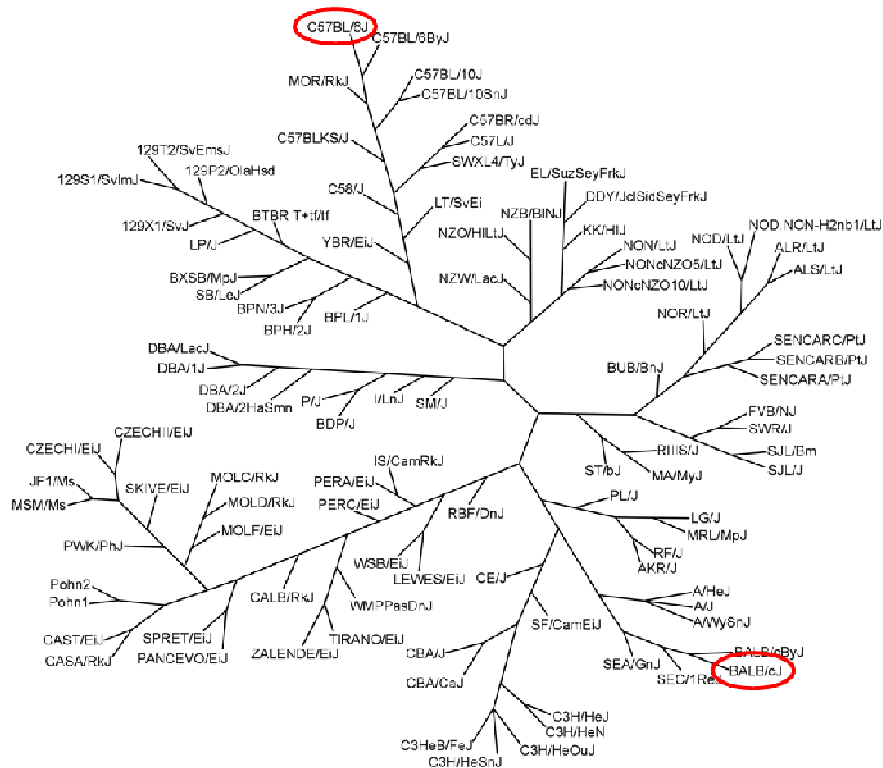


Figura 4: Árvore filogenética das linhagens isogênicas estabelecida a partir da análise de SNPs. As marcações nas figuras evidenciam a distância entre as duas linhagens utilizadas no cruzamento para a geração de polimorfismos. (Petkov *et al.* 2004)

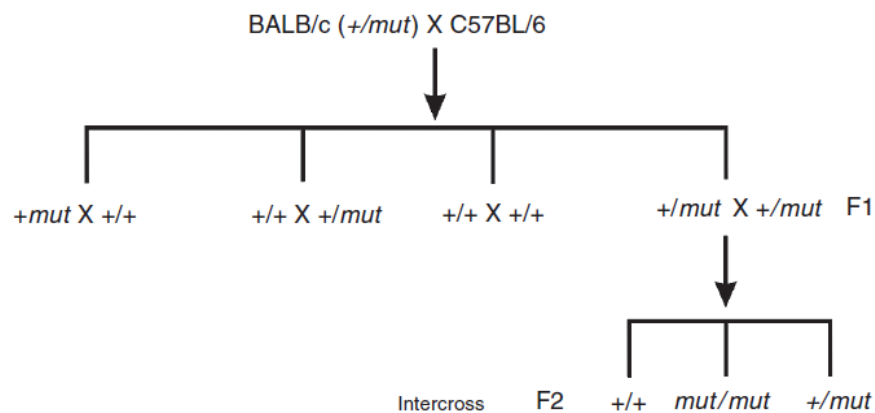


Figura 5: Esquema de cruzamento utilizado para a obtenção de camundongos *fraqueza* para o mapeamento. (Massironi *et al.*, 2006)

1.9 A MUTAÇÃO *FRAQUEZA*

A mutação *fraqueza* (*frqz*) é herdada de forma autossômica recessiva e deletéria, sendo que seu caráter monogênico foi determinado pela observação do protocolo de cruzamentos realizado. O fenótipo torna-se visível apenas na segunda semana após o nascimento e, a partir de então, os animais apresentam perda da força muscular (o que deu nome à mutação) e, quando suspensos pela cauda, se contorcem e contraem os membros posteriores contra o corpo (Figura 6). Os mutantes morrem entre sete e dez semanas de idade por causas ainda desconhecidas. A sobrevivência desses mutantes, entretanto, pode ser aumentada, a um máximo de 12 semanas, melhorando o ambiente da gaiola e com a oferta de água e comida no fundo, uma vez que os animais não conseguem levantar para se alimentar como os outros camundongos.

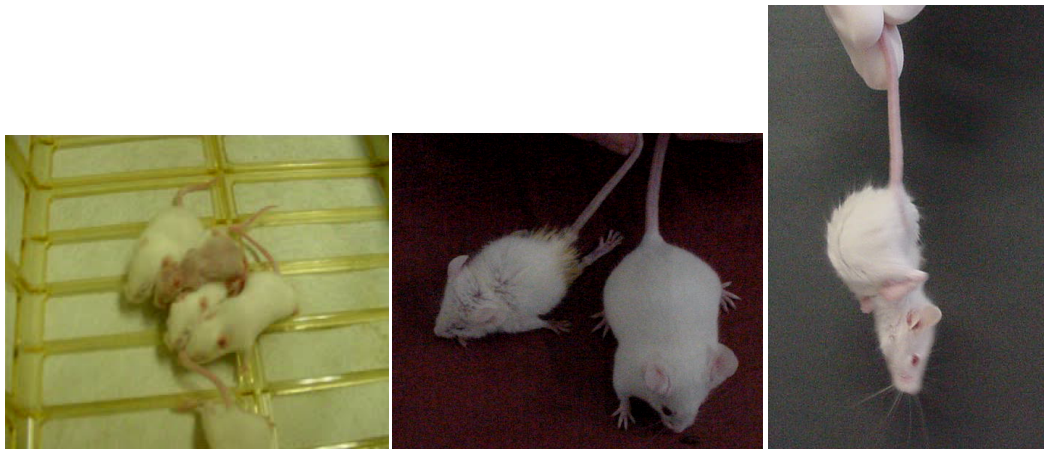


Figura 6: Aspecto comparativo entre animais controle e *fraqueza* (A) animal *fraqueza* (pelagem rarefeita) e animais normais com treze dias de idade; (B) à esquerda animal mutante *fraqueza* e à direita animal normal da mesma ninhada com cerca de quatro semanas; (C) contração dos membros posteriores contra o corpo quando suspenso pela cauda.

Sugere-se que o mutante *fraqueza* seja um modelo animal de doença neuromuscular. Doenças neurodegenerativas são um grande grupo de doenças caracterizadas pela degeneração de um subconjunto de neurônios. Suas causas são várias, desde casos com uma herança familiar definida (como doença de Huntington) até casos esporádicos com causas ainda desconhecidas (como Alzheimer e Parkinson).

Uma vez determinado o lócus alterado, será possível avaliar a sua ortologia com humano e, conseqüentemente, estabelecer um modelo de tratamento para a patologia em questão.

1.9.1 Busca do gene candidato

A segunda etapa do processo de mapeamento genético de uma mutação, estabelecendo como primeira a redução da região, consiste na identificação de genes candidatos posicionais para a mutação em estudo. Um gene candidato posicional é todo aquele que se localiza dentro do intervalo cromossômico mapeado.

Os dados relativos à localização dos genes se encontram hoje disponíveis na internet, em bancos de dados especializados. Para camundongos, o Mouse Genome Informatics apresenta a localização cromossômica de milhares de genes e marcadores genéticos.

A determinação do momento em que se deve partir para esta segunda abordagem de estudo envolve diversos fatores, tais como o tamanho da região mapeada, a disponibilidade de outros marcadores genéticos polimórficos dentro da região, o número de animais disponíveis para análise e a evidência de genes candidatos com base em registros na literatura. A escolha de genes candidatos deve levar em consideração tanto a localização do gene dentro da região mapeada, quanto as informações funcionais relacionadas aos genes, disponíveis na literatura no caso dos genes já descritos.

A partir daí, a escolha do gene candidato envolve pesquisas bibliográficas extensas acerca das funções de cada um dos genes já descritos na região, bem como da descrição de alterações fenotípicas observadas em animais mutantes para estes genes.

No mapeamento genético, cada marcador testado tem a capacidade de delimitar uma região próxima a ele, cujo tamanho é definido pelo número de animais genotipados. O mapeamento genético a média resolução da mutação *fraqueza* revelou a segregação conjunta da mutação com alguns marcadores testados, permitindo, assim, o estabelecimento de uma região em desequilíbrio de ligação. A localização muito próxima destes marcadores aos genes dystonin (Dst; Bpag1) e actin-related protein 1 homolog B (Actr1b; Arp1; β -centractin), localizados no cromossomo 1, a 12,91 e 15,38 cM, respectivamente, levou à escolha destes como candidatos para a mutação *fraqueza*.

Bpag1 foi primeiramente identificado como alvo de um dos auto-anticorpos produzidos por indivíduos que apresentavam uma doença crônica, autoimune, caracterizada pela perda da união entre a epiderme e a derme, levando ao aparecimento de lesões vesiculobolhosas na pele e mucosas, conhecida como Pênfigo Bolhoso (BP) (Stanley *et al.*, 1981). Posteriormente, verificou-se que se tratava do mesmo gene (chamado de Dst na época) em que alterações espontâneas na sua sequência codificadora levavam a uma doença neurodegenerativa característica em camundongos, de herança autossômica recessiva, conhecida como Dystonia musculorum - dt (Brown *et al.*, 1995). Animais que apresentam essa mutação desenvolvem uma diminuição progressiva da coordenação motora que se inicia na segunda semana de idade (Duchen, 1976). Uma das características fenotípicas apresentadas por camundongos homocigotos para o alelo mutante dt, é a flexão das patas contra o corpo ao serem suspensos pela cauda, diferentemente de camundongos selvagens, que estendem seus membros. Geralmente esses animais morrem após o desmame (Brown *et al.*, 1995).

Neste trabalho, o gene Dst/Bpag1 e suas isoformas serão tratados apenas como Bpag1, embora as duas nomenclaturas sejam aceitas.

O gene Bpag1 é um membro da família das proteínas Plakin (ou plaquinas) que estão interligadas no citoesqueleto e são responsáveis pela sua conexão a junção celular (Jefferson *et al.*, 2004), e possui diferentes isoformas, as quais são produzidas devido a ocorrência de splicing alternativos. Essas isoformas tecido-específicas apresentam diferentes domínios e são divididas em quatro principais, a saber: Bpag1e conhecida como isoforma pele-específica (302 kDa); Bpag1a (615 kDa) e Bpag1n como isoformas cérebro-específicas e Bpag1b isoforma músculo-específica (824 kDa) (Leung *et al.* 2001; Sawamura *et al.*, 1991). Estas diferentes isoformas são necessárias para a manutenção da integridade estrutural dos tecidos epitelial, nervoso e muscular, respectivamente (Poll *et al.*, 2005).

O gene Actr1b foi primeiramente descrito com o nome de β -contractina, por Sean Clarck e colaboradores, através da análise de bibliotecas de etiquetas de sequências expressas (EST), no ano de 1994. Àquela época, pensava-se que o cDNA isolado representaria uma isoforma da Contractina (α -contractina), um gene já descrito, com cerca de 70% de similaridade com o gene humano da Actina. Estudos posteriores demonstraram que, apesar de compartilharem 90% de identidade entre seus

aminoácidos, as duas proteínas, α e β - contractina, provinham de genes diferentes, denominados, atualmente, de Actin-related protein 1 homolog A e B (Actr1a e Actr1b).

A proteína codificada pelo gene *Actr1b* (Actr1b, 42.3 kD) constitui uma subunidade de um complexo macromolecular denominado Dinactina. Este complexo possui ao todo 10 subunidades e liga-se igualmente a microtúbulos e a proteínas motoras com funções de transporte e organização de vesículas intracelulares, denominadas dineína (dynein) (Figura 12) e cinesina (kinesin). Estas duas proteínas, juntamente com o complexo dinactina, são responsáveis pela circulação de vesículas, organelas e moléculas no interior de neurônios motores e sensitivos. (Deacon *et al.*, 2003)

A semelhança fenotípica entre os animais *fraqueza* e os camundongos distônicos, aliadas ao mapeamento da mutação *frqz* em uma região que compreende o gene codificador desta proteína, tornaram o Bpag1 um forte candidato funcional e posicional para a mutação. Além disso, a função desempenhada pelo complexo dineína-dinactina nos neurônios, o fenótipo apresentado pelas linhagens celulares com disfunções neste complexo, e a presença do gene Actr1b (uma subunidade do complexo dinactina) dentro da região mapeada também credencia este gene como um possível candidato para a mutação em estudo.

2 JUSTIFICATIVA

A utilização de modelos animais em pesquisas científicas é essencial para o entendimento dos processos biológicos e do funcionamento dos organismos vivos, bem como para a elucidação de aspectos relacionados a doenças humanas e para o desenvolvimento de medicamentos e terapias para tratamento de doenças.

Na era pós-sequenciamento, o conhecimento das sequências completas do genoma humano e do camundongo aumentou ainda mais a importância da genômica funcional, que se encarrega da elucidação dos papéis desempenhados pelos genes. A identificação de correlações entre genes e fenótipos pode fornecer modelos genéticos para patologias humanas e permite estudos aprofundados dos aspectos biológicos destas patologias, fornecendo conhecimentos transponíveis para a medicina das doenças humanas.

A mutação *fraqueza* foi selecionada para mapeamento por representar, possivelmente, um bom modelo para estudo de doenças neuromusculares. A validação desse modelo permitirá uma melhor compreensão desta classe de doenças e o enriquecimento dos bancos de dados fenotípicos e genotípicos disponíveis, inserindo novas informações, ou mesmo descrevendo novos fenótipos ainda não descritos em outros modelos.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar o os aspectos moleculares da mutação neuromuscular *fraqueza* correlacionando-os com seus aspectos fenotípicos.

Objetivos específicos:

- Realizar o mapeamento à média resolução;
- Selecionar genes candidatos ao fenótipo *fraqueza*;
- Comparar a região encontrada com a região ortóloga no cromossomo humano;
- Identificar a mutação responsável pelo fenótipo e avaliar suas consequências moleculares;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS PARA O MAPEAMENTO

A partir dos cruzamentos descritos, foram selecionados 52 animais homocigotos para o locus *fraqueza* para o mapeamento genético. Embora este seja um número relativamente pequeno para o mapeamento por análise de ligação, vale ressaltar que, devido ao protocolo de intercruzamento utilizado, cada camundongo em F2 apresenta duas meioses informativas, totalizando 104 meioses analisadas, número suficiente para o mapeamento à média resolução.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA dos 52 camundongos utilizados no mapeamento, amostras das caudas foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em papel manteiga e posteriormente mergulhadas em tampão de lise (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0; 0,5% SDS) e proteinase K, e incubadas em banho Maria à 65°C por 1 hora. Após centrifugação por 20 minutos a 11.000 RPM, o sobrenadante foi recolhido. O DNA precipitado do sobrenadante foi colocado para secar a temperatura ambiente e posteriormente diluído em tampão TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8.0). Para cada amostra de DNA, a concentração e a pureza foram determinadas pelo nível de absorvância por espectrofotometria sob um comprimento de onda de 260 nm. Cada solução estoque foi diluída em água milliQ para uma concentração final de 50 ng/ μ L.

4.3 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Cinco animais de cada grupo (controle e *fraqueza*) foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletadas amostras de tecidos nervoso (cérebro), muscular (patas posteriores) e epitelial (dorso). O material foi estocado em tubos de 2mL e congelado em nitrogênio líquido até o processo de extração de RNA. Fígado e

baço de todos os animais utilizados na extração de RNA foram também retirados e estocados para um potencial uso futuro.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras dos tecidos de interesse foram colocadas em tubos de 2mL contendo 1,0 mL de TRizol[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil) para cada 100 mg de tecido. A solução foi então homogeneizada na frequência mínima (Polytron PT10/35-Brinkmann, Westbury, NY, USA) em intervalos com tempo máximo de 10 segundos de homogeneização para 10 segundos de descanso. Posteriormente, a mistura ficou em temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio PA, agitado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi centrifugado a 12000 rcf (g) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 500 µL de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 10 minutos a temperatura ambiente. Nova centrifugação foi feita a 12000 rcf por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e ao precipitado foi adicionado 0,8mL de etanol 80% gelado, misturado por inversão e centrifugado a 7500 rcf durante 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado ficou secando por aproximadamente 20 a 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 20µL de água ultra pura[®] (Qiagen, São Paulo, Brasil) e misturado até a completa diluição do precipitado antes de ser quantificad. O RNA total foi quantificado utilizando NanoDrop ND-1000v3 1.0[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e todas as amostras utilizadas apresentaram razões 260/230 e 260/280nm maiores que 1.7. A integridade foi verificada em gel de agarose 1% corado com 25µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TAE 1x (Ácido acético glacial 20mM, Tris 40mM, EDTA 1mM) onde foi possível observar a presença das bandas ribossomais 28S e 18S. As condições da corrida foram 300mA, 90V aproximadamente 30 minutos.

4.5 SÍNTESE DE cDNA

A partir do RNA total, utilizou-se 4µg de amostra em um volume final de 20µL para a reação de confecção do cDNA. Foi utilizado *Random hexamers* como iniciador (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e a enzima SuperScriptIII® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante.

4.6 MAPEAMENTO

O mapeamento genético da mutação *fraqueza* foi realizado por análise de ligação, observando o desequilíbrio de ligação entre marcadores microssatélites polimórficos entre as duas linhagens em estudo (BALB/c e C57BL/6) e o locus mutado em questão.

Os marcadores microssatélites polimórficos para as duas linhagens cruzadas (BALB/c e C57BL/6) foram selecionados no banco de dados *online* Mouse Genome Informatics (MGI - <http://www.informatics.jax.org/>), de onde foram retiradas as seqüências dos iniciadores (*primers*) a serem utilizados para amplificação por (PCR). Os iniciadores utilizados no mapeamento genético foram sintetizados pela empresa Prodimol.

A mutação localizada no cromossomo 1, foi inicialmente mapeada entre os marcadores D1mit3, localizado a 11,0 cM, e D1mit504, localizado a 81,0 cM (Massironi, 2006). A partir desta delimitação inicial, foram selecionados marcadores situados dentro desta região para refinar o mapeamento. Os marcadores utilizados encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Lista de marcadores microssatélites utilizados para a análise de ligação

Marcador	Localização		Polimorfismo	
	cM	Mpb	BALB/c	C57BL/6
D1mit294	2,61	11,73	212 pb	150 pb
D1mit430	4,31	14,27	124 pb	114 pb
D1mit3	6,27	19,80	185 pb	160 pb
D1mit231	6,50	20,86	219 pb	267 pb
D1mit373	10,92	26,53	130 pb	124 pb
D1mit70	12,43	32,73	190 pb	176 pb
D1mit411	12,62	33,27	96 pb	112 pb
D1mit171	15,40	36,80	148 pb	158 pb
D1mit320	18,64	40,13	94 pb	90 pb
D1mit18	26,99	52,47	170 pb	160 pb
D1mit302	30,05	59,52	162 pb	140 pb
D1mit504	69,95	16,39	196 pb	148 pb
D1mit403	81,63	17,75	147 pb	125 pb
rs4222277	15,46	37,46	-	-

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A amplificação dos marcadores microssatélites selecionados foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com o protocolo padrão estabelecido no Laboratório de Genética Animal e Humana (Tabela 2). A Temperatura de anelamento utilizada foi prioritariamente de acordo com as indicações da empresa fornecedora dos iniciadores, porém, em alguns casos, para aumentar a estrincência da reação evitando a amplificação de fragmentos espúrios, a temperatura foi alterada, assim como a concentração de cloreto de magnésio e iniciadores.

Tabela 2 – Protocolo para reação de PCR

Reagentes	Concentração solução estoque	Concentração para 1 reação	Volume da solução estoque para 1 tubo (µL)
H ₂ O	-	-	20,1
Tampão PCR 10X	10X	1X	2,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
Iniciadores (F+R)	50 mM	0,25 mM	0,25
Taq Polimerase	5U / µL	0,7 U	0,15

DNA : 0,5 µL de solução 100 ng/µL Volume final da reação = 25 µL

Para o mapeamento, todos os animais foram genotipados com os marcadores listados na Tabela 1. Para tanto, foram realizadas reações de PCR das amostras parentais (BALB/c e C57BL/6) e dos animais fenotipicamente caracterizados como *fraqueza*. Além destes, uma amostra equivalente a um “heterozigoto forçado”, composta de uma mistura, em proporções idênticas, das amostras de DNA de camundongos BALB/c e C57BL/6 também foi sintetizada para cada marcador. Esta estratégia permite verificar se determinado iniciador tem uma preferência na amplificação do DNA de determinada linhagem ou se ele é capaz de discriminar um indivíduo heterozigoto.

As reações foram efetuadas em termocicladores Peltier Thermal Cycler MJ96+ e MJ96G (Termocicladores Biocycler). Os programas utilizados obedeceram às seguintes temperaturas: Desnaturação inicial – 94°C durante 1 minuto; Ciclo – 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos (Desnaturação), 52°C - 57°C durante 40 segundos (Anelamento), 72°C durante 30 segundos (Extensão); e Fase final – 72°C durante 3 minutos (Extensão final).

4.8 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel para a visualização dos polimorfismos. Os fragmentos amplificados apresentavam tamanhos variando entre 100 e 300pb, e a análise por eletroforese foi realizada em gel de agarose ou poliacrilamida, de acordo com o tamanho do polimorfismo entre as duas linhagens parentais. Polimorfismos maiores ou iguais a 10pb foram analisados em gel de agarose (Agargen – agarose padrão) 1, 2 ou 3%, e polimorfismos menores que 10pb foram analisados em gel de poliacrilamida (Acrilamida VETEC e Bis-acrilamida VETEC) 8 ou 12,5%.

Os géis de agarose foram aplicados em cubas horizontais de eletroforese com tampão TBE 1x (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2 mM). O tempo de corrida e a diferença de potencial aplicada foram estabelecidos levando-se em conta a concentração do gel, o tamanho do amplicon e o polimorfismo do marcador testado. Os géis de poliacrilamida foram aplicados em cubas verticais de eletroforese com tampão TBE 1x de acordo com o protocolo padrão estabelecido no Laboratório de Genética Animal e Humana. Foi utilizada uma diferença de potencial de 150 V em período *overnight*. Os géis de agarose foram corados com Brometo de Etídio na concentração de

10 mg/mL, sendo utilizado, aproximadamente, 2,0 µL da solução de brometo para cada 100 mL de gel. A revelação dos géis foi feita por exposição à radiação ultravioleta. A revelação dos géis de poliacrilamida foi feita pela técnica de coloração por Nitrato de prata, seguindo protocolo estabelecido no Laboratório de Genética Animal e Humano (LGAH).

4.9 SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA A MUTAÇÃO

A seleção dos genes candidatos dentro da região mapeada foi realizada de acordo com um protocolo de prioridades. Todos os genes presentes na região mapeada foram estudados através de um extenso levantamento bibliográfico e classificados em classes distintas dependendo da importância de sua função para a contribuição no fenótipo *fraqueza*.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

A análise de ligação permitiu a escolha de dois genes candidatos para o locus *fraqueza*, Bpag1 e Actr1b. A partir daí iniciou-se a análise da sequência do gene candidato através do sequenciamento do seu cDNA com o intuito de localizar a mutação pontual.

4.11 DESENHO DOS INICIADORES

As sequências de cDNA referentes aos genes Bpag1 (NM_133833.2; MN_134448.2) e Actr1b (NM_146107.2) utilizadas para a confecção dos iniciadores foram retiradas dos bancos de dados públicos *online* Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) e GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Os iniciadores foram desenhados manualmente ou utilizando-se o programa Primer 3 Input (versão 0. 4. 0 – <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Para os iniciadores, os principais parâmetros levados em consideração foram o tamanho dos fragmentos,

variando próximo a 500 pb cada um; tamanho dos iniciadores, estabelecido entre 19 e 25 pb; T_m, tendo sido escolhido 54°C como temperatura mínima e 57°C como temperatura máxima.

A qualidade dos iniciadores foi testada utilizando-se o software NetPrimer (Premier Biosoft International - <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>). Os iniciadores foram testados individualmente e aos pares quanto à formação de homodímeros, heterodímeros e grampos (*hairpins*) e quanto à presença de sequências repetitivas e palindrômicas.

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT), comercializados via Prodimol e Bioneer, e estão listados no anexo.

4.12 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS

A amplificação do material genético foi realizada por PCR seguindo o mesmo protocolo estabelecido para a amplificação dos marcadores moleculares utilizados para o mapeamento.

4.13 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS FRAGMENTOS EM GEL

Os produtos de amplificação por PCR foram testados em gel de agarose (Agargen – agarose padrão) 1%, em TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2 mM), para verificação da qualidade de amplificação e validação do fragmento amplificado de acordo com o tamanho previsto. O gel foi corado com Brometo de Etídio (na concentração 10 mg/mL, 1,0 µL para cada 100,0 mL de gel). Os fragmentos que apresentaram bandas espúrias, ou seja, aquelas além das de interesse, foram submetidas à purificação por dois métodos diferentes: polietilenoglicol (PEG 8000 20% NaCl 2,5 M) ou purificação em coluna por gel.

4.14 PURIFICAÇÃO POR PEG

As amostras que não apresentaram qualidade satisfatória de amplificação tendo bandas espúrias de tamanhos inferiores à banda de interesse foram purificadas pela técnica do Polietilenoglicol (PEG 8000 20% NaCl 2,5 M).

Após o processo de purificação as amostras foram testadas novamente em gel de agarose (Agargen – agarose padrão) 1%, em TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2 mM), corado com Brometo de Etídio, para verificação da qualidade do produto.

4.15 PURIFICAÇÃO POR COLUNA

As amostras que apresentaram bandas espúrias maiores ou de tamanho semelhante (cerca de 80%) à banda de interesse foram purificadas por meio de coluna através do *kit* Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com protocolo do fabricante.

4.16 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento dos amplicons foi realizado em sequenciador ABI, modelo 3130 (Applied Biosystems), utilizando o Kit *Big Dye Terminator v3.01*, segundo protocolo do fabricante otimizado. (Tabela 4).

Tabela 3 – Reação de sequenciamento padrão para ABI 3130

Reagente	Concentração	Volume em µl
Big Dye v. 3.01	Padrão kit	1,0
Tampão 10X	Padrão kit	1,0
Primer	0,8 pM/µL	2,0
Produto PCR	3 - 10 ng/µL	1,0
H2O	-	5,0

4.17 PRECIPITAÇÃO E LAVAGEM

A precipitação da reação de sequenciamento para remoção dos resíduos de iniciadores, reagentes e moléculas fluorescentes não incorporadas foi feita por etapas de centrifugação utilizando EDTA (125 mM), Acetato de Sódio (3M) e Etanol (100% e 70%), de acordo com protocolo padronizado pelo Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares.

4.18 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A qualidade das sequências obtidas foi verificada utilizando o programa Sequence Scanner (*v.1.0*) e posteriormente alinhadas à sequência referência utilizando-se o programa Codon Code Aligner (*v.2.0.6*, versão demonstrativa).

5 RESULTADOS

A análise de ligação foi realizada através da genotipagem de 52 animais *frqz/frqz* para 13 marcadores microssatélites e um SNP, todos polimórficos entre as linhagens BALB/c e C57BL/6.

Inicialmente a mutação foi localizada no cromossomo 1 entre os marcadores D1mit3, localizado a 11,0 cM, e D1mit504, localizado a 81,0 cM (Massironi, 2006). Após a identificação do cromossomo, o mapeamento foi refinado através dos demais marcadores selecionados (Tabela 1).

O marcador D1mit171, localizado a 20,2 cM, não apresentou polimorfismo evidente entre os animais parentais (BALB/c e C57BL/6), mesmo sendo identificada uma diferença de 10pb entre eles (BALB/c – 148pb e C57BL/6 – 158pb) no MGI.

Os demais marcadores testados (D1mit294, D1mit430, D1mit3, D1mit231, D1mit373, D1mit320, D1mit18, D1mit302, D1mit504 e D1mit403) forneceram informações úteis para a construção do haplótipo. Neste sentido, com a genotipagem dos 52 animais, a região de mapa foi reduzida a 7,72 cM sendo encontrados sete recombinantes para o marcador D1mit320, localizado a 18,64 cM, e dois recombinantes para o marcador D1mit373, localizado a 10,92 cM, mostrando assim uma localização centromérica para o locus mutado (Figura 7).

Os marcadores rs4222277, D1mit70 e D1mit411 localizados, respectivamente, a 15,46, 17,8, 18,5 cM, não foram válidos para a redução da região, já que nenhuma recombinação foi verificada. Por outro lado, esta ausência de recombinação para as 104 meioses analisadas fornece a evidência de uma forte ligação destes marcadores ao o locus mutado.

A região mapeada possui ortologia com os cromossomos 2, 6 e 13 humanos.

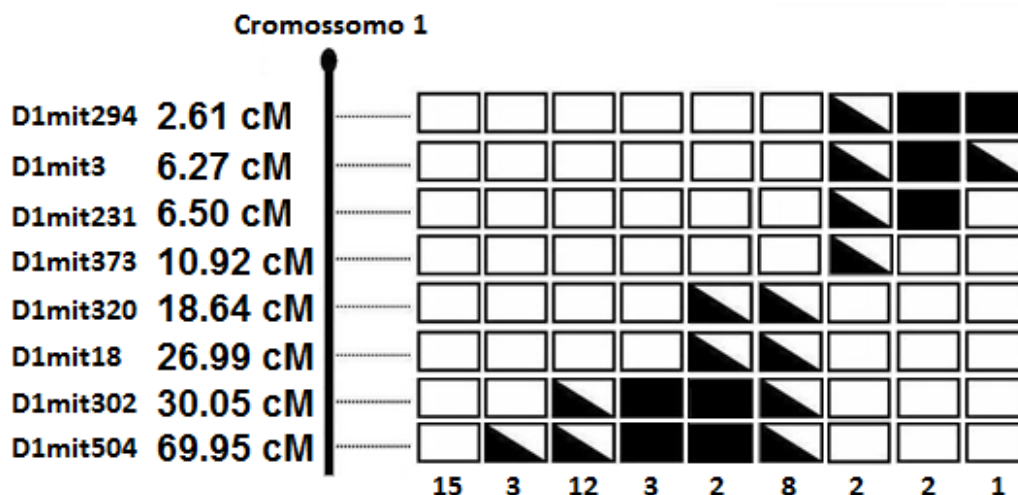


Figura 7: Haplótipo resumido representando animais testados. Retângulos brancos indicam homozigose para BALB/c e retângulos preenchidos indicam homozigose para C57BL/6. Os retângulos semi-preenchidos representam camundongos heterozigotos para o marcador. Os números abaixo de cada coluna indicam a quantidade de animais com o respectivo haplótipo.

Uma vez estabelecida a região de mapa, teve início a análise dos genes presentes nesta região cromossômica com o objetivo de selecionar genes candidatos funcionais para a mutação *fraqueza*. Uma tabela de prioridades com quatro categorias foi construída levando em consideração a função de cada gene e sua potencial participação para a construção do fenótipo dos animais *fraqueza*. Neste protocolo, os genes candidatos foram classificados através de um padrão de pontuação de acordo com o seu nível de relevância. Genes com expressão comprovada em células musculares ou neurônios e que codificam proteínas estruturais ou integrantes de processos bioquímicos musculares ou neurais foram considerados como “Candidato funcional (símbolo, ++)”. Genes codificadores de fatores de transcrição ou genes envolvidos com os processos de sinalização, diferenciação ou crescimento celular e indiretamente relacionados aos tecidos nervoso ou muscular foram considerados como “Candidato funcional não excluído (símbolo, +)”. Genes ribossomais, relacionados à resposta imune, memória, reparo de mutações, maturação visual, olfatória e espermatogonial foram classificados como “Excluído como candidato funcional (símbolo, 0)”. Apenas o gene *Dst/Bpag1* foi classificado como “Forte candidato funcional (símbolo, +++)” (Tabela 4).

Tabela 4 – Tabela de prioridades: possíveis genes candidatos funcionais

10,92cM D1Mit 373					
cM	Símbolo	Função	Fenótipo em modelos animais	Score	REF.
10.98	4931408C20Rik	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
10.98	Gm11161*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
10.98	Gm17684*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
10.98	Gm19543*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
10.98	Gm597*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.43	Gm19292*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.44	Gm9898*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.45	Phf3	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.47	Ptp4a1	The protein encoded by this gene is a member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family. PTPs are known to be signaling molecules that regulate a variety of cellular processes including cell growth, differentiation, the mitotic cycle, and oncogenic transformation.	-	+	69; 75
11.48	Gm5698*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.49	Gm5699*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.52	4931428L18Rik	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
11.53	Lgsn	This gene encodes a protein with similarity to the GS I members of the glutamine synthetase superfamily. The encoded protein is referred to as a pseudo-glutamine synthetase because it has no glutamine synthesis activity and may function as a chaperone protein. This protein is localized to the lens and may be associated with cataract disease.	-	0	69; 75
11.86	Khdrbs2	RNA-binding protein that plays a role in the regulation of alternative splicing and influences mRNA splice site selection and exon inclusion.	-	0	12;69;75; 89
12.43	Gm5415*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
12.43	Gm9839*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
12.70	Prim2	Primase synthesizes small RNA primers for the Okazaki fragments made during discontinuous	-	0	69; 75

		DNA replication			
12.80	Rab23	It may be involved in small GTPase mediated signal transduction and intracellular protein transportation.	Mice homozygous for a spontaneous allele show neural tube defects, exencephaly, spinal cord and dorsal root ganglia anomalies, malformed eyes and defects in the axial skeleton and developing limbs. Mice homozygous for an ENU-induced allele die in utero with exencephaly, polydactyly and eye defects.	0	69;33
12.81	Zfp451	DNA binding, regulation of transcription	-	0	69
12.81	Bag2	BAG proteins compete with Hip for binding to the Hsc70/Hsp70 ATPase domain and promote substrate release. All 3 BAG proteins bind with high affinity to the ATPase domain of Hsc70 and inhibit its chaperone activity in a Hip-repressible manner.	-	0	69;75
12.85	Bend6	Proteína não descrita/hipotética	-		69
12.91	Dst	This gene encodes a member of the plakin protein family of adhesion junction plaque proteins. Multiple alternatively spliced transcript variants encoding distinct isoforms have been found for this gene. It has been reported that some isoforms are expressed in neural and muscle tissue, anchoring neural intermediate filaments to the actin cytoskeleton, and some isoforms are expressed in epithelial tissue, anchoring keratin-containing intermediate filaments to hemidesmosomes.	Mutations in this gene produce peripheral nervous system demyelination resulting in impaired muscle function and shorter lifespan.	+++	56;69
13.14	Gm11158*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
13.22	Ccdc115	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
13.22	Imp4	The protein encoded by this gene is a component of the 60-80S U3 small nucleolar ribonucleoprotein (U3 snoRNP). Required for the early cleavages during pre-18S ribosomal RNA processing.	-	+	69;75;61
13.25	Ptpn18	The protein encoded by this gene is a member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family. PTPs are known to be signaling molecules that regulate a variety of cellular processes including cell growth, differentiation, the mitotic cycle, and oncogenic transformation.	-	+	69;75
13.29	Prss39*	The protein encoded by this gene may play a role in acrosomal proteins that act on the sperm/egg interaction.	-	0	69;51
13.34	Plekhb2	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69;
13.34	Prss40	The protein encoded by this gene may play a role in acrosomal proteins that act on the sperm/egg interaction.	-	0	69;51
13.34	Fam123c	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69

13.34	1700101119Rik	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
13.34	Arhgef4	Rho GTPases play a fundamental role in numerous cellular processes that are initiated by extracellular stimuli that work through G protein coupled receptors. The encoded protein may form complex with G proteins and stimulate Rho-dependent signals.	Mice homozygous for a knock-out allele exhibit decreased angiogenesis, vascular endothelial cell migration, tumor growth, and tumor vascularization.	0	47;69
13.34	Cfc1	This gene encodes a member of the epidermal growth factor (EGF)- Cripto, Fr-1, and Cryptic (CFC) family, which are involved in signalling during embryonic development. The protein encoded by this gene is necessary for patterning the left-right embryonic axis.	Targeted null mutations of this gene result in left-right laterality defects, including randomization of abdominal situs, asplenia or severe hyposplenia, pulmonary right isomerism, randomized embryo turning and cardiac looping, and postnatal death due to complex cardiac malformations.	0	69;93
13.34	Fam168b	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.15	Uggt1	Uggt1 glucosylates misfolded proteins, retaining them in the ER until they are correctly folded or transferring them to degradation pathways	-	0	52;69;75
15.15	Hs6st1	The protein encoded by this gene is a member of the heparan sulfate biosynthetic enzyme family. This enzyme is a type II integral membrane protein and is responsible for 6-O-sulfation of heparan sulfate.	Mice homozygous for a null allele show prenatal loss, stunted growth, dilated alveoli and lower postweaning survival. Homozygotes for another null allele show additional defects in placenta, eye, phalanx and tarsus morphology. Homozygotes for a gene trap allele show altered retinal axon guidance.	0	69;80
15.18	Neurl3	In vitro, generates polyubiquitin chains via non-canonical lysine residues suggesting that it is not involved in tagging substrates for proteasomal degradation	-	0	61;69;89
15.2	Arid5a	Members of the ARID protein family, including ARID5A, have diverse functions but all appear to play important roles in development, tissue-specific gene expression, and regulation of cell growth (Patsialou et al., 2005	-	+	69;75;78
15.22	Kansl3	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.26	Fer1l5	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.26	Lman2	This gene encodes a type I transmembrane lectin that shuttles between the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and the plasma membrane. The encoded protein binds high mannose type glycoproteins and may facilitate their sorting, trafficking and quality control.	-	+	69; 75
15.28	Cnnm4	This gene encodes a member of the ancient conserved domain containing protein family. Members of this protein family contain a cyclin box motif and have structural similarity to the cyclins. The encoded protein may play a role in metal ion transport. Mutations in	-	0	61;69;75; 77

		ortholog gene <i>CNNM4</i> are associated with Jallili syndrome which consists of cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta.			
15.30	<i>Cnnm3</i>	Probable metal transporter (By similarity)	-	**	61;69
15.31	<i>Ankrd23</i>	This gene is a member of the muscle ankyrin repeat protein (MARF) family and encodes a protein with four tandem ankyrin-like repeats. The protein is localized to the nucleus, functioning as a transcriptional regulator	Mice muscles have a slower fiber type distribution but no differences in muscle fiber size. Single KO fibers were less stiff, tended to have longer resting sarcomere lengths	++	69;3
15.32	<i>Sema4c</i>	cerebellar development, myogenic differentiation, neural tube closure	-	+	62;69;75
15.32	<i>Ankrd39</i>	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.33	<i>Fam178b</i>	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.38	<i>Actr1b</i>	This gene encodes a 42.3 kD subunit of dynactin, a macromolecular complex consisting of 10 subunits ranging in size from 22 to 170 kD. Dynactin binds to both microtubules and cytoplasmic dynein and is involved in a diverse array of cellular functions, including ER-to-Golgi transport, the centripetal movement of lysosomes and endosomes, spindle formation, chromosome movement, nuclear positioning, and axonogenesis.	-	++	69; 75
15.38	<i>Cox5b</i>	This gene encodes the nuclear-encoded subunit Vb of the mitochondrial respiratory chain enzyme	-	0	69; 75
15.41	<i>Zap70</i>	T-cell development and lymphocyte activation	Immunodeficiency disease characterized by a selective absence of CD8-positive T-cells	+	68;69;75
15.42	<i>Tmem131</i>	The protein encoded by this gene may play a role in the immune response to viral infection (by similarity)	-	0	61;69;89
15.46	<i>Vwa3b</i>	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.46	<i>Unc50</i>	May be involved in cell surface expression of neuronal nicotinic receptors. Binds RNA (by similarity)	-	**	61;69;89
15.46	<i>Mgat4a</i>	This gene encodes a key glycosyltransferase that regulates the formation of tri- and multiantennary branching structures in the Golgi apparatus. The encoded protein may play a role in regulating the availability of serum glycoproteins, oncogenesis, and differentiation.	Mice homozygous for a knock-out allele show defects in glucose-stimulated insulin secretion, impaired cellular glucose import, increased susceptibility to weight gain, hyperglycemia, impaired glucose tolerance, insulin resistance, high free fatty acid and triglyceride levels, and hepatic steatosis.	0	55;61;69
15.46	<i>6330578E17Rik</i>	This gene encodes an ortholog of yeast Pet191, which in yeast is a subunit of a large oligomeric complex associated with the mitochondrial inner membrane, and required for the assembly of the cytochrome c oxidase complex.	-	+	69; 75

15.46	Cnga3	This gene encodes a member of the cyclic nucleotide-gated cation channel protein family which is required for normal vision and olfactory signal transduction.	Homozygous mutant animals experience progressive loss of cone photoreceptor cells.	0	69;51
15.46	Inpp4a	This gene encodes an Mg ⁺⁺ independent enzyme that hydrolyzes the 4-position phosphate from the inositol ring of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, inositol 1,3,4-trisphosphate, and inositol 3,4-bisphosphate.	Homozygotes for a spontaneous mutation exhibit small size, ataxia, loss of cerebellar and hippocampal CA1 neurons, and death by 24 days of age from seizures and/or malnutrition.	+	69;81
15.57	2010300C02Rik	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
15.88	Tsga10	Tsga10 plays a role in the sperm tail fibrous sheath	-	0	67;69;75
16.13	Mitd1	The protein encoded by this gene may play a role in endosomal protein transport	-	**	69; 75
16.13	Lipt1	The process of transferring lipoic acid to proteins is a two-step process. The first step is the activation of lipoic acid by lipoate-activating enzyme to form lipoyl-AMP. For the second step, the protein encoded by this gene transfers the lipoyl moiety to apoproteins.	-	+	69; 75
16.17	Mrpl30	This gene encodes a 39S subunit protein of mitoribosomes	-	+	29;69
16.20	Lyg2	The protein encoded by this gene contains a SLT domain, a protein domain present in bacterial lytic transglycosylase (SLT) and in eukaryotic lysozymes (GEWL). SLT domain catalyzes the cleavage of the beta-1,4-glycosidic bond between N-acetylmuramic acid (MurNAc) and N-acetylglucosamine (GlcNAc).	-	+	69;74;75
16.29	Lyg1	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69;
16.37	Txndc9	The exact function of this protein is not known but it is associated with cell differentiation	-	+	69; 75
16.40	Eif5b	Function in general translation initiation by promoting the binding of the formylmethionine-tRNA to ribosomes. Seems to function along with eIF-2 (By similarity)	-	0	61;69;75; 89
16.46	Rev1	Rev1-like protein is as a scaffold that recruits DNA polymerases involved in translesion synthesis (TLS) of damaged DNA.	Mice homozygous for a knock-in allele exhibit abnormal somatic hypermutation frequency of the Ig gene. Mice homozygous for a knock-out allele exhibit background-sensitive prenatal lethality and abnormal somatic hypermutation frequency.	0	42;69
16.58	Aff3	This gene encodes a tissue-restricted nuclear transcriptional activator that is preferentially expressed in lymphoid tissue.	-	0	69;
17.17	Lonrf2	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69;
17.24	Chst10	The protein encoded by this gene transfers sulfate to the C-3 hydroxyl of terminal glucuronic acid of protein- and lipid-linked oligosaccharides.	Homozygous mutation of this gene results in altered synaptic transmission and long term potentiation. Mutant animals exhibit impaired spatial learning and long	0	69;85

			term memory deficits.		
17.31	Nms	regulation of smooth muscle contraction, regulation of circadian rhythm and feeding behavior	-	+	66;69;75
17.36	Pdcl3	This gene encodes a member of the phosducin-like protein family and is a putative modulator of heterotrimeric G proteins	-	+	69; 75
17.98	Npas2	The protein encoded by this gene may play a regulatory role in the acquisition of specific types of memory. It also may function as a part of a molecular clock operative in the mammalian forebrain.	Targeted mutation of this gene results in deficits in complex emotional long-term memory tasks	0	24; 69; 75
18.30	Rpl31	This gene encodes a ribosomal protein that is a component of the 60S subunit.	-	0	69; 75
18.30	Tbc1d8	The protein encoded by this gene may act as a GTPase-activating protein for Rab family protein(s).	-	+	61;69; 75;89
18.31	D1Bwg0212e	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
18.33	Rnf149	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
18.37	Creg2	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
18.41	Rfx8	transcription factor	-	+	69
18.50	Gm3646*	Proteína não descrita/hipotética	-	**	69
18.53	Map4k4	Serine/threonine kinase that may play a role in the response to environmental stress and cytokines such as TNF-alpha. Appears to act upstream of the JUN N-terminal pathway. Phosphorylates SMAD1 on Thr-322 signaling pathway.	Mice homozygous for disruptions in this gene die as embryos around day E9.5-10.5.	+	61;69;89; 92
18,64cM			D1Mit320		

Legenda:

- (+) Candidato funcional não excluído;
- (++) Possível candidate funcional;
- (+++) Forte candidate funcional;
- (-) Ausência de modelos animais
- (*) Ausência de gene ortólogo em humanos;
- (**) Informações insuficientes para avaliação
- (0) Excluído como candidate funcional

REF.: Referências

Com relação à caracterização do gene *Bpag1*, até o momento, já foram sequenciadas cerca de 90% de toda sua região codificadora, sendo que nenhuma isoforma foi ainda totalmente sequenciada. A análise dos cromatogramas e o alinhamento das sequências obtidas à sequência referência ainda não demonstraram nenhuma alteração no material genético desses animais.

Apesar dos primers para o sequenciamento do gene *Actr1b* já terem sido desenhados, nenhuma análise molecular foi ainda realizada.

6 DISCUSSÃO

As mutações com ENU podem resultar em mudanças proteicas muito informativas: mudanças hipomórficas (perda parcial de função), antimórficas (função oposta ou dominância negativa) e hipermórfica (função exagerada). Apesar das mutações mais comuns causadas pelo ENU serem transversões de AT para TA e transições de AT para GC em regiões codificadoras (Barbaric *et al.*, 2007), um estudo feito por García-García & Anderson (2003) mostrou a inserção de seis nucleotídeos na junção do sétimo com o oitavo éxon no transcrito Ugdh do mutante Izme. Entretanto, essa inserção está presente imediatamente abaixo do sítio de *splicing* na extremidade 3', sugerindo que a inserção no transcrito Udgh seja resultado de um *splicing* aberrante.

Outros três estudos (por Hoebe *et al.* 2003, Huangfu *et al.* 2003, e Klopp *et al.*, 1998) isolaram três mutantes que apresentavam deleções também provocadas por alterações no sítio de *splicing*. De acordo com um levantamento realizado (por Barbaric *et al.* 2007), mutações da classe “sentido trocado” são sub-representadas em mutantes induzidos por ENU, por outro lado, mutações do tipo “sem sentido” ou “mutações em sítios de *splicing*” são altamente frequente. Segundo o autor, em mutagênese aleatória, mutações “sem sentido” e “mutações em sítios de *splicing*” são mais prováveis de apresentarem um fenótipo visível em relação às mutações de “sentido trocado”, gerando assim um viés na seleção dos fenótipos.

O mapeamento genético por análise de ligação à média resolução da mutação fraqueza permitiu o estabelecimento de uma região de 7.72 cM no cromossomo 1, entre os marcadores D1mit373 (10,92 cM) e D1mit320 (18,64 cM), como localização do *locus* responsável pelo fenótipo em estudo.

A escolha de genes candidatos requer preferencialmente o estabelecimento de uma região do genoma que contenha uma pequena densidade gênica, para que cada gene presente no intervalo de mapa possa ser avaliado individualmente, possibilitando assim a escolha adequada do gene candidato mais provável.

Embora a região delimitada no presente projeto seja ainda extensa, compreendendo aproximadamente 13,60 Mpb, a inexistência de mais marcadores polimórficos dentro desta região impede a continuidade do mapeamento. No entanto, o

levantamento bibliográfico realizado, levando em consideração o mapeamento e o estudo fenotípico, possibilitou a identificação de dois genes relacionados à manutenção da integridade da estrutura celular: *Bpag1*, localizado a 12.91 cM, e *Actr1b*, localizado a 15.38 cM, ambos no cromossomo 1 murino.

A evidência de ligação entre os marcadores D1mit70 e D1mit411 (localizados respectivamente a 17.8 e 18.5 cM) e o *locus* mutado, comprova a localização do gene em estudo nas proximidades destes marcadores. Sendo assim, os genes *Bpag1* e *Actr1b*, emergem como fortes candidatos posicionais e funcionais, tendo recebido, por isso, atenção especial neste projeto.

Em estudos histológicos realizados com o camundongo *fraqueza*, foi verificada uma maior celularidade no gânglio da raiz dorsal desses animais quando comparados a controles da mesma ninhada (Figura 8 C e D), fenótipo semelhante ao apresentado por camundongos distônicos (Duchen *et al.*, 1963). Apesar da severa alteração motora provocada nesses animais, as raízes dos nervos motores estão preservadas. Estudos de hibridização *in situ* indicaram que o gene *Bpag1* é expresso no gânglio da raiz dorsal, que é o foco da neurodegeneração em camundongos distônicos (Brown *et al.*, 1995).

Não há alterações significativas da arquitetura e celularidade medulares, especialmente neurônios do corno anterior e aspecto da substância branca entre os animais *fraqueza* e seus pares controles nas idades de 3, 7 e 11 semanas. Nota-se, no entanto uma discreta redução do diâmetro neuronal no corno posterior da medula e alterações degenerativas muito discretas em algumas amostras desta região (Figura 8 A e B). Não há alterações degenerativas intensas, sinais de morte neuronal, ou processo inflamatório detectável no tecido nervoso da medula ou conjuntivo e vasos peridurais. No entanto, os gânglios sensitivos da raiz dorsal dos nervos espinhais dos animais *fraqueza* apresentam maior celularidade da região central, rica em fibras nervosas (zona axial ou medular).

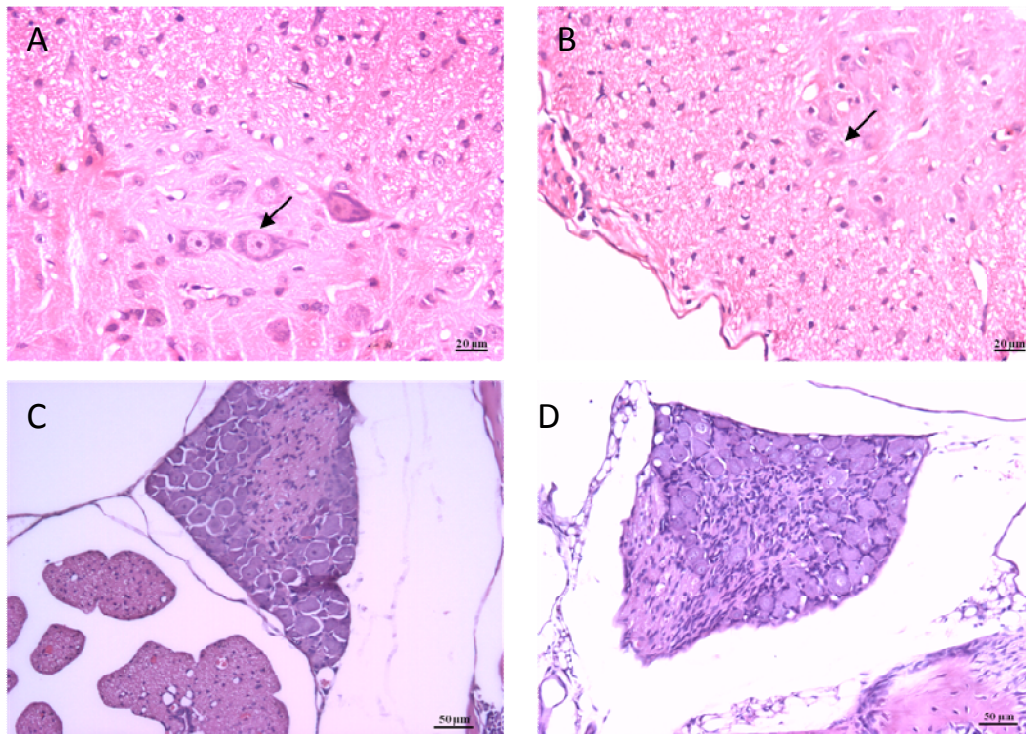


Figura 8: Análise histológica de tecido nervoso em coloração HE em animais com 7 semanas. **A e B**: cortes de medula. Setas evidenciam a redução do diâmetro do corpo celular em animais fraqueza quando comparados a controles da mesma ninhada. Controle é mostrado à esquerda (A) e *fraqueza* à direita (B). **C e D**: Gânglios sensitivos da raiz dorsal. Controle (C); *fraqueza* (D).

Em doenças neurodegenerativas, de um modo geral, observa-se um comprometimento no transporte axonal, a formação de agregados proteicos no meio intra ou intercelular e a morte de um subconjunto de neurônios específicos, dependendo da patologia em questão. Apesar dos resultados preliminares indicarem a redução do número de neurônios no corno posterior da medula, estudos ultraestruturais que evidenciem a citoarquitetura neuronal são necessários para tentar esclarecer a causa primária das lesões características dos animais *fraqueza*.

Os músculos esqueléticos de camundongos dt são fracos e apresentam citoarquitetura desorganizada uma vez que a proteína distonia, codificada pelo gene *Bpag*, é essencial para o estabelecimento e a manutenção da citoarquitetura muscular (Dalpe *et al.*, 1999). Camundongos *fraqueza* possuem o músculo sóleo/gastrocnêmio macroscopicamente menor, quando comparados a animais controles da mesma ninhada.

Uma análise histológica preliminar do músculo da pata posterior do mutante fraqueza mostrou alterações leves, como fibras musculares de menor diâmetro, espessamento do endomísio e núcleos celulares localizados na periferia das células (Policarpo, em preparação). Esses achados podem indicar um processo de reparo de lesão da membrana por mecanismos que podem estar relacionados com deficiências na manutenção estrutural do arcabouço citoesquelético e de membrana da célula, associado à provável disfunção proteica relativa à alteração molecular presente nos animais mutados. Em outros estudos, a caracterização de músculos esqueléticos de camundongos distônicos também não evidenciaram diferenças óbvias neste tecido, sendo necessária a utilização de técnicas mais específicas como a microscopia eletrônica para uma melhor caracterização destes animais (Dalpe *et al.*, 1999; Dowling *et al.*, 1997). Neste sentido, nossos resultados podem ser indicativos de lesão ultraestrutural e serão confirmados pela utilização da microscopia eletrônica.

O gene *Bpag1* possui 107 éxons abrangendo cerca de 400kb (Pool *et al.*, 2005) e é constituído de 4 isoformas principais, *Bpag1n* e *Bpag1a* (neuronaes), *Bpag1b* (muscular) e *Bpag1e* (epitelial). As diferentes isoformas são originadas por *splicing* alternativo e desempenham funções semelhantes em seus respectivos tecidos. Este gene codifica uma *crosslinking* proteína pertencente à família das plaquinas. Proteínas *crosslinking* são elementos chave na organização da arquitetura celular, pois possuem a habilidade de associar-se simultaneamente com dois ou mais dos três filamentos do citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos. A família plaquina compreende diversas proteínas com essa função, tais como desmoplaquina, plequitina, envoplaquina, Macf e periplaquina, sendo todas constituídas por um domínio plaquina conservado, bem como vários domínios de ligação ao citoesqueleto (Leung *et al.*, 2002).

As isoformas tecido-específicas apresentam tanto domínios comuns quanto específicos de determinada variante. A isoforma *a*, ou *Bpag1a*, possui um domínio de ligação à actina (ABD) na sua porção N-terminal, seguido pelo domínio plaquina, vinte e três repetições de espectrina e, por fim, um domínio de ligação a microtúbulos (MTBD) na porção C-terminal regulado por dois domínios EF-hand (domínio de ligação ao cálcio) (Figura 9). O domínio ABD é formado por dois domínios homólogos à calponina (CH1 e CH2) em tandem, motivo altamente conservado em muitas proteínas de ligação à actina (Stradal *et al.*, 1998). Apesar dos domínios homólogos à

calponina apresentarem uma estrutura similar, estudos demonstram que, enquanto CH1 por si só possui a habilidade de ligar-se aos filamentos de actina, CH2 é incapaz de fazê-lo (Way *et al.*, 1992).

A isoforma *a* é expressa no tecido nervoso e possui três éxons iniciais dependentes de *splice* alternativo. Cada éxon define um subtipo de isoforma com diferentes regiões N-terminal, Bpag1a1, Bpag1a2 e Bpag1a3, também verificados na isoforma músculo-específica, Bpag1b. Cada subtipo atribui uma função característica à sua isoforma, sendo que o subtipo N-2 possui habilidade de se ligar à actina e N-3 contém um possível sinal de modificação de lipídeos, podendo desempenhar um papel na localização cortical da proteína. Até o presente momento nenhuma função específica foi atribuída à porção N1 e, devido ao seu tamanho reduzido (91 pb), acredita-se que ela não desempenhe um papel determinante para as isoformas *a1* e *b1*. (Julius *et al.*, 2006) (Figura 10).

A isoforma músculo-específica, Bpag1b, é idêntica à isoforma *a*, com exceção de um domínio extra localizado entre o domínio plaquina e as repetições de espectrina. Esse domínio, chamado de PRD2 (domínio de repetição de plaquina/plequitina) ou IFBD2 (domínio de ligação a filamentos intermediários), possivelmente está relacionado à interação com filamentos de queratina (Pool *et al.*, 2006). Bpag1b também possui os três subtipos de porções N-terminal (Julius *et al.*, 2006). (Figura 9)

A isoforma epitélio-específica Bpag1e diverge das anteriores. Sua proteína possui um domínio plaquina seguido por um domínio Coiled Coil (CC-rod) e um domínio de repetição de plaquina/plequitina (PRD1 ou IFBD1) diferente daquele apresentado pela Bpag1b. A isoforma Bpag1n, específica de tecido nervoso, é semelhante à isoforma *e*, porém possui o domínio ABD ausente na primeira. Por não possuir o domínio ABD, o primeiro éxon de Bpag1e é exclusivo dessa isoforma, além disso, o éxon PRD1 possui um códon de parada e um sinal de poliadenilação, compartilhada entre as isoformas *1e* e *1n* (Goryunov *et al.*, 2006). (Figura 9)

Mutações no gene *Bpag1* causam Distonia muscular (dt), uma doença autossômica recessiva neurodegenerativa em camundongos, caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios sensoriais. Camundongos homocigotos para o gene são incapazes de controlar seus movimentos (os quais se tornam progressivamente

atáxicos) e apresentam postura anormal com movimentos contorcidos do tronco ao tentar se movimentar (Brown *et al.*, 1995).

Existem inúmeros alelos mutantes para dt, muitos deles surgidos através de mutações espontâneas devido ao grande tamanho do gene (Pool *et al.*, 2005). Análises do DNA genômico de quatro alelos mutantes espontâneos, Albany (dt^{Alb}), 27 Jackson (dt^{27j}), 24 Jackson (dt^{24j}) e Frankel (dt^{Frk}), mostraram uma grande deleção na parte central do gene para o alelo mutante dt^{Alb} e mutações pontuais ou pequenas deleções ou rearranjos para os demais alelos (Brown *et al.*, 1994).

No genoma humano, o gene ortólogo é o BPAG1, localizado em uma região de sintenia conservada no cromossomo 6 (6p12.1). A função do BPAG1 no homem é a mesma descrita para o camundongo: ancoragem dos filamentos do citoesqueleto e manutenção da arquitetura celular. (Benson *et al.* 2005).

Até o momento, apenas um caso clínico de alteração em um dos alelos BPAG1 foi descrito. O paciente com uma translocação 6:15 apresentava grave retardo mental e motor, encefalopatia não progressiva, diminuição da maturação visual e atresia traqueosofaríngea (Giorda *et al.*, 2004).

Análises do citoesqueleto em camundongos distônicos mostraram desorganização nos filamentos intermediários e microtúbulos nos axônios dos neurônios sensoriais (Bernier & Kothary, 1998; Dalpe *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999), além da citoarquitetura anormal observada em células musculares com redução no comprimento do sarcômero e um agrupamento anormal de mitocôndrias (Dalpe *et al.*, 1999). Esses estudos sugerem que as isoformas muscular e neuronal do gene Bpag1 respondam pela manutenção e organização do citoesqueleto (Kevin *et al.*, 2003). Esses dados da literatura em conjunto com os observados na caracterização histopatológica dos camundongos *fraqueza*, corroboraram a escolha do Bpag1 como gene candidato no presente estudo.

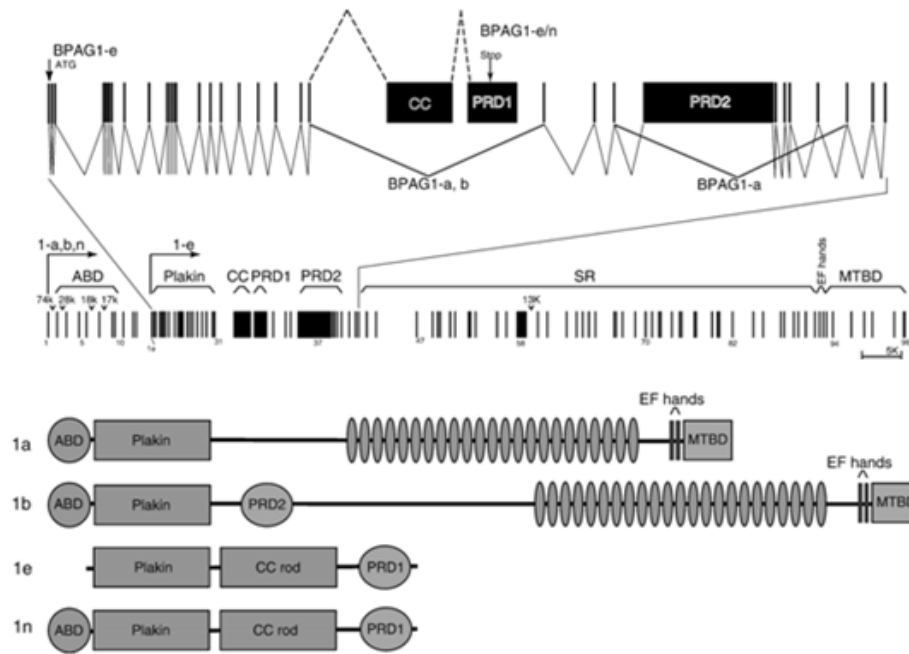


Figura 9: Estrutura do gene *Bpag1* e suas diferentes isoformas tecido-específicas. Goryunov *et al.*, 2006 (modificado).

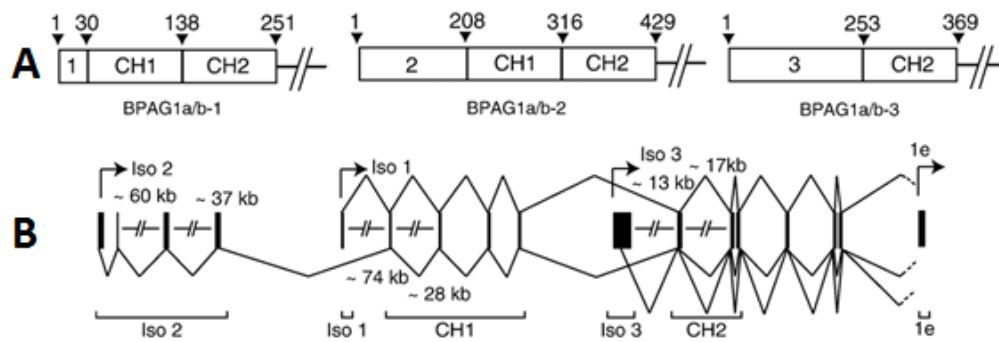


Figura 10: (A) Diferentes porções N-terminal encontradas nas isoformas 1a e 1b (1, 2 e 3). Observa-se também o esquema estrutural do domínio ABD constituídos por Homólogos de calponina (CH1 e CH2); (B) Composição exônica do domínio ABD originada por *splicing* alternativo. Julius *et al.*, 2006 (modificado).

Levando em consideração o fato de que a maioria das mutações geradas pelo agente mutagênico ENU já identificadas se encontram em regiões codificadoras dos genes ou em regiões fronteiriças entre éxons e íntrons (Barbaric *et al.*, 2007), optou-se primeiramente pelo sequenciamento dos éxons do gene *Bpag1*. Para tanto, suas diferentes isoformas (cerebral, muscular e epitelial) foram sequenciadas a partir de seu cDNA.

Até o presente momento foram sequenciados cerca de 92% de toda a região codificadora do gene. Apesar de não ter sido evidenciada nenhuma alteração na sequência de DNA com dados obtidos até então, o gene ainda continua como um forte candidato.

O gene *Bpag1* possui 62 sequências regulatórias abrangendo 32 Kb (Ensembl, 17/Jun/12). Apesar de mais raras, as mutações induzidas por ENU podem ser encontradas em regiões regulatórias, sendo assim, o sequenciamento dessas regiões não deve ser descartado.

Em um estudo paralelo, foi realizada a análise quantitativa dos transcritos das isoformas *Bpag1b* por PCR em tempo real. Neste estudo, constatou-se um nível significativamente menor destes transcritos no músculo de camundongos *fraqueza* quando comparados a camundongos controle. Apesar desta diferença observada não garantir que a mutação esteja de fato no gene *Bpag1*, fornece fortes evidências de que ele ao menos participa de alguma maneira na construção do fenótipo apresentado pelo mutante. Por se tratar de uma proteína que interage com diversas outras (como dinactina, periferina, α -internexina, entre outras) para formar a arquitetura celular, seu perfil de transcrição poderia estar negativamente regulado pela ação indireta de algum outro gene mutado presente nesta rede de interações (Figura 11).

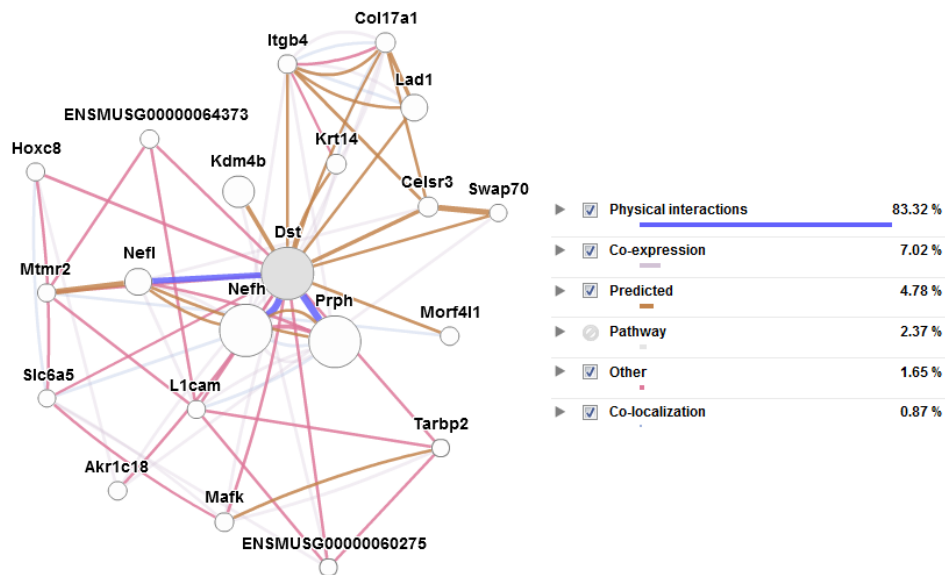


Figura 11: Rede de interações proteicas observada para o gene *Bpag1* (mostrado como *Dst*). Nenhuma das proteínas representadas localiza-se no intervalo atual de mapa estabelecido. Nem todas as interações proteicas existentes estão representadas. (GeneMANIA, 24/Jun/2012).

Um exemplo dessas interações é evidenciada entre os produtos dos genes *Dst*, *Nefl* e *Nefh* (neurofilamentos). Neste caso, os neurofilamentos associam-se ao domínio IFBD das isoformas neuronais (1a e 1n) de *Bpag1* para promoverem o transporte retrógrado associado a vesículas em neurônios sensoriais.

Além do *Bpag1*, outro gene se mostrou como um possível candidato para a mutação fraqueza. O gene *Actr1b* (Actin-related protein 1 homolog B), localizado a 15.38 cM no cromossomo 1, possui funções relacionadas à organização do citoesqueleto e encontra-se dentro da região mapeada no estudo. Este gene possui 10 éxons abrangendo 10,724 bp e seu produto proteico é membro de uma família de proteínas denominada Actin-related proteins. Essas proteínas, em geral, possuem grande similaridade com a Actina e desempenham funções também semelhantes a ela, como contração muscular, organização da estrutura celular e transporte citoplasmático. (Sean W. Clark *et al.*, 1994; MGI).

A proteína codificada pelo gene *Actr1b* (*ACTR1B*, 42.3 kD) constitui uma subunidade de um complexo macromolecular denominado Dinactina (*dynactin*). Este complexo possui ao todo 10 subunidades e liga-se igualmente a microtúbulos e a uma proteína motora com funções de transporte e organização de vesículas intracelulares, a dineína (Figura 12).

O complexo dinactina localiza-se em múltiplas estruturas celulares, incluindo organelas membranosas, centrossoma e fibras do fuso, e promove o transporte entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi, movimentação de lisossomos e endossomos e axonogênese. (Judith Eschbach & Luc Dupuis, 2011).

Estudos sugerem que a proteína $\beta 3$ -spectrina age através de *Actr1b* (*Arp1*) para realizar a ligação do complexo dinactina a vesículas citoplasmáticas. (Figura 12) (Holleran *et al.*, 2001).

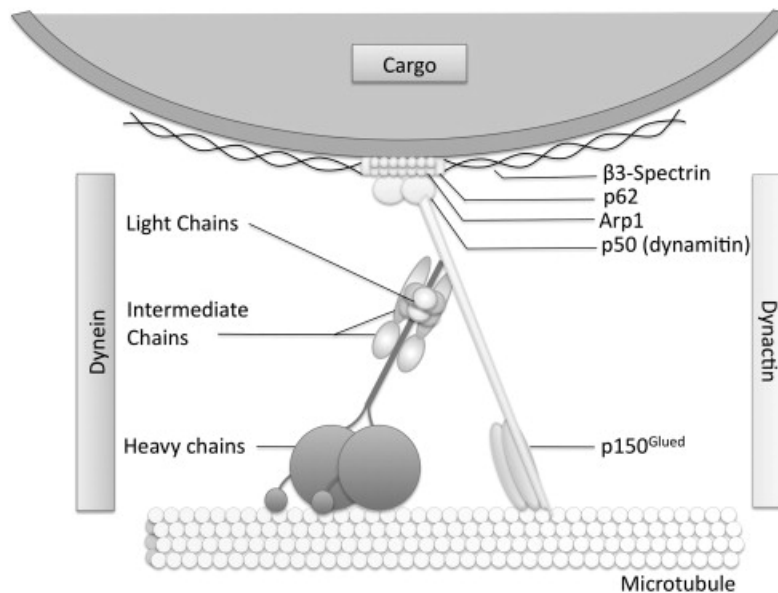


Figura 12: Complexo Dinactina-dineína. Este complexo está presente em neurônios e responde pelo transporte retrógrado axonal. *Judith Eschbach & Luc Dupuis, 2011*

O complexo dinactina-dineína também está diretamente relacionado ao transporte retrógrado axonal (TRA). O TRA desempenha um importante papel na manutenção das funções neuronais através do trânsito de vesículas, mitocôndrias, lipídeos e proteínas do axônio até o corpo celular (Cowie & Stanton, 2007).

Estudos demonstram que o déficit no TRA contribui direta ou indiretamente para a patogênese de várias doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose amiotrófica lateral (Eschbach & Dupuis, 2011). Além disso, modelos animais possuindo mutações induzidas por ENU em genes do complexo dineína-dinactina apresentam deficiência no transporte retrógrado em neurônios motores associada à degeneração neuronal (Hafezparast et al. 2003).

Outros estudos verificaram que mutações nesses complexos promovem, em linhagens celulares, a desorganização de organelas e vesículas citoplasmáticas neuronais, e que, em *Drosophila melanogaster*, mutações no gene da cinesina e na cadeia pesada da dineína provocam a paralisia em seus segmentos distais (Martin, M. A. et al., 1999).

Jia-Jia Liu e colaboradores, em 2007, realizaram um estudo associando o complexo dineína-dinactina, o gene *Bpag1* e o TRA. Neste trabalho, foi identificada e

descrita uma proteína transmembrana nova, denominada retrolinquina (*retrolinkin*), responsável pela ancoragem da isoforma proteica Bpag1n4 (recentemente caracterizada) a vesículas axonais em neurônios motores e sensitivos. A deleção do domínio transmembrana presente na retrolinquina resulta em alto prejuízo no TRA em neurônios sensitivos, fenótipo também verificado em camundongos *knockout* para o gene Bpag1. O complexo Bpag1n4-retrolinquina foi então descrito como responsável pela ligação das vesículas axonais ao complexo dinactina-dineína para promover o TRA (Jia-Jia Liu *et al.*, 2007).

Em vista disso, o gene *Actr1b*, que codifica uma subunidade proteica do complexo dinactina, aparece também como um bom candidato para a mutação *fraqueza*. Além de estar localizado dentro do intervalo mapeado (candidato posicional), o gene tem ligação direta com alguns dos fenótipos apresentados pelo modelo, como fraqueza muscular e degeneração neuronal (candidato funcional). Ademais, a diferença no número de transcritos do gene Bpag1, demonstrada pela PCR em tempo real, pode ser devida não diretamente a uma disfunção neste gene, mas também em virtude de uma alteração em algum gene que interaja diretamente com o *Bpag1*, como é o caso do *Actr1b*. Análises moleculares deste gene ainda são necessárias para confirmar ou refutar esta hipótese.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O mapeamento genético da mutação *fraqueza* permitiu a escolha dos genes Bpag1 e Actr1b como fortes candidatos, posicional e funcional, para a mutação e a continuidade da caracterização destes genes através do sequenciamento possivelmente permitirá a identificação desta.

A perspectiva é que, tão logo a mutação seja identificada, o camundongo *fraqueza* possa ser utilizado como modelo genético para o entendimento e estudo de terapias em casos clínicos em que haja acometimento muscular e neuronal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, M.C.R. A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental. 2006. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>.
2. AUSTIN, C.P.; BATTEY, J.F.; BRADLEY, A.; CAPECCHI, M.; COLLINS, F.S.; DOVE, W.F.; DUYK, G.; DYMECKI, S.; EPPIG, J.T. *et al.*, The Knockout Mouse Project, *Nature Genetics*, vol. 36, n. 9, p. 921-924, 2004.
3. Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL. Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007, 293(1):C218-27.
4. BARBARIC, I.; WELLS, S.; RUSS, A.; DEAR, T.N. Spectrum of ENU-Induced mutations in phenotype-driven and gene-driven screens in the mouse. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 124-142, 2007.
5. BEHMER, O.A.E; TOLOSA, et al. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Edart, Editora da Universidade de São Paulo. 1976.
6. BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L.; GenBank: Update. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:D34–D38.
7. BERNIER, G.; KOTHARY, R. Prenatal onset of axonopathy in dystonia musculorum mice, *Dev. Genet.*, 22: 160–168, 1998.
8. Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F. Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(13):7553-7.
9. BOYER, J.G; BHANOT, K.; KOTHARY, R.; BOUDREAU-LARIVIÈRE, C. Hearts of Dystonia musculorum Mice Display Normal Morphological and Histological Features but Show Signs of Cardiac Stress. *Plos One*, 5(3): e9465, 2010.
10. BROWN, A.; BERNIER, G.; MATHIEU, M.; ROSSANT, J.; KOTHARY, R. The mouse Dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous emphygoid antigen 1. *Nat. Genet.*, 10: 301–306, 1995.
11. BROWN, A.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A.; ROSSANT, J.; KOTHARY, R. The genomic structure of an insertional mutation in the Dystonia musculorum locus. *Genomics*, 20: 371–376, 1994.
12. CHEN, H.-J.; LIN, C.-M.; LIN, C.-S. The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes Dev*. 20: 1933-1945, 2006.

13. CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N., Animais de laboratório : o camundongo, *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 28, n.1, p. 11-23, 2007.
14. CORDES, S.P. N-Ethyl-N-Nitrosourea Mutagenesis: Boarding the Mouse Mutant Express, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 69, n. 3, p. 426-439, 2005.
15. Cowie R.J. and Stanton G.B. "Axoplasmic Transport and Neuronal Responses to Injury." Howard University College of Medicine. Retrieved on January 25, 2007.
16. DALPE, G.; LECLERC, N.; VALLEE, A.; MESSER, A.; MATHIEU, M.; DE REPENTIGNY, Y.; KOTHARY, R. Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Mol. Cell. Neurosci.* 10, 243–257, 1998.
17. DALPE, G.; MATHIEU, M.; COMTOIS, A.; ZHU, E.; WASIAK, S.; DE REPENTIGNY, Y.; LECLERC, N.; KOTHARY, R. Dystonin-deficient mice exhibit an intrinsic muscle weakness and an instability of skeletal muscle cytoarchitecture. *Dev. Biol.* 210: 367–380, 1999.
18. DIETRICH, W. F.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; MILLER, J.C.; JENKINS, N. A.; LANDER, E. S. Mapping the mouse genome: current status and future prospects. *Proc Natl Acad Sci.*, 21; 92(24): 10849–10853, 1995.
19. DOWLING, J.Y.; YANG, R.; WOLLMANN, L.F.; REICHARDT, E. FUCHS. Developmental expression of BPAG1-n: insights into the spastic ataxia and gross neurologic degeneration in *dystonia musculorum* mice. *Dev. Biol.* 187:131–142, 1997.
20. DUCHEN, L. Dystonia musculorum - An inherited disease of the nervous system in the mouse. *Adv. Neurol.* 14, 353–365, 1976.
21. DUCHEN, L.W; FALCONER, D.S.; STRICH, S.J. Dystonia musculorum. A hereditary neuropathy of mice affecting mainly sensory pathways. *J Physiol.* 165, 7-9, 1963.
22. ENSEMBL – Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org).
23. Eschbach J, Dupuis L. “Cytoplasmic dynein in neurodegeneration”. *Pharmacology & Therapeutics*, 130: 348-363, 2011
24. Garcia JA, Zhang D, Estill SJ, Michnoff C, Rutter J, Reick M, Scott K, Diaz-Arrastia R, McKnight SL. Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice. *Science*. 2000, 288(5474):2226-30.

25. GARCIA-GARCIA, M.J.; ANDERSON, K.V. Essential role of glycosaminoglycans in Fgf signaling during mouse gastrulation. *Cell*, 114: 727–737, 2003.
26. GeneMANIA – (www.genemania.org).
27. GIORDA, R.; CERRITELLO, A.; BONAGLIA, M.; BOVA, S.; LANZI, G.; REPETTI, E.; IGLIO, S.; BASCHIROTTO, C.; PRAMPARO, T.; AVOLIO, L.; BRAGHERI, R.; MARASCHIO, P.; ZUFFARDI, O. Disruption of muscle and brain-specific BPAG1 isoforms in a girl with a 6;15 translocation, cognitive and motor delay, and tracheo-oesophageal atresia. *J. Med. Genet.* 41-71, 2004.
28. GODARD, Ana Lúcia Brunialti, A clonagem posicional – uma abordagem para o estudo do genoma funcional, *Monografias SBG*, Ribeirão Preto: SBG, 151 p., 2008.
29. Goldschmidt-Reisin S, Kitakawa M, Herfurth E, Wittmann-Liebold B, Grohmann L, Graack HR. Mammalian mitochondrial ribosomal proteins. N-terminal amino acid sequencing, characterization, and identification of corresponding gene sequences. *J Biol Chem.* 1998, 273(52):34828-36.
30. GORYUNOV, D.; ADEBOLA, A.; JEFFERSON, J.J.; LEUNG, C.L.; MESSER, A.; LIEM, R.K.H. Molecular characterization of the genetic lesion in Dystonia musculorum (dt-Alb) mice. *Brain Research*, 179 – 187, 2007.
31. GREEN M. Gene Mapping. *The mouse in biomedical research*, vol. I, Academic Press, p. 105-117, 1995.
32. GUÉNET, J. L. The mouse genome, *Genome Research*, vol. 15, p. 1729-1740, 2005.
33. Günther T, Struwe M, Aguzzi A, Schughart K. Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development.* 1994, 120(11):3119-30.
34. GUO, L.; DEGENSTEIN, L.; DOWLING, J.; YU, Q.C.; WOLLMAN, R.; PERMAN, B.; FUCHS, E. Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurological degeneration. *Cell* 81: 233–243, 1995.
35. Hafezparast M., Klocke R., Ruhrberg C. et al. (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 300, 808–812.
36. HARDING, A.E. *The hereditary ataxias and related disorders*. Churchill Livingston, New York, 1984.

37. HOEBE, K.; GEORGEL, P.; MANN, N.; MUDD, S.; CROZAT, K.; SOVATH, S.; HAN, J.; BEUTLER, B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling. *Nature* 424: 743-748, 2003.
38. Holleran EA, Ligon LA, Tokito M, Stankewich MC, Morrow JS, Holzbaur EL (2001)
39. HUANGFU, D.; LIU, A.; RAKEMAN, A.S.; MURCIA, N.S.; NISWANDER, L.; ANDERSON, K.V. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426:83-87, 2003.
40. IKMC - International Knockout Mouse Consortium (www.knockoutmouse.org).
41. *J Biol Chem* 276:36598-36605.
42. Jansen JG, Langerak P, Tsaalbi-Shtylik A, van den Berk P, Jacobs H, de Wind N. Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med.* 2006, 203(2):319-23.
43. JEFFERSON, J.J.; CIATTO, C.; SHAPIRO, L.; LIEM, R. K. H.; Structural Analysis of the Plakin Domain of Bullous Pemphigoid Antigen1 (BPAG1) Suggests that Plakins are Members of the Spectrin Superfamily. *J. Mol. Biol.* 366(1): 244-257, 2007.
44. JEFFERSON, J.J.; LEUNG, C.L.; LIEM, R.K. Dissecting the sequence specific functions of alternative N-terminal isoforms of mouse bullous pemphigoid antigen 1. *Experimental Cell Research*, 312, 2006.
45. JEFFERSON, J.J.; LEUNG, C.L.; LIEM, R.K. Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 5: 542-553, 2004.
46. Judith Eschbach & Luc Dupuis, Cytoplasmic dynein in neurodegeneration, *Pharmacology therapeutics*, 130: 348-363, 2011
47. Kawasaki Y, Jigami T, Furukawa S, Sagara M, Echizen K, Shibata Y, Sato R, Akiyama T. The adenomatous polyposis coli-associated guanine nucleotide exchange factor Asef is involved in angiogenesis. *J Biol Chem.* 2010, 285(2):1199-207.
48. KEVIN, G.; KOTHAR, R. Dystonin/Bpag1 is a necessary endoplasmic reticulum/nuclear envelope protein in sensory neurons. *Cell Research*, 314: 2750-2761, 2008.
49. KEVIN, G.; YOUNG; MADELINE, P.; KOTHAR, R. Bpag1 localization to actin filaments and to the nucleus is regulated by its N-terminus. *Journal of Cell Science*, 116: 4543-4555, 2003.
50. KLOPP, N.; FAVOR, J.; LOSTER, J.; LUTZ, R.B.; NEUHAUSER-KLAUS, A.; PRESCOTT, A.; PRETSCH, W.; QUINLAN, R.A.; SANDILANDS, A.;

- VRENSEN, G.F.; GRAW, J. Three murine cataract mutants (Cat2) are defective in different g-crystallin genes. *Genomics* 52:152–158, 1998.
51. Kohno N, Yamagata K, Yamada S, Kashiwabara S, Sakai Y, Baba T. Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 28;245(3):658-65.
 52. Korotkov KV, Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 2001, 276(18):15330-6.
 53. KOSKINEN, T., *et al.* Infantile onset spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy: A new inherited disease. *J. Neurol. Sci.*, 121: 50–56, 1994.
 54. KOSTER, J.; GEERTS, D.; FAVRE, B.; BORRADORI, L.; SONNENBERG, A. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.*, 116: 387–399, 2003.
 55. Kudo T, Nakagawa H, Takahashi M, Hamaguchi J, Kamiyama N, Yokoo H, Nakanishi K, Nakagawa T, Kamiyama T, Deguchi K, Nishimura S, Todo S. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer.* 2007, 6:32.
 56. Lalonde R, Strazielle C. Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain Res.* 2007, 1140:51-74.
 57. Lee M. Silver, *Mouse Genetics Concepts and Applications*, Oxford University Press, 1995.
 58. LEUNG, C.L.; SUN, D.; LIEM, K.H. The Intermediate Filament Protein Peripherin Is the Specific Interaction Partner of Mouse BPAG1-n (Dystonin) in Neurons. *J. Cell Biol.* 144: 435-446, 1999.
 59. LEUNG, C.L.; ZHENG, M.; PRATER, S.M.; LIEM, R.K. The BPAG1 locus: alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J. Cell Biol.* 154: 691–697, 2001.
 60. LIU, J-J.; DING, J.; WU, C.; BHAGAVATULA, P.; CUI, B.; CHU, S.; MOBLEY, W.C.; YANG, Y. Retrolinkin, a membrane protein, plays an important role in retrograde axonal transport. *Cell Biol.*, 104(7): 2223-2228, 2007.
 61. López-Orduña E, Cruz M, García-Mena J. The transcription of MGAT4A glycosyl transferase is increased in white cells of peripheral blood of type 2 diabetes patients. *BMC Genet.* 2007, 8:73.

62. Maier V, Jolicoeur C, Rayburn H, Takegahara N, Kumanogoh A, Kikutani H, Tessier-Lavigne M, Wurst W, Friedel RH. Semaphorin 4C and 4G are ligands of Plexin-B2 required in cerebellar development. *Mol Cell Neurosci*. 2011, 46(2):419-31.
63. MaryAnn Martin, Stanley J. Iyadurai, Andrew Gassman, Joseph G. Gindhart, Jr., Thomas S. Hays, and William M. Saxton. "Cytoplasmic Dynein, the Dynactin Complex, and Kinesin Are Interdependent and Essential for Fast Axonal Transport". *Molecular Biology of the Cell*, 10: 3717-3728, 1999
64. MASSIRONI, Silvia Maria Gomes; REIS, Bruno Luiz Fonseca Schamber; CARNEIRO, Juliana Garcia ; BARBOSA, Lucas Boaventura da Silva; ARIZA, C B; SANTOS, Gustavo Costa; GUÉNET, Jean-louis; GODARD, A. L. B. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 1217-1226, 2006.
65. MGI – Mouse Genome Informatics (www.informatics.jax.org).
66. Miyazato M, Mori K, Ida T, Kojima M, Murakami N, Kangawa K. Identification and functional analysis of a novel ligand for G protein-coupled receptor. *Neuromedin S. Regul Pept*. 2008, 145(1-3):37-41.
67. Modarressi MH, Behnam B, Cheng M, Taylor KE, Wolfe J, van der Hoorn FA. Tsga10 encodes a 65-kilodalton protein that is processed to the 27-kilodalton fibrous sheath protein. *Biol Reprod*. 2004, 70(3):608-15.
68. Motoyama N, Nakayama K, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, Zhang Q, Chan AC, Loh DY. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. Negishi I. *Nature*. 1995, 376(6539):435-8.
69. Mouse Genome Database (MGD) at the Mouse Genome Informatics website, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org>). 07/2012
70. NCBI - National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).
71. NORWOOD, F. L. M.; SUTHERLAND-SMITH, A. J.; KEEP, N. H.; KENDRICK-JONES, J. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure*, 8:481-491, 2000.
72. NOVEROSKE, J.; WEBER, J.; JUSTICE, M. The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mammal Genome*. 11:478-483, 2000.
73. O'BRIEN, S.J.; MENOTTI-RAYMOND, M.; MURPHY, W.J.; NASH, W.G.; WIENBERG, J.; STANYON, R.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.;

- WOMACK, J.E.; GRAVES, J.A.M. The Promise of Comparative Genomics in Mammals, *Science*, vol. 286, p. 458-62 479-81, 1999.
74. Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*. 2005, 123(7):1307-21.
 75. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 07/2012. World Wide Web URL: <http://omim.org/>.
 76. OUVRIER, R.A.; MCLEOD, J.G.; CONCHIN, T.E. Friedreich's ataxia. Early detection and progression of peripheral nerve abnormalities. *J. Neurol. Sci.*, 55: 137-145, 1982.
 77. Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, Bloch-Zupan A, Carlos R, Carr IM, Downey LM, Blain KM, Mansfield DC, Shahrabi M, Heidari M, Aref P, Abbasi M, Michaelides M, Moore AT, Kirkham J, Inglehearn CF. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 2009, 84(2):266-73.
 78. Patsialou A, Wilsker D, Moran E. DNA-binding properties of ARID family proteins. *Nucleic Acids Res*. 2005, 33(1):66-80.19
 79. POOL, M.; BOUDREAU, C.; LARIVIERE; BERNIER, G.; YOUNG, K.G.; KOTHARY, R. Genetic alterations at the Bpag1 locus in dt mice and their impact on transcript expression, *Mamm. Genome*, 16: 909-917, 2005.
 80. Pratt T, Conway CD, Tian NM, Price DJ, Mason JO. Heparan sulphation patterns generated by specific heparan sulfotransferase enzymes direct distinct aspects of retinal axon guidance at the optic chiasm. *J Neurosci*. 2006, 26(26):6911-23.
 81. Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, Sasaki T. The PtdIns(3,4)P(2) phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature*. 2010, 465(7297):497-501.22
 82. SAWAMURA, D.; LI, K.; CHU, M.L.; UITTO, J. Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J Biol Chem*, 266:17784-17790, 1991.
 83. Sean W. Clark; Olivier Staub; Imran B. Clark; Erika L.F. Holzbaur; Bryce M. Paschal; Richard B. Vallee; David I. Meyert, β l-Centractin: Characterization and Distribution of a New Member of the Centractin Family of Actin-related Proteins, *Molecular Biology of the Cell*, 5: 1301-1310, 1994.
 84. Sean W. Deacon, Anna S. Serpinskaya, Patricia S. Vaughan, Monica Lopez Fanarraga, Isabelle Vernos, Kevin T. Vaughan, Vladimir I. Gelfand. "Dynactin

- is required for bidirectional organelle transport” *The Journal of Cell Biology* 160: 297-301, 2003
85. Senn C, Kutsche M, Saghatelian A, Bösl MR, Löhler J, Bartsch U, Morellini F, Schachner M. Mice deficient for the HNK-1 sulfotransferase show alterations in synaptic efficacy and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci.* 2002, 20(4):712-29.
 86. SILVER, L. M. *Mouse Genetics – Concepts and Applications.* Oxford University Press, New York, 1995.
 87. STANLEY, J.R.; HAWLEY-NELSON, P.; YUSPA, S.H.; SHEVACH, E.M.; KATZ, S.I. Characterization of bullous pemphigoid antigen:a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell*, 24: 897–903, 1981.
 88. STRADAL, T.; KRANEWITTER, W.; WINDER, S.J; GIMONA, M. CH domains revisited. *FEBS Lett.*, 431, p. 134–137, 1998.
 89. The UniProt Consortium: The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2008, 36:D190-D195. 07/201223
 90. *Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research, Committee on the Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research, Institute of Medicine (U.S.), National Academies, 1988.*
 91. WAY, M.; POPE, B.; WEEDS, A.G. Evidence for functional homology in the F-actin binding domains of gelsolin and alpha-actinin: implications for the requirements of severing and capping. *J. Cell Biol.*, 119, p. 835–842, 1992.
 92. Xue Y, Wang X, Li Z, Gotoh N, Chapman D, Skolnik EY. Mesodermal patterning defect in mice lacking the Ste20 NCK interacting kinase (NIK). *Development.* 2001, 128(9):1559-72.24
 93. Yan YT, Gritsman K, Ding J, Burdine RD, Corrales JD, Price SM, Talbot WS, Schier AF, Shen MM. Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes Dev.* 1999, 13(19):2527-37.
 94. YANG, Y.; BAUER, C.; STRASSER, G.; WOLLMAN, R.; JULIEN, J.P.; FUCHS, E. Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell*, 98: 229–238, 1999.
 95. YANG, Y.; DOWLING, J.; YU, Q.-C.; KOUKLIS, P.; CLEVELAND, D.W.; FUCHS, E. An Essential Cytoskeletal Linker Protein Connecting Actin Microfilaments to Intermediate Filaments. *Cel*, 86:655, 1996.
 96. YANG, Y.; PINHEIRO, B.; KOTHARY, R. A Bpag1 isoform involved in cytoskeletal organization surrounding the nucleus. *Exp. Cell Research*, 312: 121-134, 2006.

ANEXOS

Anexo I: Sequência de iniciadores

Ia – Iniciadores utilizados para a amplificação dos éxons da isoforma Bp_{gla}.

Nome	FORWARD	REVERSE
Dst 1	GGGAATTCGATTATGGCGGGGTACCTG	ATGTCCTCTGACTCTCCAGTGAC
Dst 2	ATCCTAAGCTGACTTTGGGGTTAATA	CTGGATGAGGTAGTTCACCATATTCT
Dst 3	AGGTGGCGAAGGCATTGGTG	CTTTTGAATCAGACTGGAGAGCATT
Dst 4	GAGGTTGAGAGGTTGGATATGCT	AAGCCAGAAGTCACGCTAGAAGAC
Dst 5	CTAACCCAGAGTTTAAACCCCTTC	GCGTACTGACTCTCTAATCTGTGC
Dst 6	TGAAGAATTTGAATCCAGCCTTA	TTCTCTGAATGTGCTGCTC
Dst 7	TTAAAGCTGTTTCAGGAGATCG	ATGAGAGTTGTTTGCCAAGA
Dst 8	TAACCATTTACAAAGACGATGAG	TGACTTATATCCGAGCTGAGAA
Dst 9	ACCAGCAGGTTCTCAGTAATCTCCA	AGGGCTTCGCGGCTTGAGT
Dst 10	GGTCATTCAGAGCTTGAGTCAGAT	TGAATTTTTCTCTGGGTCGTTT
Dst 11	GCACTACAGGGACTCCTACCA	TGATATTTGATACCCATTTCTGC
Dst 12	AGGAGAAGTCACTGGATGAAGAG	TCACAAAGGCTTCCTGGTTACTA
Dst 13	ATCTCCTCACCCAGACTGAAAAC	GCTCCTAACTTGCTATCACCTTC
Dst 14	TGTCAAATGTTGAGGAAGACTCC	CTCCAGGTTCCGCCAGTCTT
Dst 15	CTACAGCGAGTTTGAGCACT	CAATGGGCTCCCGTAAATGT
Dst 16	AGTATGAAGATGCTTCCTGCG	TGCTTTGACGACCCGTAATA
Dst 17	GTGCCACTAAACTCCACAGC	CCTCCATTTCTTTGAATTC
Dst 18	CACAGCCTCCTGAAAGAGAT	CAACTATTTTATCCTTGAGTAAGAG
Dst 19	GAAGGACATGACTGACATAAGC	TTCTCCATGAGCCACTGTTT
Dst 20	GAGTCCTCCAATAATCTAACCCAGT	GATTTCTGCTTCAGCTTCT
Dst 21	GATGCCGTGAACCAACAAC	TTCTCTGCCCCCTGTGTCTT
Dst 22	AGCAGTCTAACATTTACGAG	AGACTTCCTGAAATCTTTA
Dst 23	GAAAAGGTAAACAGGGTCAC	CTCATCATCACACTCGGTAATA
Dst 24	GCCACTTCCAGAATACCATCC	GCAAGGGTTCGATTTCTTCTT
Dst 25	TTGATGTGTTTAAAGGTATCCA	ATCTACTGTCCAAGAGGCTCA
Dst 26	GGACAGAGTGAAGCTCACGA	AGCCAGTTACACAGCTCCTT
Dst 27	CAAGTTGAGTGCCGATGTAG	CATGGTGAAAGCCTTCTGAA
Dst 28	TATCCTGGATCACTGAAACAC	CTCGCTTTTTGACATCTTCT
Dst 29	ATTTATATCCAAGAAAAGTATGTG	GAGTGTCTTTGATGGTGACG
Dst 30	AAGAACGGGAAGCCAAACTG	TCCATTTCCATCTGTTGTTGATAA
Dst 31	CAAGCAGCAGATTGAAGAGC	ATTTACCCGTGGAACCCTTT
Dst 32	AAGAAGCAAGCAACCTCCAG	GGTAAGCCAGTTGATGAAGTCCT
Dst 33	CAAACCTCAACGAGAAGAAAACAAAG	GTTGGTGGTATCGTAGACAGAATG
Dst 34	CAACGATCCAGACAAAATCAAAG	GATGAGTTCCCTGGCAGAGC
Dst 35	CGATAATCACAAAGTCTTCC	AGTGCTTAATGGTGGTAATG
Dst 36	GAGAAAAGGGCAGAACTAAG	TGTGAGCCAGATGGATAGAA
Dst 37	CTCCCTCGTTACAGTCTCACATC	TTTGTACGCATCTTTGTTTGGAT
Dst 38	AGATGGTGATGGGTACATTGACTAC	CTCTGGATGAAGGGCGAGAT
Dst 39	GCTAAAGGAAGGACCAACAT	ATTTTAGAAGGCTTGGCTGT
Dst 40	TCCCACAGACACACAGACCT	TGTTCAGAATCTCCATAAAAAGG
Dst 41	CCTACAGGTAAGTCCACATTCT	CGCATCCCTATGGTAGAGAC
Dst 42	AGTGTCTTGTGCTCTGCT	TCAAGTGAATATGTTTTATTAATGC

Ib – Iniciadores utilizados para a amplificação do domínio Coiled coil

Nome	FORWARD	REVERSE
CC 01	GTTGAAAAGGCTGGAAGAGG	CACTGAGGCTCGAGTCTTTC
CC 02	CAGGAAAACACCTTCACCAG	GTTATTCGTCTCGTCCAATTTAT
CC 03	AGGGAGCTGAAGTATGAACTC	CTTGAATATTCTGAAGCAACTGT
CC 04	GACCTCTCAGAAGAGAGGAGA	ATGCTCTGCTGGTCACACTT
CC 05	GATTTCCACAGAAAAATTTAAAG	AAGCTCTCGAATGTTGGTCT
CC 06	AAGCACGACTTTGTGTCTCTC	CTCCTTCGGAAGTTGTTTCAG
CC 07	CCTTAACCTAAAGACCAGACTCC	CCTCTGGCTCTACGCTTTTC
CC 08	AAGAGAAGAGGCTGGGTTC	ATCAACGATGCCATGAAGAAC
CC 09	AAATGATAGCTCTAGCCTTTTTAGA	ATATTTCCCTCTCCCCAAAC
CC 10	CAACACGAGAGTCTTTCTAATC	ATAGCCTGCAATGGGACTGT
CC 11	TAACTACACTAACAGAAGTGGCTGA	GCGATGAGGACATCAATGATAC
CC 12	TGCAAATATCATCAGTAAAGAAATGG	CCTACAAGAAATTAACAGCGCTTC

Ic - Iniciadores utilizados para a amplificação do domínio PRD1/IFBD1

PRIMER	FORWARD	REVERSE
IFBD1 01	GGATTGTGATTGGGTGGAGA	GCCGAAGTGAACGACATTTT
IFBD1 02	GAAGTCTTAGCAAGTTTCTGACC	TTGTTGTTGGGATTAGGAAA
IFBD1 03	TGAACAACGCCCTCTAC	CTCAGAAGAAAGTCACCCAGT
IFBD1 04	GCTGACTGATACTAAAAGTGGTCT	GAAAACCTTCGGCTCTATCA
IFBD1 05	CACCCCGTCAGCAATAAAAT	CTGAACAGATGGCAGGATG

Id – Iniciadores utilizados para a amplificação do domínio PRD2/IFBD2 e sequência linker/haste

Nome	FORWARD	REVERSE
IFBD 01	GAGGGCTACAATTTATTATTCAGTG	CTGTTGGAAAGCCTGTTGTAAG
IFBD 02	GTGCTTGATTCTCTGGCTCA	GCGGTGTCTCTGTCAATCAC
IFBD 03	AAACCATGTTTAGGCTGTTAGG	ATTTTGTCTGGCAGCGTTAC
IFBD 04	AGCTGGGGATCATAGATAACA	TATGTCCGGGGTGACTGTAA
IFBD 05	ACTGTGCTTTGAGTGAAGAAA	CAACTCATCGTGGCTTAACA
IFBD 06	AGAGAGGATGAAGAGAATATACAGA	AATGGCTCCTTTATGTGACAGT
IFBD 07	GCAGACAGATGAGTCAGAGAAA	ACTAACTGTTCTGAGCCACCA
IFBD 08	AATGGATGAGAGCTTAGGTGT	GTAGGGTCAGCTTGGTACTG
IFBD 09	GTAGCGACTTGGATGAGGAA	AATGTTGTCAGAAGATGGGCT
IFBD 10	CTCAGAAGAAATCAGGTTGG	ACCTCAAGAGTCATGGTTG
IFBD 11	ACACACACCGAGGAACCTTAG	TTTTCTTCGGAGATACTTTC
IFBD 12	TGAAAGATAACTTATGCTCTGTA	CCACTTCCTGGAGATTCATA
IFBD 13	AGCCCCAAGAAAGAGAACATC	CTGGTCTTTTTAGTTGCATA
IFBD 14	TAACCCAGATGGACTGTGAT	TCATATCTTGAAGCAAACC
IFBD 15	AAGTACATCTGGATCAAAGAAAG	TCTGAATAGGATGTAAGTTGTGTA
IFBD 16	GTCCTCAGAAAGGATGAAACTG	TACTAATTAGGCGGTTTTAGT
HASTE	AGTGATGGTTCGTGTTGGAG	GAAGTGTGTTCCGACTCTGG

Ie - Sequência dos iniciadores utilizados no PCR em tempo real

Nome	FORWARD	REVERSE
Gapdh	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	GTGGTTCACACCCATCACAA
B-actina	GTGGGAATGGGTCAGAAGG	GGTCATCTTTTACGGTTGG
Cyclo	AATGCTGGACCAAACACAAA	CCTTCTTTACCTTCCAAA
Bpag1a	ATTCAAGAGTTCATGGACCTACGG	TTCTCCTCTTCCAGCCTTT