

Uirá Souto Melo

Desvendando as bases moleculares da síndrome SPOAN: deleção em homozigose em região regulatória leva à superexpressão do gene *KLC2*

Unraveling the molecular basis of SPOAN syndrome: deletion in homozygosis in regulatory region leads to *KLC2* gene overexpression

São Paulo

2016

Uirá Souto Melo

Desvendando as bases moleculares da síndrome SPOAN: deleção em homozigose em região regulatória leva à superexpressão do gene *KLC2*

Unraveling the molecular basis of SPOAN syndrome: deletion in homozygosis in regulatory region leads to *KLC2* gene overexpression

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

Orientador(a): Fernando Kok
Co-orientador(a): Silvana Santos

VERSÃO CORRIGIDA - O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP.

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Souto Melo, Uirá

Desvendando as bases moleculares da síndrome SPOAN: deleção em homozigose em região regulatória leva à superexpressão do gene *KLC2*

80 páginas

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

1. Palavra-Chave Principal – Síndrome SPOAN 2. Palavra-Chave Secundária – Paraplegia espástica 3. Palavra-Chave Secundária – *KLC2* 4. Palavra-Chave Secundária – Estudo funcional Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Fernando Kok

Orientador(a)

Epígrafe

Se avexe não...
Amanhã pode acontecer tudo
Inclusive nada

Se avexe não...
A lagarta rasteja até o dia
Em que cria asas

Se avexe não...
Que a burrinha da felicidade
Nunca se atrasa

Se avexe não...
Amanhã ela pára na porta
Da sua casa

Se avexe não...
Toda caminhada começa
No primeiro passo
A natureza não tem pressa
Segue seu compasso
Inexoravelmente chega lá
(...)

Flávio José, A Natureza das Coisas

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Kok, por toda a dedicação, amizade, carinho e presteza durante o período de orientação.

À minha eterna “comadre” e co-orientadora Profa. Dra. Silvana Santos, a ela dedico toda minha vida científica.

À minha “ex” mãe científica e eterna colaboradora Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto e ao excelentíssimo Prof. Dr. Paulo Otto. Agradeço também aos professores Ângela Morgante, Luciana Haddad, Maria Rita Passos Bueno e Merari Ferrari pela oportunidade de aprendizado e discussão sobre ciência. Em especial, agradeço à Profa. Dra. Mayana Zatz pela oportunidade de realizar os experimentos do doutorado em seu laboratório.

Ao Ph.D. Len Pennacchio por ter me recebido no seu laboratório situado na cidade de Berkeley, Estados Unidos, durante meu período de “doutorado-sanduíche”. Também agradeço aos grandes amigos do laboratório nos EUA: Iros Barrozi, Evgeny Kvon, Remo Monti, Marco Osterwalder, Cailyn Spurrel, Brandon Manion entre outros. Em especial, agradeço a Lindsay Capellot pela companhia e por todo carinho que me deu durante os meses nos EUA.

À Dra. Nora Calcaterra por ter me recebido tão bem em seu laboratório em Rosário, na Argentina. À todos os integrantes desse laboratório, em especial à Ezequiel Margarit, Valeria Mouguelar, Pablo Armas, Gabi Coux, Aldana David e Sofia Heckell. Meus sinceros agradecimentos pela hospitalidade, ajuda e companhia.

Aos bons e velhos amigos do Laboratório de Genética Humana: Leandro Ucela, Dayane Cruz, Ana Carla Batisso, Lilian Kimura, Renan Lemos, Rodrigo Salazar, Juliana Prior, Teresa Balester. Às minhas queridas amigas Fátima Caly e Maria Raimunda do laboratório da Professora Ângela Morgante, as quais foram pessoas essenciais na minha formação e convivência dentro do espaço da USP. Também agradeço a companhia de Maraísa Sebastião e Paulo Rogério, dois grandes amigos que lembrarei sempre com muito carinho.

Aos grandes amigos do Laboratório de Evolução Humana coordenado pelo querido Prof. Dr. Walter Neves e pelo Prof. Dr. Rui Murrieta, a quem tenho enorme admiração. Agradeço também a amizade dos alunos desse laboratório, em especial ao conterrâneo Carlos Frederico e à Mariana Inglez.

Agradecimentos

Aos bons e novos amigos do Laboratório de Doenças Neuromusculares: Melinda Beccari, Naila Lourenço, Antônia Cerqueira, Luiz Caires, Ernesto Goulart, Thiago Rosa, Lucia Inês Macedo Souza, Danyllo Oliveira, Bruno Ghirotto, Giovanna Pontillo, Carolina Rauffus, Gabriel Lauria, Bárbara Bischain e Lucas Leite. Aos bons amigos e colegas do Laboratório de Genética do Desenvolvimento (vulgo sala 200): Carol Malcher, Lucas Alvizi, Roberto Fanganiello, Bela Mayá, Luciano Abreu, Felipe Ishy, Simone Gomes, Gerson Kobayashi, Duda Morgana entre vários outros. Agradeço em especial ao Dr. João Kitajima por todas as trocas de conversa e discussão sobre temas relacionados à bioinformática.

À todos os participantes do NEGE da Universidade Estadual da Paraíba, entre eles: Thalita Figueiredo, Thiago Pequeno, Aluska Matias, Prof. Dr. Mathias Weller, Roberta Smania, Karol Souza, Fernando Lopes entre outros que participaram ativamente da construção do NEGE.

À minha família paulistana, amigos que a vida me apresentou no primeiro ano de residência em São Paulo e que me acompanharam por toda minha trajetória. Agradeço enormemente a vocês: Fernando Mouron, Erika Jessica Maria Alexandra Medina Barrantes, Matheus Soldi Hardt, Francisco Urdinez, Lucio Salles e Alysson Moraes.

Aos eternos amigos do curso de Biologia 2006.2 da Universidade Estadual da Paraíba: Mariana Fragoso, Ribamar Lima, Thiago Severo, Magna Barbosa, Fernanda Brito, Ana Amélia Calazans, Daniela Lima e Emmannuel Duarte. Em especial, agradeço a super amizade do meu querido e eterno companheiro Allysson Allan de Farias.

Aos meus pais, Fabíola e Josemir, pelo apoio psicológico, emocional e financeiro. Aos meus irmãos Cauê, Tainá e Anaíra pelo prazer da convivência. À minha avó, aos meus tios e tias, primos e primas. À todos os meus amigos queridos: Edilson Junior, Thiago Alcântara, Felício Queiroz, Filipi Freire, Jalmair Araújo, Yury Frederico, Felipe Vasconcelos, Fagner Melo, Luciano Lonegro, dentre muitos outros.

Aos pacientes que aceitaram participar deste projeto de pesquisa.

À CAPES pela bolsa de doutorado e “doutorado-sanduiche” concedidas.

À FAPESP pelo auxílio financeiro à realização dos experimentos.

Índice

Apresentação da tese de doutorado	1
Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução	5
1.1. Paraplegias espásticas hereditárias	5
1.2. Transporte axonal	9
1.3. Cinesinas	12
1.4. Doenças neurodegenerativas associadas ao defeito de transporte axonal	15
1.5. Modelos animais de neurodegeneração	16
1.6. Síndrome SPOAN	19
1.7. Objetivos	22
1.7.1. Objetivos específicos	22
2. Materias e métodos	23
2.1. Casuística	23
2.2. Estudo molecular realizado no laboratório de doenças neuromusculares do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo	24
2.2.1. Sequenciamento de nova geração e estudo de segregação das variantes	24
2.2.2. Extração de RNA, cDNA e PCR em tempo real (qRT-PCR)	25
2.3. Colaboração com outros centros de pesquisa	26
2.4. Modelo animal de <i>zebrafish</i>	27
2.4.1. Extração de RNA de <i>zebrafish</i> e cDNA	27
2.4.2. Clonagem dos cDNAs do <i>klc2</i> em plasmídeos	28
2.4.3. Estudo de <i>knockdown</i> do <i>klc2</i> em <i>zebrafish</i>	30
2.4.4. Superexpressão do <i>klc2</i> e resgate de fenótipo em <i>zebrafish</i>	31
2.4.5. <i>Whole-mount in situ hybridization</i> (WISH)	31
2.5. Metodologia do uso do modelo animal de camundongo	32
2.5.1. Plasmídeos e ensaio de gene <i>reporter</i> por LacZ	32
2.5.2. Superexpressão do gene <i>KLC2</i> humano em camundongo	33

Índice

3. Resultados e discussão	35
3.1. Identificação da variante patogênica associada à síndrome SPOAN	35
3.2. Artigo publicado na revista <i>Human Molecular Genetics</i>	38
3.3. Resultados do experimento de WISH em <i>zebrafish</i>	55
3.4. Ensaio realizado em modelo de camundongo	56
3.4.1. Resultados do gene <i>reporter</i> LacZ em embriões de camundongo	57
3.4.2. Superexpressão do <i>KLC2</i> humano em camundongo	59
3.4.2.1. Camundongos da geração F0	60
3.4.2.2. Camundongos da geração F1	63
4. Considerações finais e perspectivas futuras	68
5. Referências	71

Índice de Tabelas

Tabela 1. <i>Loci</i> e genes relacionados às HSPs.....	6
Tabela 2. Ortólogos de <i>zebrafish</i> associados à HSPs em <i>Homo sapiens</i>	17
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do cDNA do <i>klc2</i>	30
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados no estudo de camundongos transgênicos.....	34
Tabela 5. Variantes detectadas em homozigose pelo WES na região cromossômica ligada à síndrome SPOAN.....	36

Índice de Figuras

Figura 1. Representação estrutural das cinesinas e dineínas, e o sentido de locomoção dessas proteínas motoras em relação a polarização do microtúbulo.....	11
Figura 2. As estruturas denominadas de <i>head</i> , <i>neck</i> , <i>stalk</i> e <i>tail</i> são estruturas representativas das KHCs.....	13
Figura 3. A região tetratricopeptídeo (TRP) <i>coiled-coil</i> , que tem como função o reconhecimento de cargas específicas a serem transportadas pela cinesina.....	14
Figura 4. Genealogia de um grande núcleo familiar da síndrome SPOAN do estado do Rio Grande do Norte.....	20
Figura 5. Sequência do plasmídeo pCS2+MT com o cDNA do <i>eGFP</i> fusionado.....	29
Figura 6. Padrão de expressão do <i>klc2</i> por meio de WISH em embriões no estágio de 4 a 8 células (a,c) e embriões no estágio de 15 a 20 somitos (b,d,e,f).....	55
Figura 7. Padrão de expressão do <i>klc2</i> por meio de WISH em embriões no estágio de 48-hpf (a,b,c,d) e embriões no estágio de 72-hpf (e,f)	56
Figura 8. Expressão do LacZ em embriões no estágio e.15.5 usando a construção da região regulatória <i>wild-type</i>	58
Figura 9. Expressão do LacZ em embriões no estágio e.15.5 usando a construção da região regulatória com a deleção de 216-pb.....	59
Figura 10. Esquematização da localização dos <i>amplicons</i> da PCR no Fosmídeo.....	60
Figura 11. qPCR mostrando o número de cópias do <i>KLC2</i> humano inseridos no genoma de camundongos da linhagem F0.....	61
Figura 12. Gráficos mostrando a avaliação do peso dos camundongos transgênicos e controles durante sete semanas.....	62
Figura 13. qRT-PCR usando cDNA de cérebro de camundongos transgênicos coletados no estágio de P10 comparados com o mesmo tecido de camundongos <i>wild-type</i> , pareados para a mesma ninhada.....	64
Figura 14. Genealogia dos camundongos e resultado do qPCR mostrando o número de cópias do <i>KLC2</i> humano nos camundongos transgênicos da geração F1.....	65
Figura 15. Genealogia simples e qPCR mostrando o número de cópias do <i>KLC2</i> humano nos camundongos transgênicos da geração F2.....	67

Apresentação da tese de doutorado

A síndrome SPOAN é uma doença neurodegenerativa de herança autossômica recessiva pertencente ao grande grupo das paraplegias espásticas hereditárias (HSP). As HSPs são um grupo nas quais os pacientes apresentam espasticidade progressiva e fraqueza dos membros inferiores. Até o presente momento mais de 70 *loci* foram associados à HSP e em mais da metade o gene associado à condição foi identificado. SPOAN é o acrônimo dos principais sinais clínicos, em inglês *spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy*.

O estudo clínico e genético de indivíduos com a síndrome SPOAN vêm sendo realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) desde 2003 sob coordenação da Profa. Dra. Mayana Zatz e do Prof. Dr. Fernando Kok. A casuística foi identificada durante o doutoramento da Profa. Dra. Silvana Santos, hoje docente da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), e foi avaliada clinicamente pela equipe do Prof. Dr. Fernando Kok do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). A descrição clínica e genética inicial dessa síndrome foi realizada durante a tese de doutoramento da Dra. Lucia Inês Macedo Souza.

Ao longo do período de dez anos foram identificadas mais de 70 pessoas afetadas com a síndrome SPOAN, oriundas da região do interior do estado do Rio Grande do Norte. Além desse grande *cluster*, outros três pacientes sem parentesco com os pacientes da região do Rio Grande do Norte também foram diagnosticados com essa síndrome, sendo esses oriundos dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Em colaboração com Joseph Gleeson, MD, Ph.D., do laboratório de neurogenética da *University of California, San Diego*, identificamos mais dois pacientes egípcios (irmãos) com essa doença.

Nessa tese de doutorado foram realizados estudos genômicos e funcionais para identificar e avaliar a patogenicidade da variante associada à síndrome SPOAN. A introdução da tese é uma

revisão da literatura sobre paraplegias espásticas hereditárias, sobre o tráfego de vesículas axonal, sobre as proteínas motoras cinesinas, doenças neurodegenerativas associadas ao defeito de transporte axonal e sobre a síndrome SPOAN. A seção de materiais e métodos apresenta todas as técnicas e procedimentos realizados dos estudos genéticos e funcionais desta tese. A seção dos resultados e discussão consiste na descrição da variante patogênica associada ao fenótipo e estudos funcionais em modelos *in vitro* e *in vivo*. Nessa seção também se encontra o artigo originado desta tese, na íntegra, com título “*Overexpression of KLC2 due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome*”, publicado no periódico internacional *Human Molecular Genetics* (A1 para área de Genética). Para finalizar, a última seção da tese discerne sobre as considerações finais e perspectivas futuras reúne os principais achados experimentais dessa tese de doutoramento e as possíveis novas estratégias para continuar a investigação do mecanismo patofisiológico da síndrome SPOAN.

Resumo

A síndrome SPOAN (acrônimo do inglês *spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy*) é uma doença neurodegenerativa de herança autossômica recessiva que tem como achados clínicos a atrofia ótica congênita não progressiva, paraplegia espástica e neuropatia ambas progressivas. Ela havia sido mapeada na região cromossômica 11q13, porém a variante patogênica e o gene associados à síndrome não haviam sido identificados. Após execução do sequenciamento do genoma completo de um paciente foi detectada a deleção de 216-pb (chr11.hg19:g.66,024,557_66,024,773del) em homozigose localizada em região regulatória *upstream* do gene *KLC2*. Surpreendentemente, essa deleção causa superexpressão do *KLC2*, detectada em estudos de *Real-Time Quantitative Reverse Transcription* PCR (qRT-PCR) utilizando fibroblastos e neurônios motores de pacientes comparados com controles. Ensaios utilizando o *Danio rerio* como modelo *in vivo* mostraram que tanto o *knockdown* quanto a superexpressão do *kcl2* em embriões de *zebrafish* causa o fenótipo de cauda curvada (leve ou grave); fenótipo esse associado às doenças neurodegenerativas e HSPs. Superexpressão de um gene causada por uma pequena deleção em região regulatória é um novo mecanismo que até então não havia sido descrito na condição autossômica recessiva. Estudos funcionais por meio de gene *reporter* de LacZ avaliando o padrão de expressão espaço-temporal da região regulatória *wild-type* e com a deleção de 216-pb foram realizados nesse trabalho em modelo de camundongo, porém, não foi possível identificar um padrão de expressão reprodutível do gene *reporter* nesse modelo. Por fim, camundongos transgênicos para a superexpressão do *KLC2* humano foram gerados, no entanto não foram realizados testes físicos e comportamentais para validar o transgênico como modelo para síndrome SPOAN.

Abstract

SPOAN (the acronym of its clinical symptoms) syndrome is a neurodegenerative disorder mainly characterized by a progressive spastic paraplegia, congenital non-progressive optic atrophy and progressive neuropathy. A potential causative gene was mapped at 11q13, but so far no gene and mutation were identified. Whole-genome sequencing allowed to detect a homozygous 216-bp deletion (chr11 hg19:g.66,024,557_66,024,773del) located at the regulatory upstream region of the *KLC2* gene. Surprisingly, this deletion causes *KLC2* overexpression detected by Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) using fibroblasts and motor-neurons from patients compared with controls. Assays using *Danio rerio* as *in vivo* model showed that the *klc2* knockdown either its overexpression in zebrafish embryos causes mild to severe curly-tail phenotype; phenotype that is already well defined as suggestive of a neurodegenerative disorder and HSP. Overexpression of a gene caused by a small deletion in the regulatory region is a novel mechanism, which to the best of our knowledge, was never reported before in a recessive condition. Functional studies using LacZ reporter assay evaluating the spatiotemporal expression pattern of wild-type regulatory region and with the deletion of 216-bp were performed in this work using mouse, but was not possible to identify an specific gene reporter expression pattern in this animal model. As a last experiment, transgenic mice for human *KLC2* overexpression were generated, though behavioral tests were not performed to validate this transgenic animal as a model for SPOAN syndrome.

1. Introdução

1.1. Paraplegias espásticas hereditárias

As paraplegias espásticas hereditárias (HSPs, do inglês *hereditary spastic paraplegia*) são um grupo diverso de doença genética neurodegenerativa caracterizadas por fraqueza muscular e rigidez progressiva nas extremidades inferiores que resultam da degeneração dos axônios dos neurônios motores superiores (Blackstone *et al.*, 2011; Schule & Schols, 2011). Com base na presença ou ausência de outros distúrbios neurológicos, as HSPs são classificadas como não complicadas (puras) e complicadas, respectivamente. As HSPs não complicadas têm como achados clínicos apenas a paraparesia progressiva, fraqueza muscular e espasticidade nos membros inferiores. As HSPs complicadas podem apresentar, além das características citadas acima, outros quadros clínicos como surdez, ataxia, retardo mental, sinais extrapiramidais, distúrbios visuais e epilepsia. As HSPs são geralmente progressivas e apresentam idade de início de manifestação muito variável.

A heterogeneidade de apresentação clínica é acompanhada pela heterogeneidade genética. Até o presente, mais de 70 *loci*, que incluem quase todos os mecanismos de herança, foram associados às HSPs (Blackstone *et al.*, 2011; Schule & Schols, 2011; Fink, 2006; Salinas *et al.*, 2008; Ikenaka *et al.*, 2012; Finsterer *et al.*, 2012; Millecamps & Julien, 2013; Lo Giudice *et al.*, 2014). Os casos de HSP apresentam transmissão de herança compatível com autossômico recessivo (AR), autossômico dominante (AD) ou ligado ao cromossomo X. Os *loci* associados às HSPs recebem o nome de SPG e foram descritos na **Tabela 1**. Até o presente momento, a maioria dos *loci* associados à HSP teve a identidade do gene e a variante patogênica causadora da doença elucidadas.

Tabela 1. Locus e genes relacionados às HSPs. Fonte: OMIM, 2016; Finsterer *et al.*, 2012; Millecamps & Julien, 2013; Novarino *et al.*, 2014; Halevy *et al.*, 2014; Lo Giudice *et al.*, 2014.

<i>Locus</i>	<i>Definição</i>	<i>Transmissão</i>	<i>Região</i>	<i>Gene</i>
SPG1	Paraplegia espástica 1	Ligada ao X Recessiva	Xq28	<i>LICAM</i>
SPG2	Paraplegia espástica 2	Ligada ao cromossomo X	Xq22.2	<i>PLP1</i>
SPG3A	Paraplegia espástica 3	Autossômica Dominante	14q22.1	<i>ATL1</i>
SPG4	Paraplegia espástica 4	Autossômica Dominante	2p22.3	<i>SPAST</i>
SPG5A	Paraplegia espástica 5	Autossômica Recessiva	8q12.3	<i>CYP7B1</i>
SPG5B	Paraplegia espástica 5B	Autossômica Recessiva	-	-
SPG6	Paraplegia espástica 6	Autossômica Dominante	15q11.2	<i>NIPA1</i>
SPG7	Paraplegia espástica 7	Autossômica Recessiva	16q24.3	<i>SPG7</i>
SPG8	Paraplegia espástica 8	Autossômica Dominante	8q23-q13	<i>KIAA0196</i>
SPG9	Paraplegia espástica 9	Autossômica Dominante	10q23.3-24.1	-
SPG10	Paraplegia espástica 10	Autossômica Dominante	12q13.3	<i>KIF5A</i>
SPG11	Paraplegia espástica 11	Autossômica Recessiva	15q21.1	<i>SPG11</i>
SPG12	Paraplegia espástica 12	Autossômica Dominante	19q13.32	<i>RTN2</i>
SPG13	Paraplegia espástica 13	Autossômica Dominante	2q24-q34	<i>SSPD1</i>
SPG14	Paraplegia espástica 14	Autossômica Recessiva	3q27-q28	-
SPG15	Paraplegia espástica 15	Autossômica Recessiva	14q24.1	<i>ZFYVE26</i>
SPG16	Paraplegia espástica 16	Ligada ao X	Xq11.2	<i>SPG16</i>
SPG17	Paraplegia espástica 17	Autossômica Dominante	11q12-q14	<i>BSCL2</i>
SPG18	Paraplegia espástica 18	Autossômica Recessiva	8p11.23	<i>ERLIN2</i>
SPG19	Paraplegia espástica 19	Autossômica Dominante	9q	-
SPG20	Síndrome de Troyer	Autossômica Recessiva	13q13.3	<i>SPG20</i>
SPG21	Paraplegia espástica 21	Autossômica Recessiva	15q21	<i>SPG21</i>
SPG22	Paraplegia espástica 22	Ligada ao X	Xq21	<i>SLC16A2</i>
SPG23	Paraplegia espástica 23	Autossômica Recessiva	1q24-q32	-
SPG24	Paraplegia espástica 24	Autossômica Recessiva	13q14	-
SPG25	Paraplegia espástica 25	Autossômica Recessiva	6q23-q24.1	-
SPG26	Paraplegia espástica 26	Autossômica Recessiva	12p11.1-q14	<i>B4GALNT1</i>
SPG27	Paraplegia espástica 27	Autossômica Recessiva	10q22.1-q24.1	<i>ENTPDI</i>
SPG28	Paraplegia espástica 28	Autossômica Recessiva	14q22.1	<i>DDHD1</i>
SPG30	Paraplegia espástica 30	Autossômica Recessiva	2q37.3	<i>KIF1A</i>
SPG31	Paraplegia espástica 31	Autossômica Dominante	2p11.2	<i>REEP1</i>
SPG32	Paraplegia espástica 32	Autossômica Recessiva	14q12-q21	-
SPG33	Paraplegia espástica 33	Autossômica Dominante	10q24.2	<i>ZFYVE27</i>
SPG34	Paraplegia espástica 34	Ligada ao X	Xq24-q25	-
SPG35	Paraplegia espástica 35	Autossômica Recessiva	16q23.1	<i>FA2H</i>
SPG36	Paraplegia espástica 36	Autossômica Dominante	12q23-q24	-
SPG37	Paraplegia espástica 37	Autossômica Dominante	8p21.1-q13.3	-

Continuação da Tabela 1. Locus e genes relacionados às HSPs. Fonte: OMIM, 2016; Finsterer *et al.*, 2012; Millecamps & Julien, 2013; Novarino *et al.*, 2014; Halevy *et al.*, 2014; Lo Giudice *et al.*, 2014.

Locus	Definição	Transmissão	Região	Gene
SPG38	Paraplegia espástica 38	Autossômica Dominante	4p16-p15	-
SPG39	Paraplegia espástica 39	Autossômica Recessiva	19p13.2	<i>PNPLA6</i>
SPG40	Paraplegia espástica 40	Autossômica Dominante	-	-
SPG41	Paraplegia espástica 41	Autossômica Dominante	11p14.1-p11.2	-
SPG42	Paraplegia espástica 42	Autossômica Dominante	3q25.31	<i>SLC33A1</i>
SPG43	Paraplegia espástica 43	Autossômica Recessiva	19p13.11-q12	<i>C19orf12</i>
SPG44	Paraplegia espástica 44	Autossômica Recessiva	1q42.13	<i>GJC2</i>
SPG45	Paraplegia espástica 45	Autossômica Recessiva	10q24.3-q25.1	<i>ERLIN1</i>
SPG46	Paraplegia espástica 46	Autossômica Recessiva	9p13.3	<i>GBA2</i>
SPG47	Paraplegia espástica 47	Autossômica Recessiva	1p13.2-1p12	<i>AP4B1</i>
SPG48	Paraplegia espástica 48	Autossômica Recessiva	7p22.1	<i>AP5Z1</i>
SPG49	Paraplegia espástica 49	Autossômica Recessiva	14q32.31	<i>TECPR2</i>
SPG54	Paraplegia espástica 54	Autossômica Recessiva	8p11.23	<i>DDHD2</i>
SPG55	Paraplegia espástica 55	Autossômica Recessiva	12q24.31	<i>C12ORF65</i>
SPG56	Paraplegia espástica 56	Autossômica Recessiva	4q25	<i>CYP2U1</i>
SPG57	Paraplegia espástica 57	Autossômica Recessiva	3q12.2	<i>TFG</i>
SPG58	Paraplegia espástica 58	Autossômica Recessiva	17p13.2	<i>KIF1C</i>
SPG59	Paraplegia espástica 59	Autossômica Recessiva	15q21.2	<i>USP8</i>
SPG60	Paraplegia espástica 60	Autossômica Recessiva	3p22.2	<i>WDR48</i>
SPG61	Paraplegia espástica 61	Autossômica Recessiva	16p12.3	<i>ARL6IP1</i>
SPG62	Paraplegia espástica 62	Autossômica Recessiva	10q24.31	<i>ERLIN1</i>
SPG63	Paraplegia espástica 63	Autossômica Recessiva	1p13.3	<i>AMPD2</i>
SPG64	Paraplegia espástica 64	Autossômica Recessiva	10q24.1	<i>ENTPD1</i>
SPG65	Paraplegia espástica 65	Autossômica Recessiva	10q24.3-q25.1	<i>NT5C2</i>
SPG66	Paraplegia espástica 66	Autossômica Recessiva	5q32	<i>ARSI</i>
SPG67	Paraplegia espástica 67	Autossômica Recessiva	2q33.1	<i>PGAP1</i>
SPG68	Paraplegia espástica 68	Autossômica Recessiva	11q13.1	<i>FLRT1</i>
SPG69	Paraplegia espástica 69	Autossômica Recessiva	1q41	<i>RAB3GAP2</i>
SPG70	Paraplegia espástica 70	Autossômica Recessiva	12q13.3	<i>MARS</i>
SPG71	Paraplegia espástica 71	Autossômica Recessiva	5p13.3	<i>ZFR</i>
-	-	Autossômica Recessiva	9p13.2	<i>EXOSC3</i>

Mais da metade dos casos de HSPs na América do Norte e do norte europeu podem ser atribuídos a defeitos de organelas (Soderblom & Blackstone, 2006). Em geral, as variantes patogênicas que causam HSP modificam a estrutura do retículo endoplasmático (RE) ou

interrompem a relação de transporte intracelular de vesículas e macromoléculas do RE com o complexo de Golgi. O RE é composto por uma rede de túbulos de membrana e cisternas que se estendem por todo o citoplasma e encerram no núcleo (Voeltz *et al.*, 2002; Renvoise & Blackstone, 2010; Friedman & Voeltz, 2011). Vários fatores contribuem para estrutura do ER, incluindo as proteínas da membrana REEP e proteínas da família reticulon, os reguladores do citoesqueleto de microtúbulos e os componentes da via de secreção da vesícula, que controlam a biogênese e excreção (Voeltz *et al.*, 2006; Audhya *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010; Park & Blackstone, 2010; Dykstra *et al.*, 2010; Valenzuela *et al.*, 2011; Zanetti *et al.*, 2012).

Dentre as diferentes formas de HSP, estão melhores caracterizados os genes *SPAST*, *ATL1* e *REEP1*, os quais codificam as proteínas espastina, atlastina GTPase-1, e REEP1, respectivamente; proteínas essas responsáveis pela organização da estrutura do RE, bem como atuam na regulação do transporte intracelular de vesículas e macromoléculas entre o RE e o complexo de Golgi. As variantes patogênicas em *SPAST* foram as primeiras a serem identificadas e são as mais frequentes em pacientes com HSP não complicada de transmissão AD (Hazan *et al.*, 1999). A proteína espastina se liga aos microtúbulos do citoesqueleto, e dessa forma, atua regulando a morfologia e a estrutura do RE (Park *et al.*, 2010; Connell *et al.*, 2009). Variantes patogênicas no *ATL1* também são frequentes em formas de HSP não complicada (Zhao *et al.*, 2001) e a ausência dessa proteína na célula interfere na formação da estrutura do ER e inibe o alongamento axonal nos neurônios corticais de ratos (Zhu *et al.*, 2006; Bian *et al.*, 2011). Variantes patogênicas em *REEP1* causam HSP não complicada, e esse gene, juntamente com reticulon, é responsável por gerar e manter as curvas das membranas do RE (Zuchner *et al.*, 2006; Friedman & Voeltz, 2011; Montenegro *et al.*, 2012). Outros estudos demonstraram que a espastatina interage bioquimicamente com proteínas da família da atlastina, REEP e reticulon, sugerindo que essas proteínas estejam fortemente associadas na formação e manutenção do RE

(Mannan *et al.*, 2006). Além disso, o efeito das variantes patogênicas nos genes que causam HSP sugere que o próprio RE deva desempenhar uma função importante na manutenção do axônio até então ainda pouco conhecida.

Além de defeitos no RE, variantes patogênicas em genes relacionados à função mitocondrial, mielinização, tráfego de vesículas e transporte de membranas também estão relacionados à HSP (Lo Giudice *et al.*, 2014). Defeitos de mitocôndria já estão associados com HSPs desde o final da década de 90. Variantes patogênicas em *SPG7*, por exemplo, que codifica a proteína paraplegina, podem causar HSP não complicada e complicada em famílias com padrão de herança AR, indicando o possível envolvimento da disfunção da fosforilação oxidativa mitocondrial desencadeando o fenótipo de HSP (Casari *et al.*, 1998). Outro gene com função mitocondrial associado à HSP é o *HSPDI*, que codifica a proteína chaperonina e está envolvido com o dobramento e montagem de proteínas importadas pela mitocôndria (Hansen *et al.*, 2002). Ademais, acredita-se que *SPG20*, também associado à HSP, tenha algum envolvimento com atividade mitocondrial (Blackstone *et al.*, 2011). Outro mecanismo importante para o desenvolvimento de HSPs, entre outras doenças neurodegenerativas, é o defeito no transporte axonal neuronal (Stevanin *et al.*, 2008; Dion *et al.*, 2009). Este tema está discutido na seção 1.4 desse capítulo.

1.2. Transporte axonal

O transporte axonal é responsável pelo tráfego bidirecional de vesículas (mitocôndrias, lisossomos, vesículas sinápticas entre outras) e macromoléculas (RNA, proteínas, lipídeos, etc.) entre o corpo celular neuronal e sua terminação axonal (Millecamps & Julien, 2013). Esse transporte, juntamente com outros mecanismos de tráfego neuronal, é de fundamental importância para formação da dinâmica das estruturas pré e pós-sinápticas, e para o

desenvolvimento e manutenção de processos axonais e dendríticos (Maeder *et al.*, 2014). O transporte axonal tem de ser efetivo, visto que o axônio é uma estrutura delgada e longa, que pode chegar até um metro de comprimento em neurônios motores, e que necessita uma coordenação específica do transporte de carga, em especial das mitocôndrias, para realização funcional do tráfego interno (Lin & Sheng, 2015).

O transporte axonal é realizado por meio da ligação de proteínas motoras aos microtúbulos. Os microtúbulos do axônio são uniformemente polarizados, o que permite com que proteínas motoras “trafeguem” em apenas um sentido, diferentemente dos microtúbulos localizados na região dendrítica, que são polarizados em ambos os sentidos. O sentido da polarização do microtúbulo é essencial para diferenciar o transporte axonal anterógrado de retrógrado. O transporte anterógrado é definido pelo tráfego de cargas do corpo celular até a terminação axonal e é majoritariamente realizado pelas proteínas da família das cinesinas. O transporte retrógrado se dá no sentido inverso, carregando as cargas presentes na terminação axonal até o corpo celular (**Figura 1**), sendo as proteínas da família dineína responsáveis por esse transporte (Carter, 2013). Ambas as proteínas motoras (cinesinas e dineínas) hidrolisam ATP para realizar o transporte das vesículas e macromoléculas (Hirokawa *et al.*, 2010). Na **Figura 1** estão representadas as estruturas dessas proteínas.

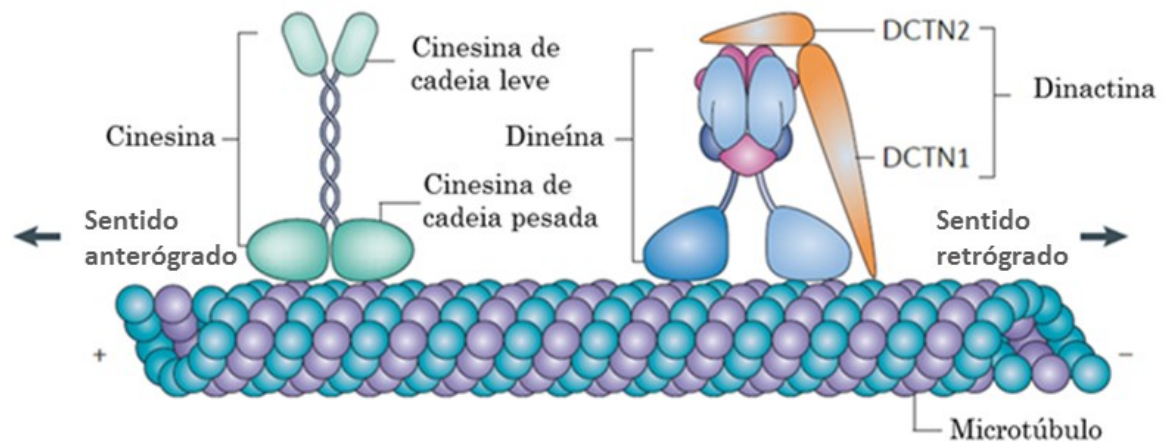


Figura 1. Representação estrutural das cinesinas e dineínas, e o sentido de locomoção dessas proteínas motoras em relação à polarização do microtúbulo. Figura modificada de Millecamps & Julien (2013).

O reconhecimento específico das vesículas e macromoléculas a serem transportadas através do axônio é feito pela extremidade das proteínas cinesinas e dineínas, com auxílio ou não de proteínas adaptadores. Essas proteínas motoras se ligam em sua região C-terminal a diversos adaptadores, os quais apresentam ligações específicas a um grupo restrito de vesículas e macromoléculas (Millecamps & Julien, 2013). Várias dessas proteínas adaptadoras são bem estudadas como, por exemplo, as proteínas da família TRAK, MIRO, JNK, entre outras (Fujita *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2007; Lin & Sheng, 2015). No modelo animal de *Drosophila*, a proteína adaptadora MIRO foi bem caracterizada por reconhecer o domínio de ligação de cargas das cinesinas (Glater *et al.*, 2006). Em relação aos mamíferos que não possuem a proteína MIRO, foram caracterizados ortólogos desse adaptador, que são as proteínas TRAK1 e TRAK2 (Koutsopoulos *et al.*, 2010; Macaskill *et al.*, 2009), e variantes patogênicas nessas proteínas adaptadoras estão relacionadas direta ou indiretamente com neurodegeneração (ver seção 1.4).

1.3. Cinesinas

As cinesinas são proteínas que atuam como “motores” responsáveis pelo transporte axonal de vesículas e organelas no sentido anterógrado (i.e., do corpo celular para a terminação axonal) por meio de microtúbulos (Pernigo *et al.*, 2013; Birsa *et al.*, 2013). As cinesinas se organizam em heterotetrâmeros e se ligam direta ou indiretamente às cargas que são transportadas ao longo do axônio (Akhmanova & Hammer, 2010; Baird & Bennett, 2013). Até o momento 45 genes, pertencentes a 14 superfamílias de cinesinas, já foram descritos (Hirokawa *et al.*, 2009; Verhey & Hammond, 2009). Dentre o grupo dessa superfamília proteica, a mais estudada é a cinesina-1, comumente chamada de KIF5 e está principalmente relacionada ao transporte axonal anterógrado de mitocôndrias (Hurd & Saxton, 1996; Pilling *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 1998). As três proteínas da superfamília KIF5 que atuam na formação do complexo cinesina-1 são KIF5A, KIF5B e KIF5C.

A estrutura proteica das cinesinas de diferentes proteínas da mesma superfamília apresenta alta conservação estrutural. O complexo das cinesinas é formado por duas cinesinas de cadeias pesadas (KHC, do inglês *kinesin heavy chain*) que se ligam diretamente ao microtúbulo e se movem ao longo do axônio, estando associadas ou não à duas cinesinas de cadeia leve (KLC, do inglês *kinesin light chain*), cuja função está relacionada à ligação às vesículas e macromoléculas a serem transportadas pelo complexo da cinesina (Bloom *et al.*, 1988; Yip *et al.*, 2016). A porção N-terminal das KHCs é denominada domínio motor ou *head* e, por meio de hidrólise de ATP, faz a ligação e se move ao longo dos microtúbulos (**Figura 2**). A estrutura *head* da cinesina pesada está conectada ao *stalk* por meio da estrutura *neck*. O *stalk* é composto por extensas repetições peptídicas em espiral (do inglês *coil*) que se dimerizam para formar a estrutura de corpo das cinesinas, sendo o *stalk* também responsável pelo reconhecimento e ligação às KLCs (Hackney, 2007). Já a subunidade C-terminal das KHCs (*tail*) está relacionada

ao reconhecimento e ligação aos adaptadores e cargas (Hirokawa *et al.*, 2010; Diefenbach *et al.*, 1998).

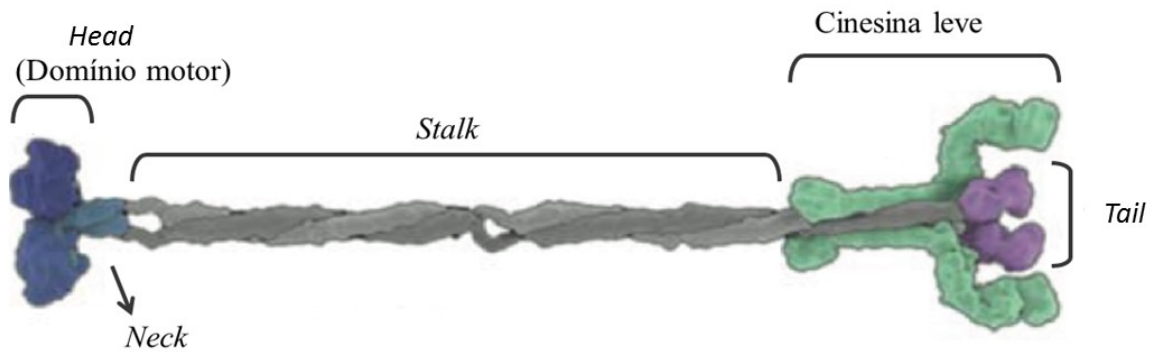


Figura 2. As estruturas denominadas de *head*, *neck*, *stalk* e *tail* são estruturas representativas das KHCs. As KLCs estão representadas na cor verde. Figura modificada de Carter (2013).

As cinesinas de cadeia leve também são divididas em três domínios: a região N-terminal formada por domínios *coiled-coil*, compostos por repetições heptapeptídicas que reconhecem a região *coiled-coil* das KHCs; a região de domínio repetitivo de tetratricopeptídeos (TRPs) e a região C-terminal (**Figura 3**). As duas últimas regiões citadas são as mais bem estudadas e têm como função realizar a ligação das cinesinas às mais diversas cargas (Kamal & Goldstein, 2002; Zhu *et al.*, 2012). Os domínios TRP são chamados de módulos de interação proteína-proteína, no qual consistem em repetições de 34 aminoácidos e são os domínios-chave para reconhecimento de cargas específicas (D'Andrea & Regan, 2003). Esses domínios apresentam diversidade estrutural dentro o grupo das KLCs.

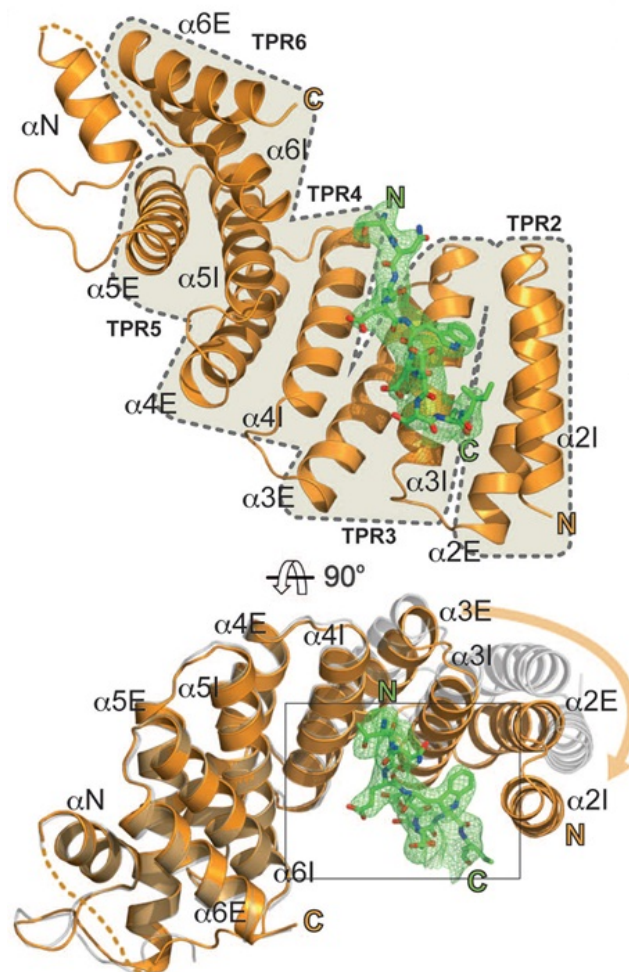


Figura 3. A região tetrapéptido (TRP) *coiled-coil*, que tem como função o reconhecimento de cargas específicas a serem transportadas pela cinesina. A região TRP está delimitada dentro da linha tracejada sombreada em cinza (Zhu *et al.*, 2012).

Quatro proteínas da família das cinesinas de cadeia leve foram descritas até o momento e são codificadas por quatro diferentes genes (*KLC1*, *KLC2*, *KLC3* e *KLC4*), sendo as proteínas *KLC1* e *KLC2* as mais estudadas e apresentam 67% de identidade proteica entre si (Moriyama *et al.*, 2014). O *KLC1*, bem como o *KLC2*, apresenta alta expressão em tecido cerebral e em neurônios, e as proteínas codificadas por esses genes se ligam à diversas proteínas adaptadoras e à cargas neuronais (McGuire *et al.*, 2006; Kamm *et al.*, 2004; Bracale *et al.*, 2007; Kimura *et al.*,

2005; Lalioti *et al.*, 2009; Araki *et al.*, 2007; Konecna *et al.*, 2006). Muitas proteínas adaptadoras e várias cargas são reconhecidas por ambas as cinesinas KLC1 e KLC2, porém algumas são reconhecidas apenas pela região TRP de uma das duas cinesinas de cadeia leve, tornando essencial o funcionamento de ambas em tecidos e tempos diferentes (Zhu *et al.*, 2012). Sabe-se também que o KLC2 tem papel importante na ligação física e tráfego de mitocôndrias e da enzima Na,K-ATPase (Trejo *et al.*, 2010).

A cinesina de cadeia leve-2 se liga fisicamente com as cinesinas de cadeia pesada KIF5A e KIF5B (Morton *et al.*, 2010). O *KLC2*, localizado na região cromossômica 11q13.2 (chr11:66025174-66035332), apresenta 14 transcritos e duas isoformas proteicas conhecidas com 622 (CCDS8130) e 545 (CCDS44653) resíduos de aminoácidos. O maior transcrito tem aproximadamente 3-Kb e possui 16 éxons, sendo o primeiro deles não codificador. O *KLC2* expressa-se principalmente em tecido nervoso central e periférico (Cabeza-Arvelaiz *et al.*, 1993; Rahman *et al.* 1998). Até o presente momento, variantes patogênicas em *KLC2* não haviam sido associadas a qualquer doença genética.

1.4. Doenças neurodegenerativas associadas ao defeito de transporte axonal

Defeitos relacionados à formação e manutenção dos microtúbulos geralmente são deletérios e acarretam a morte neuronal (Rahman *et al.*, 1999; Mandelkow & Mandelkow, 2002). Defeitos de transporte axonal, principalmente o defeito de transporte de mitocôndrias, também estão relacionados a diversos casos de doenças neurodegenerativas e de distúrbios neurológicos (Sheng & Cai, 2012; Gindhart *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 1999; Mandelkow & Mandelkow, 2002; Stokin *et al.*, 2005; Perlson *et al.*, 2010; Millicamps & Julien, 2013). Tanto as proteínas motoras como as adaptadoras envolvidas no transporte axonal podem causar, quando mutadas, neurodegeneração. Alterações estruturais ou que levem a diminuição da expressão das proteínas

adaptadoras MIRO e TRAK causam deficiência no transporte anterógrado de mitocôndrias (Stowers *et al.*, 2002; van Spronsen *et al.*, 2013; Brickley & Stephenson, 2011). Variantes patogênicas em genes da família da dineína (Lipka *et al.*, 2013) e das cinesinas de cadeia pesada (*KIF2A*, *KIF1B*, *KIF5C* e *KIF21A*) já foram associadas a várias doenças neurodegenerativas (revisão em Maday *et al.*, 2014). Entre as cinesinas de cadeia leve, *KLC1* é mais investigada e foi a primeira a ser associada à neurodegeneração, tal como há sugestões da importância dessa cinesina na doença de Alzheimer (Morihara *et al.*, 2014), e ela apresenta 67% de identidade a nível proteico com *KLC2*.

Dentro do espectro das paraplegias espásticas hereditárias, variantes patogênicas em três cinesinas de cadeia pesada (*KIF5A*, *KIF1A* e *KIF1C*) foram associadas à HPS (Reid *et al.*, 2002; Ebbing *et al.*, 2008; Novarino *et al.*, 2014; Caballero Oteyza *et al.*, 2014). Variantes patogênicas em *KIF5A*, que codifica a proteína cinesina de cadeia pesada da isoforma 5A, por exemplo, causam diminuição da afinidade e velocidade de transporte de macromoléculas através do axônio, resultando na HSP conhecida como SPG10 (Ebbing *et al.*, 2008). Recentemente foi descrita uma família com HSP apresentando uma variante patogênica em homozigose na cinesina de cadeia leve-4 codificada por *KLC4* (Bayrakli *et al.*, 2015), evidenciando que a perda de função das cinesinas, tanto da cadeia pesada quanto da leve, tem papel fundamental no distúrbio do transporte axonal, causando neurodegeneração e levando ao fenótipo de paraplegia espástica hereditária.

1.5. Modelos animais de neurodegeneração

Diversos modelos animais mostraram que defeito de transporte axonal causa neurodegeneração. Várias espécies de animais, desde *Drosophila melanogaster* até murinos como *Mus Musculus* e *Rattus Novergicus* já foram usados como modelo para doenças

neurodegenerativas humanas (Munch *et al.*, 2005; Falzone *et al.*, 2009; Hirokawa *et al.*, 2010). O modelo animal de *zebrafish* (*Danio rerio*) tem sido utilizado com bastante frequência em estudos genéticos, uma vez que seu genoma, ainda que parcialmente duplicado, apresenta vários genes em cópia única. Além disso, esse modelo animal apresenta um curto período de desenvolvimento embrionário, facilitando a geração de animais *knockdown* ou transgênicos. Estudos funcionais por meio de *knockdown* realizados em genes de *zebrafish*, no qual os genes ortólogos em humanos foram previamente associados à HSP, demonstraram que a perda de função desses genes apresentaram fenótipo sugestivo de neurodegeneração no embrião (**Tabela 2**). Em resumo, vários estudos demonstraram que a perda de função de genes associados a HSPs, geralmente realizada por *knockdown* em *zebrafish* utilizando morfolinós, causa fenótipo de cauda-curvada, déficit de nado do embrião, letalidade e defeitos no eixo corporal no peixe.

Tabela 2. Ortólogos de *zebrafish* associados à HSPs em *Homo sapiens*.

<i>Locus</i>	Gene (<i>Homo sapiens</i>)	Gene ortólogo (<i>Danio rerio</i>)	Referência
SPG3A	<i>ATL1</i>	<i>atl1</i>	Fassier <i>et al.</i> , 2010
SPG4	<i>SPAST</i>	<i>spast</i>	Butler <i>et al.</i> , 2010
SPG8	<i>KIAA0196</i>	<i>strumpellin</i>	Valdmanis <i>et al.</i> , 2007; Clemen <i>et al.</i> , 2010
SPG11	<i>SPG11</i>	<i>spg11</i>	Southgate <i>et al.</i> , 2010; Martin <i>et al.</i> , 2012
SPG15	<i>ZFYVE26</i>	<i>zfyve26</i>	Martin <i>et al.</i> , 2012
SPG39	<i>PNPLA6</i>	<i>pnpla6</i>	Song <i>et al.</i> , 2013
SPG42	<i>SLC33A1</i>	<i>slc33a1</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008
SPG46	<i>GBA2</i>	<i>gba2</i>	Martin <i>et al.</i> , 2013
SPG59	<i>USP8</i>	<i>usp8</i>	Novarino <i>et al.</i> , 2014
SPG61	<i>ARL6IP1</i>	<i>arl6ip1</i>	Novarino <i>et al.</i> , 2014
SPG67	<i>PGAP1</i>	<i>pgap1</i>	Novarino <i>et al.</i> , 2014
SPG70	<i>MARS</i>	<i>Mars</i>	Novarino <i>et al.</i> , 2014

Apesar do *zebrafish* ser bastante usado como modelo animal de doenças humanas, o modelo murino é uma excelente alternativa para geração de linhagens estáveis de diversas doenças neurodegenerativas devido sua maior semelhança genética com o *Homo sapiens*. A

esclerose lateral amiotrófica (ELA) e a distrofia muscular de Duchenne, por exemplo, apresentam diversos modelos de ratos e camundongos transgênicos gerados (Collard *et al.*, 1995; revisão em Vainzof *et al.* 2008; revisão em Philips & Rothstein, 2015). Camundongos transgênicos vem sendo utilizados como modelo de doenças neurodegenerativas desde a década de 80 quando o grupo de Bulfield *et al.* (1984) desenvolveu o primeiro modelo de distrofia de Duchenne. Esse animal apresentava elevados níveis de creatina quinase em tecido muscular e de piruvato quinase no soro, além de apresentarem lesões histológicas características de distrofia muscular. Após esse primeiro modelo murino, dezenas de camundongos transgênicos modelados para doenças neurodegenerativas foram gerados (Vainzof *et al.*, 2012). Em geral, os camundongos transgênicos para doenças neurodegenerativas apresentam como características clínicas a distrofia esquelética de leve a grave, cardiopatia e fraqueza muscular. Testes físicos, testes comportamentais e avaliação da longevidade são os melhores experimentos e critérios utilizados como indicadores para diagnosticar e acompanhar a perda ou progressão da disfunção neuromuscular.

Doenças neurodegenerativas relacionadas ao defeito de transporte axonal já foram estudadas por meio de modelos murinos transgênicos para os genes mutados nessas doenças. Camundongos apresentando variantes patogênicas em genes relacionados ao tráfego neuronal apresentam características bem definidas de neurodegeneração nesse modelo animal (revisão em Roy *et al.*, 2005). Em relação aos modelos animais envolvendo cinesinas, o modelo *knockdown* do *Klc1* em camundongo ($Klc1^{tm1Gsn}/Klc1^{tm1Gsn}$) apresentou fenótipo de neurodegeneração, sendo os principais achados a morfologia anormal axonal, defeito de transporte axonal, defeito morfológico da matéria branca cerebral e da medula espinhal, degeneração axonal e depósito de proteínas tau (Rahman *et al.*, 1999). De acordo com o banco de dados *Mouse Genome Database* (MGD; <http://www.informatics.jax.org/>), camundongos *knockdown* do *Klc2*

($Klc2^{tm1e(EUCOMM)Wtsi}/Klc2^{tm1e(EUCOMM)Wtsi}$) apresentaram alterações de comportamento, tais como hiperatividade e de respostas neurológicas, como ausência do reflexo auditivo, além de outros defeitos relacionados à audição e de homeostasia e metabolismo (Eppig *et al.*, 2015). Outro banco de dados relacionado à fenótipos em camundongos (<https://www.mousephenotype.org/>) mostrou que animais *knockdown* do *Klc2* apresentam principalmente defeitos auditivos, além de defeitos secundários não significativos (que não aparecerem em replicatas biológicas): defeitos neurológicos, de crescimento, da estruturação esquelética, visuais entre outros.

1.6. Síndrome SPOAN

A síndrome SPOAN (OMIM #609541), acrônimo do inglês *spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy*, é uma doença neurodegenerativa de herança AR que tem como achados clínicos a atrofia ótica congênita e aparentemente não progressiva; a paraparesia espástica de início na primeira década de vida, levando à perda da deambulação autônoma antes da adolescência; a neuropatia periférica, com início clínico após a primeira década de vida e causando perda progressiva da função dos membros superiores, o que leva a comprometimento da sensibilidade profunda e do agravamento da fraqueza muscular; as deformidades articulares e da coluna; a resposta de sobressalto a sons inesperados e ausência de comprometimento cognitivo e auditivo (Macedo-Souza *et al.*, 2005; Macedo-Souza *et al.*, 2009). Em estudo clínico e fisiológico mais detalhado sobre essa síndrome, Amorim *et al.* (2014) avaliou 27 pacientes com a síndrome SPOAN e os principais achados clínicos desse estudo foram fraqueza distal e atrofia muscular, deformidade nos pés e na coluna, e ausência de reflexos no tornozelo de todos os pacientes.

A síndrome SPOAN foi identificada pela primeira vez em um município do interior do estado do Rio Grande do Norte, Serrinha dos Pintos, com população de 4.538 habitantes (IBGE,

Até a realização dos experimentos desta tese de doutorado, era conhecido apenas a região cromossômica (11q13) onde estava mapeada a variante patogênica causativa da síndrome SPOAN, identificada por meio de estudo de ligação utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites. A primeira região mapeada possuía 4.8-Mb de comprimento, com o valor de LOD *score* de 14,43, localizada próxima ao marcador D11S1883 (Macedo-Souza *et al.*, 2005). Essa região mapeada foi posteriormente reduzida a 2.3-Mb com a adição de amostras de mais pacientes à casuística (Macedo-Souza *et al.*, 2009). Com base na análise da região cromossômica mapeada, os três melhores genes candidatos (expressos em tecido cerebral) foram selecionados para sequenciamento de Sanger dos éxons codificadores: *LRFN4*, que codifica uma glicoproteína que tem função no desenvolvimento do sistema nervoso central; *KLC2*, que codifica a proteína cinesina de cadeia leve-2, cuja função está relacionada ao transporte axonal de vesículas e macromoléculas; e *CCS*, que codifica uma proteína chaperona que é responsável pela manutenção do cobre intracelular. Entretanto, nenhuma variante patogênica foi encontrada em homozigose nos éxons codificadores de aminoácidos desses genes nos pacientes (Macedo-Souza *et al.*, 2009).

Essa tese de doutorado teve como intenção continuar o estudo genético de identificação da variante patogênica associada à síndrome SPOAN e a realização de estudos funcionais utilizando os modelos *in vitro* e *in vivo* para responder as questões relacionadas à patogenicidade da variante e compreender os mecanismos patofisiológicos dessa síndrome. Estudo de segregação de variantes candidatas, análise de expressão do gene candidato por meio de qRT-PCR, ensaios de *knockdown* e superexpressão do gene associado à síndrome em modelo de *zebrafish*, e a geração de camundongos transgênicos como modelo animal da síndrome SPOAN foram executados durante o período de doutoramento e estão descritos nesta tese.

1.7. Objetivo

O objetivo deste trabalho identificar a variante patogênica e o gene associados à síndrome SPOAN e buscar subsídios da variante patogênica como causadora da síndrome por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

1.7.1. Objetivos específicos

- Identificar a variante patogênica causadora da síndrome SPOAN.
- Realizar experimentos *in vitro* para avaliar a expressão do gene alterado nos pacientes com a síndrome SPOAN em comparação com controles saudáveis.
- Realizar experimentos *in vivo* de *knockdown* e superexpressão do gene alterado em modelo de *zebrafish*.
- Gerar linhagens estáveis de camundongos transgênicos como modelo animal da síndrome SPOAN.

2. Materiais e métodos

2.1. Casuística

A casuística deste estudo foi composta por 75 pacientes diagnosticados clínica e geneticamente com a síndrome SPOAN. Esses pacientes são oriundos ou tem ancestrais provenientes do interior do estado do Rio Grande do Norte e estados circunvizinhos (n = 70). Outros pacientes originários dos estados de Minas Gerais (n = 1) e Rio Grande do Sul (n = 2), sem relação de parentesco com as famílias do Nordeste também foram diagnosticados com a síndrome SPOAN e foram incluídos nesse estudo. Além da casuística brasileira, foram investigadas amostras de dois irmãos com fenótipo dessa síndrome provenientes do Egito, por meio de colaboração com o grupo coordenado por Joseph Gleeson, MD, Ph.D., do laboratório de neurogenética da *University of California, San Diego*. Todos os pacientes, além de controles normais familiares, tiveram amostras de sangue coletadas para extração de DNA.

Para realização de ensaios sobre expressão gênica, foram coletadas amostras de sangue de pacientes com a síndrome SPOAN (n = 7), de heterozigotos para a variante patogênica (n = 7) e homozigotos *wild-type* familiares (n = 6) para extração de RNA. Amostras de fibroblastos de pele também foram coletadas para extração de RNA de pacientes (n = 5), de heterozigoto para a variante patogênica da síndrome SPOAN (n = 1) e de controles saudáveis normais (n = 4). Fibroblastos de pacientes e controles foram diferenciados em neurônios motores (NM) pela Dr. Lúcia Inês Macedo-Souza, segundo protocolo descrito em Melo *et al.* (2015). Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo CEP 010/2003).

2.2. Estudo molecular realizado no laboratório de doenças neuromusculares do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

2.2.1. Sequenciamento de nova geração e estudos de segregação das variantes

Como parte desse estudo, duas amostras de pacientes com a síndrome SPOAN, sendo um de origem brasileira e outro de origem egípcia, foram submetidas ao sequenciamento de nova geração do exoma (WES, do inglês *whole-exome sequencing*) usando o kit da Agilent SureSelect Human All Exon 50Mb e foi sequenciado no Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, EUA). A amostra do paciente brasileiro foi sequenciada nas dependências do laboratório *Broad Institute of MIT and Harvard*, enquanto que a amostra do paciente egípcio foi sequenciada no laboratório da *Howard Hughes Medical Institute*.

A análise de bioinformática foi realizada pelo Dr. João Kitajima da Mendelics (São Paulo, SP), o qual efetuou o alinhamento das sequências usando a montagem do genoma GRCh37 por meio do software BWA (Li & Durbin, 2010). A genotipagem foi realizada usando o GATK (McKenna *et al.*, 2010), SNPs e InDels foram anotados usando o ANNOVAR (Wang *et al.*, 2010) e a detecção de CNVs foi avaliada usando o pacote em R do ExomeDepth (Plagnol *et al.*, 2012). A cobertura média do exoma na região de ligação foi de 40x na amostra brasileira e 77x na amostra egípcia. As variantes detectadas no exoma dos dois pacientes foram filtradas por frequência menor que 1% usando os bancos do 1000 genomas (<http://www.1000genomes.org/>), NHLBI GO *Exome Sequencing Project* (ESP, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), *Exome Aggregation Consortium* (ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>), e do banco interno da Mendelics com 1484 amostras brasileiras. As variantes candidatas foram sequenciadas pelo método de Sanger para checar a segregação com o fenótipo, e essa etapa do estudo de co-segregação das variantes foi realizada pela Dra. Lúcia Inês Macedo-Souza (Relatório FAPESP, 2012).

Após a realização do experimento para checar a segregação com o fenótipo das variantes detectadas no WES, nenhuma variante apontou como forte candidata a explicar o fenótipo. Dessa forma decidimos submeter uma amostra de outro paciente brasileiro para o sequenciamento do genoma completo (WGS, do inglês *whole-genome sequencing*) utilizando o kit Illumina TruSeq DNA. A análise de bioinformática também foi realizada pelo Dr. João Kitajima, utilizando o mesmo *pipeline* descrito acima no WES. A cobertura do WGS na região de ligação da síndrome SPOAN foi de 26x. As variantes detectadas nesse experimento foram filtradas usando os mesmos parâmetros e bancos de dados citados acima, e após a filtragem, a deleção de 216-pb localizada na região *upstream* do *KLC2* (chr11.hg19:g.66,024,557_66,024,773del) foi detectada em homozigose no paciente com a síndrome SPOAN. Essa variante foi genotipada para checar a co-segregação usando os *primers forward*: 5'-GCCCTGGGTTCATTGACTTA-3' e *reverse*: 5'-ACCCAGACGGACAAGCTAGA-3' por meio da técnica de amplificação do DNA por PCR seguida de eletroforese em gel de agarose. Essa variante também foi checada em controles familiares (n = 111) e controles normais não-aparentados brasileiros (n = 474).

2.2.2. Extração de RNA e PCR em tempo real (qRT-PCR)

A extração de RNA de fibroblastos de pacientes (n = 5), heterozigoto (n = 1) e controles normais (n = 4), bem como a extração de RNA de NM derivados de iPSC dos mesmos indivíduos foi realizada utilizando TRIZOL (Invitrogen) e o kit da Norgen Biotek RNA/DNA/Protein Purification (Norgen Biotek Corp., Ontário, Canadá). A extração de RNA de sangue total de pacientes (n = 7), heterozigotos (n = 7) e controles familiares *wild-type* (n = 6) foi realizada utilizando o kit PAXgene Blood RNA (Qiagen). O RNA extraído de todas as amostras foi submetido à eletroforese em gel de agarose para verificar a integridade do material. O RNA

extraído dos três tipos celulares foi retrotranscrito utilizando *primers* de oligo(dT) com o kit SuperScript™ III First-strand Synthesis System (Life Technologies).

Os estudos de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizados utilizando cDNA de fibroblastos, de NM derivados de iPSC e de sangue, de pacientes e controles. Os *primers* para o qRT-PCR foram desenhados entre a junção éxon 3-4 do *KLC2*, a fim de amplificar todas os transcritos desse gene. A sequência dos *primers* foram: *forward*: 5'-GACGTCCCCAAAGACACACT-3'; *reverse*: 5'-CATGCTGACCAGACACATCC-3'. A reação de qRT-PCR foi normalizada para os genes endógenos *GAPDH* e *TBP* utilizando o aparelho LightCycler® 480 (Roche). A expressão relativa do *KLC2* foi calculada utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

2.3. Colaboração com outros centros de pesquisa

O estudo funcional utilizando o modelo animal do *zebrafish* foi realizado em colaboração com o grupo coordenado pela Profa. Dra. Nora Beatriz Calcaterra, do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade de Rosário, Argentina. Esse laboratório é especializado no uso desse animal como modelo de doenças genéticas humanas relacionadas ao desenvolvimento embrionário. Experimentos de *knockdown*, superexpressão e de localização do *klc2* em *zebrafish* foram realizados nas dependências desse laboratório na Argentina durante o período de Março a Junho de 2014.

O estudo funcional utilizando o modelo de camundongo foi realizado durante o período do “doutorado-sanduíche”, entre Março a Dezembro de 2015, em colaboração com o grupo de pesquisa do laboratório *Mammalian Functional Genomics Laboratory* coordenado por Len Pennacchio, Ph.D., do *Lawrence Berkeley National Laboratory*, em Berkeley, Estados Unidos. Na tentativa de compreender o mecanismo patofisiológico e molecular da síndrome SPOAN,

foram realizados experimentos de gene *reporter* e geração de camundongo transgênico para o *KLC2* humano nas dependências desse laboratório.

2.4. Modelo animal de *zebrafish*

O modelo animal selecionado para estudo *in vivo* da função do gene *klc2* relacionado à síndrome SPOAN foi o *zebrafish* (*Danio rerio*), devido seu curto período de desenvolvimento embrionário e esse modelo possui a proteína ortóloga com 79% de similaridade proteica em relação à humana (Altschul *et al.*, 1997). Além disso, esse gene está em apenas uma cópia no genoma do *Danio rerio* (ZFIN ID: ZDBGENE-030131-2670), tornando factível a utilização do desse modelo animal nesse estudo e ensaios de *knockdown* e de hibridação *in situ* desse gene em *zebrafish* não haviam sido realizados até o presente estudo. Nós realizamos também a técnica de WISH (*whole-mount in situ hybridization*) para identificar os locais de expressão do *klc2* em diferentes fases do desenvolvimento embrionário do *zebrafish*, utilizando o protocolo descrito em Weiner *et al.* (2012).

Embriões adultos de *zebrafish* foram mantidos a 28°C durante 14h expostos à luz e 10h no escuro, seguindo protocolo estabelecido pelo laboratório supervisionado pela Dra. Nora Calcaterra. Os embriões utilizado nos experimentos foram obtidos por fecundação natural. Os ensaios usando *Danio rerio* nesse estudo foram aprovados pelo comitê de ética em experimento animal do departamento de ciências farmacológicas e bioquímicas da Universidade Nacional de Rosário, Argentina (Protocolo No. 429/2014).

2.4.1. Extração de RNA de *zebrafish* e cDNA

Embriões em diferentes estágios embrionários (6, 24, 48 e 72-*hours post fertilization*; hpf) foram selecionados para esse estudo. Para extração do RNA foi utilizado o reagente TRIZOL® (Invitrogen) e as amostras de RNA dos quatro estágios embrionários selecionados foram

misturadas e armazenadas a -70°C . A reação de transcrição reversa foi realizada pela enzima SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen), usando o *primer* 5'-CAACAGCACTTTCCCCACG-3', que hibrida na região 3'UTR desse gene. Esse mesmo cDNA foi utilizado para todas as outras etapas do estudo funcional em *zebrafish*.

2.4.2. Clonagem dos cDNAs do *klc2* em plasmídeos

O plasmídeo pCS2+MT+eGFP foi utilizado para inserção completa do cDNA de aproximadamente 2-kb do *klc2* com a finalidade de gerar clones de mRNA desse gene. Esse plasmídeo apresenta um *polylinker* fusionado ao cDNA de *eGFP* entre os sítios *EcoRI* e *XhoI* e a descrição da sequência do plasmídeo está descrita na **Figura 5**. Os *primers* desse estudo foram desenhados para a amplificação do cDNA com a sequência das enzimas de restrição *EcoRI* e *SacI*, e estão descritos na **Tabela 3**. Foram adicionados nucleotídeos (um ou dois) às sequências dos *primers* para manter a matriz de leitura (ORF). O cDNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, sendo as bandas de aproximadamente 2-kb recortadas e purificadas. Os produtos (cDNA amplificado e Plasmídeo) foram digeridos com *EcoRI* e *SacI* a 37° *overnight*. Posteriormente foi efetuada a ligação do cDNA ao plasmídeo e foram utilizadas bactérias *E. coli* competentes para fazer a transformação. O cDNA das colônias que se desenvolveram foram checadas por meio do sequenciamento de Sanger para verificar se continham o inserto e a direção ao qual o inserto foi incluído no vetor.

```

1   ATG GAG CAA AAG CTC ATT TCT GAA GAG GAC TTG AAT GAA ATG GAG   45
1   M E Q K L I S E E D L N E M E   15

46  CAA AAG CTC ATT TCT GAA GAG GAC TTG AAT GAA ATG GAG CAA AAG   90
16  Q K L I S E E D L N E M E Q K   30

91  CTC ATT TCT GAA GAG GAC TTG AAT GAA ATG GAG CAA AAG CTC ATT   135
31  L I S E E D L N E M E Q K L I   45

136 TCT GAA GAG GAC TTG AAT GAA ATG GAG CAA AAG CTC ATT TCT GAA   180
46  S E E D L N E M E Q K L I S E   60

181 GAG GAC TTG AAT GAA ATG GAG AGC TTG GGC GAC CTC ACC ATG GAG   225
61  E D L N E M E S L G D L T M E   75

226 CAA AAG CTC ATT TCT GAA GAG GAC TTG AAT TCA GAT CTG ATA TCA   270
76  Q K L I S E E D L N S D L I S   90

271 CCG GTG AGC TCC CCG GGC TGC AGC ATC GAA GCG TCC GCG GCG GAT   315
91  R V S S P G C S I E A S A A D   105

316 CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC   360
106 P P V A T M V S K G E E L F T   120

361 GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC   405
121 S V V P I L V E L D G D V N G   135

406 CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC   450
136 H K F S V S G E G E G D A T Y   150

451 GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC   495
151 S K L T L K F I C T T G K L E   165

496 GTG CCC TGG CCA CCT CGT GAC CAC CCT GAC CTA CGG CGT GCA GTG   540
166 V P W P P R D H P D L R R A V   180

541 CTT CAG CCG CTA CCC GAC CAC ATG AGC AGC ACG ACT CTC AGT CGC   585
181 L Q P L P D H M S S T T L S R   195

586 ATG CCC GAG CTA CGT CAG AGC GCA CAT CTT CTT CAG GAC GAC GGC   630
196 M P E L R Q S A H L L Q D D G   210

631 ACT ACA GAC CGC GCG AGT GAG TCG AGG GCG ACC CTG ... CTC GAG CCT...
211 E T D R A S E S R A T E ...

```

Figura 5. Sequência do plasmídeo pCS2+MT com o cDNA do *eGFP* fusionado. Na cor rosa estão os epítomos marcados do Myc; em vermelho *EcoRI*; em amarelo *BglIII*; em verde e com contorno *EcoRV*; em anil *MluI*; Em cinza *SacI*; em verde escuro *SmaI*; em roxo *PstI*; em verde e sem contorno *eGFP*; e em azul escuro *XhoI*.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação do cDNA do *klc2*. Em destaque vermelho e negrito estão as sequências para amplificação dos sítios de restrição da *EcoRI* e *SacI*. Foram adicionados nucleotídeos na região 5' dos *primers* para certificar a ligação da enzima de restrição com a sequência. Também foram adicionados nucleotídeos após a sequência dos sítios de restrição para manter a matriz de leitura.

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'
Forward	GGG GAATTC CAATGTCCACCATGGTTTACCCTC
Reverse	CCC GAGCTC CACACTGATCAGAGAGTTGCGTCT

O plasmídeo pGEM-T Easy Vector System (Promega) foi utilizado para inserção das sondas do cDNA do *klc2* para realização do experimento de WISH. As sondas foram amplificadas utilizando os *primers*: *forward*: 5'-TGGGCGCAGATGATCCAAAT-3'; e *reverse*: 5'-CAACAGCACTTTCCCCACG-3'. O cDNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, sendo as bandas de aproximadamente 830-pb recortadas e purificadas. Após a inserção das sondas no plasmídeo pGEM-T Easy, colônias com *E. coli* competentes foram utilizadas para a transformação. Foi utilizado o antibiótico ampicilina para seleção de colônias com o inserto e foi adicionado X-gal como controle negativo. O cDNA obtido das colônias foi checado por meio de PCR utilizando os mesmos *primers* usados para amplificar as sondas e o cDNA das colônias que foram sequenciados para verificar o sentido do inserção.

2.4.3. Estudo de *knockdown* do *klc2* em *zebrafish*

A técnica de *knockdown* foi executada por meio de microinjeções de morfolidos no saco vitelino de embriões de *zebrafish* no estágio de uma a quatro células, nas concentrações de 4 e 6ng. A sequência do morfolino de bloqueio de tradução ($MO^{klc2-TB}$) foi 5'-GGTGGACATCACCCACTGACACACA-3'(o controle *mismatch* [$misMO^{klc2-TB}$] foi 5'-

GGaGcACATgACCCAgTcACACACA-3') e a sequência do morfolino de bloqueio de *splicing* (MO^{klc2-SP}) foi 5'-CGTGTGTGTTTCACCTGTGCTTCCC-3' (misMO^{klc2-SP} foi 5'-CGTcTcTGTTTgACCTcTcCTTCCC-3').

2.4.4. Superexpressão do *klc2* e resgate de fenótipo em *zebrafish*

A técnica de superexpressão do *klc2* em *zebrafish* foi realizada por meio de microinjeções do mRNA (mRNA^{klc2-eGFP}) no saco vitelino de embriões no estágio de uma a quatro células, nas concentrações de 100, 150 e 200pg. As mesmas concentrações foram microinjetadas utilizando o mRNA^{eGFP} como controle. Os embriões fluorescentes foram selecionados no estágio de 24-hpf para imagem e caracterização do fenótipo. O resgate de fenótipo foi realizado por meio de coinjeção de 6ng de MO^{klc2-SP} com 100pg de mRNA^{klc2-eGFP} no saco vitelino de embriões no estágio de uma a quatro células.

2.4.5. *Whole-mount in situ hybridization* (WISH)

A técnica de WISH foi utilizada para identificar os locais de expressão do *klc2* em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário do *zebrafish* (4- a 8-células, 15 a 20 somitos, 48- e 72-hpf), e foi realizado de acordo com protocolo descrito em Thisse & Thisse (2008). O mRNA antisense foi sintetizado *in vitro* usando como molde o cDNA *full-length* do *klc2* que foi clonado no plasmídeo pCS2+MT+eGFP, sendo marcado com digoxigenina uridina-5'- trifosfato (Digoxigenina-11-UTP). Após a hibridação, a localização das sondas marcadas foi visualizada imuniquimicamente usando o anticorpo anti-digoxigenina. Essas sondas foram hibridadas em embriões fixados *overnight* a 4% em paraformaldeído. No estágio final, os embriões foram visualizados e registrados utilizando os equipamentos MVX10 Olympus Microscope e

MVXTV1XC Olympus digital câmera, disponíveis no laboratório de ciências moleculares da Universidade de Rosário, Argentina.

2.5. Metodologia do uso do modelo animal de camundongo

O modelo murino selecionado para gerar linhagens transgênicas do *KLC2* humano foi o camundongo (*Mus musculus*) da linhagem FVB, visto que vários estudos usam esse modelo animal para mimetizar o fenótipo de doenças neurodegenerativas. Devido a síndrome SPOAN ser acarretada pela superexpressão do *KLC2*, nesse presente estudo geramos camundongos que superexpressam o *KLC2* humano para avaliar o fenótipo do aumento da expressão desse gene em camundongos. Também realizamos ensaios de gene *reporter* utilizando a região regulatória *wild-type* e a com a deleção de 216-pb para verificar o padrão de expressão tempo-espacial dessa região regulatória.

2.5.1. Plasmídeos e ensaio de gene *reporter* por LacZ

A região regulatória *wild-type* e a com a deleção de 216-bp foram usados para estudo de gene *reporter* por LacZ usando o modelo de camundongo. Para a amplificação da região regulatória foram utilizados o *primer forward*: 5'-CACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGTGAGGGCTGAAGGATCACA-3', o qual foram adicionados nucleotídeos referentes ao sítio de restrição da enzima *KpnI* e mais 20 nucleotídeos para *Gibson assembly assay* (GAA); O *primer reverse* foi 5'-TTTGATGTTTCCTGGAGCTCGGTACCCCGCCCGGATTAGGTAAA-3', também com nucleotídeos para o *KpnI* e mais 19 nucleotídeos para GAA. Os produtos da PCR foram purificados de géis de agarose e clonados no vetor Hsp-68-promoter-LacZ reporter (Visel *et al.*, 2009) conforme o protocolo do *Gibson Assembly* (NEB, MA, EUA). Os dois vetores, um com a

região regulatória *wild-type* e outro com a deleção de 216-pb foram linearizados usando *NotI*, e foram injetados em embriões de camundongo por meio de microinjeção pronuclear. Embriões transgênicos foram coletados no estágio embrionário de 15 dias e meio (e15.5) e foram corados para visualizar a atividade do gene *reporter LacZ* (Nobrega *et al.*, 2003). O comitê de ética em animais do Lawrence Berkeley National Laboratory (AWRC) aprovou o uso dos camundongos como modelo animal para esse estudo.

2.5.2. Superexpressão do *KLC2* humano em camundongo

Para realização do estudo transgênico da síndrome SPOAN em modelo de camundongo, nós obtivemos o Fosmídeo G248P85490B12, que daqui em diante será chamado de Fosmídeo do *KLC2*. Esse fosmídeo contém aproximadamente 44-kb de comprimento (chr11:66.000.283-66.044.619), que inclui todo o *KLC2* e sua região regulatória, além de um gene vizinho (*RAB1B*). O Fosmídeo do *KLC2* foi linearizado por *RsrII* (que interrompe a transcrição do *RAB1B*) e foi inserido no embrião por microinjeção pronuclear. O número de cópias do transgene nos camundongos foi detectado por qPCR usando os *primers forward*: 5'-TGGGCAAGTTTCACCCAGAT-3' e *reverse*: 5'-TTCCACCTCCTCAGCTTTGC-3' (Tabela 4), usando o LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Os *primers* desenhados para esse experimento se hibridam por completo no éxon 8 tanto no genoma do *Homo sapiens* (NM_001134775) quanto no do *Mus musculus*. A reação do qPCR foi normalizada usando o *DBH* e o número de cópias do Fosmídeo do *KLC2* foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

Tabela 4. *Primers* utilizados no estudo de camundongos transgênicos

Primers	Sequência (5'-3')	Finalidade
Forward	TGGGCAAGTTTCACCCAGAT	Avaliar o número de cópias do Fosmídeo do <i>KLC2</i> nos camundongos transgênicos por qPCR
Reverse	TTCCACCTCCTCAGCTTTGC	
Forward	CGGGCATGAGGGTTCATAG	Checar o tamanho do Fosmídeo do <i>KLC2</i> na região 5'UTR
Reverse	GGTTGGTGGGGTGCTATTCA	
Forward	GCCTGGTTGTTAGCCTCTGT	Checar a presença do Fosmídeo do <i>KLC2</i> na região central
Reverse	TGCCACTCAGGTGTCATTCC	
Forward	GGACAGTGTGTCTCGCTCAA	Checar o tamanho do Fosmídeo do <i>KLC2</i> na região 3'UTR
Reverse	TTGCCTTCTGGGGCTTGTAG	
Forward	CACTGGAGATCCGGGAGAAG	Avaliar a expressão do transgene <i>KLC2</i> por qRT-PCR
Reverse	GGCCACATCTGGGTGAAACT	

Amostras de cérebro de camundongos F1 no estágio de P10 (10 dias pós nascimento) foram coletadas para extração de RNA. A extração de RNA foi realizada usando TRIZOL e o RNA foi retrotranscrito em cDNA usando *primers* oligo(dT), utilizando o kit SuperScript™ III First-strand Synthesis System (Life Technologies). A variação de expressão do *KLC2* humano em camundongos foi analisada por qRT-PCR usando os *primers* descritos na **Tabela 4**, também usando o LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Os *primers* desenhados para esse experimento se hibridam por completo no *exon-boundary* 7-8 tanto no genoma do *Homo sapiens* (NM_001134775) quanto no do *Mus musculus*. A reação do qRT-PCR foi normalizada para o endógeno da *B-ACT* e a quantificação da expressão foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3. Resultados e discussão

3.1. Identificação da variante patogênica associada à síndrome SPOAN

Neste estudo realizamos o WES na tentativa de detectar a variante patogênica em homozigose associada à síndrome SPOAN. Inicialmente realizamos a busca de variantes provavelmente patogênicas e com baixa frequência em bancos de dados populacionais (<1% no 1000 genomas, <http://www.1000genomes.org/>) em genes já associados à HSPs (ver **Tabela 1**), e não foram identificadas variantes que pudessem ser candidatas a causar o fenótipo da doença. Em uma segunda análise restrita à região cromossômica mapeada da síndrome SPOAN (11q13), foram detectadas variantes nos genes *ACTN3*, *MRPL11*, *NUDT8* e *RBM4B* presentes no WES da amostra brasileira. Além dessas variantes, detectamos variantes em homozigose em *CLCF1* e *RINI* na amostra do paciente egípcio. Essas variantes foram triadas em pacientes, em controles familiares (das famílias do Brasil e do Egito) e em controles não familiares brasileiros, e foram utilizados dois critérios para exclusão de associação da variante à doença: a) Variante não detectada em homozigose em todos os pacientes; b) Variante encontrada em homozigose em controles. Três variantes foram descartadas como candidatas (*RINI*, *NUDT8* e *CLCF1*). As variantes que segregaram junto com o fenótipo (nos genes *MRPL11*, *ACTN3* e *RBM4B*) são variantes de ponto (SNPs) em regiões não codificadoras, provavelmente sem efeito fenotípico significativo, e também provavelmente devem estar em desequilíbrio de ligação com a variante patogênica causadora da síndrome SPOAN.

Tabela 5. Variantes detectadas em homozigose pelo WES na região cromossômica ligada à síndrome SPOAN.

Genes	Posição cromossômica e variantes	Localização da variante	Pacientes			Controles familiares			Controles brasileiros		
			-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+
<i>CLCF1</i>	67,135,092 A>G	Exon 2	48	0	0	18	0	62	NR	NR	NR
<i>RINI</i>	66,102,179 A>C	Exon 5	0	0	20	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>MRPL11</i>	66,205,845 C>T	RNC	71	0	0	0	46	23	0	0	140
<i>ACTN3</i>	66,326,677 G>A	RNC	65	0	0	0	40	20	0	40	102
<i>RBM4B</i>	66,444,626 G>A	RNC	71	0	0	0	47	23	0	46	169
<i>NUDT8</i>	67,396,600 G>C	RNC	29	1	0	NR	NR	NR	8	61	24

Legenda: RNC – Região não codificadora; NR – Teste molecular não realizado; -/-, +/- e +/+ significam homozigoto para o alelo mutado, heterozigoto e homozigoto para o alelo normal, respectivamente.

Até o presente momento foram descritas variantes patogênicas em três genes associados à HSP localizadas na mesma região ou próxima a região mapeada da síndrome SPOAN (*FLRT1*, *BSCL2* e *CAPN1*), porém nenhuma variante patogênica no WES dos dois pacientes foi detectada em homozigose nesses genes (Gan-Or *et al.*, 2016). Recentemente foi identificada uma família consanguínea de origem árabe composta por 12 pacientes apresentando paraplegia espástica, atrofia ótica e neuropatia periférica, que os autores denominaram essa doença de SPOAN-like (Lossos *et al.*, 2015). Estudos de ligação mapearam a variante patogênica dessa família na região cromossômica 1q e o sequenciamento do exoma identificou a variante c.678A>G (p.Q226Q) no *IBA57* como causadora da doença. Pouco tempo depois, Debray *et al.* (2015) identificaram a variante patogênica c.436C>T (p.R146W) em homozigose em *IBA57* como causadora de leucodistrofia fatal infantil. Checamos as variantes detectadas pelo WES na região de código e regiões intrônicas desse gene e nenhuma variante apareceu como candidata à síndrome SPOAN.

Após o sequenciamento do genoma completo de um paciente brasileiro, nosso grupo identificou uma deleção de 216-pb (chr11.hg19:g.66,024,557_66,024,773del) em homozigose na região regulatória *upstream* do *KLC2*. Essa deleção foi detectada em homozigose em todos os

pacientes com a síndrome SPOAN, incluindo os dois irmãos egípcios; não foi detectada em homozigose em 111 controles familiares e não foi encontrada em 600 controles brasileiros. A deleção de 216-pb sobrepõe 9-pb da região 5' UTR do maior transcrito do *KLC2* (NM_001134775.1). Essa variante também se sobrepõe à região regulatória que contém sítios de DNase *hypersensitivity sites* (DHS); se sobrepõe à diversos sítios de ligação de fatores de transcrição (TFBS); à marcas de histonas; e à metilação de DNA, podendo esta região atuar como promotor ou *enhancer* em diferentes tipos celulares (Ernst *et al.*, 2011). Essa região regulatória apresenta alta conservação entre os primatas e tem baixo índice de fixação (do inglês *fixation index*; F_{ST}) entre as regiões 10-kb *up* e *downstream* do *KLC2*. Três SNPs localizados próximos a região da deleção (rs116801155, rs190099601 e rs76627914) também mostraram baixa frequência de F_{ST} em diversas populações. Esses dados evidenciam que essa região é conservada, com pouca tolerância à variações.

O *KLC2* é expresso em neurônios e a proteína codificada por esse gene, uma cinesina de cadeia leve, está associada ao transporte de cargas ao longo do axônio (Ebbing *et al.*, 2008). As cinesinas são moléculas que atuam como motores responsáveis pelo transporte axonal de vesículas e organelas no sentido anterógrado ao longo do axônio por meio dos microtúbulos (Pernigo *et al.*, 2013; Birsa *et al.*, 2013). A *KLC2* é componente do complexo das cinesinas, juntamente com outras proteínas (KIF5A, KIF5B; Morton *et al.*, 2010). Dessa forma, os indícios aqui apresentados sugerem que a deleção 216-pb em homozigose na região regulatória *upstream* do *KLC2* seja causadora da síndrome SPOAN.

Estudos funcionais *in vitro* foram realizados para avaliar o padrão de expressão do *KLC2* em indivíduos com a deleção de 216-pb em homozigose em comparação com controles, por meio de qRT-PCR. Estudos funcionais *in vivo* utilizando o modelo animal de *zebrafish* foram realizados durante o período de Março a Junho de 2014 em colaboração com o Instituto de

Biologia Molecular e Celular da Universidade de Rosário, Argentina, sob supervisão da Profa. Dra. Nora Calcaterra. Nesse período foram realizados os ensaios de *knockdown* e superexpressão do *klc2* em embriões de *zebrafish*. A variante patogênica da síndrome SPOAN (deleção de 216-pb em homozigose localizada no cromossomo 11) e os resultados e discussão dos estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* validando a superexpressão do *KLC2* como causa dessa síndrome foram publicados no periódico internacional *Human Molecular Genetics*. O artigo encontra-se na íntegra abaixo.

3.2. Artigo publicado na revista *Human Molecular Genetics*



ORIGINAL ARTICLE

Overexpression of *KLC2* due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome

Uirá S. Melo^{1,†}, Lucia I. Macedo-Souza^{1,†}, Thalita Figueiredo^{2,3}, Alysson R. Muotri⁴, Joseph G. Gleeson⁵, Gabriela Coux⁶, Pablo Armas⁶, Nora B. Calcaterra⁶, João P. Kitajima⁷, Simone Amorim⁸, Thiago R. Olávio¹, Karina Griesi-Oliveira¹, Giuliana C. Coatti¹, Clarissa R.R. Rocha⁹, Marinalva Martins-Pinheiro⁹, Carlos F.M. Menck⁹, Maha S. Zaki¹⁰, Fernando Kok^{1,7}, Mayana Zatz^{1,*} and Silvana Santos^{2,3}

¹Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, SP 05508-090, Brazil, ²Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Paraiba (UFPB), Joao Pessoa, PB 58051-900, Brazil, ³Department of Biology, Paraiba State University (UEPB), Campina Grande, PB 58429-500, Brazil, ⁴Department of Pediatrics/Rady Children's Hospital San Diego, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093, USA, ⁵Laboratory for Pediatric Brain Disease, The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA, ⁶Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Rosario, SF S2002LRK, Argentina, ⁷Mendelics Genomic Analysis, São Paulo, SP 04013-000, Brazil, ⁸Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), São Paulo, SP 01246-903, Brazil, ⁹Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP 05508-900, Brazil and ¹⁰Department of Clinical Genetics, Human Genetics and Genome Research Division, National Research Center, Cairo 12311, Egypt

*To whom correspondence should be addressed at: Rua do Matao, 277, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil. Tel: +55 1130917563; Fax: +55 1130917419; Email: mayazatz@usp.br

Abstract

SPOAN syndrome is a neurodegenerative disorder mainly characterized by spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy (SPOAN). Affected patients are wheelchair bound after 15 years old, with progressive joint contractures and spine deformities. SPOAN patients also have sub normal vision secondary to apparently non-progressive congenital optic atrophy. A potential causative gene was mapped at 11q13 ten years ago. Here we performed next-generation sequencing in SPOAN-derived samples. While whole-exome sequencing failed to identify the causative mutation, whole-genome sequencing allowed to detect a homozygous 216-bp deletion (chr11.hg19:g.66,024,557_66,024,773del) located at the non-coding upstream region of the *KLC2* gene. Expression assays performed with patient's fibroblasts and motor neurons derived from SPOAN patients showed *KLC2* overexpression. Luciferase assay in constructs with 216-bp deletion confirmed the overexpression of gene reporter, varying from 48 to 74%, as compared with wild-type. Knockdown and overexpression of *klc2* in *Danio rerio* revealed mild to severe

[†]Authors contributed equally to this work.

Received: June 14, 2015. Revised and Accepted: September 14, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

curly-tail phenotype, which is suggestive of a neuromuscular disorder. Overexpression of a gene caused by a small deletion in the non-coding region is a novel mechanism, which to the best of our knowledge, was never reported before in a recessive condition. Although the molecular mechanism of *KLC2* up-regulation still remains to be uncovered, such example adds to the importance of non-coding regions in human pathology.

Introduction

Hereditary spastic paraplegias (HSPs) are common neurodegenerative genetic disorders in which patients present progressive spasticity and lower limbs weakness. Up to date, more than 70 loci had been associated with HSPs and at least 50 genes have been identified (1). In 2005, our group identified in a geographic isolate in the backlands of Northeastern Brazil, 26 Caucasian individuals belonging to consanguineous families with an autosomal recessive (AR) complicated form of HSP, which associates spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy (SPOAN syndrome, OMIM #609541) (2). This condition is characterized by onset of progressive spastic paraplegia in infancy, and progressive motor and sensory axonal neuropathy in late childhood/early adolescence leading to severe motor disability. All patients are wheelchair bound after 15 years old, with progressive joint contractures and spine deformities. Patients also have sub normal vision secondary to apparently non-progressive congenital optic atrophy, dysarthria starting in the third decade of life and exacerbated acoustic startle response. Patients show no intellectual impairment. Ten years after the gene mapping, more than 70 individuals from this cluster, three unrelated affected individuals from Southern and Southeast Brazil, and a pair of Egyptian siblings were diagnosed with SPOAN. Although, all patients share the same haplotype spanning 2.3 Mb into chromosome region 11q13, Sanger sequencing of candidate genes failed to reveal the causative gene (3). Here we describe the SPOAN causative mutation, a small deletion in the non-coding region that causes gene overexpression. Gain of function in a recessive condition is a novel mechanism that, to the best of our knowledge, was never reported before.

Results

Next-generation sequencing and SPOAN mutation

Whole-exome sequencing (WES) was performed in genomic DNA from one Brazilian and one Egyptian patient diagnosed with SPOAN syndrome. We identified six homozygous variants at the critical region, but population frequency and segregation analysis excluded four variants, while the remaining two were SNPs located in non-coding region, suggesting that these two were unlikely to be associated to the clinical phenotype (Supplementary Material, Table S1). Although WES failed to reveal the SPOAN mutation, the sequencing allowed us to refine the critical interval on chromosome 11q13 to 1.77 Mb, between markers rs508548 (A>G at 65,626,289 position in *CFL1*) and an undescribed variant located at 67,395,410 (G>C in *NUDT8*). Next, using whole-genome sequencing (WGS), we identified a homozygous 216-bp deletion (chr11.hg19:g.66,024,557_66,024,773del), located at the non-coding upstream region of kinesin light chain-2 (*KLC2*) (Supplementary Material, Fig. S1). This variant was detected in homozygosity in all affected Brazilian individuals ($n = 73$), and in the Egyptian affected siblings, while it was not present in homozygosity in 111 healthy Brazilian relatives. This 216-bp deletion was also absent in 474 Brazilian healthy controls and is not described in the 1000 genomes database.

Gene expression analysis

To verify if the deletion affects the expression level of genes located in SPOAN critical region, we performed expression array using cDNA from fibroblasts. Several genes ($n = 23$; Supplementary Material, Table S2) showed differential expression in patients compared with controls ($P < 0.01$). Unexpectedly, this assay revealed *KLC2* overexpression. Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) performed using fibroblast cDNA samples confirmed the expression array results (Fig. 1A). We next generated induced pluripotent stem-cells (iPSC) which were differentiated into motor neurons (MN). RT-qPCR using MN samples revealed *KLC2* up-regulation in SPOAN patients compared with healthy controls, confirming the over expression observed in the previous experiments (Fig. 1C). Also we investigated *KLC2* expression in blood, using a larger number of cDNA samples from healthy controls, heterozygotes and affected individuals. This assay did not reveal any difference in expression levels between heterozygotes compared with SPOAN's and to healthy controls (Fig. 1E).

To investigate if the 216-bp deletion is the cause of *KLC2* up-regulation, we performed luciferase gene reporter assay using three cell lines (HEK293T, U87MG and MN), which were transfected with two constructs: a *KLC2* wild-type promoter and *KLC2* 216-bp deleted regulatory region driving the *Luciferase* gene. In the three cell lines, the construct with the 216-bp deletion produced a luciferase activity increment compared with wild-type promoter, varying from 48 to 74% (Fig. 1F).

Klc2 knockdown and overexpression in *Danio rerio*

We then used *Danio rerio* as an animal model to study the 'in vivo' effect of *klc2* knockdown and overexpression. Knockdown regulation was achieved by microinjecting zebrafish embryos with two different *klc2* morpholinos (translation blocking morpholino [$MO^{klc2-TB}$] and splice morpholino [$MO^{klc2-SP}$]), each one at doses of 4 and 6 ng. Mild phenotype was defined for embryos showing curly-tail and circular swimming whereas severe phenotype for embryos with dramatically shortened and twisted tail and that were unable to swim. Both phenotypes became evident at 48-h post fertilization (hpf) (Fig. 2A). In all cases, statistically significant differences were observed between mismatch-MO and specific-MO injected embryos. For both morpholino strategies when comparing to the respective mismatch-MO controls, an increase in lethality and/or frequency of phenotypes was mainly observed in detriment of normal phenotype. Furthermore, this difference was more evident when higher amount of either $MO^{klc2-TB}$ or $MO^{klc2-SP}$ was injected (Fig. 2B). Phenotype rescue assays were performed by co-injection of 100 pg of mRNA^{*klc2-eGFP*} and splice morpholino at 6 ng (Fig. 2C), and an improvement of ~33% ($P < 0.01$), from severe to mild phenotype, was consistently observed (Fig. 2D).

As SPOAN syndrome seems to result from *KLC2* up-regulation, we mimicked this condition in zebrafish by microinjecting mRNA^{*klc2-eGFP*} in specific concentrations in embryos. Fluorescent embryos displayed similar phenotype to *klc2* morphants (Fig. 3A). A high lethality (over than 70%) was observed in embryos micro-injected with mRNA^{*klc2-eGFP*} at 200 pg at 24-hpf stage and we excluded this concentration data in phenotype analysis (Fig. 3B). We observed higher frequency of curly-tail phenotype in

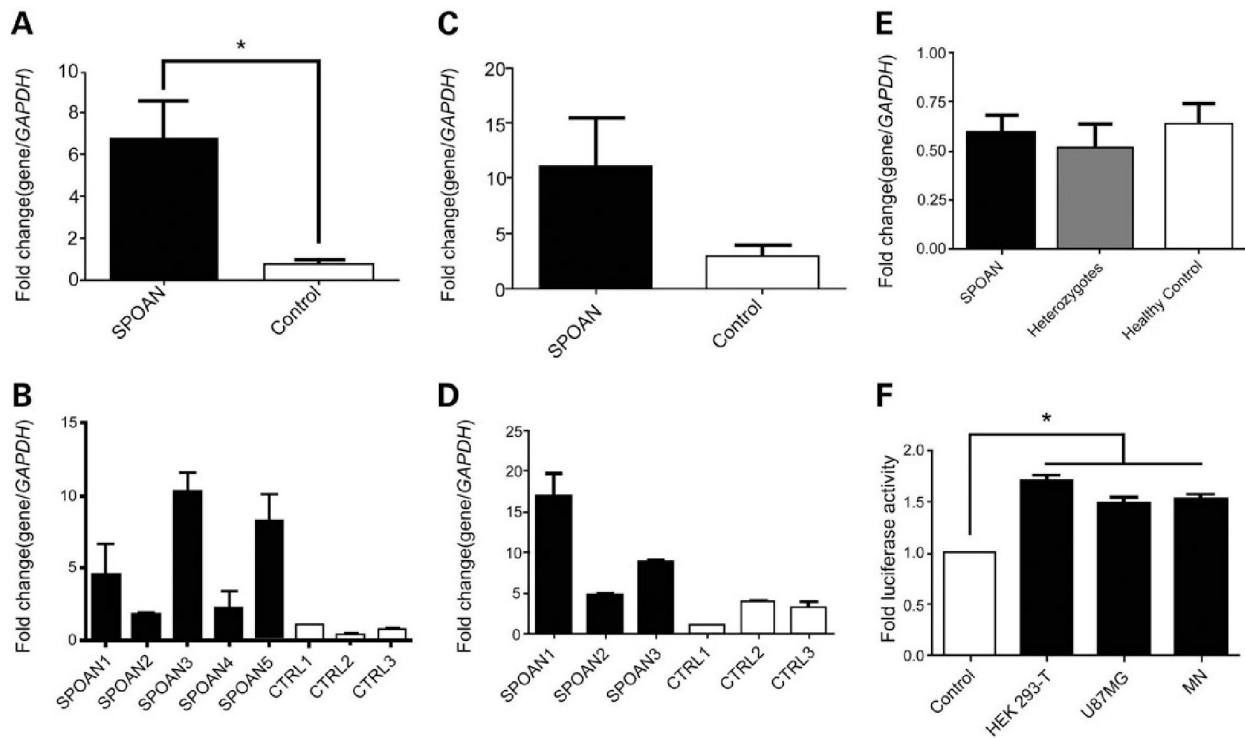


Figure 1. Effect of 216-bp deletion on *KLC2* expression. (A) Relative expression of *KLC2* measured by RT-qPCR performed on fibroblast cDNA isolated from SPOAN patients and healthy controls ($P < 0.05$; Nonparametric test [Mann–Whitney]). (B) *KLC2* relative expression measured on fibroblast samples from individual patients and healthy controls. (C) Relative expression of *KLC2* measured by RT-qPCR using MN. (D) *KLC2* relative expression measured on MN samples from individual patients and healthy controls. (E) *KLC2* relative expression measured on whole-blood cDNA samples from affected (homozygotes), heterozygotes and healthy controls. Each RT-qPCR experiment was performed in triplicate and each sample was replicated twice. (F) Expression of luciferase reporter gene controlled by the 216-bp-deleted *KLC2* regulatory region relative to the expression controlled by the wild-type *KLC2* regulatory region measured in HEK293 T, U87MG and MN cells. Each experiment was performed in triplicate and each cell type was replicated twice ($P < 0.05$; One-way ANOVA).

embryos microinjected with mRNA^{*KLC2-eGFP*} compared with control (mRNA^{*eGFP*}), being statistical significant in embryos microinjected at 150 pg mRNA concentration ($P < 0.05$) (Fig. 3C).

Discussion

We previously mapped the SPOAN gene, responsible for a syndromic form of AR spastic paraplegia, at 11q13 (2,3). Based on next-generation sequencing, we were able to uncover a new causative mechanism for this condition. We observed that a small deletion in *KLC2* non-coding region is responsible for the gene up-regulation and SPOAN phenotype. Additionally, *BSCL2* and *FLRT1*, two genes previously associated with HSP and located nearby but outside the 11q13 critical region, were excluded as candidates (4,5). The Egyptian patients reported in this study as SPOAN carried the c.T2023C (stop loss) homozygous mutation in *FLRT1*, and were previously assigned by Novarino *et al.* (5) (Family 709) as SPG68. However, here we suggest that 216-bp deletion, shared by all SPOAN patients, is probably the causative mutation in both Egyptian siblings, rather than the reported *FLRT1* mutation.

KLC2 codes for KLC2, a protein involved in anterograde axoplasmic transport of organelles and macromolecules cargoes (6–10). *KLC2* is a part of kinesin protein-1 complex (11), which binds to kinesins heavy chain in a stoichiometric ratio of 1:1 (12), being highly expressed in neurons. Several neurodegenerative diseases show impairment in axonal transport (13,14) and some kinesins heavy chains (KIF5A, KIF1A and KIF1C) have been associated with HSP (15–18). Animal models have also shown

that disturbance of axonal transport proteins cause neurodegenerative disease and axon degeneration (10,19–21). Although the disease mechanism described here involves a homozygous deletion in a non-coding region, all these observations strongly suggest that *KLC2* is the causative gene for SPOAN.

According to the RepeatMask database, *KLC2* upstream region was generated by a non-LTR retrotransposon (L3/CR-1) insertion. DNA footprint and alignment of L3/CR-1 did not show conservation among distant species, but the high conservation observed among primates suggests it was inserted during the divergence of primates from other mammals. In several human populations, *KLC2* surrounding region (10-kb up- and downstream) and three described SNPs surrounding the mutation location have low fixation index (F_{ST}) (Supplementary Material, Fig. S2) (rs116801155, rs190099601 and rs76627914 with F_{ST} of 0.0044, 0.0002 and 0.0427, respectively), indicating a high conservation in humans.

Surprisingly, the small deletion in its non-coding upstream region causes *KLC2* overexpression, suggesting a novel molecular mechanism never report before, a gain of function in recessive condition. Intriguingly, the 216-bp deletion overlaps 9-bp of 5'-untranslated region (5'-UTR) of the largest *KLC2* transcript (NM_001134775.1), which means that this mutation is located at *KLC2* promoter region (upstream of the transcription start site [TSS]) and it should cause gene downregulation instead gain of function. Although this region has characteristics of a promoter (enrichment of H3Kme3, DNase I hypersensitive sites [DHS], RNA pol II binding sites, etc.), transcription factors complexes that bind at this region may act as transcriptional repressor, which could explain the gene up-regulation. Additionally, this

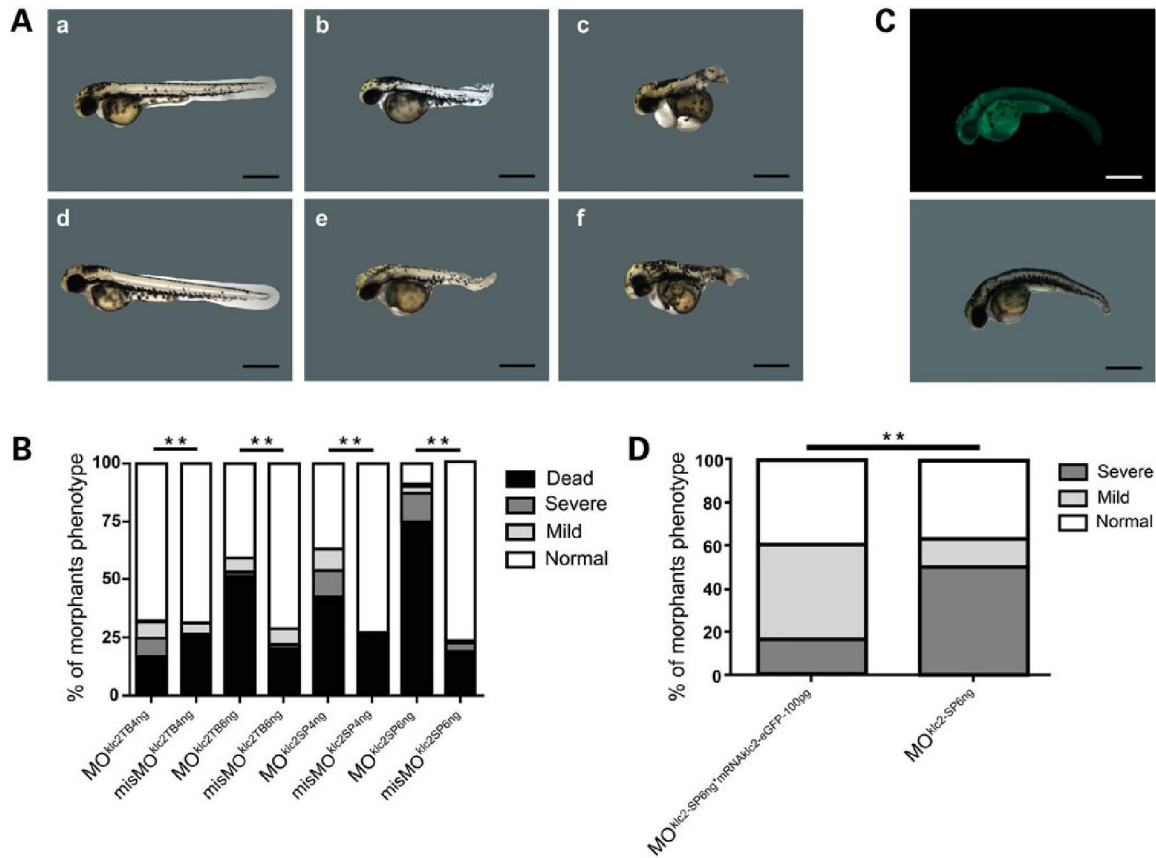


Figure 2. Effect of *klc2* knockdown in zebrafish. (A) (a and d) Embryos microinjected with control splicing blocking morpholino: (a) misMO^{klc2-SP4ng} (d) misMO^{klc2-SP6ng}, (b, c, e and f) Embryos microinjected with splicing blocking morpholino: (b and c) MO^{klc2-SP4ng} (e and f) MO^{klc2-SP6ng}. Normal (a and d), mild curly-tail (b and e) and severe curly-tail (c–f) phenotypes were recorded at 48-hpf. (B) Frequencies of observed phenotypes among morphants. Number of microinjected embryos: MO^{klc2-TB4ng} (292); misMO^{klc2-TB4ng} (305); MO^{klc2-TB6ng} (103); misMO^{klc2-TB6ng} (249); MO^{klc2-SP4ng} (283); misMO^{klc2-SP4ng} (234); MO^{klc2-SP6ng} (423); misMO^{klc2-SP6ng} (370). $P < 0.01$, χ^2 test. (C) Fluorescent embryo coinjected with 6 ng MO^{klc2-SF} and 100 pg mRNA^{klc2-eGFP} (selected by fluorescence at 24-hpf) showing mil-curly tails was recorded at 48-hpf. Scale bar 200 μ m. (D) Embryos coinjected with 6 ng MO^{klc2-SF} and 100 pg mRNA^{klc2-eGFP} ($n = 70$ embryos) showed a partial rescue of morphant phenotype compared with MO^{klc2-SP6ng} ($n = 30$ embryos). $P < 0.01$, χ^2 test.

deletion overlaps an unspliced antisense long non-coding RNA (lncRNA, AU311830.1) and regulatory elements: DHS, several transcription factors binding sites (TFBS), histone marks and DNA methylation (Supplementary Material, Fig. S1). Thus, a disruption of this non-coding and regulatory region might alter the expression level of downstream genes, which can explain SPOAN gain of function.

Expression analysis showed an unexpected *KLC2* overexpression from fibroblast and MN SPOAN samples. Because SPOAN is a recessive condition, we tried to check the *KLC2* expression pattern in heterozygous samples. Whole-blood samples collected from a large number of heterozygotes did not reveal increased *KLC2* expression, when compared with homozygotes and healthy controls. These results suggest a tissue-specific effect since 216-bp deletion causes *KLC2* up-regulation in fibroblast and MN cell-lines, but does not in blood. Also, luciferase assay showed that reporter constructs with 216-bp deletion have increased luciferase activity when compared with the wild-type. These results support the hypothesis that the 216-bp deletion located at non-coding region is likely the responsible for the *KLC2* overexpression.

Zebrafish has been an interesting animal model used in genetic studies due to its fast embryonic development and the fact it carries several human orthologues genes. The percentages of

lethality and animals with curly-tail phenotype observed in morphants in this study were similar to those reported in several reports that employed zebrafish for other HSP (22–28). Microinjection of mRNA^{klc2-eGFP} in zebrafish embryos showed a similar phenotype of *klc2* morphants, which reinforces our hypothesis that *klc2* is an essential gene for MN function and development. Thus, we hypothesize that imbalance of *KLC2* gene expression results in neurodegenerative phenotype in humans.

Gene overexpression had been associated with several neurological disorders but none of them have AR inheritance. For example, duplication or triplication of *PLP1* cause Pelizaeus-Merzbacher disease (OMIM #312080) (29–33) and *PMP22* duplication causes Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (OMIM #118220), a hereditary demyelinating neuropathy (34,35). Variants detected upstream *APP* region were associated with up-regulation of *APP* protein in Alzheimer disease and Down syndrome patients (36). Additionally, downregulation or complete disruption of protein synthesis is usually the common mechanism in HSP in which functional studies have been conducted. For instance, this is the case in X-linked [e.g. *L1CAM* (37)], autosomal dominant [e.g. *ATL1* (38) and *SPAST* (39)] and AR conditions [as *SPG20* (40) and *FA2H* (41)].

In short, several unexpected and surprising results were observed during SPOAN syndrome molecular investigation. Although the molecular mechanism of this up-regulation still

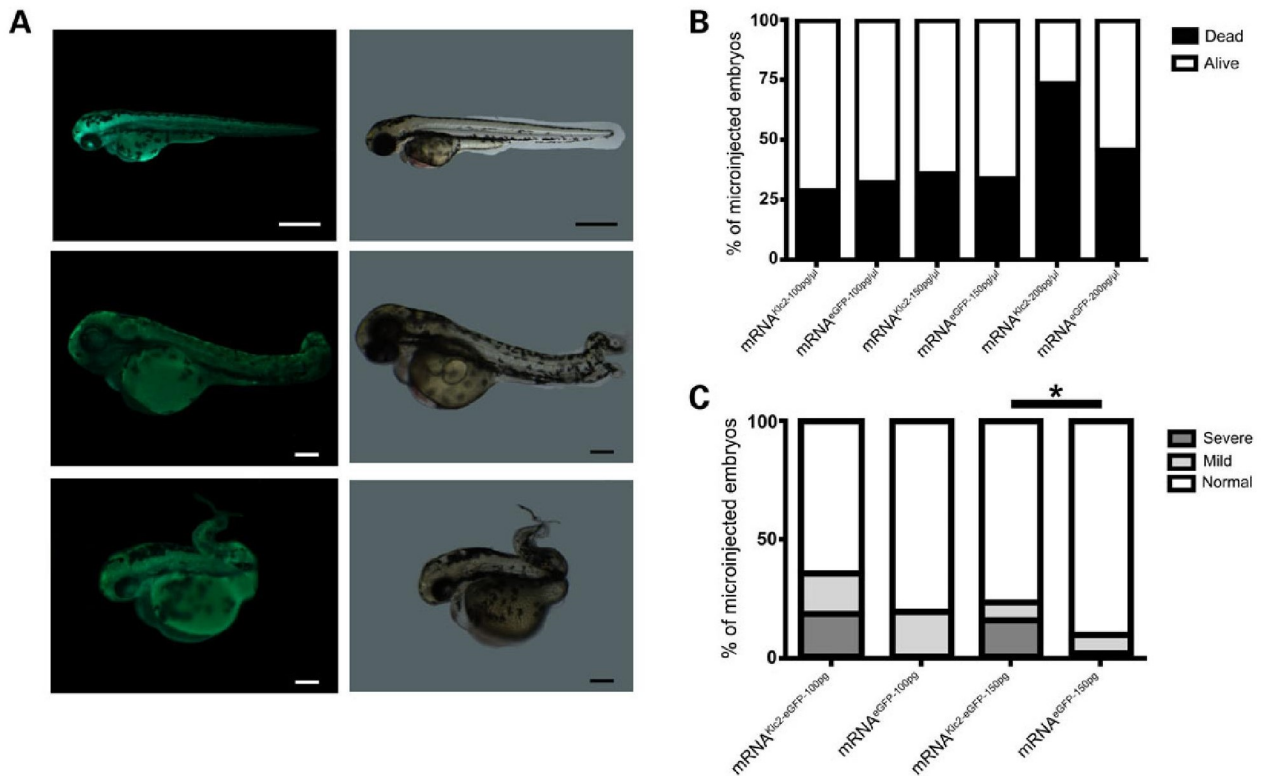


Figure 3. Effect of *klc2* overexpression in zebrafish. (A) (a and b) Embryos microinjected with 100 pg of mRNA^{eGFP} and (c–f) embryos microinjected with 100 pg of mRNA^{klc2-eGFP} were selected by fluorescence at 24-hpf, and recorded at 48-hpf. (a and b) Normal Embryos, (c and d) mild curly-tail and (e and f) severe curly-tail phenotypes. Scale bars: (a and b) 200 μm; (c–f) 100 μm. (B) Lethality frequency observed in embryos at 24-hpf stage. Embryos microinjected with 200 pg mRNA^{klc2-eGFP} showed high lethality and were excluded from phenotype analysis. (C) Frequencies of observed phenotypes among GFP-fluorescent embryos. Numbers of embryos selected by fluorescence: mRNA^{klc2-eGFP-100pg} = 32; mRNA^{eGFP-100pg} = 16; mRNA^{klc2-eGFP-150pg} = 43; mRNA^{klc2-eGFP-150pg} = 52. $P < 0.05$, χ^2 and Fisher's exact tests.

remains to be uncovered, it adds another example of the importance of non-coding regions in human pathology.

Materials and Methods

Patients

Clinical information regarding SPOAN patients in the geographic cluster detected in northeastern Brazil was detailed elsewhere (2,3). Additionally, we evaluated another three Brazilian patients, with different ancestors from northeastern Brazil and two Egyptians siblings with the identified 216-bp deletion and same clinical symptoms. Blood samples were used for DNA extraction from all patients, from several obligated carriers and from unaffected siblings. Fibroblasts were obtained from dermal biopsies from five patients, one heterozygote and four Brazilian healthy controls, following informed consent under protocols approved by the Biosciences Institute, University of São Paulo (Protocol CEP 010/2003).

Molecular analysis

Previous studies conducted by our group using Sanger sequencing did not identify deleterious variants in exons of candidate genes located in the critical region for SPOAN (*LRFN4*, *KLC2* and *CCS*) (3). To have a more comprehensive and detailed view over this region, WES was performed using DNA samples from two SPOAN subjects using Agilent SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit and sequenced in Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Alignment against reference GRCh37 was

performed with BWA (42); genotyping with GATK (43); SNP and InDel annotation with Annovar (44) and CNV detection with the R package ExomeDepth (45). The WES coverage achieved at the candidate region was 40× and 77× in the Egyptian and Brazilian samples, respectively. The 216-bp deletion was not detectable by WES. Variants detected in the mapped linkage region were filtered by their frequency, compared with 1000 Genomes database, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Exome Aggregation Consortium (ExAC) and with sequences obtained from 1484 Brazilian controls.

Whole-genome sequencing was performed in DNA from a third affected patient (a distant cousin from Brazilian series) using Illumina TruSeq DNA kit. Alignment against reference GRCh37 was performed with BWA (42); genotyping with GATK (43); SNP and InDel annotation with SnpEff (46) and CNV detection using R package ExomeDepth (45) restricted to exon regions (using bedfile template of the Agilent V4Plus kit), Pindel and additional manual screening in the target linkage region. The achieved coverage at the candidate region was 26×. Variants were filtered by comparison with 1000 Genomes. SPOAN mutation (chr11.hg19:g.66,024,557_66,024,773del) was checked for co-segregation in affected and family health controls (also checked in 474 unrelated health controls) by PCR followed by agarose gel electrophoresis using primer ID 1 (Supplementary Material, Table S3).

Induced pluripotent stem-Cells (iPSC)

Retrovirus vectors containing the Oct4, c-Myc, Klf4 and Sox2 human cDNAs were obtained from Muotri's group and the

protocol is described elsewhere (47). Embryoid bodies (EBs) were formed by mechanical dissociation of cell clusters (pre-treated with dorsomorphin, 1 nM, for 2 days) and plating onto low-adherence dishes in NB media (DMEM/F12 plus 0.5X N2 and 0.5X B27 supplements) plus dorsomorphin for 2 days and in the next 5 days in NB media plus FGF and EGF. After that, mature EBs were dissociated with accutase for 5 min at 37°C and plated in matrigel in NB media plus FGF 20 ng/ml and EGF 20 ng/ml. Rosettes were visible for collection after 7 days and were then dissociated with accutase (Chemicon, EMD Millipore, Darmstadt, Germany) and plated onto poly-ornithine/laminin-coated dishes (Sigma) with NB media plus FGF and EGF. Homogeneous populations of neural progenitor cells (NPCs) were achieved after 1–2 passages with accutase in the same condition. To improve cell differentiation, brain-derived neurotrophic factor (20 ng/ml), glial cell-derived neurotrophic factor (20 ng/ml), insulin-like growth factor-1 (20 ng/ml), Ri (5 μM) and SHH (100 ng/ml; neuronal maturation medium) were added to neuronal cultures for 5 weeks. NPCs were differentiated in MN following a protocol modified from study described elsewhere (48).

Human RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction from fibroblasts ($n = 5$ affected; $n = 1$ heterozygote; $n = 4$ healthy controls) and MN ($n = 3$ affected; $n = 1$ heterozygote; $n = 3$ healthy controls) was performed with TRIZOL® reagent (Invitrogen) and Norgen Biotek RNA/DNA/Protein Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada); RNA from whole-blood ($n = 7$ affected; $n = 7$ heterozygotes; $n = 6$ family healthy controls +1 unrelated healthy control from the same region) were extracted using PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen); RNA was reverse-transcribed with oligo(dT) primers using SuperScript™ III First-strand Synthesis System (Life Technologies).

Expression array

Fibroblast cDNA samples were submitted to array expression assay using GeneChip® Scanner 3000 7G System (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The results of expression array were normalized by Robust Multi-array Average (49) and statistical method (test-T) was performed using CLCbio Genomics Workbench, adjusted by Bonferroni and false discovery rate (FDR). Data were submitted to GEO (accession number: GSE67527).

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

KLC2 primers for RT-qPCR were detailed in Supplementary Material, Table S3 (primer ID 2). RT-qPCR was normalized to GAPDH and was performed using LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). KLC2 expression data were calculated using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (50). Mann-Whitney test (Nonparametric) was performed using GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA, USA). Each experiment was performed in triplicate and each sample was replicated twice.

TaqMan Gene Expression Assay probes: MNX1/HB9 (Hs00907365_m1), CHAT (Hs00252848_m1) and ISL1 (Hs00158126_m1) were used to validate the neurons derived cells from iPSC as MN (Applied Biosystems, USA). RT-qPCR was normalized to Human ACTB (β -actin; Hs01060665_g1). RT-qPCR was performed using the Applied Biosystems® 7500 Fast Real-time PCR System.

Immunofluorescence and MN validation

For immunofluorescence evaluation of MN, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, followed by permeabilization and

blocking with 0.05% (v/v) Triton X in PBS containing 5% (v/v) donkey serum. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Samples were washed three times before secondary antibodies incubation (Alexa Fluor Dyes, Life Technologies). Dapi was added in the last 20 min of secondary antibody incubation. Primary antibody concentrations were: a-NeuN mouse monoclonal 1:500 (Millipore); a-Hb9 mouse polyclonal 1:500 (DSHB) and a-Islet 1 rabbit polyclonal 1:1000 (BD Bio-science). Images were obtained through Axio Observer.A1 immunofluorescence microscope (Zeiss). cDNA obtained from fibroblasts, NPC and MN were used for MN validation using TaqMan probes described above. RT-qPCR using fibroblast samples did not show expression of MN probes. RT-qPCR of MN samples showed expression of MNX1/HB9 probe, which was not amplified in NPC samples. MN samples showed higher significant ($P < 0.05$) expression of CHAT compared with NPC (Supplementary Material, Fig. S3B). We confirmed the presence of 216-bp deletion in DNA extracted from MN patient samples (Supplementary Material, Fig. S3C).

Gene reporter assay

The full-length (3,313-bp) and deleted 216-bp (3,097-bp) KLC2 upstream region was synthesized (Genone) and cloned into promoterless firefly luciferase vector pGL4 (Promega). pShuttle/RL was used for transfection normalization, which expresses the reporter gene Renilla luciferase (51). Assays using HEK239T, U87MG and MN about 1×10^4 cells were plated in 96-well dishes in triplicate for each point. In HEK239T and U87MG a total of 200 ng of plasmids (180 ng pGL4 and 20 ng pShuttle/RL) were used for transfection using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen). In MN we used 480 ng pGL4 and 20 ng pShuttle/RL. Two days after DNA transfection, the luciferase activities were measured in Glo-max luminometer (Promega) with the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) according to manufacturer's instructions. One-way ANOVA was performed using GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA, USA).

Zebrafish animal model

Adult zebrafish were maintained at 28°C on a 14 h light/10 h dark cycle and the embryos were obtained by natural mating. Zebrafish presents only one *klic2* gene in its genome (ZFIN ID: ZDB-GENE-030131-2670), which turns appropriate the use *Danio rerio* as animal model in this study. The use of *Danio rerio* in this study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Pharmacology and Biochemistry Sciences department of National University of Rosario, Argentina (No. 429/2014).

Zebrafish RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from whole embryos at different embryonic stages (6, 24, 48 and 72-hpf). RNA extraction was performed using TRIZOL® reagent (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was synthesized using SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) with a specific primer (primer ID 3) for *Danio rerio klic2* gene transcript (Ensembl ENSDARG00000075485). The complete *klic2* CDS was amplified by PCR using primers ID 4, forward including *EcoRI* and reverse including *SacI* restriction sites.

Plasmids and DNA constructs

The complete CDS sequence from *klic2* (mRNA^{klic2}) was cloned using *EcoRI* and *SacI* sites into an engineered version of pCS2 +MT as described elsewhere (52). This plasmid was used to

transcribe mRNA^{klc2-eGFP} coding for KLC2 fused to eGFP. Plasmid without *klc2* insert was used to transcribe mRNA^{eGFP} as a control. For mRNA^{klc2-eGFP} and mRNA^{eGFP} transcription, plasmids were linearized by *NotI* and the SP6 promoter was used for *in vitro* transcription using mMESAGE mMACHINE® Kit (Ambion, Applied Biosystems). The mRNA^{klc2-eGFP} was used to perform the overexpression assay and for rescue of morphant's phenotype.

Knockdown and overexpression assays

Microinjection of morpholino oligonucleotides (MO) in the yolk of embryos at one- to two-cell stage were performed in specific concentrations (4 and 6 ng). Translation blocking morpholino (MO^{klc2-TB}) sequence was 5'-GGTGGACATCACCCACTGACACACA-3' (misMO^{klc2-TB} was 5'-GGaGcACATgACCCAgTcACACACA-3') and splicing blocking morpholino (MO^{klc2-SP}) sequence was 5'-CGTGTGTGTTTTCACCTGTGCTTCCC-3' (misMO^{klc2-SP} was 5'-CGTcTcTGTTTgACCTcTcCTTCCC-3'). MO^{klc2-SP} target exon 2 of *klc2* gene. The rescue of phenotype was performed by co-injecting 6 ng MO^{klc2-SP} and 100 pg mRNA^{klc2-eGFP} in the yolk of embryos staged at one- to two-cells. Chi-square and Fisher's exact tests were performed using GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA, USA).

Overexpression of *klc2* gene in zebrafish was performed by microinjecting mRNA^{klc2-eGFP} at specific concentrations (100, 150 and 200 pg), as described in previous study (53). Same concentrations of mRNA^{eGFP} were microinjected in zebrafish embryos to be used as controls. Both microinjected embryos (mRNA^{klc2-eGFP} and mRNA^{eGFP}) were selected by fluorescence at 24-hpf stage and evaluated at 48-hpf under MVX10 Olympus Microscope, and recorded with MVXTV1XC Olympus digital camera. Chi-square test was performed using GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA, USA).

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We are grateful to H. Miranda for her help in conducting MN differentiation. We also thank R. Moura for his contribution in bioinformatics analysis.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

This work was supported by Propesq/UEPB, PPSUS/FAPESQ/PB, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)/Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq).

References

- Lo Giudice, T., Lombardi, F., Santorelli, F.M., Kawarai, T. and Orlandi, A. (2014) Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp. Neurol.* **261**, 518–539.
- Macedo-Souza, L., Kok, F., Santos, S., Amorim, S.C., Starling, A., Nishimura, A., Lezirovitz, K., Lino, A.M. and Zatz, M. (2005) Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Ann. Neurol.* **57**, 730–737.
- Macedo-Souza, L., Kok, F., Santos, S., Licinio, L., Lezirovitz, K., Cavaçana, N., Bueno, C., Amorim, S., Pessoa, A., Graciani, Z. et al. (2009) Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy: new observations, locus refinement, and exclusion of candidate genes. *Ann. Hum. Genet.* **73**, 382–387.
- Windpassinger, C., Auer-Grumbach, M., Irobi, J., Patel, H., Petek, E., Hörl, G., Malli, R., Reed, J.A., Dierick, I., Verpoorten, N. et al. (2004) Heterozygous missense mutations in *BSC12* are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 271–276.
- Novarino, G., Fenstermaker, A.G., Zaki, M.S., Hofree, M., Silhavy, J.L., Heiberg, A.D., Abdellateef, M., Rosti, B., Scott, E., Mansour, L. et al. (2014) Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*, **31**, 506–511.
- Vale, R.D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, **112**, 467–480.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. and Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 682–696.
- Visscher, K., Schnitzer, M.J. and Block, S.M. (1999) Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, **400**, 184–189.
- Verhey, K.J. and Hammond, J.W. (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 765–777.
- Hirokawa, N., Niwa, S. and Tanaka, Y. (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, **68**, 610–638.
- Pernigo, S., Lamprecht, A., Steiner, R.A. and Dodding, M.P. (2013) Structural basis for kinesin-1: cargo recognition. *Science*, **340**, 356–359.
- Rahman, A., Friedman, D.S. and Goldstein, L.S.B. (1998) Two kinesin light chain genes in mice: identification and characterization of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 15395–15403.
- Perlson, E., Maday, S., Fu, M.M., Moughamian, A.J. and Holzbaur, E.L. (2010) Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci.* **33**, 335.
- Millicamps, S. and Julien, J.P. (2013) Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 161–176.
- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svensson, I.K., Graham, F.L., Gaskell, P.C., Dearlove, A., Pericak-Vance, M.A. et al. (2002) A kinesin heavy chain (*KIF5A*) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1189–1194.
- Ebbing, B., Mann, K., Starosta, A., Jaud, J., Schöls, L., Schüle, R. and Woehlke, G. (2008) Effect of spastic paraplegia mutations in *KIF5A* kinesin on transport activity. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1245–1252.
- Caballero Oteyza, A., Battaloglu, E., Ocek, L., Lindig, T., Reichbauer, J., Rebelo, A.P., Gonzalez, M.A., Zorlu, Y., Ozes, B., Timmann, D. et al. (2014) Motor protein mutations cause a new form of hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, **3**, 2007–2016.
- Lee, J., Srour, M., Kim, D., Hamdan, F.F., Lim, S.H., Brunel-Guitton, C., Décarie, J.C., Rossignol, E., Mitchell, G.A., Schreiber, A. et al. (2015) De novo mutations in the motor domain of *KIF1A* cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy and cerebellar atrophy. *Hum. Mutat.* **36**, 69–78.
- Munch, C., Rosenbohm, A., Sperfeld, A.D., Uttner, I., Reske, S., Krause, B.J., Sedlmeier, R., Meyer, T., Hanemann, C.O., Stumm, G. et al. (2005) Heterozygous R1101K mutation of

- the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann. Neurol.*, **58**, 777.
20. Falzone, T.L., Stokin, G.B., Lillo, C., Rodrigues, E.M., Westerman, E.L., Williams, D.S. and Goldstein, L.S. (2009) Axonal stress kinase activation and tau misbehavior induced by kinesin-1 transport defects. *J. Neurosci.*, **29**, 5758.
 21. Fügler, P., Sreekumar, V., Schüle, R., Kern, J.V., Stanchev, D.T., Schneider, C.D., Karle, K.N., Daub, K.J., Siegert, V.K., Flötenmeyer, M. et al. (2012) Spastic paraplegia mutation N256S in the neuronal microtubule motor KIF5A disrupts axonal transport in a Drosophila HSP model. *PLoS Genet.*, **8**, e1003066.
 22. Valdmanis, P.N., Meijer, I.A., Reynolds, A., Lei, A., MacLeod, P., Schlesinger, D., Zatz, M., Reid, E., Dion, P.A., Drapeau, P. et al. (2007) Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.*, **80**, 152–161.
 23. Lin, P., Li, J., Liu, Q., Mao, F., Li, J., Qiu, R., Hu, H., Song, Y., Yang, Y., Gao, G. et al. (2008) A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42). *Am. J. Hum. Genet.*, **83**, 752–759.
 24. Clemen, C.S., Tangavelou, K., Strucksberg, K.H., Just, S., Gaertner, L., Regus-Leidig, H., Stumpf, M., Reimann, J., Coras, R., Morgan, R.O. et al. (2010) Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases. *Brain*, **133**, 2920–2941.
 25. Fassier, C., Hutt, J.A., Scholpp, S., Lumsden, A., Giros, B., Nothias, F., Schneider-Maunoury, S., Houart, C. and Hazan, J. (2010) Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat. Neurosci.*, **13**, 1380–1387.
 26. Martin, E., Yanicostas, C., Rastetter, A., Naini, S.M., Maouedj, A., Kabashi, E., Rivaud-Péchéux, S., Brice, A., Stevanin, G. and Soussi-Yanicostas, N. (2012) Spatacsin and spastizin act in the same pathway required for proper spinal motor neuron axon outgrowth in zebrafish. *Neurobiol. Dis.*, **48**, 299–308.
 27. Martin, E., Schüle, R., Smets, K., Rastetter, A., Boukhris, A., Loureiro, J.L., Gonzalez, M.A., Mundwiller, E., Deconinck, T., Wessner, M. et al. (2013) Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 238–244.
 28. Song, Y., Wang, M., Mao, F., Shao, M., Zhao, B., Song, Z., Shao, C. and Gong, Y. (2013) Knockdown of Pnpla6 protein results in motor neuron defects in zebrafish. *Dis. Model Mech.*, **6**, 404–413.
 29. Cremers, F.P.M., Pfeiffer, R.A., van de Pol, T.J., Hofker, M.H., Kruse, T.A., Wieringa, B. and Ropers, H.H. (1987) An interstitial duplication of the X chromosome in a male allows physical fine mapping of probes from the Xq13-q22 region. *Hum. Genet.*, **77**, 23–27.
 30. Hodes, M.E., Pratt, V.M. and Dlouhy, S.R. (1993) Genetics of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Dev. Neurosci.*, **15**, 383–394.
 31. Inoue, K., Osaka, H., Sugiyama, N., Kawanishi, C., Onishi, H., Nezu, A., Kimura, K., Yamada, Y. and Kosaka, K. (1996) A duplicated PLP gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease detected by comparative multiplex PCR. *Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 32–39.
 32. Mimault, C., Giraud, G., Courtois, V., Cailloux, F., Boire, J.Y., Dastugue, B. and Boespflug-Tanguy, O. (1999) Clinical European network on brain dysmyelinating disease. Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 360–369.
 33. Carvalho, C.M.B., Ramocki, M.B., Pehlivan, D., Franco, L.M., Gonzaga-Jauregui, C., Fang, P., McCall, A., Pivnick, E.K., Hines-Dowell, S., Seaver, L.H. et al. (2011) Inverted genomic segments and complex triplication rearrangements are mediated by inverted repeats in the human genome. *Nat. Genet.*, **43**, 1074–1081.
 34. Hertz, J.M., Borglum, A.D., Brandt, C.A., Flint, T. and Bisgaard, C. (1994) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: the parental origin of a de novo 17p11.2-p12 duplication. *Clin. Genet.*, **46**, 291–294.
 35. Sorour, E., Thompson, P., MacMillan, J. and Upadhyaya, M. (1995) Inheritance of CMT1A duplication from a mosaic father. *J. Med. Genet.*, **32**, 483–485.
 36. Theuns, J., Brouwers, N., Engelborghs, S., Sleegers, K., Bogaerts, V., Corsmit, E., De Pooter, T., van Duijn, C.M., De Deyn, P.P. and Van Broeckhoven, C. (2006) Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **78**, 936–946.
 37. Nagaraj, K., Kristiansen, L.V., Skrzynski, A., Castiella, C., Garcia-Alonso, L. and Hortsch, M. (2009) Pathogenic human L1-CAM mutations reduce the adhesion-dependent activation of EGFR. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3822–3831.
 38. Meijer, I.A., Dion, P., Laurent, S., Dupré, N., Brais, B., Levert, A., Puymirat, J., Rioux, M.F., Sylvain, M., Zhu, P.P. et al. (2007) Characterization of a novel SPG3A deletion in a French-Canadian family. *Ann. Neurol.*, **61**, 599–603.
 39. Havlicek, S., Kohl, Z., Mishra, H.K., Prots, I., Eberhardt, E., Denguir, N., Wend, H., Plötz, S., Boyer, L., Marchetto, M.C. et al. (2014) Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2527–2541.
 40. Bakowska, J.C., Wang, H., Xin, B., Sumner, C.J. and Blackstone, C. (2008) Lack of spartin protein in Troyer syndrome: a loss-of-function disease mechanism? *Arch. Neurol.*, **65**, 520–524.
 41. Krüer, M.C., Paisán-Ruiz, C., Boddaert, N., Yoon, M.Y., Hama, H., Gregory, A., Malandrini, A., Woltjer, R.L., Munnich, A., Gobin, S. et al. (2010) Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann. Neurol.*, **68**, 611–618.
 42. Li, H. and Durbin, R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **26**, 589–595.
 43. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M. et al. (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.*, **20**, 1297–1303.
 44. Wang, K., Li, M. and Hakonarson, H. (2010) ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e164.
 45. Plagnol, V., Curtis, J., Epstein, M., Mok, K.Y., Stebbings, E., Grigoriadou, S., Wood, N.W., Hambleton, S., Burns, S.O., Thrasher, A.J. et al. (2012) A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics*, **28**, 2747–2754.
 46. Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S.J., Lu, X. and Ruden, D.M. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, **6**, 80–92.
 47. Marchetto, M.C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H. and Muotri, A.R. (2010) A model for

- neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, **12**, 527–539.
48. Mitne-Neto, M., Machado-Costa, M., Marchetto, M.C., Bengtson, M.H., Joazeiro, C.A., Tsuda, H., Bellen, H.J., Silva, H.C., Oliveira, A.S., Lazar, M. et al. (2011) Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 3642–3652.
 49. Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, **4**, 249–264.
 50. Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, **3**, 1101–1108.
 51. Soltys, D.T., Rocha, C.R., Lerner, L.K., de Souza, T.A., Munford, V., Cabral, F., Nardo, T., Stefanini, M., Sarasin, A., Cabral-Neto, J.B. et al. (2013) Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Hum. Mutat.*, **34**, 481–489.
 52. Favaro, F.P., Alvizi, L., Zechi-Ceide, R.M., Bertola, D., Felix, T.M., de Souza, J., Raskin, S., Twigg, S.R., Weiner, A.M., Armas, P. et al. (2014) A noncoding expansion in EIF4A3 causes Richieri-Costa-Pereira syndrome, a craniofacial disorder associated with limb defects. *Am. J. Hum. Genet.*, **94**, 120–128.
 53. Niederriter, A., Davis, E.E., Golzio, C., Oh, E.C., Tsai, I.C. and Katsanis, N. (2013) In vivo modeling of the morbid human genome using *Danio rerio*. *J. Vis. Exp.*, **24**, e50338.

Human Molecular Genetics

Supplemental material

Overexpression of *KLC2* due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome

Uirá S. Melo, Lucia I. Macedo-Souza, Thalita Figueiredo, Alysson R. Muotri, Joseph G. Gleeson, Gabriela Coux, Pablo Armas, Nora B. Calcaterra, João P. Kitajima, Simone Amorim, Thiago R. Olávio, Karina Griesi-Oliveira, Giuliana C. Coatti, Clarissa R.R. Rocha, Marinalva Martins-Pinheiro, Carlos F.M. Menck, Maha S. Zaki, Fernando Kok, Mayana Zatz, Silvana Santos.

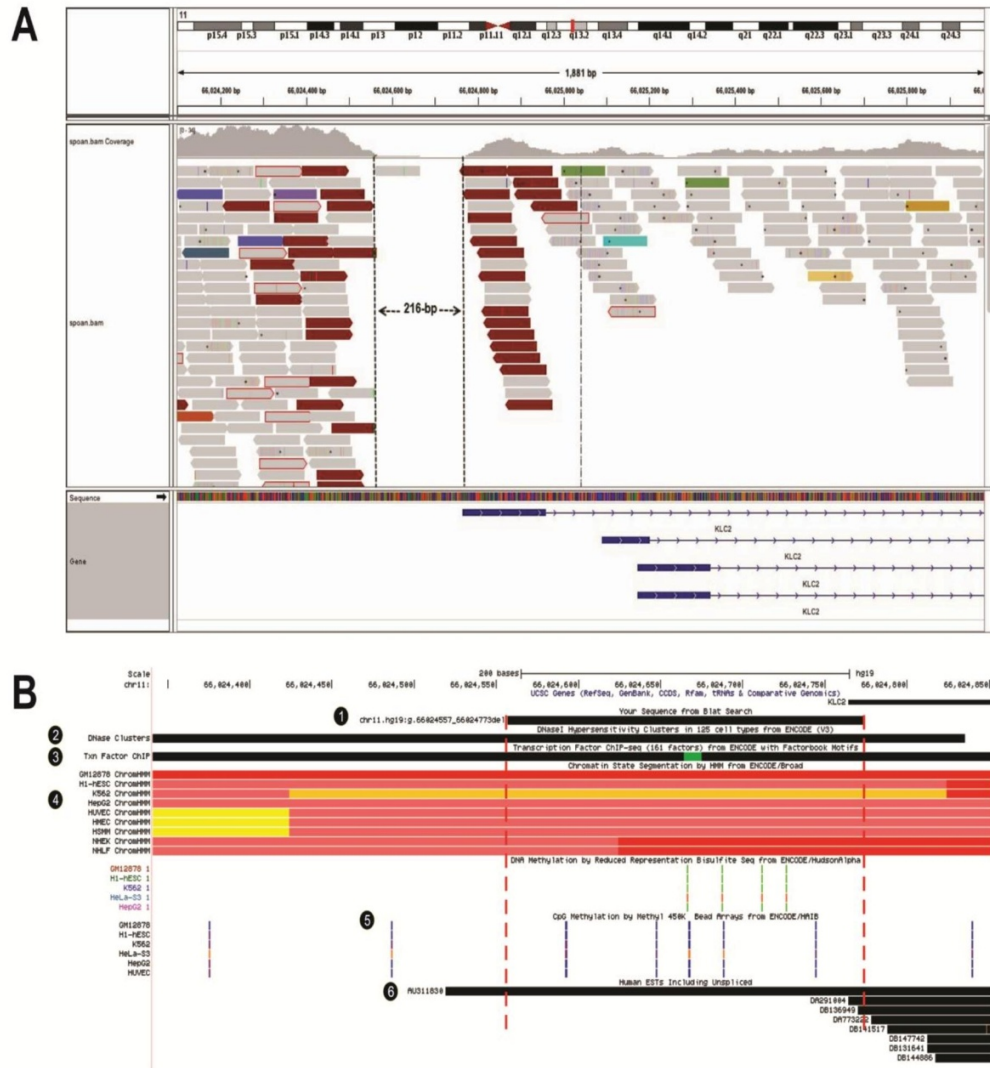


Figure S1. (A) BAM file of WGS result from one SPOAN patients showing the alignment of *KLC2* upstream region, highlighting the 216-bp deletion, visualized in IGV 2.3 software (Broad institute). (B) Screenshot retrieved from UCSC genome browser showing *KLC2* upstream region, highlighting the 216-bp deletion (surrounded by red dashed lines). Numbers inside black circles means: 1- SPOAN mutation (216-bp deletion); 2- DHS; 3- TFBS; 4- Chromatin state segmentation by HMM, in which yellow/orange bars means that region probably acts as enhancer (Ernst *et al.*, 2011); 5- DNA methylation; 6- lncRNA (AU311830.1)

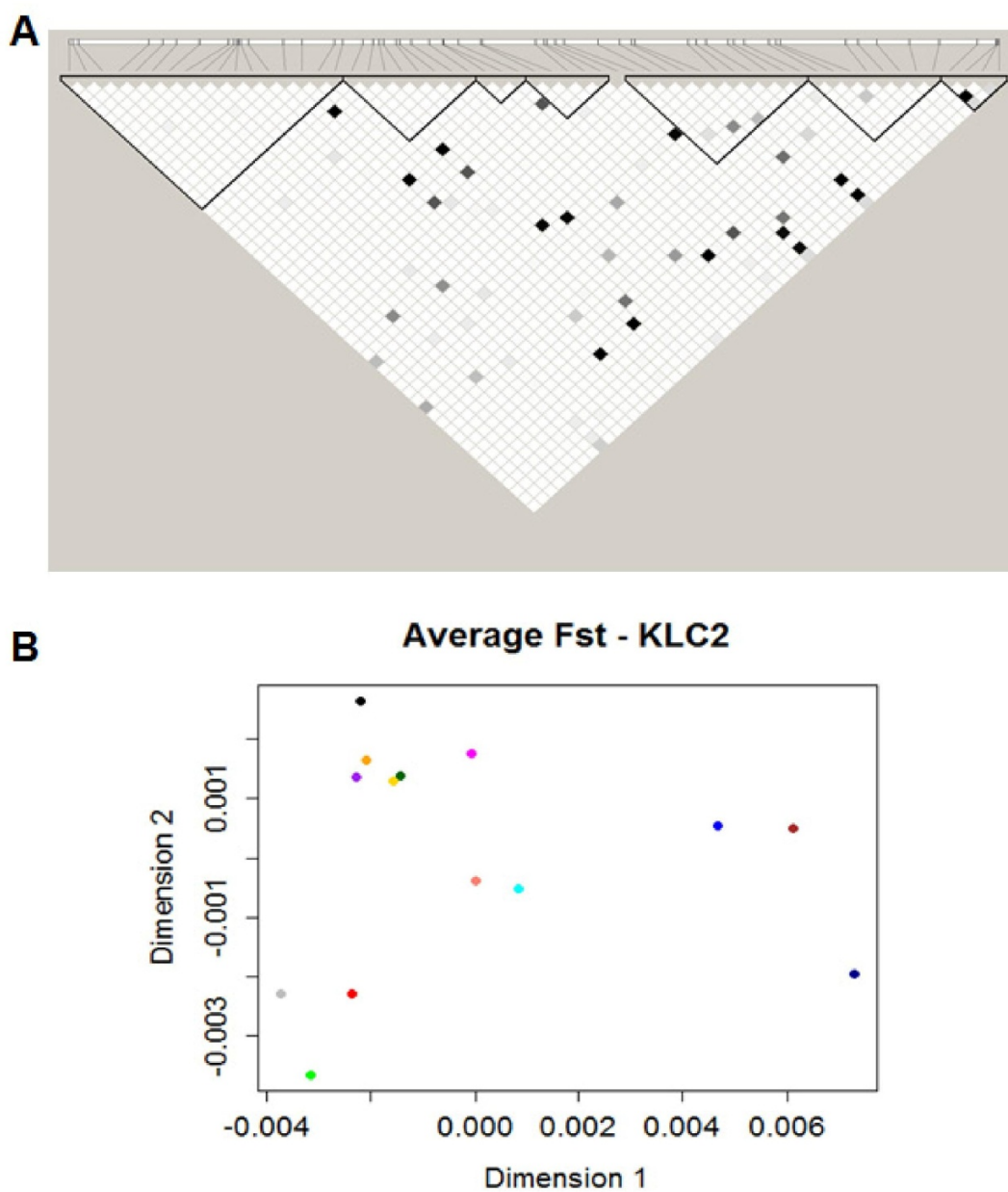


Figure S2 (A) Linkage disequilibrium blocks between 10 kb up- and downstream of *KLC2*. Darkest blocks suggest strong LD between markers. (B) MDS plot of PCA based on F_{ST} . Distant plots mean higher genetic diversity among populations.

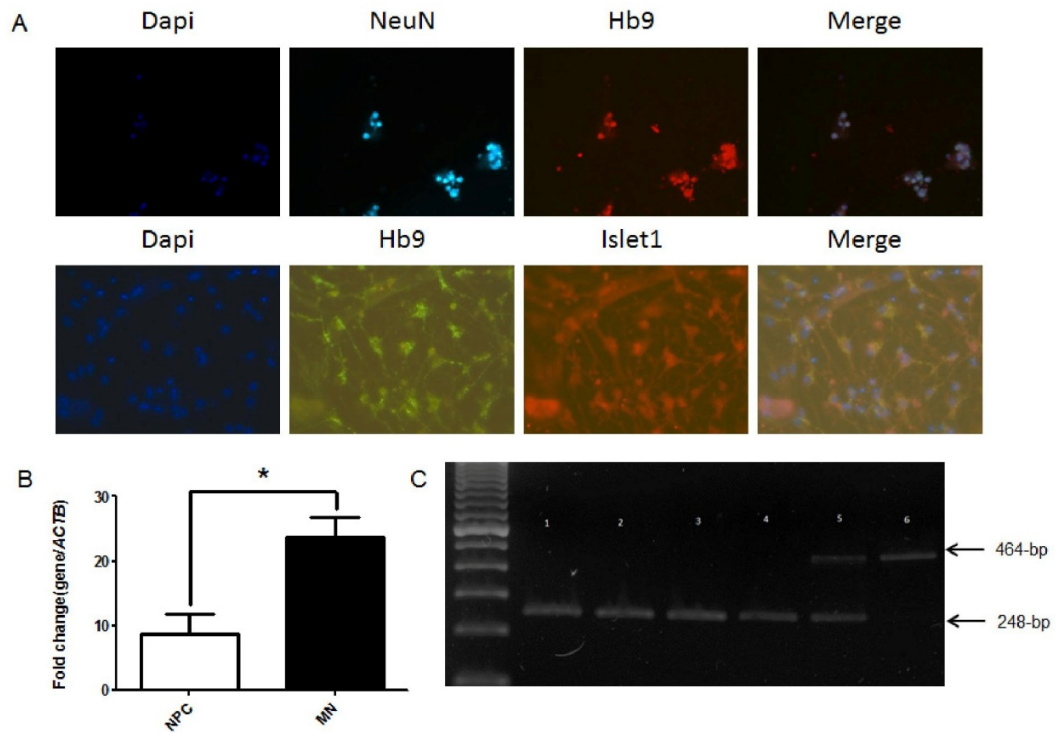


Figure S3 (A) Immunofluorescence using neurons and MN markers. First row shows one heterozygote MN sample and second row shows MN healthy control sample. Original magnification 400X. (B) Relative expression of CHAT measured by qRT-PCR performed in NPC and MN (p -value < 0.05). (C) PCR product showing 216-bp deletion visualized in agarose gel (2%): (1) DNA extracted from blood of affected individual. (2-4) DNA extracted from MN showing 216-bp deletion in homozygosis, (5) in heterozygosis and (6) in wild-type.

Table S1 Variants detected in WES using GRCh37 as genomic reference and checked for co-segregation using Sanger sequencing.

Gene	Variant	Gene location	Allele Frequency*	Patients			Family controls			Unrelated controls			Excluded as candidate?
				-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	
<i>CLCF1</i>	67,135,092 A>G	Exon 2	8.453e-06	48	0	0	18	0	62	NP	NP	NP	Yes
<i>RIN1</i>	66,102,179 A>C	Exon 5	0.002141	0	0	20	NP	NP	NP	NP	NP	NP	Yes
<i>MRPL11</i>	66,205,845 C>T	NCR	NA	71	0	0	0	46	23	0	0	140	No
<i>ACTN3</i>	66,326,677 G>A	NCR	0.001239	65	0	0	0	40	20	7	40	95	Yes
<i>RBM4B</i>	66,444,626 G>A	NCR	NA	71	0	0	0	47	23	0	46	169	No
<i>NUDT8</i>	67,396,600 G>C	NCR	NA	29	1	0	NP	NP	NP	8	61	24	Yes

Table key: NCR – Non-coding region; NA – Not annotated; NP – Molecular test not performed; -/-, +/- and +/+ means homozygote for mutated allele, heterozygote and homozygote for wild-type allele, respectively. *Allele frequency obtained from ExAC.

Table S2 Genes with significant differential expression in SPOAN patients compared to controls.

Gene	Fold Change	p-value	Chromosome region
<i>DPF2</i>	1.022	1.09E-03	11q13.1
<i>CYB561A3</i>	1.017	1.49E-03	11q12.2
<i>CCDC88B</i>	1.029	1.90E-03	11q12.3
<i>ATL3</i>	-1.038	2.05E-03	11q13.1
<i>AIP</i>	1.025	2.25E-03	11q13.3
<i>SCYL1</i>	1.029	2.43E-03	11q13
<i>B3GAT3</i>	1.09	2.56E-04	11q12.3
<i>MRPL11</i>	-1.083	2.94E-03	11q13.3
<i>FAM89B</i>	1.025	2.97E-03	11q13
<i>TMEM138</i>	1.048	3.25E-03	11q12.2
<i>STX5</i>	1.102	3.41E-03	11q12.3
<i>ZFPL1</i>	1.071	3.43E-03	11q13
<i>CAPN1</i>	1.046	3.55E-03	11q13
<i>SNX32</i>	1.111	3.88E-03	11q13.1
<i>EFEMP2</i>	1.024	4.36E-03	11q13.1
<i>MARK2</i>	1.057	4.53E-03	11q13.1
<i>RAD9A</i>	1.03	4.99E-03	11q13.1-q13.2
<i>SSH3</i>	1.078	6.09E-03	11q13.2
<i>ATG2A</i>	1.073	6.77E-03	11q13.1
<i>SUV420H1</i>	-1.041	7.15E-03	11q13.2
<i>FOLH1</i>	1.028	9.04E-03	11p11.2
<i>FKBP2</i>	-1.02	9.04E-03	11q13.1-q13.3
<i>KLC2</i>	1.068	9.21E-04	11q13.2

Table S3 Primers sequences used in this study.

Primer ID	Sense	Primers sequencing (5'-3')	Target region	Purpose
1	Forward	GCCCTGGGTTTCATTGACTTA	<i>KLC2</i> upstream region	Detect 216-bp deletion amplification by PCR
	Reverse	ACCCAGACGGACAAGCTAGA		
2	Forward	CACTGGATGACCTGTTCCCC	<i>KLC2</i> exon boundaries (3-4)	Evaluate <i>KLC2</i> expression in SPOAN samples
	Reverse	ATGCTGACCAGACACATCCC		
3	Reverse	CAACAGCACTTTCCCCACG	3'UTR of zebrafish <i>Klc2</i>	Reverse transcription of <i>klc2</i> in zebrafish
4	Forward	GGGGAATTCAATGTCCACCATGGTTTACCCTC	Whole <i>klc2</i>	Microinjection in zebrafish embryos for <i>klc2</i> overexpression assay
	Reverse	CCCGAGCTCACACTGATCAGAGAGTTGCGTCT		

3.3. Resultados do experimento de WISH em *zebrafish*

O experimento de WISH foi realizado com a finalidade de identificar o padrão de expressão espaço-temporal do *klc2* em *zebrafish*, em quatro estágios embrionários diferentes: 4 a 8 células, 15 a 20 somitos, 48- e 72-hpf. Em embriões de 4 a 8 células observou-se um padrão de expressão significativo do *klc2*, o que se sugere expressão de origem materna desse gene (**Figura 6a**). No segundo estágio embrionário avaliado observou-se o padrão de expressão preferencial nos somitos (**Figura 6b**). A expressão do *klc2* ficou mais definida em estágios embrionários mais avançados, apresentando um padrão específico de expressão na notocorda, retina, nervo óptico, prosencéfalo e em somitos, em embriões no estágio de 48-hpf e 72-hpf (**Figura 7**). Esse padrão de expressão do *klc2* é similar ao detectado nos genes parálogos *klc1a* e *klc1b* por Thisse & Thisse (2004).

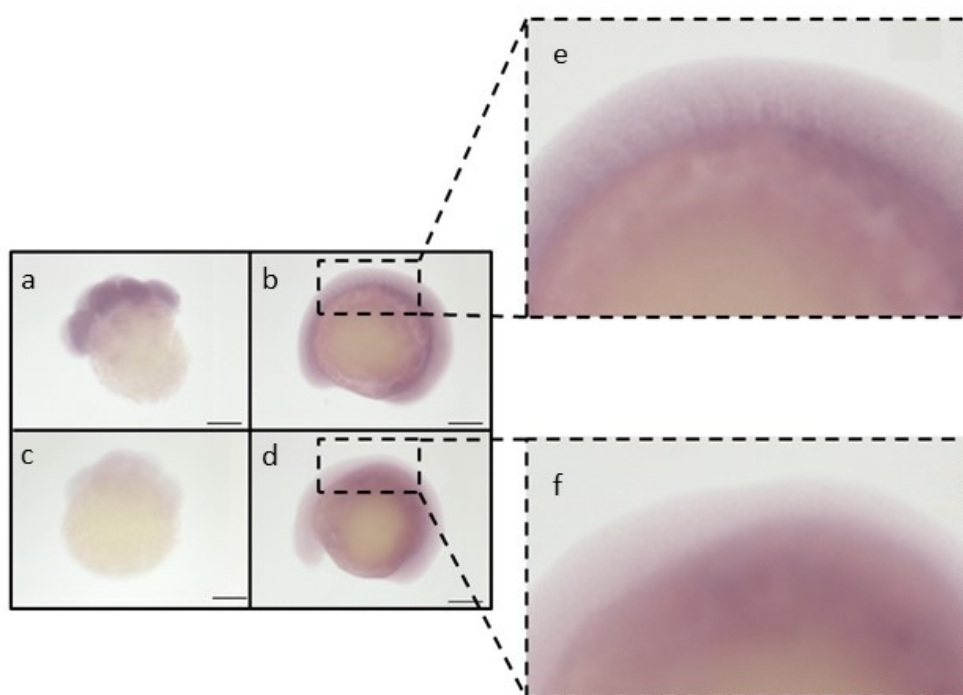


Figura 6. Padrão de expressão do *klc2* por meio de WISH em embriões no estágio de 4 a 8 células (a,c) e embriões no estágio de 15 a 20 somitos (b,d,e,f). As imagens (c) (d) são controle negativo utilizando a sonda senso. *Scale bar* 500 μ m.

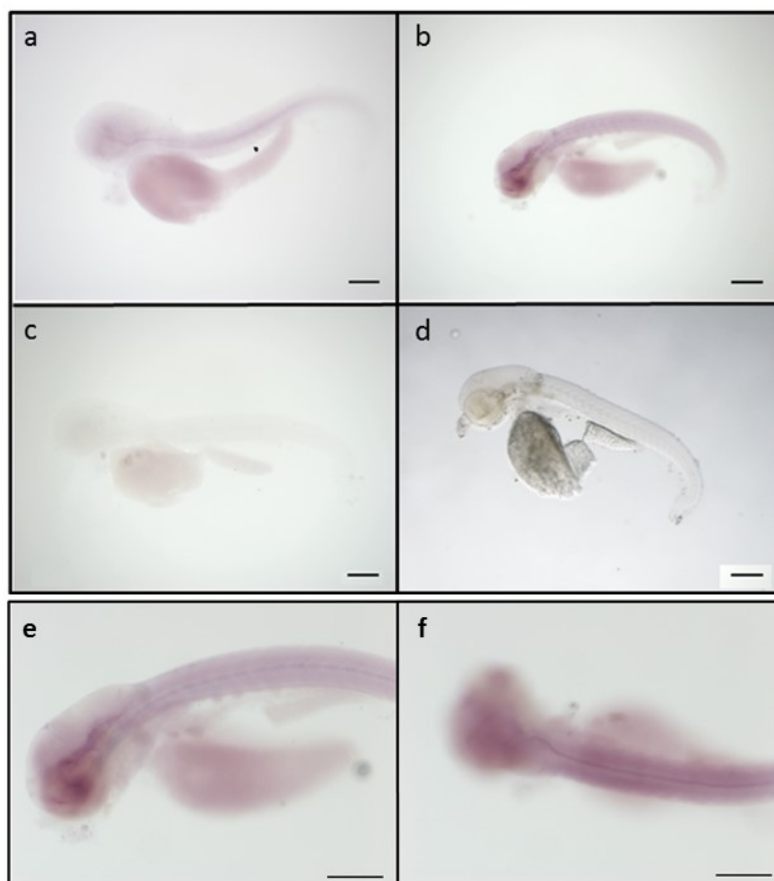


Figura 7. Padrão de expressão do *klc2* por meio de WISH em embriões no estágio de 48-hpf (a,b,c,d) e embriões no estágio de 72-hpf (e,f). As imagens (c) e (d) são controle negativo utilizando a sonda senso em embriões no estágio de 48-hpf. *Scale bar* 500 μ m.

3.4. Ensaios realizados em modelo de camundongo

Ainda dentro do tema da tese de doutorado, sugerimos a realização de outros estudos funcionais visando compreender melhor os mecanismos genéticos e a fisiopatologia da síndrome SPOAN. Durante o período de Março a Dezembro de 2015, foi realizado um estágio do

doutorando no exterior (“doutorado-sanduíche”) no *Lawrence Berkeley National Laboratory*, situado na cidade de Berkeley, Estados Unidos, sob supervisão de Len Pennacchio, Ph.D. Nessa colaboração foi utilizado o camundongo como modelo animal da síndrome SPOAN.

Camundongos transgênicos para o *KLC2* humano foram gerados durante essa colaboração. Estudos de qPCR e qRT-PCR confirmaram a inserção, número de cópias do transgene e a expressão do mRNA do *KLC2* humano nos transgênicos. Estudos de *gene reporter* usando LacZ também foram realizados, nos quais as construções com a região regulatória *wild-type* e a com deleção de 216-pb foram microinjetados em embriões para visualizar o padrão de expressão do LacZ das duas diferentes construções.

3.4.1. Resultados do *gene reporter* LacZ em embriões de camundongos

Camundongos com o *gene reporter* para a região regulatória *wild-type* coletados no estágio de e.15.5

Embriões com a construção do *gene reporter* contendo a região regulatória *wild-type* do *KLC2* humano foram coletados no estágio de e.15.5 para coloração por meio do *gene reporter* LacZ. Nós obtivemos 16 embriões com marcação positiva do *gene reporter*. Nesses embriões positivos, a expressão do LacZ foi levemente detectada nos rins e na coluna espinhal, além de que alguns embriões apresentaram expressão generalizada, ou seja, expressão não bem definida e sem reprodutibilidade (**Figura 8**). Embora tivemos um número significativo de embriões positivos para o LacZ, visto que acima de cinco embriões positivos é considerado válido para caracterizar o padrão de expressão da região regulatória alvo do ensaio, os resultados não foram reprodutíveis, o que nos sugere relatar que estudos utilizando a região regulatória *wild-type* do

KLC2 humano foram inconclusivos para identificar o padrão de expressão espacial do gene *reporter*.

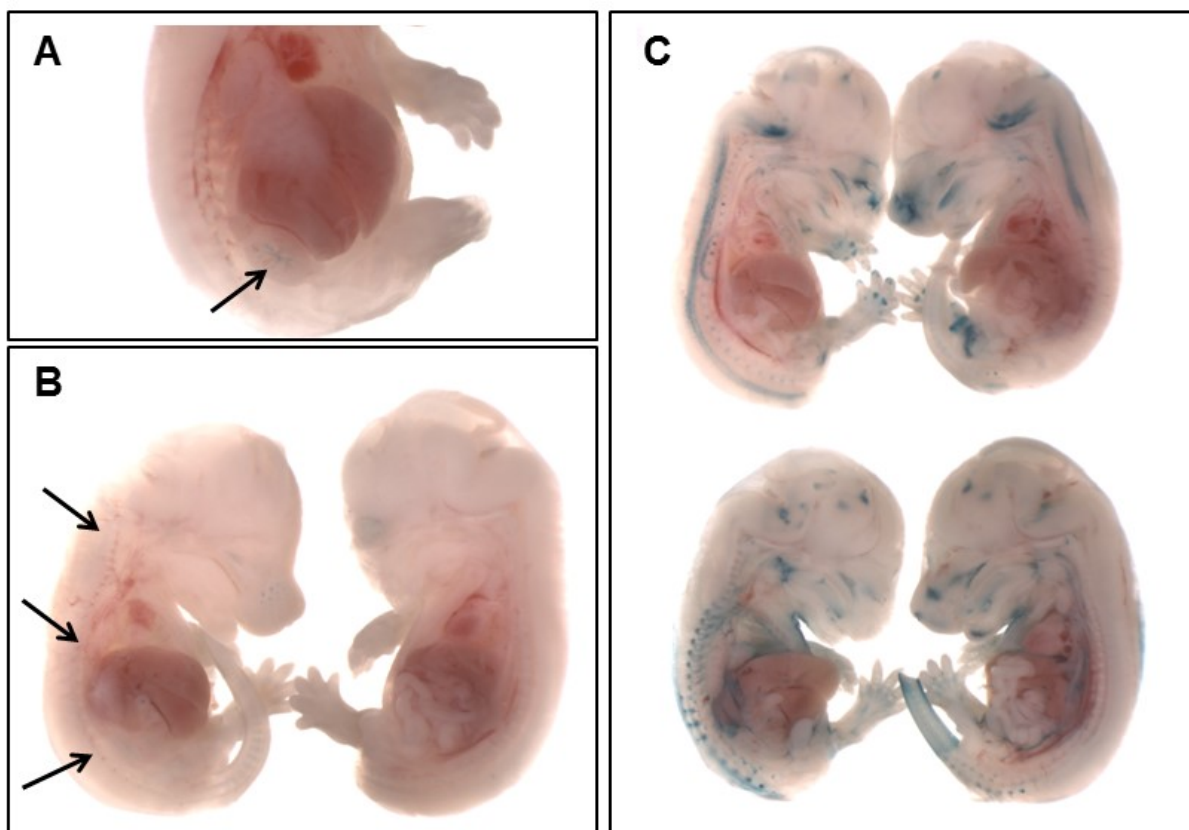


Figura 8. Expressão do LacZ em embriões no estágio e.15.5 usando a construção da região regulatória *wild-type*. (A) Expressão pouco expressiva no rim (n = 9/16). (B) Expressão muito pouco expressiva na espinha (n = 3/16). (C) Expressão generalizada não bem definida (n = 2/16).

Camundongos com o gene *reporter* para a região regulatória com a deleção de 216-pb coletados no estágio de e.15.5

Embriões com a construção do gene *reporter* contendo a região regulatória com a deleção de 216-pb do *KLC2* humano foram coletados no estágio de e.15.5 para coloração por meio do gene *reporter* LacZ. Nós obtivemos oito embriões positivos para o gene *reporter*, sendo a expressão do LacZ detectada no rim, medula espinhal, narinas e expressão generalizada não bem

definida (**Figura 9**). Embora um forte sinal de expressão do LacZ foi detectado na medula espinhal, o que seria relevante em relação ao fenótipo da síndrome SPOAN, os resultados não foram reprodutíveis e nós consideramos o resultado da expressão do gene *reporter* contendo a região regulatória com a deleção de 216-pb inconclusivos.

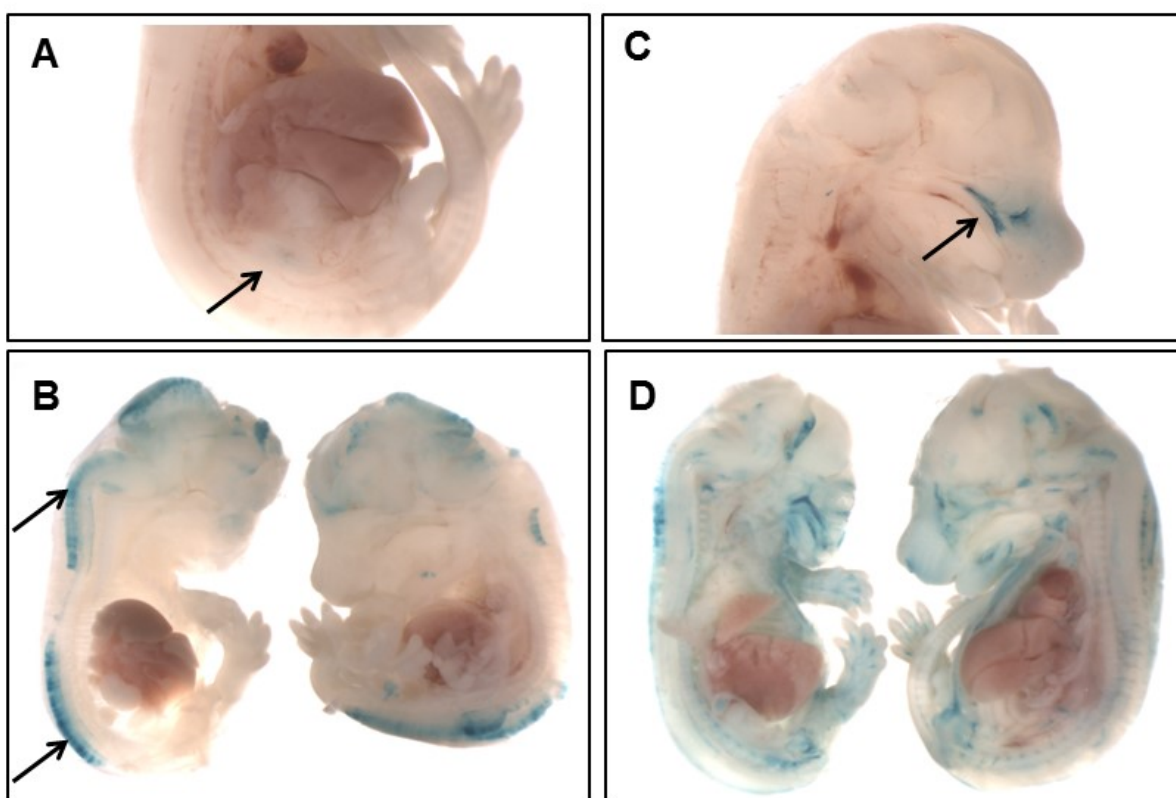


Figura 9. Expressão do LacZ em embriões no estágio e.15.5 usando a construção da região regulatória com a deleção de 216-pb. (A) Expressão com baixa intensidade no rim (n = 3/8). (B) Expressão com alta intensidade na medula espinhal (n = 1/8). (C) Expressão na região nasal (n = 2/8). (D) Expressão generalizada não bem definida (n = 2/8).

3.4.2. Superexpressão do *KLC2* humano em camundongos

Nós geramos camundongos transgênicos que continham o *KLC2* humano inserido no seu genoma por meio de microinjeções pronucleares do Fosmídeo do *KLC2*. Após a microinjeção nós obtivemos sete camundongos transgênicos (n = 7/59, 12%) contendo o *KLC2* humano. O

comprimento da inserção do Fosmídeo do *KLC2* no genoma dos camundongos foi avaliado por meio de PCR usando *primers* para regiões específicas do Fosmídeo (ver **Tabela 4** na seção 2.5.2 de materiais e métodos; **Figura 10**). Os camundongos transgênicos da primeira geração serão chamados a partir de agora de camundongos da geração F0.

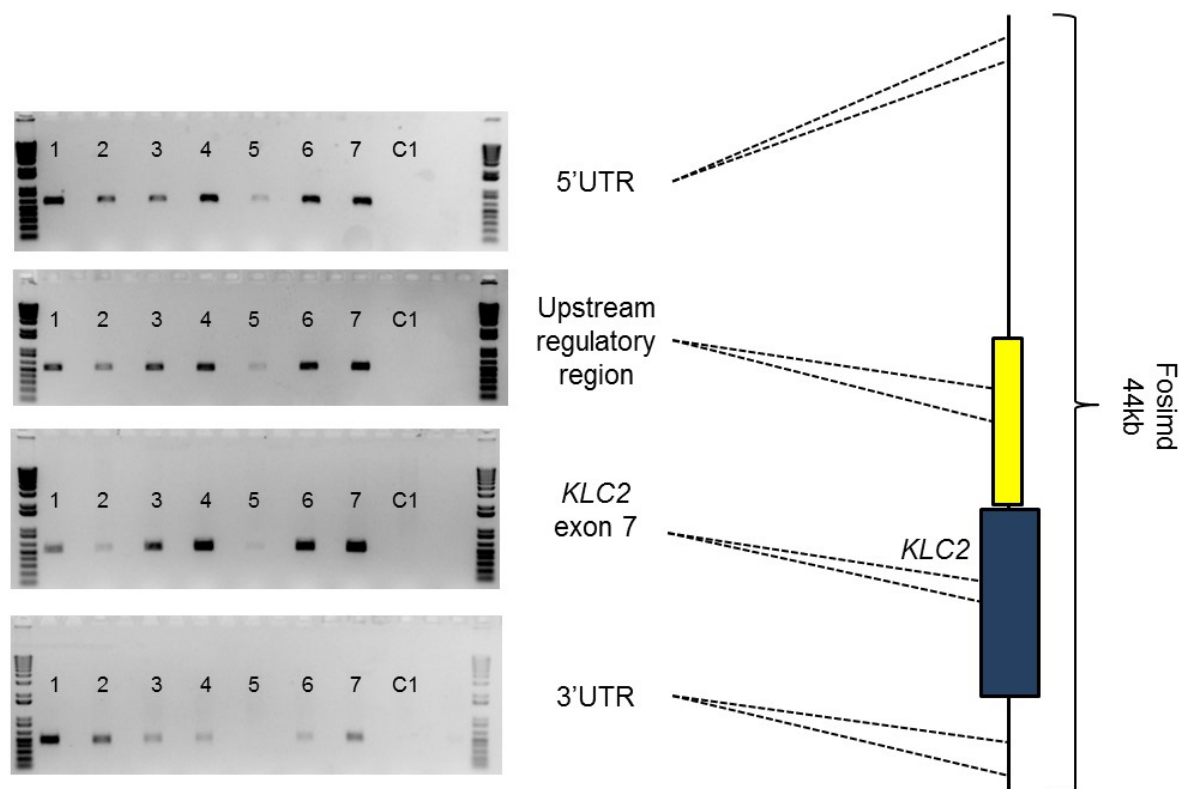


Figura 10. Esquematização da localização dos *amplicons* da PCR no Fosmídeo. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para checar o comprimento do Fosmídeo do *KLC2* inserido no genoma dos camundongos da geração F0. C1 é amostra de camundongo *wild-type* e foi utilizada como controle negativo.

3.4.2.1. Camundongos da geração F0

O DNA de camundongos da geração F0 foi submetido ao qPCR para avaliar o número de cópias do *KLC2* humano no genoma dos camundongos (**Figura 11**). Dos sete camundongos positivos para o transgênico *KLC2*, duas linhagens tiveram baixo número de cópias do transgene

e esses animais foram sacrificados (a linhagem F4193 apresentou de uma a duas cópias e a linhagem B4676 apenas uma cópia do transgene). As cinco linhagens F0 restantes (F4190, B4648, B4652, B4657 e B4680), sendo todas formadas por indivíduos machos, apresentaram entre seis a 20 cópias do *KLC2* humano em seu genoma.

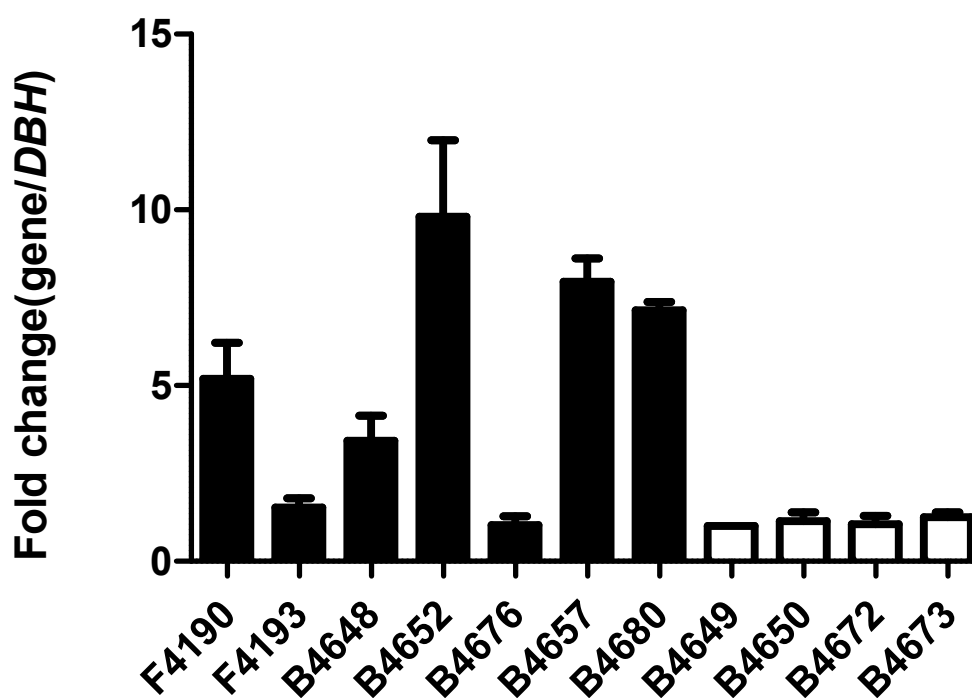


Figura 11. qPCR mostrando o número de cópias do *KLC2* humano inseridos no genoma de camundongos da linhagem F0. Os camundongos positivos para o transgene *KLC2* estão representados por colunas pretas e os camundongos *wild-type* para o transgene estão representados por colunas brancas, pareados por ninhada. A linhagem B4649 é *wild-type* para o transgene e foi usada como calibrador. Cada experimento foi realizado em triplicata e cada amostra de DNA foi replicada duas vezes. As análises da variação do número de cópias foi realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Os cinco camundongos da geração F0 foram avaliados clinicamente durante sete semanas em busca de fenótipos grosseiros associados à neurodegeneração. A principal avaliação foi a perda de peso, o que após 16 semanas de vida não foi detectada nos transgênicos quando

comparados com controles pareados por sexo e ninhada (**Figura 12**). Além disso, após a 16ª semana os camundongos não apresentaram fenótipo que pudesse ser associado à neurodegeneração, tal qual tremores nas patas e deformidade esquelética.

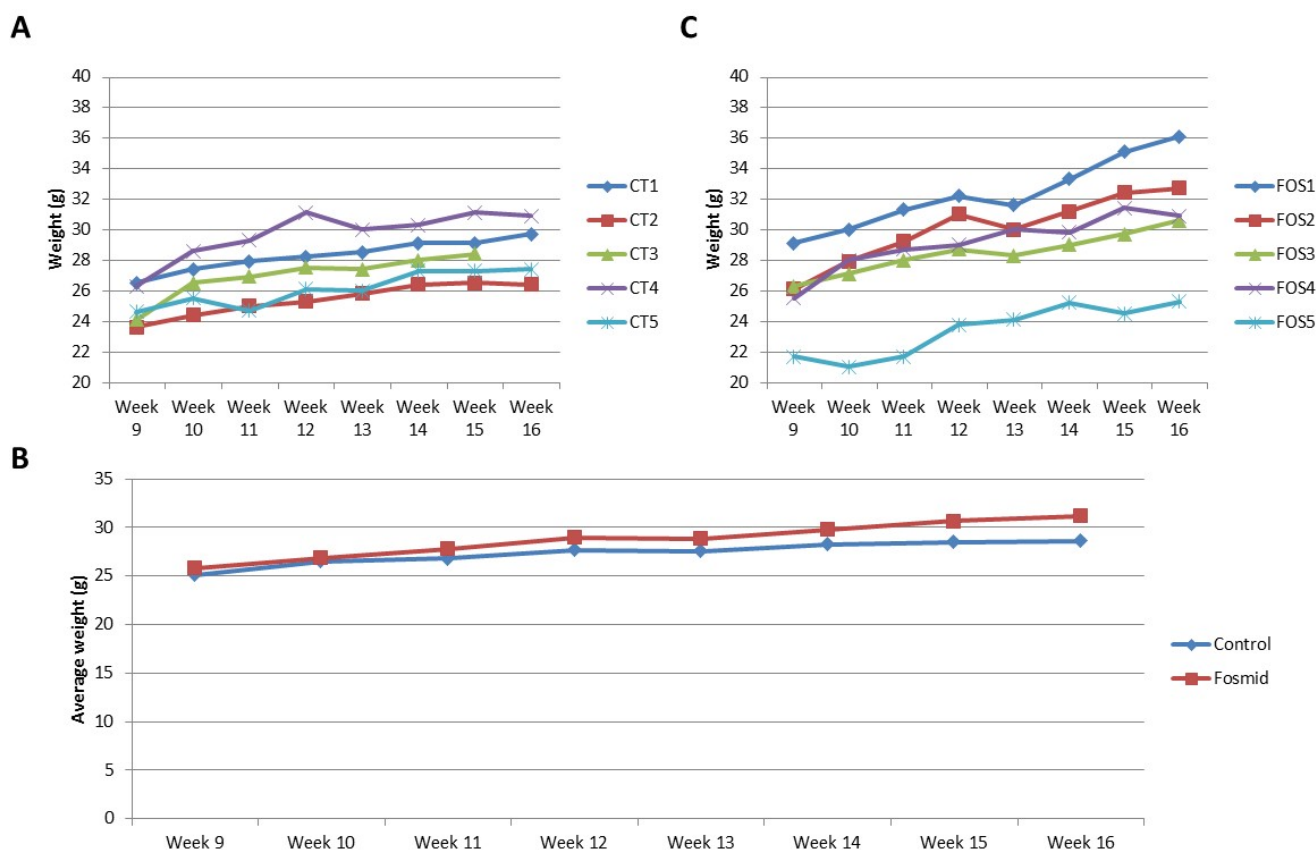


Figura 12. Gráficos mostrando a avaliação do peso dos camundongos transgênicos e controles durante sete semanas. (A) Cinco controles machos *wild-type*. (C) Cinco transgênicos machos. (B) Média de peso dos camundongos transgênicos e *wild-type*.

Nós cruzamos as cinco linhagens de camundongos F0 com fêmeas *wild-type* FVB/N para gerar duas proles de camundongos F1: a primeira ninhada (*first breed*) foi gerada para coletar RNA de tecido cerebral a fim de confirmar a superexpressão do transgene; e a segunda ninhada (*second breed*) para gerar linhagens estáveis para estudos posteriores.

3.4.2.2. Camundongos da geração F1

Os camundongos da geração F1 da primeira ninhada (*first breed*) foram sacrificados 10 dias após o nascimento (P10) e tiveram seus cérebros dissecados para extração de RNA. qRT-PCR usando o cDNA de tecido cerebral mostrou superexpressão do *KLC2* em quatro das cinco linhagens testadas (**Figura 13**). A linhagem B4652 foi considerada mosaico pois não transmitiu o Fosmídeo do *KLC2* para sua descendência (nenhum dos 38 filhotes dessa linhagem foram positivos para o transgene), sendo sacrificada em seguida. Os camundongos F1 da linhagem B4648 mostraram uma relativa baixa expressão do transgene (quatro a seis vezes em comparação com controles) e essa linhagem também foi sacrificada e não incluída em estudos posteriores (**Figura 13B**). Embora os camundongos F1 da linhagem F4190 apresentaram alta expressão do *KLC2* humano (média de ~20 vezes), os camundongos da geração F0 dessa linhagem apresentou baixo número de cópias no experimento de qPCR (**Figura 11**), e por isso não demos continuidade a essa linhagem para demais estudos. No final, selecionamos duas linhagens que apresentaram alto número de cópias do transgene detectado no experimento de qPCR da geração F0 combinado com alta expressão do *KLC2* em camundongos da geração F1 (B4657 e B4680). Essas duas linhagens foram cruzadas com fêmeas *wild-type* para gerar linhagens estáveis da *second breed*.

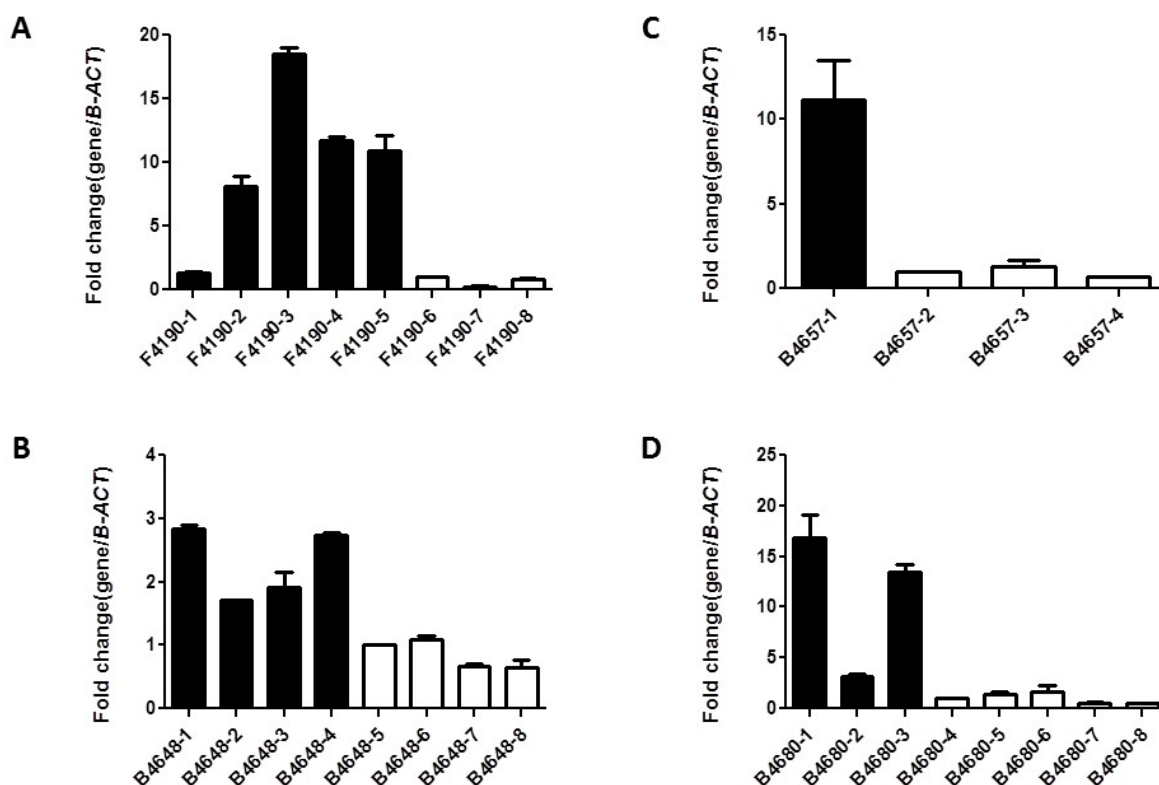


Figura 13. qRT-PCR usando cDNA de cérebro de camundongos transgênicos coletados no estágio de P10 comparados com o mesmo tecido de camundongos *wild-type*, pareados para a mesma ninhada. Os camundongos positivos para o transgene *KLC2* estão representados por colunas pretas e os camundongos *wild-type* para o transgene estão representados por colunas brancas. (A) Os camundongos F1 da linhagem F4190 apresentaram superexpressão do *KLC2*, sendo o gene humano superexpresso em média 20 vezes em comparação com controles. (B) A ninhada F1 da linhagem B4648 apresentou superexpressão do *KLC2* entre quatro a seis vezes quando comparados com controles. (C) Apenas um camundongo F1 do B4657 foi positivo para o transgene e o gene humano apresentou-se ~20 vezes mais expresso em comparação com controles. (D) Camundongos F1 do B4680 apresentaram superexpressão do transgene variando de oito a ~30 vezes em relação aos controles.

As duas linhagens estáveis de camundongos da geração F1 (*second breed*) tiveram suas amostras de DNA submetidas a análise do número de cópias do transgene por meio de qPCR. Da linhagem B4657, nós obtivemos quatro filhotes (C0682, C0683, C0685 e C0684) que

apresentaram aproximadamente 14 cópias do *KLC2* humano em seu genoma (**Figura 14A**). A linhagem B4680 gerou seis filhotes (C0697, C0698, C0699, C0696, B4748 e B4749) apresentando em média 30 a ~40 cópias do Fosmídeo (**Figura 14B**). As duas linhagens F1 foram acompanhadas por oito semanas em busca de fenótipos grosseiros relacionados a doenças neurodegenerativas, porém, até a última semana, os camundongos transgênicos não apresentaram nenhuma característica clínica sugestiva de neurodegeneração.

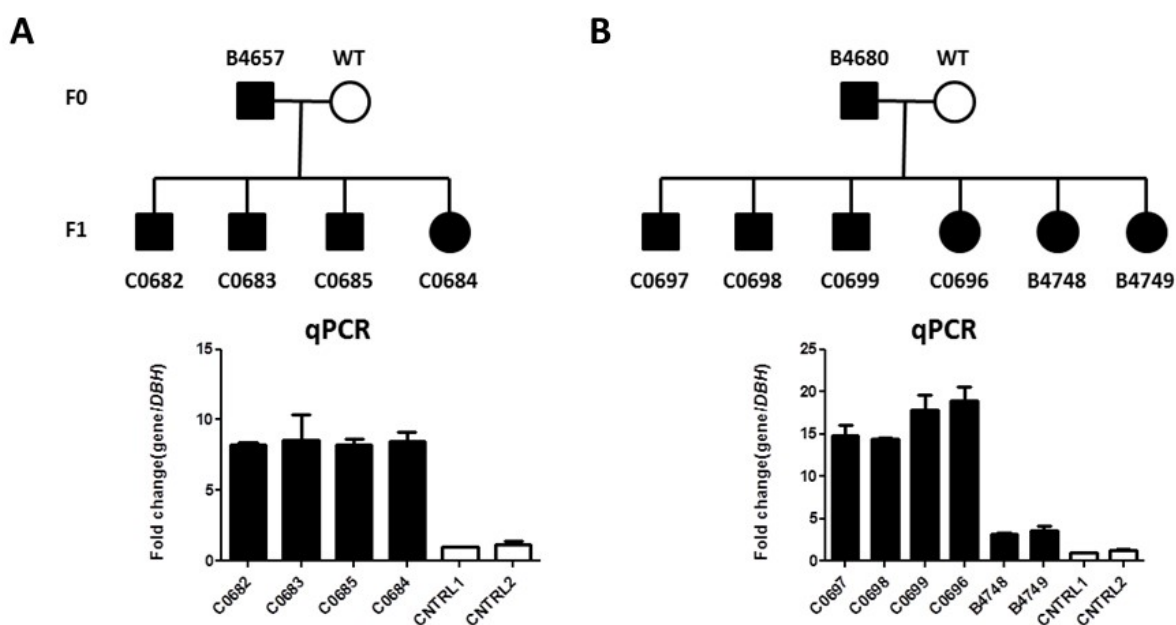


Figura 14. Genealogia dos camundongos e resultado do qPCR mostrando o número de cópias do *KLC2* humano nos camundongos transgênicos da geração F1. Os camundongos positivos para o transgene *KLC2* estão representados por colunas pretas e os camundongos *wild-type* para o transgene estão representados por colunas brancas, pareados por ninhada. (A) Os camundongos F1 da linhagem B4657 apresentaram aproximadamente 14 cópias do transgene cada. (B) Os camundongos F1 da linhagem B4680 apresentaram em média 30 a ~40 cópias do Fosmídeo.

Após não detectarmos nenhuma característica sugestiva de neurodegeneração nos camundongos F1, decidimos então gerar camundongos da geração F2 intercruzando os da F1, a

fim de aumentarmos o número de cópias do transgene e consequentemente aumentar a superexpressão do *KLC2* humano. Dessa forma, poderíamos observar um fenótipo associado à neurodegeneração em um espaço menor de tempo. Para isso, inter cruzamos a fêmea C0684 (da linhagem B4657) com o macho C0697 (da linhagem B4680). Além disso, inter cruzamos os irmãos F1 da linhagem B4680 que apresentaram o maior número de cópias transgênicas (macho C0699 com fêmea C0696). Três camundongos da geração F2 apresentaram aproximadamente 80 cópias do transgene em seu genoma (C1851, C1853 e C1857; **Figura 15**). Esses camundongos foram acompanhados por oito semanas para avaliação de fenótipo grosseiro associado à neurodegeneração, porém, até a última semana de vida eles não apresentaram fenótipo sugestivo e os camundongos foram sacrificados.

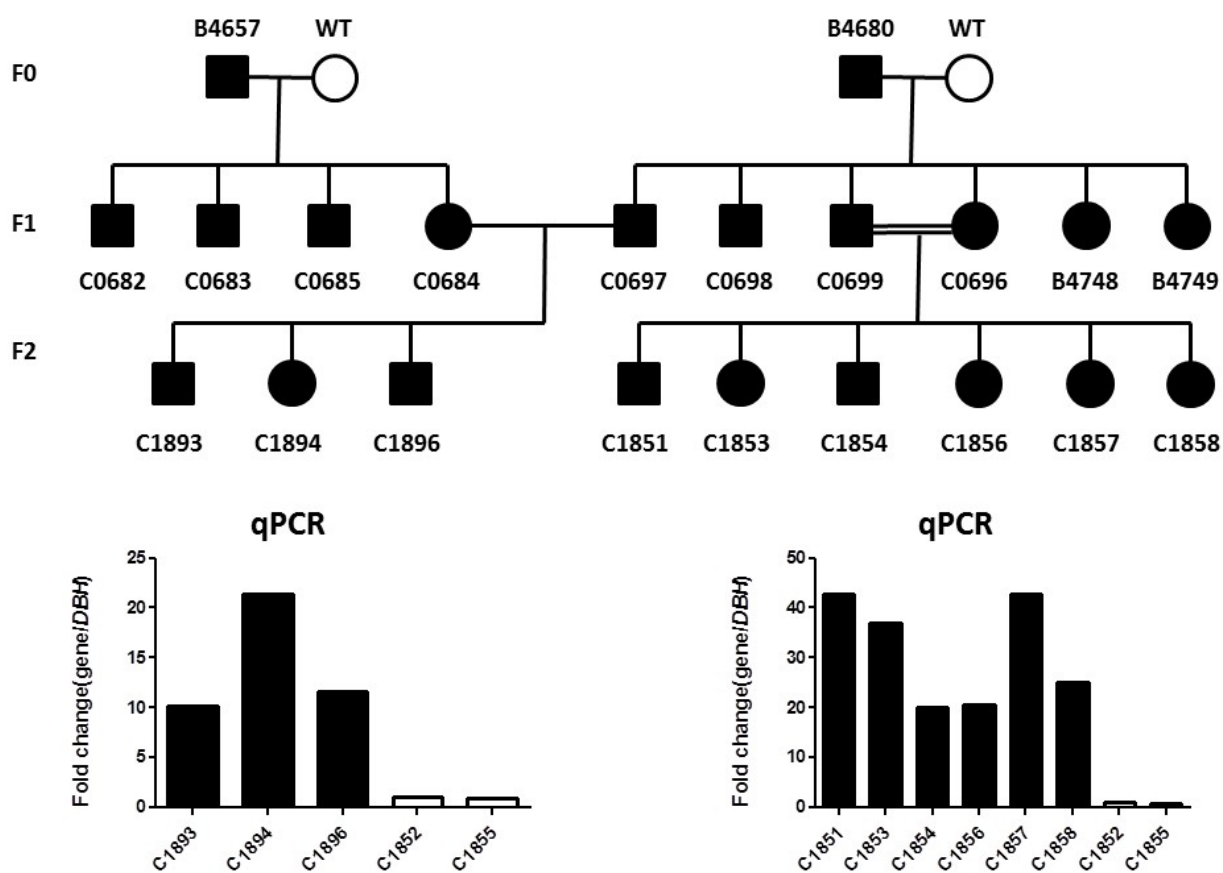


Figura 15. Genealogia simples e qPCR mostrando o número de cópias do *KLC2* humano nos camundongos transgênicos da geração F2. Os camundongos positivos para o transgene *KLC2* estão representados por colunas pretas e os camundongos *wild-type* para o transgene estão representados por colunas brancas, pareados por ninhada. Os camundongos F2 resultantes do cruzamento de duas linhagens diferentes (C0684 com C0697) apresentaram entre 20 a 40 cópias do *KLC2* humano. O intercruzamento da linhagem B4680 (C0699 com C0696) resultou em camundongos com ~80 cópias do Fosmídeo.

Camundongos transgênicos vêm sendo utilizados desde a década de 80 como modelo de doenças neuromusculares e neurodegenerativas (Bulfield *et al.*, 1984). Dentre os principais achados clínicos nos camundongos modelos para as doenças neurodegenerativas estão a diminuição da longevidade, fraqueza muscular, tremores nas patas e deformidade e distrofia esquelética. Esses camundongos apresentam uma grande variação em relação ao início do

surgimento das características sugestivas de neurodegeneração, em alguns casos o aparecimento da condição surge em quatro semanas e em outros em até 20 semanas de vida, como por exemplo em casos mais graves como a perda de função de dois genes simultaneamente (Durbeej & Campbell, 2002). Em alguns outros modelos, o fenótipo de neurodegeneração é observado apenas após de 12 meses de vida do animal (Vainzof et al., 2008). No caso das diferentes linhagens dos nossos camundongos transgênicos, não observamos nenhum fenótipo sugestivo de neurodegeneração nesses animais. O fato de não termos encontrado nenhum fenótipo sugestivo da síndrome SPOAN nesses camundongos pode ser devido ao curto tempo de observação desses animais, visto que foram sacrificados pouco tempo após a maturação sexual (oito semanas). Além disso, ensaios físicos e comportamentais não foram realizados para verificar diferenças sutis nos camundongos transgênicos em relação aos controles normais.

4. Considerações finais e perspectivas futuras

Nesta tese de doutorado foram realizados estudos moleculares da síndrome SPOAN que permitiram identificar o gene e a variante patogênica associada ao fenótipo. Após a descrição da doença em 2005, foram necessários praticamente dez anos para que esta variante patogênica fosse identificada com auxílio de sequenciamento de nova geração. Inicialmente, foi realizado o sequenciamento do exoma e não foi detectada a variante patogênica causadora da síndrome SPOAN, mesmo com o mapeamento da região de ligação associada à síndrome. De fato, a variante patogênica foi encontrada em uma região regulatória do *KCL2* e esta descoberta foi possível apenas com uso do sequenciamento completo do genoma. Esta abordagem ainda é muito pouco utilizada para detecção de variantes patogênicas associadas a doenças genéticas raras, visto que o custo financeiro de execução desse sequenciamento, bem como a dificuldade

para analisar o resultado oriundo desse experimento, ainda não são condições a serem executadas em rotina nos laboratórios brasileiros. Essa metodologia nos permitiu identificar a deleção de 216-pb em homozigose na região regulatória do *KLC2*, deleção essa que segregou em homozigose nos 75 pacientes com a síndrome SPOAN e não foi detectada em duas cópias em controles normais e familiares.

Surpreendentemente, essa deleção que se localiza em região promotora ao invés de causar perda de função do *KLC2* diminuindo sua expressão, causa superexpressão desse gene. Ensaios de qRT-PCR em amostras de fibroblastos e NM, de pacientes em comparação com controles, confirmou essa superexpressão. O mesmo padrão de superexpressão não foi observado usando qRT-PCR em um número maior de amostras de sangue de pacientes, de heterozigotos e de controles familiares, indicando que essa deleção teria apenas função em determinados tipos celulares. Após a validação da superexpressão usando o modelo *in vitro*, decidimos realizar estudos de *knockdown* e de superexpressão do *klc2* em modelo *in vivo* usando o *Danio rerio* (*zebrafish*). Ambos os ensaios revelaram que a desregulação da expressão do *klc2* acarreta em fenótipo sugestivo de neurodegeneração nesse modelo animal. Aqui demonstramos pela primeira vez uma doença de herança autossômica recessiva causada por ganho de função, ou seja, uma deleção em região reguladora do *KLC2* causando a superexpressão desse gene.

Por fim, na tentativa de modelar essa síndrome em modelo murino, geramos linhagens transgênicas com o *KLC2* humano inserido no genoma dos camundongos em diversas cópias. Estudos de qRT-PCR em tecido cerebral de camundongos transgênicos confirmaram a superexpressão do *KLC2*. Infelizmente, não houve tempo hábil para realizar ensaios físicos e comportamentais em camundongos com alta expressão do *KLC2* humano para verificar

características sugestivas de neurodegeneração e validar esse transgênico como modelo para essa doença.

Algumas questões continuam em aberto em relação ao mecanismo molecular de atuação da deleção de 216-pb em homozigose como causadora da síndrome SPOAN: Qual o mecanismo molecular é afetado pela deleção na região regulatória do *KLC2*? Perda de ligação de determinados fatores de transcrição? Ganho de ligação de outros fatores de transcrição na região? Mudança na regulação da cromatina nessa região por meio da mudança molecular das caudas das histonas? Perda de algum repressor que se liga a essa região *wild-type*? Perda ou alteração do padrão de metilação dessa região? Além dessas questões moleculares, porque os heterozigotos não apresentam nenhum fenótipo relacionado a essa síndrome, mesmo os indivíduos mais velhos? Estudos futuros realizando experimentos específicos para responder cada uma dessas questões podem vir a revelar o mecanismo molecular causador da fisiopatologia de neurodegeneração dos neurônios motores da síndrome SPOAN.

5. Referências

- Akhmanova A & Hammer J. (2010). Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr Opin Cell Biol* 22:479-489.
- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-3402.
- Amorim S, Heise C, Santos S, Macedo-Souza L, Zatz M, Kok F. (2014). Nerve conduction studies in spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy (SPOAN) syndrome. *Muscle Nerve*. 49(1):131-3.
- Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, *et al.* (2007) The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *Embo J* 26:1475–1486.
- Audhya A, Desai A, Oegema K. (2007). A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 178(1):43–56.
- Baird F & Bennett C. (2013). Microtubule defects & Neurodegeneration. *J Genet Syndr Gene Ther.* 6;4:203.
- Bayrakli F, Poyrazoglu H, Yuksel S, Yakicier C, Erguner B, Sagiroglu MS, Yuceturk B, Ozer B, Doganay S, *et al.* (2015). Hereditary spastic paraplegia with recessive trait caused by mutation in KLC4 gene. *J Hum Genet.* 60(12):763-8.
- Bian X, Iemm R, Liu T, Zhang M, Sun S, Sui X, Liu X, Rapoport T, Hu J. (2011). Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(10):3976–3981.
- Blackstone C, O’Kane C, Reid E. (2011). Hereditary Spastic Paraplegia: Membrane traffic and the motor pathway. *Nat Rev Neurosci* 12(1):31–42.
- Bloom G, Wagner M, Pfister K, Brady S. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* 27:3409–3416.
- Bracale A, Cesca F, Neubrand V, Newsome T, Way M, *et al.* (2007). Kidins220/ARMS is transported by a kinesin-1-based mechanism likely to be involved in neuronal differentiation. *Mol Biol Cell* 18: 142–152.

- Brickley K & Stephenson F. (2011). Trafficking kinesin protein (TRAK) mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons. *J.Biol.Chem.* 286, 18079–18092.
- Birsa N, Norkett R, Higgs N, Lopez-Domenech G, Kittler J. (2013). Mitochondrial trafficking in neurons and the role of the Miro family of GTPase proteins. *Biochem Soc Trans* 41:1525-1531.
- Bulfield G, Siller W, Wight P, Moore K. (1984). X Chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 1189–1192.
- Butler R, Wood J, Landers J, Cunliffe V. (2010). Genetic and chemical modulation of spastic-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia. *Dis Model Mech* 3(11-12):743-751.
- Caballero Oteyza A, *et al.* (2014). Motor protein mutations cause a new form of hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 3, 2007-2016.
- Cabeza-Arvelaiz Y, Shih L, Hardman N, Asselbergs F, Bilbe G, Schmitz A, White B, Siciliano M, Lachman L. (1993). Cloning and genetic characterization of the human kinesin light-chain (KLC) gene. *DNA Cell Biol* 12(10):881-892.
- Carter A. (2013). Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *J Cell Sci.* 1;126(3):705-13.
- Casari G, *et al.* (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93, 973–983.
- Cho K, Cai Y, Yi H, Yeh A, Aslanukov A, Ferreira P. (2007). Association of the kinesin-binding domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C determines mitochondria localization and function. *Traffic* 8.
- Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6(2):80-92.
- Clemen C, Tangavelou K, Strucksberg K, Just S, Gartner L, Regus-Leidig H, Stumpf M, Reimann J, Coras R, *et al.* (2010). Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases. *Brain* 133(10):2920-2941.

- Collard J, Côté F, Julien J. (1995). Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 4;375(6526):61-4.
- Connell J, Lindon C, Luzio J, Reid E. (2009). Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic* 10(1):42–56.
- D’Andrea L & Regan L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28: 655–662.
- Debray F, Stümpfig C, Vanlander A, Dideberg V, Josse C, Caberg J, Boemer F, Bours V, *et al.* (2015). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene *IBA57* causes fatal infantile leukodystrophy. *J Inher Metab Dis*.38(6):1147-53.
- Diefenbach R, Mackay J, Armati P, Cunningham A. (1998). The C-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry* 37(47):16663–16670.
- Dion P, Daoud H, Rouleau G. (2009). Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nature Rev Genet* 10:769–782.
- Durbeej M & Campbell K. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 349–361.
- Dykstra K, Pokusa J, Suhan J, Lee T. (2010). Yip1A structures the mammalian endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 21(9):1556–1568.
- Ebbing B, *et al.* (2008). Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet* 17:1245–1252.
- Eppig J, Blake J, Bult C, Kadin J, Richardson J, The Mouse Genome Database Group. (2015). The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res.* 28;43:D726-36.
- Ernst J, *et al.* (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 5, 43-49.
- Falzone T, *et al.* (2009). Axonal Stress Kinase Activation and Tau Misbehavior Induced by Kinesin-1 Transport Defects. *J. Neurosci.* 29, 5758.
- Fassier C, Hutt J, Scholpp S, Lumsden A, Giros B, Nothias F, Schneider-Maunoury S, Houart C, Hazan J. (2010). Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat Neurosci* 13(11):1380-1387.

- Fink J. (2006). Hereditary Spastic Paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6(1):65–76.
- Finsterer J, Loscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G. (2012). Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci* 318(1-2):1-18.
- Friedman J & Voeltz G. (2011). The ER in 3D: A multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol* 21(12):709–717.
- Fujita T, Maturana A, Ikuta J, Hamada J, Walchli S, Suzuki T, Sawa H, *et al.* (2007). Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF stimulated PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361(2007)605–610.
- Gan-Or Z, Bouslam N, Birouk N, Lissouba A, Chambers D, Vérièpe J, Androschuk A, Laurent S, *et al.* (2016). Mutations in CAPN1 Cause Autosomal-Recessive Hereditary Spastic Paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2;98(6):1271.
- Gindhart J, Desai C, Beushausen S, Zinn K, Goldstein L. (1998). Kinesin light chains are essential for axonal transport in *Drosophila*. *J Cell Biol* 141: 443–454.
- Glater E, Megeath L, Stowers R, Schwarz T. (2006). Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J.CellBiol.* 173, 545–557.
- Hackney D. (2007). Jump-starting kinesin. *J Cell Biol* 176(1):7–9.
- Halevy A, Lerer I, Cohen R, Kornreich L, Shuper A, Gamliel M, Zimmerman B, Korabi I, Meiner V, Straussberg R, Lossos A. (2014). Novel EXOSC3 mutation causes complicated hereditary spastic paraplegia. *J Neurol.* 261 (11):2165-9.
- Hansen J, *et al.* (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1328–1332.
- Hazan J, Fonknechetten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine Cm Cruaud C, *et al.* (1999). Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 23(3):296–303.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:682-696.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610–638.

- Hurd D & Saxton W. (1996). Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics* 144, 1075–1085.
- Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishiasku S, Tanaka F, Sobue G. (2012). Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci* 13(1):1225–1238.
- Kamal A & Goldstein L. (2002). Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 14: 63–68.
- Kamm C, Boston H, Hewett J, Wilbur J, Corey D, *et al.* (2004) The early onset dystonia protein torsinA interacts with kinesin light chain 1. *J Biol Chem* 279:19882–19892.
- Kimura T, Watanabe H, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J Neurochem* 93: 1371–1382.
- Konecna A, Frischknecht R, Kinter J, Ludwig A, Steuble M, *et al.* (2006) Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol Biol Cell* 17: 3651–3663.
- Koutsopoulos O, Laine D, Osellame L, Chudakov D, Parton R, Frazier E, Ryan M. (2010). Human Mitons associate with mitochondria and induce microtubule-dependent remodeling of mitochondrial networks. *Biochim.Biophys.Acta* 1803, 564–574.
- Lalioti V, Vergarajauregui S, Tsuchiya Y, Hernandez-Tiedra S, Sandoval I. (2009). Daxx functions as a scaffold of a protein assembly constituted by GLUT4, JNK1 and KIF5B. *J Cell Physiol* 218: 416–426.
- Li H & Durbin R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26,589–595.
- Lipka J, Kuijpers M, Jaworski J, Hoogenraad C. (2013). Mutations in cytoplasmic dynein and its regulators cause malformations of cortical development and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 41(6):1605-12.
- Lin P, Li J, Liu Q, Mao F, Li J, Qiu R, Hu H, Song Y, Yang Y, Gao G, Yan C, Yang W, Shao C, Gong Y. (2008). A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42). *Am J Hum Genet* 83(6):752-759.
- Lin M & Sheng Z. (2015). Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp Cell Res.* 2015 15;334(1):35-44.

- Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. (2014). Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol.* 261:518-39.
- Lossos A, Stümpfig C, Stevanin G, Gaussen M, Zimmerman B, Mundwiler E, Asulin M, *et al.* (2015). Fe/S protein assembly gene IBA57 mutation causes hereditary spastic paraplegia. *Neurology.* 17;84(7):659-67.
- Macaskill A, Brickley K, Stephenson F, Kittler J. (2009). GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons. *Mol.Cell.Neurosci.* 40, 301–312.
- Macedo-Souza L, Kok F, Santos S, Amorim S, Starling A, Nishimura A, Lezirovitz K, Lino A, Zatz M. (2005). Spastic paraplegia, Optic Atrophy and Neuropathy (SPOAN Syndrome) is linked to chromosome 11q13. *Annals of Neurology* 57(5):730-737.
- Macedo-Souza L, Kok F, Santos S, Licinio L, Lezirovitz K, Nascimento R., Bueno C, Martyn M, Ekea L, Zatz M. (2009). Spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy: new observations, locus refinement, and exclusion of candidate genes. *Ann Hum Genet* 73(3): 382-387.
- Maeder C, Shen K, Hoogenraad C. (2014). Axon and dendritic trafficking. *Curr Opin Neurobiol.* 27:165-70.
- Mandelkow E & Mandelkow E. (2002) Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol* 12: 585–591.
- Mannan A, Boehm J, Sauter S, Rauber A, Byrne P, Neesen J, Engel W. (2006). Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein. *Neurogenetics* 7(2):93–103.
- Martin E, Yanicostas C, Rastetter A, Naini S, Maoudj A, Kabashi E, Rivaud-Péchoux S, Brice A, Stevanin G, Soussi-Yanicostas N. (2012). Spatacsin and spastizin act in the same pathway required for proper spinal motor neuro axon out growth in zebrafish. *Neurobiol Dis* 48(3):299-308.
- Martin E, Schule R, Smets K, Rastetter A, Boukhris A, Loureiro J, Gonzalez M, Mundwiler E, Deconinck T, Wessner M, Jornea L, *et al.* (2013). Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 92(2):238-244.

- McGuire J, Rong J, Li S, Li X. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* 281: 3552–3559.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, *et al.* (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.*, 20, 1297–1303.
- Melo U, Macedo-Souza L, Figueiredo T, Muotri A, Gleeson J, Coux G, Armas P, Calcaterra N, *et al.* (2015). Overexpression of KLC2 due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome. *Hum Mol Genet.* 2015 15;24(24):6877-85.
- Millecamps S & Julien J. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14(3):161-176.
- Montenegro G, Rebelo A, Connell J, Allison R, Babalini C, D'Aloia M, Montieri P, Schule R, Ishjura H *et al.* (2012). Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J Clin Invest* 122(2):538–544.
- Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K *et al.* (2014). Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid- β accumulation modifier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(7):2638-43.
- Munch C, *et al.* (2005). Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann. Neurol.* 58, 777.
- Nobrega M, Ovcharenko I, Afzal V, Rubin E. (2003). Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science* 302, 413.
- Novarino G, *et al.* (2014). Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* 31, 506-511.
- OMIM. (2016). Online Mendelian Inheritance in Man. World Wide Web URL: <http://www.omim.org> Acesso em Junho de 2016.
- Park S & Blackstone C. (2010). Further assembly required: Construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep* 11(7):515–521.

- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. (2010). Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest* 120(4):1097–1110.
- Pernigo S, Lamprecht A, Steiner R, Doodding M. (2013). Structural basis for kinesin-1: cargo recognition. *Science* 340:356-359.
- Philips T & Rothstein J. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol.* 1;69:5.67.1-5.67.21.
- Pilling A, Horiuchi D, Lively C, Saxton W. (2006). Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol.Biol.Cell* 17, 2057–2068.
- Plagnol V, Curtis J, Epstein M, Mok K, Stebbings E, Grigoriadou S, Wood N, Hambleton S, Burns S, Thrasher A, *et al.* (2012). A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics*, 28, 2747–2754.
- Rahman A, Friedman D, Goldstein L. (1998). Two kinesin light chain genes in mice. Identification and characterization of the encoded proteins. *J Biol Chem* 273(25):15395-15403.
- Rahman A, Kamal A, Roberts E, Goldstein L. (1999). Defective kinesin heavy chain behavior in mouse kinesin light chain mutants. *J Cell Biol* 146:1277–1288.
- Reid E, *et al.* (2002). A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1189-1194.
- Renvoise B & Blackstone C. (2010). Emerging themes of ER organization in the development and maintenance of axons. *Curr Opin Neurobiol* 20(5):531–537.
- Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner T. (2008). Hereditary Spastic Paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 7(12):1127–1138.
- Santos S, Kok F, Weller M, Paiva F, Otto P. (2010). Inbreeding levels in Northeastern Brazil: strategies for the prospection of new genetic disorders. *Genetics and Molecular Biology* 33:1-2.
- Schmittgen T & Livak K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 3, 1101–1108.

- Schule R & Schols L. (2011). Genetics of hereditary spastic paraplegia. *Semin Neurol* 31(5):484–493.
- Sheng Z & Cai Q. (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat.Rev. Neurosci.*13, 77–93.
- Soderblom C & Blackstone C. (2006). Traffic accidents: Molecular genetic insights into the pathogenesis of the hereditary spastic paraplegia. *Pharmacol Ther* 109(1-2):42–56.
- Song Y, Wang M, Mao F, Shao M, Zhao B, Song Z, Shao C, Gong Y. (2013). Knockdown of Pnpla6 protein results in motor neuron defects in zebrafish. *Dis Model Mech* 6(2):404-413.
- Southgate L, Dafou D, Hoyle J, Li N, Kinning E, Critchley P, Nemeth A, Talbot K, *et al.* (2010). Novel SPG11 mutations in Asian kindreds and disruption of spatacsin function in the zebrafish. *Neurogenetics* 11(4):379-389.
- van Spronsen M, Mikhaylova M, Lipka J, Schlager M, van den Heuvel D, *et al.* (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron*77 (2013), 485–502.
- Stevanin G, Ruberg M, Brice A. (2008). Recent advances in the genetics of spastic paraplegias. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8:198–210.
- Stokin G, Lillo C, Falzone T, Bruschi R, Rockenstein E, *et al.* (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307: 1282–1288.
- Stowers R, Megeath L, Górska-Andrzejak J, Meinertzhagen I, Schwarz T. (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. *Neuron* 36, 1063–1077.
- Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Sen Takeda Harada A, Hirokawa A. (1998). Targeted disruption of mouse conventional Kinesin heavy Chain kif5B results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93, 1147–1158.
- Thisse C & Thisse B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3:59-69.
- Thisse B & Thisse C. (2004). Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).
- Trejo H, Lecuona E, Grillo D, Szleifer I, Nekrasova O, Gelfand V, Sznajder J. (2010). Role of kinesin light chain-2 of kinesin-1 in the traffic of Na,K-ATPase-containing vesicles in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 2010 Feb;24(2):374-82.

- Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PC, Martins PC, Lopes VF, Zilberztajn D, Maia LS, Sell K, Yamamoto LU. (2008). Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci* 34(3):241-8. Review.
- Valdmanis P, Meijer I, Reynolds A, Lei A, MacLeod P, Schlesinger D, Zatz M, Reid E, Dion P, Drapeau P, Rouleau G. (2007). Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 80(1):152-161.
- Valenzuela JI, Jaureguierry-Bravo M, Couve A. (2011). Neuronal protein trafficking: Emerging consequences of endoplasmic reticulum dynamics. *Mol Cell Neurosci* 48(4):269–277.
- Verhey K & Hammond J. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 765–777.
- Visel A, Blow M, Li Z, Zhang T, Akiyama J, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, *et al.* (2009). ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 457, 854–858.
- Voeltz G, Rolls M, Rapoport T. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3(10):944–950.
- Voeltz G, Prinz W, Shibata Y, Rist J, Rapoport T. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 124(3):573–586.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. (2010). ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 38, e164.
- Weiner A, Scampoli N, Calcaterra N. (2012). Fishing the molecular bases of Treacher Collins syndrome. *PLoS One* 7(1):e29574.
- Yip Y, Pernigo S, Sanger A, Xu M, Parsons M, Steiner R, Dodding M. (2016). The light chains of kinesin-1 are autoinhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;113(9):2418-23.
- Zanetti G, Pahuja K, Studer S, Shim S, Schekman R. (2012). COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol* 14(1):20–28.
- Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber C, Tukel T, APak M, *et al.* (2001). Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet* 29(3):326–331.
- Zhu P, Soderblom C, Tao-Cheng J, Stadler J, Blackstone C. (2006). SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum Mol Genet* 15(8):1343–1353.

- Zhu H, Lee H, Tong Y, Hong B, Kim K, Shen Y, Lim K, Mackenzie F, Tempel W, Park H. (2012). Crystal structures of the tetratricopeptide repeat domains of kinesin light chains: insight into cargo recognition mechanisms. *PLoS One*. 7(3):e33943.
- Zuchner S, Wang G, Tran-Viet K, Nance M, Gaskell P, Vance J, Ashley-Koch A, Pericak-Vance M. (2006). Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet* 79(2):365–369.