Fernando Janczur Velloso

Expressão de isoformas da proteína do retardo mental
do X frágil (FMRP) e sua regulação

SÃO PAULO

2008

Fernando Janczur Velloso

Expressão de isoformas da proteína do retardo mental
do X frágil (FMRP) e sua regulação

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Mestre em ciências na área de Biologia/Genética

ORIENTADORA: PROF. DRA. LUCIANA AMARAL HADDAD

SÃO PAULO

2008

Aos meus pais, Alcir e Christine

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e confiança

À minha orientadora pelo amadurecimento científico

Às Profas. Angela Vianna Morgante e Regina Célia Mingroni Netto pelo apoio e uso das instalações de seus laboratórios

À Profa. Silvana Chiavegatto pela colaboração no desenvolvimento e análise dos experimentos de PCR em tempo real

À todos os amigos e colegas de bancada pelos momentos científicos e lúdicos, sem os quais este trabalho não seria possível

À FAPESP pelo auxílio financeiro

Ao CNPq pela bolsa de mestrado

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
I. <i>Splicing</i> : ‘corte e emenda’ do transcrito primário de RNA	5
II. <i>Splicing</i> alternativo	14
III. Regulação do <i>splicing</i> alternativo	16
IV. Produtos do <i>splicing</i> alternativo	22
V. <i>Splicing</i> alternativo e diversidade funcional no SNC.....	23
VI. <i>Splicing</i> alternativo do gene do Retardo Mental do X Frágil (<i>FMR1</i>)	25
OBJETIVOS	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
I. <u>Análise por RT-PCR em tempo real dos padrões de expressão das isoformas de Fmr1</u>	36
I.I Animais e obtenção de tecidos	36
I.II Preparo de água DEPC estéril	36
I.III Extração de RNA total	37
I.IV Extração de DNA genômico	37
I.V Sexagem molecular	38
I.VI Quantificação de RNA	38
I.VII Síntese de cDNA	39
I.VIII Teste dos cDNAs	40
I.IX Reação de PCR em tempo real	40
II. <u>Análises <i>in silico</i> para busca de elementos regulatórios</u>	43
III. <u>Clonagem de segmento genômico do Fmr1: Produção de um mini-gene</u>	44
III.I Extração de DNA de leucócitos	44
III.II Amplificação do segmento genômico do éxon 11 ao éxon 12 do Fmr1	44
III.III Purificação do produto de PCR	45
III.IV Adição de Adenosina terminal	46
III.V Clonagem com o sistema TOPO	46
III.VI Triagem das colônias	47
III.VII Extração do plasmídio	47
III.VIII Quantificação do plasmídio	48

III.IX Digestão do plasmídio para averiguar inserto	49
III.X Purificação do inserto para subclonagem.....	49
III.XI Digestão e desfosforilação do vetor de clonagem pcDNA3	49
III.XII Quantificação de vetor e inserto	50
III.XIII Ligaçãõ	51
III.XIV Preparo de células competentes pelo CaCl ₂	51
III.XV Transformação bacteriana por choque térmico	52
III.XVI Triagem das colônias contendo o vetor pcDNA3	52
III.XVII Seqüenciamento do plasmídio	52
III.XVIII Estoque de colônias.....	53
III.XIX Extração de plasmídios.....	54
III.XX Produção das construções contendo deleções	54
<u>Clone gFX11X13Δi12</u>	55
III.XXI Clonagem das construções contendo deleções	56
III.XXII Transfecção em células de rato	56
III.XXIII Análise da expressão das construções	57
RESULTADOS	59
I. <u>Estudo do padrão de expressão do éxon 12 de Fmr1</u>	59
I.I Obtenção das amostras.....	59
I.II. Estudo da expressão por PCR em tempo real.....	63
I.II.I Expressão gênica no córtex	63
I.II.II Expressão gênica no hipocampo.....	64
I.II.III Expressão gênica no cerebelo.....	66
I.II.IV Avaliação geral do estudo da expressão do éxon 12 do Fmr1	67
II. <u>Análises <i>in silico</i> das seqüências genômicas do Fmr1</u>	69
II.I Busca por ESE e ESI no éxon 12.....	70
II.II Busca por ISE e ISS no íntron 11	75
II.III Busca por ISE e ISS no íntron 12	79

III. <u>Estudo da expressão do mini-gene do éxon 12 do Fmr1</u>	83
III.I Obtenção do clone de Fmr1 tipo selvagem	83
III.II Expressão do clone gFX11X13 em células C6: Análise dos produtos de <i>splicing</i>	89
III.III Deleções do clone gFX11X13	93
DISCUSSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapas do processamento do transcrito primário de RNA	4
Figura 2: Mecanismo de <i>splicing</i>	12
Figura 3: Modos de <i>splicing</i> alternativo	15
Figura 4: Definição exônica.....	22
Figura 5: Estrutura do FMR1	28
Figura 6: Alinhamento da família da FMRP	30
Figura 7: Modelo de funções da FMRP	33
Figura 8: Deleção no clone genômico.....	56
Figura 9: Sexagem molecular	60
Figura 10: Dosagem de RNA	61
Figura 11: Teste dos cDNAs e oligonucleotídeos para tempo real	62
Figura 12: Níveis de expressão no córtex	64
Figura 13: Níveis de expressão no hipocampo	65
Figura 14: Níveis de expressão da ciclofilina	66
Figura 15: Níveis de expressão no cerebelo	67
Figura 16: Níveis de inclusão do éxon 12	69
Figura 17: Resultado in silico no éxon 12 humano (<i>Acescan2</i>)	71
Figura 18: Resultado in silico no éxon 12 humano (<i>ASD</i>)	71
Figura 19: Resultado in silico no éxon 12 humano (<i>ESE Finder</i>)	73
Figura 20: Resultado in silico no éxon 12 humano (<i>ESR Search</i>)	74
Figura 21: Resultado in silico no éxon 12 murino (<i>Acescan2</i>)	75
Figura 22: Resultado in silico no íntron 11 humano (<i>Acescan2</i>).....	76
Figura 23: Resultado in silico no íntron 11 humano (<i>ASD</i>)	77
Figura 24: Resultado in silico no íntron 11 murino (<i>Acescan2</i>).....	78
Figura 25: Resultado in silico no íntron 11 de rato (<i>ASD</i>).....	79
Figura 26: Resultado in silico no íntron 12 humano (<i>Acescan2</i>).....	80

Figura 27: Resultado in silico no íntron 12 humano (<i>ASD</i>)	81
Figura 28: Resultado in silico no íntron 12 murino (<i>Acscan2</i>).....	82
Figura 29: Resultado in silico no íntron 12 murino (<i>ASD</i>)	83
Figura 30: Representação esquemática do mini-gene	84
Figura 31: Amplificação genômica	85
Figura 32: Clonagem no vetor TOPO.....	86
Figura 33: Clonagem no vetor pcDNA3.1.....	88
Figura 34: Sequenciamento do clone gFX11X13	89
Figura 35: Expressão do clone gFX11X13.....	91
Figura 36: Expressão superexpressa e endógena do clone gFX11X13	92
Figura 37: Clonagem de gFX11X13 Δ i12	93
Figura 38: Sequenciamento do clone gFX11X13 Δ i12	94
Figura 39: Expressão do clone gFX11X13 Δ i12	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:Reguladores em <i>trans</i> do <i>splicing</i>	20
Tabela 2: Isoformas da FMRP	29
Tabela 3: Etapas para criação do clone mutante	55

RESUMO

Entre as modificações sofridas pelo transcrito primário de RNA de eucariontes, o *splicing* é responsável pela colocação lado a lado das sequências expressas alinhando a região codificadora no RNAm. Este mecanismo, descrito na década de 1970, como o responsável pela remoção dos íntrons e junção dos éxons consecutivos, é efetuado por um complexo ribonucleoprotéico conhecido como spliceossomo. O reconhecimento por este complexo dos segmentos definidos como éxons e íntrons depende de diversas sequências presentes no RNA e reconhecidas por ligantes protéicos. A modulação desta interação resulta na geração de diferentes transcritos maduros a partir de um mesmo gene, evento conhecido como *splicing* alternativo, comum a maioria dos genes humanos e um dos grandes responsáveis pela geração de variabilidade proteômica dos eucariotos e sua complexidade morfo-fisiológica. O *splicing* alternativo é um importante gerador de diversidade funcional no sistema nervoso central, onde participa da geração de variantes para mais de 80% dos genes. Entre estes está o gene do Retardo Mental do X Frágil (*FMR1*), cujo transcrito primário pode sofrer *splicing* alternativo de quatro éxons, produzindo até vinte isoformas diferentes da FMRP. Os objetivos gerais deste projeto foram (i) a análise da expressão do éxon 12 do *Fmr1* em córtex cerebral frontal, hipocampo e cerebelo de ratos em E19 e P2; e (ii) a busca por elementos *cis* reguladores do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1* de rato.

Para averiguar os níveis da expressão do éxon 12 do *Fmr1*, no final do período embrionário e início do pós-natal de rato, foi realizada RT-PCR em tempo real com os tecidos citados acima, em E19 e P2. Observamos significativa inclusão do éxon 12 nos transcritos do *Fmr1* no córtex frontal em P2 quando comparado a E19, o que não se relacionou ao aumento geral da expressão do *Fmr1*. No hipocampo, houve aumento da expressão do conjunto de mensagens do *Fmr1* e tendência à exclusão do éxon 12 em P2, quando comparado a E19. Estes dados revelam o córtex cerebral como fonte de proteínas ativadoras do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1* e onde se deve buscar pela relevância funcional das isoformas da FMRP expressando este éxon.

A busca por elementos reguladores do *splicing* do éxon 12 se baseiou na avaliação da expressão por RT-PCR de mini-gene de segmento genômico do gene *Fmr1* usado para transfectar células C6 (glioma de rato). Estas células demonstraram inclusão preferencial do éxon 12 em seus transcritos superexpressos. Um segundo clone foi gerado com uma deleção a partir do clone original, na região 5' do íntron 12, na qual observamos *in silico*, elementos ricos em U e C, candidatos a acentuadores da inclusão do éxon 12. A superexpressão deste clone em C6 revelou exclusão preferencial do éxon 12, um padrão invertido em relação ao anteriormente observado. Estes dados indicam o elemento rico em U e C como um forte candidato a acentuar a inclusão do éxon 12 no RNAm do *Fmr1*.

N. A., Nota do autor: Devido a facilidade do uso "*splicing*" foi mantido no original em inglês.

ABSTRACT

Splicing is an important hnRNA processing mechanism in eukaryotes, aligning exons in the mRNA. First described in the 1970's, it is performed by a molecular complex named spliceosome, which recognizes RNA sequences in the boundaries between exons and introns. Interaction modulation in the spliceosome results in mature transcripts with varying sizes, a process known as alternative splicing, common to most human genes and the major mechanism leading to proteomic diversity and morphological and functional complexity in eukaryotes. Alternative splicing is very important in generating functional diversity in the central nervous system (CNS), where it takes part in more than 80% of primary transcript processing. Among these is the *Fragile Mental Retardation 1* gene (*FMR1*), which undergoes alternative splicing of four exons creating the possibility of 20 non-redundant FMRP isoforms. The aims of this project were (i) to analyze the expression of rat *Fmr1* exon 12 in frontal cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum at E19 and P2 days; and (ii) to search for cis-acting elements regulating exon 12 splicing.

We performed real-time RT-PCR to examine *Fmr1* exon 12 expression, in the above-mentioned CNS structures, between the end of embryonic period and the second postnatal day. We observed significant inclusion of exon 12 in *Fmr1* mRNA in frontal cortex at P2 as compared to E19, which was unrelated to general *Fmr1* expression increase. At P2 hippocampus there was a significant increase at the expression levels of *Fmr1*, and a trend to exclude exon 12 from the primary transcript. This data indicates that cerebral cortex is an important source of proteins activating exon 12 splicing, and also a tissue where the functional relevance of FMRP isoforms expressing exon 12 should be regarded.

We adopted the mini-gene approach to search for cis elements regulating *Fmr1* exon 12 splicing. RT-PCR was performed to evaluate C6 (rat glioma) cells overexpressing a clone containing a genomic *Fmr1* segment. Transfected cells revealed preferential inclusion of *Fmr1* exon 12. A deletion construct lacking the initial bases of intron 12 was generated. The deleted segment harbor U- and C-rich sequences that had been identified *in silico* in a search for intronic splicing enhancers. Overexpression of the deletion construct in C6 yielded to preferential exclusion of exon 12, as opposed to the expression pattern previously observed in the original clone. Therefore, the U- and C-rich elements at *Fmr1* intron 12 are strong candidates to enhance *Fmr1* exon 12 splicing.

INTRODUÇÃO

A arquitetura celular de procariontes é bastante distinta da de eucariontes. Enquanto a célula de um procarionte possui apenas um compartimento onde todos os processos celulares ocorrem, a célula eucarionte tem diversas organelas que compartimentalizam muitas reações em seu interior. Esta diferença é importante para a expressão gênica, uma vez que em procariontes os ribossomos iniciam a tradução do ácido ribonucléico (RNA) mensageiro (RNAm) logo que o ácido desoxirribonucléico (DNA) é transcrito pela polimerase e, em eucariontes, estes processos são separados entre o núcleo e o citoplasma. No núcleo eucarionte, a transcrição é seguida pelo processamento do RNA e a tradução ocorrerá após o transporte desta molécula madura para o citoplasma. O processamento do RNA é composto por diversas etapas. Inicialmente uma guanina é adicionada ao nucleotídeo 5' do RNA nascente, criando uma ligação 5'-5' com ponte tri-fosfato, seguida da metilação da guanosina, que recebe o nome de *cap*. Outra característica particular em eucariontes é a presença em seus genes de sequências transcritas não codificadoras que são removidas do transcrito primário do RNA pelo processo denominado *splicing*. No RNAm eucarionte em processamento, ocorre ainda a poliadenilação, em que há clivagem da região 3' à qual será posteriormente adicionada uma sequência de adeninas (A) conhecida como cauda poli-A (Fig. 1, Alberts, 2002).

O *splicing* referido acima é o processamento de uma só molécula de RNA, denominado *splicing* em *cis*, por diferir do *splicing* em *trans*, no qual transcritos de origens diferentes sofrem ligação, e do *auto-splicing* (*self-splicing*) de íntrons de genes de organelas ou de RNA transportador (RNAt) ou ribossomal (RNAr) de raras espécies. Referimo-nos aqui somente ao *splicing* em *cis*, que foi abreviado como *splicing*, e é tido hoje como um mecanismo-chave na regulação da expressão gênica de eucariontes (N.A.). O que se conhece deste processamento do transcrito primário de RNA foi elucidado nas últimas três décadas.

Figura 1: Etapas do processamento do transcrito primário de RNA. Inicialmente o RNA recém transcrito recebe uma guanina modificada, o capuz, em sua extremidade 5'. O transcrito então sofre *splicing*, no qual os íntrons são removidos e os éxons unidos na ordem original. Na sua porção 3' o RNA possui um sítio de clivagem e poliadenilação no qual a molécula será clivada para a adição da cauda de poli-A.

I. *Splicing*: ‘corte e emenda’ do transcrito primário de RNA

Em 1977, mapeamentos de restrição nos genes da Ovoalbumina de galinha, Globina beta de coelho e cadeia leve de Imunoglobulina murino mostraram que estas sequências de DNA possuíam segmentos intragênicos ausentes em seus transcritos (Brack & Tonegawa, 1977; Breathnach *et al.*, 1977; Doel *et al.*, 1977; Jeffreys & Flavell, 1977). Estas observações foram comprovadas para estes e genes virais, com sondas intragênicas de DNA que não demonstraram capacidade de hibridar com o RNA expresso pelo respectivo gene (Aloni *et al.*, 1977). Outros autores observaram, ao microscópio eletrônico, alças em hibridações de DNA de fita simples e RNA mensageiro do gene *Hexon* de adenovírus e de Imunoglobulina murina. Estes dados evidenciaram que segmentos contíguos no RNA estavam interrompidos no DNA (Berget *et al.*, 1977; Brack e Tonegawa, 1977; Dunn e Hassell, 1977).

Em 1978, já se dispunha de evidências sobre interrupções em mais de uma dezena de genes e sobre o padrão de conservação das posições dessas sequências intercaladas entre genes ortólogos e parálogos (Jeffreys e Favell, 1977; Strair *et al.*, 1977; Lawn *et al.*, 1978; van den Berg *et al.*, 1978). O cístron, uma correspondência linear entre uma sequência gênica e uma polipeptídica, não era mais um modelo único. Gilbert (1978) cunhou o termo íntron para sequência intragênica, que se diferenciava da sequência gênica, expressa, que foi denominada éxon. Blake (1979) definiu íntrons como sequências intercaladas. O modelo de Gilbert (1978) propunha o gene eucarionte como um mosaico de sequências expressas, em uma matriz intrônica, silenciosa, e sugeria que éxons teriam agido como aceleradores evolutivos, criando diversidade protéica em novas proteínas, ao utilizar blocos de proteínas já existentes. Na época, observava-se que o tamanho dos íntrons era variável e geralmente maior do que o segmento expresso e vislumbrava-se que o conjunto intrônico deveria exceder em cinco a dez vezes o tamanho do conjunto exônico de um genoma (Gilbert, 1978). Alguns dados disponíveis sobre sequências gênicas e peptídicas por elas codificadas levaram Blake (1978 e 1979) a sugerir que éxons individuais poderiam definir

pequenas unidades peptídicas funcionais, domínios ou dobramentos da cadeia peptídica.

Modelos foram propostos em 1977 para explicar a formação de um RNAm linear a partir de sequências transcritas de um gene interrompido (Sambrook, 1977). Esses incluíam (i) saltos pela polimerase de RNA entre sequências gênicas expressas, mas interrompidas; (ii) recombinação de DNA, criando arranjos lineares, de sequências expressas, contíguas, que serviriam de molde para a polimerase de RNA; (iii) transcrição independente para cada segmento expresso pelo mesmo gene, seguida de ligação dos transcritos e formação de um só RNAm; ou (iv) existência de um transcrito precursor que, por clivagem e ligação de fragmentos, geraria uma forma mais curta de RNAm. A maioria dos pesquisadores concordava na alta probabilidade de o mecanismo envolver a ligação de segmentos de ácido nucléico, tendo então sido denominado *splicing* (Berget *et al.*, 1977; Crick, 1979). Um desafio era descobrir se haveria um mecanismo universal.

Em 1979, Murray e Holliday propuseram um mecanismo de *splicing* baseado na existência de um precursor de RNA, então chamado pré-RNAm, que foi concebido como o RNA heterogêneo nuclear (hnRNA), como discutido por Williamson (1977) e demonstrado em núcleos de várias espécies de eucariontes em mais de dez anos que se antecederam (Soeiro *et al.*, 1966). No modelo de Murray e Holliday, haveria hibridação entre o hnRNA e um tipo de RNA pequeno, que eles definiram como ‘RNA mediador de *splicing*’ (do inglês, *splicer RNA*).

A hipótese de que haveria RNAs, que não o próprio pré-RNAm, que mediaría o *splicing* no núcleo foi corroborada por Lerner e cols. (1980) e Rogers e Wall (1980). No final da década de 1960, tinha-se identificado RNAs, em gradientes de sacarose de núcleo de células hepáticas, que sedimentavam entre 4S e 7S (coeficiente de Svedberg), como um pico bem distinto dos picos de RNAr e seus precursores. Análise cromatográfica desses RNAs demonstrou haver uma fração de 4S a 6S, rica em uridina e diferente do RNAr 5S (Muramatsu *et al.*, 1966; Weinberg *et al.*, 1967; Hodnett

e Busch, 1968; Nakamura *et al.*, 1968), que foi posteriormente denominada por Weinberg e Penman (1968) como RNAs nucleares pequenos (snRNA, do inglês, *small nuclear RNA*) contendo entre 90 e 220 bases. Entre 1979 e 1980, os snRNAs foram identificados como integrantes de complexos ribonucleoprotéicos mediadores do *splicing*, através de imunoprecipitação com soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, cujos auto-anticorpos eram dirigidos a esses RNAs (Lerner e Steitz, 1979; Lerner *et al.*, 1980). Lerner e Steitz (1979) mostraram também que os snRNAs co-imunoprecitavam com proteínas, sugerindo a existência de um complexo, como havia sido proposto por Raj e cols. (1975) após Enger e Walters (1970) revelarem que snRNAs podem sedimentar em complexos de até 30 S. Mais tarde, demonstrou-se que o soro de pacientes inibia o *splicing in vitro* (Yang *et al.*, 1981; Padgett *et al.*, 1983).

Catterall e cols. (1978) relataram que as junções entre éxons e íntrons continham sequências curtas com similaridades intra- e intergênicas, que deveriam sinalizar onde ocorreria o *splicing*, o mesmo sendo observado para os limites entre íntrons e éxons. Estas similaridades iam além das bases conservadas nas extremidades 5' e 3' intrônicas, respectivamente GT e AG. Rogers e Wall (1980) revelaram que a junção éxon-intrônica e, sobretudo, a região 5' intrônica alinhava-se por complementaridade com parte da sequência do snRNA U1, ao contrário dos demais snRNAs U2, U4, U5 e U6 cujas funções ainda eram desconhecidas. Embora Rogers e Wall (1980) tenham inferido que a extremidade 3' intrônica teria também potencial para se alinhar com o snRNA U1, Oshima e cols. (1981) indicaram maior potencial de complementaridade entre o snRNA U2 e sequências exônicas e sugeriram que esta se estenderia à extremidade 3' intrônica. Análises mutacionais confirmaram ser o snRNA U2 responsável pelo reconhecimento do sítio 3' intrônico ou receptor de *splicing* (Parker *et al.*, 1987). Estes dados individualizaram a complementaridade de snRNAs em relação aos sítios intrônicos do hnRNA e sugeriam papéis independentes para U1 e U2.

As unidades peptídicas integrantes dos complexos snRNPs começaram a ser caracterizadas individualmente a partir dos estudos de Raj e cols. (1975) através de cromatografia de extratos nucleares, e de Lerner e cols. (1980) com imunoprecipitações usando soros anti-snRNA. Algumas evidências apontavam para um conjunto protéico comum para as snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6. No entanto, Kinlaw e cols. (1982) demonstraram haver polipeptídios únicos a cada um desses snRNPs, além de outros em comum. Embora as análises iniciais, até o começo da década de 1980, estimassem em poucas dezenas o número de polipeptídios integrantes de snRNPs (Raj *et al.*, 1975; Stevenin *et al.*, 1977; Howard, 1978; Lerner e Steitz, 1979; Lerner *et al.*, 1980; Pederson e Davis, 1980; Kinlaw *et al.*, 1982, 1983; Bringmann *et al.*, 1983; Hintenberger *et al.*, 1983; Sri-Widada *et al.*, 1983; Bringmann e Luhrmann, 1986), mais de 150 peptídios diferentes já foram até hoje identificados nesses complexos (Zhou *et al.*, 2002; revisto por Schellenberg *et al.*, 2008).

Um avanço fundamental ao entendimento do mecanismo de *splicing* foi o desenvolvimento de protocolos para realização de *splicing in vitro* em extratos nucleares (Blanchard *et al.*, 1978; Green *et al.*, 1983; Hernandez e Keller, 1983; Padgett *et al.*, 1983; Goldenberg, 1984; Krainer *et al.*, 1984). Com esta estratégia, o uso de RNase e a análise de intermediários de RNA no processo, identificou-se que o *splicing* é um mecanismo realizado em duas etapas. Inicialmente, há clivagem no sítio intrônico a 5' (Grabowski *et al.*, 1984; Ruskin *et al.*, 1984), seguida de ligação do fosfato na extremidade 5' a uma adenosina intrônica, interna (Konarska *et al.*, 1985). Este componente intermediário no processo de *splicing* foi descrito como um RNA com estrutura em laço (do inglês, *lariat*), que contém um único nucleotídeo no ponto de ramificação e migra mais rapidamente em géis de acrilamida submetidos à eletroforese, dada sua natureza circular (Grabowski *et al.*, 1984; Padgett *et al.*, 1984; Ruskin *et al.*, 1984). Konarska e cols. (1985) caracterizaram mais amplamente o intermediário de *lariat*, demonstrando que a adenosina do ponto de ramificação, por uma ligação fosfodiéster convencional, 3'-5', liga-se à base seguinte e, de forma não

convencional, 2'-5', à base na extremidade 5' intrônica; e que este ponto de ramificação está, na sequência de adenovírus utilizada no ensaio, a 24 bases da extremidade 3', intrônica.

Após a formação do intermediário de *lariat* e antes da conclusão do *splicing in vitro*, observava-se uma eficiente recuperação do produto final, o RNAm. Isto sugeria que os segmentos de RNA permaneciam ligados a um complexo molecular durante o *splicing* e não eram degradados. Partículas de 40S e 60S com capacidade de realizar *splicing in vitro* foram isoladas de gradientes de glicerol de extratos nucleares, respectivamente de levedura e células HeLa, e designadas corpúsculo de *splicing* (do inglês, *splicing body* ou *spliceosome*; Grabowski *et al.*, 1985; Brody e Abelson, 1985; Frendewey e Keller, 1985).

A primeira reação do *splicing* foi elucidada com a participação dos snRNPs U1 e U2. Demonstrou-se posteriormente que a atuação dos snRNAs U4 e U6 era essencial ao *splicing* mas independente de U1 e U2 (Berget e Robberson, 1986; Black e Steitz, 1986). Outros estudos revelaram que U4 e U6 têm uma extensa região de complementaridade que permite a formação de um complexo snRNP U4-U6 (Guthrie e Patterson, 1988), que se liga a snRNP U5, e é este complexo de três partes que se associará ao complexo denominado A, em que se encontram os snRNPs U1 e U2 ligados respectivamente aos sítios doador e receptor de *splicing*, com o íntron do hnRNA em forma de arco (Konarska e Sharp, 1987). A reunião em complexo dos cinco snRNPs culmina na formação do spliceossomo propriamente dito (complexo B). Rearranjos internos por maior afinidade entre novos membros do grande complexo alteram sua conformação o que permite acontecer a primeira reação do *splicing* – a formação do intermediário de *lariat*. A segunda reação do *splicing* não mais depende do snRNP U1, é conseqüente à primeira e consiste de união dos éxons consecutivos com liberação do *lariat* e separação das subunidades do spliceossomo (Konarska e Sharp, 1987).

Apesar da grande complexidade e diversidade protéica do corpúsculo do *splicing*, duas proteínas foram evidenciadas por sua importância para hibridação dos snRNAs U1 e U2 respectivamente aos sítios doador e receptor de *splicing*. O fator auxiliar de U2 (U2AF) é composto por duas subunidades, uma de 35 kDa (U2AF35) e outra de 65 kDa (U2AF65) que reconhecem respectivamente o sítio receptor de *splicing* e o trato de poli-pirimidina (Ruskin *et al.*, 1988; Zamore e Green, 1990). A especificidade para a interação de U2AF35 ao sítio receptor de *splicing* foi posteriormente consolidada por experimentos em várias espécies e demonstrou-se ser dependente do dinucleotídeo AG, o que explica a incerteza do reconhecimento pelo snRNA U2 anteriormente levantada (Merendino *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Zorio e Blumenthal, 1999). O fator de *splicing* 1 (SF1), identificado por Krainer e Maniatis (1985), foi revelado como uma proteína que coopera com U2AF para identificação do ponto de ramificação (Kramer e Utans, 1991; Berglund *et al.*, 1997; Berglund *et al.*, 1998). A sequência da atuação dos vários snRNPs foi posteriormente definida por abordagens experimentais semelhantes às descritas.

A necessidade de um spliceossomo extenso constituído por diversos elementos reside na distância entre os sítios de *splicing* no íntron e na especificidade destes e sequências adjacentes (Fig. 2A), uma vez que as reações em si são relativamente simples. Como visto, a reação do *splicing* é realizada por centros catalíticos nas ribonucleoproteínas e é constituída por duas trans-esterificações, em que a ligação covalente entre uma hidroxila e um grupo fosfato é transferida diretamente de um nucleotídeo para outro em um único passo, não ocorrendo, portanto, clivagem e ligação, como se propôs. Na primeira trans-esterificação, mediada por U2 e U6, a hidroxila livre na posição 2' da adenosina invariável do ponto de ramificação, ataca o grupo fosfato da base na extremidade 5' do íntron, criando uma ligação fosfodiéster não convencional, 2'-5', que coloca o íntron em forma de laço. Como consequência, uma alteração na interação entre as snRNPs, principalmente U5, altera a estrutura secundária do RNA, aproximando os éxons que são unidos na segunda reação de

transesterificação em que a hidroxila do último nucleotídeo livre do éxon a 5', que foi liberado na primeira reação, ataca o grupo fosfato do primeiro nucleotídeo do éxon adjacente na região do sítio receptor (Fig. 2). Esta reação liga éxons consecutivos, liberando o íntron ainda na forma de laço que será posteriormente degradado. Desta forma, a reação de um spliceossomo em cada íntron do gene resultará em uma molécula de RNAm constituída pelos segmentos exônicos na ordem em que estes se apresentavam na sequência genômica (Padgett *et al*, 1986).

Figura 2: **(A)** Representação da estrutura de um íntron eucarionte mostrando as principais sequências conservadas e as frequências de seus respectivos nucleotídeos em vertebrados. O mecanismo através do qual as unidades constituintes do spliceossomo realizam o *splicing* está relacionado diretamente com a estrutura do íntron. Nas sequências dos íntrons existem segmentos conservados com cerca de cinco nucleotídeos, dos quais os mais importantes se encontram na periferia, nas fronteiras entre éxons e íntrons, sendo respectivamente o doador a 5' (A/C A G **G U** Pu A G U em vertebrados) e aceitor a 3' (C **A G** G em vertebrados). Dentro destes consensos a maioria das bases não apresenta grande conservação entre os grupos de eucariontes, no entanto, os dinucleotídeos mais extremos no íntron, guanina e uracila a 5' e adenina e guanina a 3' (representados em negrito), estão presentes em quase todos os íntrons. Outros elementos conservados estão localizados na região terminal do íntron, a cerca de 50 bases de seu término, sendo um consenso denominado ponto de ramificação (C U Pu **A** Py), com baixa conservação com exceção de uma adenosina invariável (representada em negrito), e um segmento de extensão variável, com cerca de 10 bases, composta por pirimidinas, denominado trato de polipirimidinas.

(B) Modelo da interação das unidades integrantes do spliceossomo com o íntron eucarionte. As ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) interagem com os sítios conservados por emparelhamento de bases. A snRNP U1 reconhece o sítio doador a 5' do íntron, enquanto o fator protéico SF1 interage com o ponto de ramificação. A proteína acessória de U2 (U2af), possui duas subunidades, sendo uma de 65KDa e uma de 35KDa, que interagem respectivamente com a trato de polipirimidinas e com o sítio aceitor de *splicing* a 3' do íntron. Recrutado por U2af U2 se liga ao ponto de ramificação deslocando SF1.

(C) Emparelhamento de bases entre os snRNAs U1 e U2 respectivamente no sítio doador e ponto de ramificação no íntron.

(D) Esquema das alterações conformacionais causados pelo spliceossomo (U1, U2, U4, U5 e U6) sobre o transcrito primário, aproximando os sítios envolvidos nas duas reações de transesterificação que levam ao *splicing*. Inicialmente a primeira guanina do íntron é ligada a adenosina do ponto de ramificação, fazendo com que o íntron assuma a forma de laço, e posteriormente os éxons consecutivos são unidos, liberando o íntron.

(E) Representação das duas reações de transesterificações que são responsáveis pela excisão do íntron durante o *splicing*. Na primeira transesterificação a hidroxila 2' livre da adenosina do ponto de ramificação ataca o grupo fosfato da guanina inicial do íntron. Na segunda reação a hidroxila 3' da última base do éxon 1 ataca o grupo fosfato 5' no início do éxon 2, unindo os éxons adjacentes.

II. *Splicing* alternativo

Em 1980, cDNA codificador para imunoglobulinas com distribuições subcelulares distintas, sendo uma secretada e outra integrada à membrana celular, foram clonados. A análise das sequências das moléculas de RNAm responsáveis pela síntese destas duas isoformas mostrou perfeita identidade, exceto em suas regiões 3'. A comparação destes com sequências genômicas apontou que os dois RNAs deveriam ser produzidos a partir de um mesmo gene e que as diferenças entre eles seriam decorrentes da utilização de diferentes combinações de éxons na região terminal. A inclusão de um ou outro éxon determinaria os códons para domínios responsáveis pela localização diferencial das duas isoformas de imunoglobulinas. Foi interessante observar que esses éxons eram excludentes, isto é, a inclusão de um excluía o outro. Este mecanismo de *splicing* regulado foi considerado uma alternativa de *splicing* com éxons mutuamente excludentes (Alt *et al*, 1980; Early *et al*, 1980).

Em 1981, observou-se que a sequência genômica do gene do hormônio de crescimento humano tinha um íntron em sua extremidade 3' com duas possibilidades para sítios receptores de *splicing*. Experimentos de Northern blotting com sonda de cDNA revelaram duas formas de *splicing* deste íntron do hnRNA do gene do hormônio de crescimento humano, sendo que em uma delas haveria encurtamento exônico. Este relacionava-se a um aumento da sequência intrônica excluída. Tratava-se de sítios receptores alternativos de *splicing* (DeNoto *et al*, 1981). Da mesma forma, sítios doadores alternativos de *splicing* foram identificados, na época, no gene Ddc de *Drosophila* (Morgan *et al*, 1986). Um mecanismo menos comum de *splicing* alternativo é a retenção intrônica e não será discutido aqui (Fig. 3).

A partir dessas descrições, exemplos de genes que produziam mais de uma variante de RNA mensageiro foram inicialmente apresentados na família das imunoglobulinas e depois estendidos a outros genes. Definiu-se o termo *splicing* alternativo para explicar as alternativas de utilização regulada dos sítios de *splicing*, definindo inclusão ou exclusão total ou parcial de éxons e gerando variantes para a

sequência final do RNA mensageiro, originadas de um mesmo gene. Esta variabilidade, se localizada na região codificadora do RNAm, leva à síntese de formas variantes da mesma proteína, denominadas isoformas, por analogia ao conceito de isoenzimas, definido por Markert e Moller (1959), como formas moleculares diferentes nas quais proteínas podem existir sem diferir na especificidade enzimática. Embora se assumisse que o *splicing* alternativo fosse funcional, a ocorrência estimada deste evento do processamento do hnRNA era em torno de 5% para o genoma humano por na década de 1990 (Hanke *et al*, 1999).

Figura 3: Modos de *splicing* alternativo. Sítios alternativos no íntron a 5' (doador) ou a 3' (aceptor) levam a criação de éxons com extensões variáveis no transcrito final. Éxons cassete por sua vez tem sua sequência completa incluída ou excluída do RNAm. A retenção intrônica consiste na permanência da sequência completa de um íntron no transcrito maduro. Fonte: Lee & Black, 2007.

O entendimento do *splicing* alternativo teve grande contribuição de projetos de sequenciamento de genomas. O projeto Genoma Humano permitiu a criação de bancos de dados, desenvolvimento tecnológico e a disponibilização pública de sequências que possibilitaram a expansão do foco dos estudos genômicos para uma escala global e também transcricional. Duas iniciativas de sequenciamento, sendo uma pública e uma privada, apresentaram paralelamente seus resultados preliminares em 2001, com cerca de 90% do genoma humano publicado (Lander *et al*, 2001; Venter *et al*, 2001), e uma versão finalizada três anos mais tarde com uma precisão de 99,99% (IHGSC, 2004). Este projeto gerou grandes contribuições para a compreensão da estrutura e funcionamento do genoma humano. Entre elas, observou-se que das cerca de 2,85 bilhões de bases, apenas 1.2% correspondia a sequências expressas, constituindo cerca de 22.000 genes.

A estimativa do número de genes humanos menor do que anteriormente previsto deixou claro que a complexidade dos organismos, principalmente entre os grupos mais derivados de eucariontes, não podia ser explicada unicamente pela sua quantidade de genes, mas provavelmente por processos de regulação gênica refinados (Antequera & Bird, 1993; Ewing & Green, 2000; Lander *et al*, 2000; Roest-Crollius *et al*, 2000; Dunham, 2001; IHGSC, 2004). A partir desta impressão, intensificou-se a busca por mecanismos de regulação nestes organismos que pudessem explicar sua variabilidade proteômica. Diversos, como sítios alternativos de poliadenilação e códons alternativos de início e término de tradução alternativos foram estudados. Juntos estes mecanismos possibilitam que o proteoma desses organismos tenha uma variabilidade uma ordem de grandeza maior do que seu genoma, sendo que entre estes mecanismos, o *splicing* alternativo é considerado o mais prevalente (Fields, 2001).

III. Regulação do *splicing* alternativo

Estudos funcionais têm buscado compreender como se dá a regulação fina do *splicing* alternativo e se as diferenças de frequência deste processo, entre as

espécies, tem relevância funcional. Uma observação importante dos estudos genômicos é que os sítios de *splicing* nas espécies mais derivadas podem apresentar sequências menos similares aos consensos, conferindo flexibilidade à sua interação com o spliceossomo. Estas diferenças podem ser percebidas pela comparação de sequências dos sítios de *splicing* entre os íntrons de leveduras e mamíferos. No primeiro grupo, há um índice relativamente baixo de genes com íntrons e, nestes, os sítios são altamente conservados, interagindo fortemente com as unidades do spliceossomo, sendo pouco susceptíveis a alterações no padrão de *splicing*. Em mamíferos, há relativa degeneração dos sítios de *splicing* em relação à sequência-consenso, o que repercute na interação destes com o spliceossomo. Fatores que vêm sendo observados influenciando a fidelidade na escolha do sítio de *splicing* ou o fortalecimento de sítios de *splicing* degenerados incluem: o tamanho do éxon, a estrutura secundária do RNA nascente, a processividade da polimerase de RNA e sequências acessórias, transcritas (Ast, 2004).

As sequências acessórias são fatores importantes nos eventos de *splicing* regulado. Elas são transcritas, sendo, por isso, consideradas elementos em *cis*. São curtas, compostas por menos de dez bases, degeneradas dentro da classe, altamente variáveis e podem ter repetições internas degeneradas ou serem ricas em purinas na sequência do RNA (Blencowe, 2006). Estes elementos regulatórios, em *cis*, foram observados inicialmente em estudos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* buscando por mutações que alteravam a interação com o spliceossomo (Newman, 1987). No ano seguinte foram identificados elementos em íntrons humanos que analogamente podiam inibir a ligação dos elementos do spliceossomo aos sítios de *splicing* (Furdon & Koe, 1988). Mais tarde, foram descritos diferentes elementos exônicos, ricos em purinas, que possuíam a capacidade de acentuar ou inibir a inclusão do éxon no RNA maduro (Sun *et al*, 1993). Elementos ricos em guanina em íntrons foram posteriormente identificados como acentuadores (do inglês, *enhancer*) da reação de *splicing*. Estes estudos mostraram que estes elementos em *cis* podiam

estar presentes tanto em sequências de éxons quanto em íntrons, influenciando o *splicing* de diferentes maneiras, a grandes distâncias e de forma aparentemente independente da posição relativa a seu alvo, sendo categorizados em quatro classes: os acentuadores exônicos do *splicing* (ESE, do inglês, *exonic splicing enhancer*), os silenciadores exônicos do *splicing* (ESS, do inglês, *exonic splicing silencer*), os acentuadores intrônicos do *splicing* (ISE, do inglês, *intronic splicing enhancer*) e os silenciadores intrônicos do *splicing* (ISS, do inglês, *intronic splicing silencer*, Blencowe, 2006).

Foi proposto que a atuação destas sequências acessórias sobre a decisão de utilização de sítios de *splicing* deveria ocorrer por intermédio de elementos protéicos, o que era já sugerido em estudos de deleção (Newman, 1987; Cooper & Ordahl, 1989). Estes fatores protéicos são elementos em *trans* que interagem especificamente com os elementos em *cis* no RNA e com elementos da maquinaria de *splicing*. Os elementos em *trans* foram identificados, a partir de 1988, no *splicing* constitutivo (Schenkel *et al*, 1988; Spector *et al*, 1991; Ge *et al*, 1991). A interação direta de um elemento em *trans* ao elemento em *cis* e ao spliceossomo só foi demonstrada posteriormente (Sun *et al*, 1993). Nos últimos quinze anos, foi possível classificar diversos fatores em *trans* de acordo com as estruturas primária a quaternária dessas proteínas e as sequências de RNA às quais elas se ligam (Tabela 1). Cada nova identificação de associação entre elementos em *cis* e em *trans* depende de estudos experimentais trabalhosos, dirigidos ao éxon específico de um gene em particular e desenvolvidos através de estratégias experimentais que se iniciam pela clonagem de mini-genes e sua expressão em células de eucariontes, e continuam com análises de mutagênese, interação RNA-proteína e estudos funcionais de *splicing in vitro* para demonstrar a relevância biológica da interação (Cooper, 2005).

Os fatores em *trans* têm pelo menos um domínio de interação ao RNA e domínio(s) de interação protéica, através do(s) qual(is) eles interagem com componentes do spliceossomo (revisto por Blencowe, 2006). Esta relação entre elementos em *cis* e em

trans foi observada inicialmente nos ESEs, reconhecidos especificamente por proteínas da família SR (rica em serina e arginina, S e R, respectivamente). As proteínas desta extensa família possuem em comum um domínio de ligação ao RNA do tipo RRM (do inglês, *RNA recognition motif*) através do qual interagem com o elemento em *cis*, e um domínio RS, rico em repetições de arginina (R) e serina (S), que promove a interação da proteína com o spliceossomo. Uma consequência da interação entre ESEs, proteínas SR e o spliceossomo é a intensificação da afinidade do emparelhamento RNA:RNA, favorecendo o *splicing* naquele sítio.

A identificação de ESEs em vários éxons, em estudos sobre o *splicing* constitutivo, demonstrou a importância das proteínas SR neste processo, e levou à criação do conceito de 'definição exônica' (Fig. 4), em que a distinção entre éxon e íntron não depende apenas das sequências de *splicing* conservadas nos íntrons, mas também da presença das sequências acentuadoras nos éxons. Este conceito é aplicado principalmente a mamíferos onde este fenômeno é observado devido a característica degenerada de seus sítios de *splicing*, ao contrário de leveduras, em que o processo de *splicing* não é dependente das proteínas SR dada a alta conservação de seus sítios que garante a afinidade pelas snRNPs do spliceossomo (revisto por Black, 2003). As proteínas SR interagem com o domínio C-terminal da polimerase II de RNA, que é regulado por fosforilação ao início da transcrição gênica. Outras proteínas que participam do processamento do hnRNA também se associam a este domínio, possibilitando o recrutamento das maquinarias do processamento, que ocorre de forma co-transcricional no transcrito nascente (Bentley, 1999).

	Nome	Outros nomes	Domínios	Sítios de ligação
Proteínas SR e relacionadas a SR	SRp20	Sfrs3, X16	RRM, RS	GCUCCUCUUC
	9G8	Sfrs7	RRM, RS, C2HC Znf	(GAC)n
	ASF/SF2	Sfrs1	RRM, RS	RGAAGAAC
	SC35	Sfrs2	RRM, RS	UGCUGUU
	SRp30c	Sfrs9	RRM, RS	CUGGAUU
	SRp38	Fusip1, Nssr	RRM, RS	ACAAAGACAA
	SRp40	Sfrs5, HRS	RRM, RS	AGGAGAAGGGA
	SRp55	Sfrs6	RRM, RS	GGCAGCACCUG
	SRp75	Sfrs4	RRM, RS	GAAGGA
	Tra2 α	Tra2a	RRM, RS	GAAARGARR
	Tra2 β	Sfrs10	RRM, RS	(GAA)n
	SRm160	Srm1	RS, PWI	AUGAAGAGGA
	SWAP	Sfrs8	RS, SWAP	ND
Proteínas hnRNP	hnRNP A1	Hnrnpa1	RRM, RGG	UAGGGA/U
	hnRNP A2/B1	Hnrnpa2b1, Hnrnpa2	RRM, RGG	(UUAGGG)n
	hnRNP C	Hnrnpc, Hnrnpc1/c2	RRM	U-rich
	hnRNP F	Hnrpf	RRM, RGG, GY	GGGA, G-rich
	hnRNP G	Rbmxt, Hnrmpg	RRM, RGG, SRGY	AAGU
	hnRNP H	Hnrph1	RRM, RGG, GYR, GY	GGGA, G-rich
	hnRNP L	Hnrnpl	RRM	C/A-rich
	PTB	Ptbp1, Hnrpi	RRM	UCUU, CUCUCU
	nPTB	Ptbp2, brPTB	RRM	CUCUCU
Outros fatores	Fox1	A2bp1	RRM	(U)GCAUG
	Fox2	Rbm9	RRM	(U)GCAUG
	Cugbp	Cugbp1, Brunol2	RRM	U/G-rich
	Cugbp2	ETR-3, Brunol3	RRM	U/G-rich
	Celf4	Brunol4	RRM	U/G-rich
	HuD	Elavl4	RRM	U-rich
	Nova-1	Nova1	KH	YCAY
	Nova-2	Nova2	KH	YCAY
	TIA1	mTia1	RRM	U-rich
	TIAR	Tia1, mTIAR	RRM	U-rich
	Mbnl1	Mbnl	C3H1 Znf	YGCU(U/G)Y
	Slm-2	Khdrbs3, T-STAR	KH	UAAA
	Quaking	Qk, Qkl	KH	ACUAAY[...]UAAY
	PSF	Sfpq	RRM	ND
	SPF45	Rbm17	RRM, G patch	ND
	Rbm4	Rbm4a, Lark	RRM, C2HC Znf	C/U-rich
	Sf3b1	SAP155, SF3b155	RRM, HEAT	ND
	Sam68	Khdrbs1	KH	A/U-rich

Tabela 1: Tabela exibindo proteínas com função reconhecida de regulador em *trans* do *splicing*. As proteínas estão organizadas por família protéica com domínios principais e sítios de ligação ao RNA representados. Modificada de Gabut *et al*, 2008.

Os silenciadores exônicos, ESS, por sua vez, são reconhecidos por ribonucleoproteínas nucleares, heterogêneas (hnRNPs), dentre as quais, a hnRNP A1 é a mais estudada. Esta proteína possui domínios de ligação ao RNA do tipo RNP-cs, através dos quais ela interage com a sequência exônica, mais exatamente com o ESS. Age como antagonista de proteínas SR, como as SF2/ASF, participando da 'definição exônica'. Se há preponderância de sua ação sobre a de proteínas SR, há exclusão deste éxon no transcrito maduro.

Os elementos em *cis* que agem como acentuadores intrônicos do *splicing* podem se localizar adjacentes ou até a algumas centenas de bases do sítio de *splicing* sobre o qual agem. ISEs são reconhecidos por diferentes proteínas, entre as mais comuns encontram-se a TIA1 (*TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein*) e CELF (do inglês, *CUG-binding protein and ETR-like factors*). TIA associa-se a regiões ricas em uracila, e reforça a ligação de snRNPs U1 aos respectivos sítios, favorecendo o *splicing* (Forch *et al*, 2000). Desta forma, os íntrons, como os éxons, podem ser definidos pelo conjunto de proteínas a eles associado.

Os silenciadores intrônicos de *splicing*, ISS, são reconhecidos tanto por proteínas da família SR quanto pela hnRNP A1. Se próximo ao ponto de ramificação, pode haver ligação do ISS às proteínas SR levando, nesta posição, à inibição do *splicing*. A ligação de ISSs à hnRNP A1 antagoniza elementos de *splicing* U2 (Tange *et al*, 2001). Como se observa, a ação de fatores em *trans* na regulação do *splicing* depende da posição, em relação ao transcrito, do elemento em *cis* a ele ligado. Além disso, elementos em *cis* e em *trans*, intrônicos e exônicos de regulação de *splicing* agem concomitantemente durante um evento de *splicing*, e é o efeito combinatório deles e o spliceossomo que irá determinar o produto final deste processamento co-transcricional (Black, 2003). O efeito combinatório do *splicing* dependerá certamente de mecanismos regulatórios da atividade dos fatores em *trans* ainda não bem compreendidos.

genoma, e em tecidos altamente especializados como o sistema nervoso central (SNC).

A atuação do *splicing* alternativo como regulador da expressão gênica é evidenciada pelas funções exercidas pelas variantes criadas neste processo. Estas variantes de RNAm podem ser traduzidas, dando origem a isoformas protéicas com funções ou distribuições subcelulares distintas, como corroborado por evidências de conservação de eventos de *splicing* em eucariontes e de que o *splicing* alternativo acarreta mais comumente modificações em fragmentos codificadores do RNAm (Wen *et al*, 2004). Os dados de similaridade de sequências, principalmente entre os mamíferos, sugerem que pelo menos 25% das variantes geradas por *splicing* alternativo resultem em isoformas com ganho funcional (Sorek *et al*, 2004). Há uma tendência atual a estimar esta frequência bem acima destes valores.

As variantes de RNA podem ainda conter códons de parada de tradução prematuros podendo ser direcionadas para degradação pelo sistema de vigilância da célula, decaimento mediado por sequências sem sentido (NMD, do inglês, *nonsense-mediated decay*), um dos mecanismos responsáveis pela degradação de RNA mensageiro na célula (Lareau *et al*, 2004; Lejeune & Maquat, 2005; Matlin *et al*, 2005). Observou-se, mais recentemente, exemplos em que os sub-produtos do *splicing* alternativo, os segmentos intrônicos ou exônicos não incorporados ao RNAm, podem ser substratos para a drosha, ribonuclease nuclear que atua na produção de microRNAs para controle da meia-vida do RNAm, pelo mecanismo de interferência pelo RNA, RNAi (Berezikov *et al*, 2007).

V. *Splicing* alternativo e diversidade funcional no SNC

A diversidade funcional gerada pelo *splicing* alternativo é representada por eventos específicos relacionados a períodos de desenvolvimento, tipo e atividade celular e tecidos. Foi demonstrado que o número total de genes que sofrem *splicing* alternativo é especialmente elevado em tecidos altamente especializados como cérebro, gônadas e fígado. Dentre estes, o SNC de mamíferos se destaca pela frequência de ocorrência

do *splicing* alternativo próximo a 90%, com diversos eventos exclusivos deste tecido (Yeo *et al*, 2004). Em neurônios, o *splicing* alternativo é proposto como o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento de funções complexas deste órgão atuando na diferenciação neuro-glial, no direcionamento de axônios na sinaptogênese, modulando as respostas a neurotransmissores e gerando isoformas para todos os receptores já descritos (Lipscombe, 2005).

Um sistema bem descrito no SNC é o sinal para diferenciação e desenvolvimento neuronal pela proteína de ligação a tratos de pirimidinas (PTB) e seu parálogo neuronal (nPTB). PTB, expressa em todos os tecidos, age como um silenciador de *splicing* que causa a exclusão de um éxon na sua própria mensagem e na mensagem de nPTB, criando um códon de parada prematuro que, via NMD, reduz a tradução de PTB e bloqueia a de nPTB. Na linhagem neuro-glial direcionada à diferenciação neuronal, o gene *PTB* é bloqueado transcricionalmente, o que permite a tradução de nPTB que regula o *splicing* de até 25% dos transcritos da célula desencadeando a diferenciação para linhagem neuronal (revisto por Coutinho-Mansfield, 2007).

Outro exemplo bem caracterizado é o da neurexina e neuroligina, duas proteínas de membrana que apresentam isoformas geradas a partir de variantes criadas por *splicing* alternativo. Estas duas proteínas interagem na sinapse de forma que uma isoforma de uma dessas proteínas, em uma projeção neuronal pré-sináptica, reconhece especificamente apenas uma isoforma da outra em neurônio pós-sináptico, gerando assim uma identidade celular que permite a criação de sinapses exclusivas (Li *et al*, 2000).

Os canais de transporte de cálcio em neurônios também apresentam grande variabilidade gerada por *splicing* alternativo, podendo produzir até mil isoformas previstas por gene. O *splicing* regulado é evidenciado pela inclusão diferencial de éxons-cassete em diversos transcritos para estes canais, que apresentam uma taxa de inclusão gradativamente maior durante o desenvolvimento até a idade adulta. Em um destes genes, a inclusão de um dos éxons mutuamente excludentes altera

domínios responsáveis pelas propriedades físico-químicas do canal resultante, gerando uma isoforma que é inativada apenas por voltagem e outra inativada apenas por neurotransmissores, cada uma delas expressa em resposta a um sinal externo (revisto por Gray *et al*, 2007). Estes são poucos exemplos da diversidade funcional gerada pelo *splicing* alternativo no SNC.

Entre os reguladores de *splicing* exclusivos do SNC já identificados, a proteína de ação mais abrangente é NOVA (do inglês, *Neuro-oncological ventral antigen*). Identificados como auto-antígenos de expressão exclusivamente neuronal em uma síndrome paraneoplásica, as proteínas NOVA1 e NOVA2 são reguladores em *trans*, produzidos a partir de genes parálogos, que regulam uma grande gama de eventos de *splicing*, relacionados em sua grande maioria com a sinaptogênese (Blencowe, 2005). Estudos com *microarrays* para eventos de *splicing* realizados em modelos de camundongos nocaute individuais para os dois genes das proteínas NOVA detectaram alterações em 7% dos eventos de *splicing* exclusivos do SNC, demonstrando a abrangência da ação destes reguladores (Jensen *et al*, 2000; Ule *et al*, 2005; Li *et al*, 2007).

VI. *Splicing* alternativo do gene do Retardo Mental do X Frágil (*FMR1*)

Um dos genes expressos no SNC e que apresenta variantes geradas a partir de *splicing* alternativo é o gene do Retardo Mental do X Frágil (*FMR1*, do inglês, *Fragile Mental Retardation 1 gene*), clonado em 1991 (Fu *et al*, 1991; Kremer *et al*, 1991; Oberlé *et al*, 1991; Verkerk *et al*, 1991; Yu *et al*, 1991). O gene, com cerca de 38 Kilobases (Kb), tem 17 éxons e é em transcrito em RNAm de 4.4 Kb, composto por uma região 5' não traduzida (5' UTR) de 0.2 Kb, uma região codificadora de 1.9 Kb e uma região 3' não traduzida (3' UTR) de 2.3 Kb (Ashley *et al*, 1993; Eichler *et al*, 1993).

Há, no primeiro éxon do gene *FMR1*, um microssatélite de trinucleotídeos, citosina, guanina e guanina (CGG), que é transcrito e não traduzido, presente na porção 5' UTR de seu RNAm. Estas repetições CGG fazem parte de uma ilha CpG que, se metilada,

inativa a expressão do *FMR1* (Fu *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1991). O microssatélite de trinucleotídeos apresenta polimorfismo de tamanho na população geral, com alelos de seis a cerca de 40 repetições. Pacientes com a síndrome do X frágil (SXF), a causa hereditária mais frequente de retardo mental entre homens, apresentam mutações completas de trinucleotídeos CGG do *FMR1*, com alelos contendo mais de 200 repetições CGG, cujas citosinas e as da ilha CpG em que se encontram tornam-se metiladas, resultando na inativação do gene *FMR1*. Mães e avôs maternos de pacientes são portadores de pré-mutações, alelos instáveis às meioses, com cerca de 60 a 200 repetições CGG, sem metilação. Os portadores de pré-mutações, embora sem distúrbios de aprendizagem, podem apresentar outras afecções clínicas. Mães de crianças afetadas pela SXF podem manifestar falência ovariana prematura (Vianna-Morgante e Costa, 2000). Homens e, raramente, mulheres, portadores da pré-mutação podem vir a desenvolver, a partir da sexta década de vida, uma síndrome de distúrbios da marcha, tremor e perda cognitiva, denominada síndrome de ataxia e tremor do X frágil (FXTAS) (Hagerman *et al.*, 2001). Exames anatomo-patológicos revelaram inclusões citoplasmáticas, positivas para ubiquitina, em neurônios e astrócitos, além de gliose do SNC de pacientes FXTAS e sugeriram um mecanismo patogênético mediado pelo acúmulo do RNAm do *FMR1* (Greco *et al.*, 2006). Alelos com 40 a 60 repetições apresentam estabilidade intermediária entre alelos normais e pré-mutações, sendo denominados, por isso, alelos intermediários, sem associação clínica estabelecida (Haddad *et al.*, 1999).

A expressão do RNAm do *FMR1* foi analisada por hibridação *in situ* de tecidos humanos fetais, nas oitava, nona e trigésima quinta semanas gestacionais (Abitbol *et al.*, 1993). Os fetos na oitava e nona semanas apresentavam distribuição homogênea do RNAm do *FMR1* no encéfalo e medula espinhal, cartilagens, mesênquima cefálico (crânio cartilaginoso, corpos cerebrais e arcos carpais) e fígado. No SNC, a marcação foi mais intensa nas zonas intermediária marginal, periventricular cervical, embora as regiões mais superficiais também mostraram expressão. Em fetos de 25 semanas

gestacionais, a expressão de *FMR1* mostrou-se elevada na placa neocortical, nas zonas ventricular e subventricular, córtexes cerebral frontal, temporal e piriforme, as regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, o núcleo basal magnocelular e no cerebelo (camada de células de Purkinje, vérmis e córtex) (Abitbol *et al*, 1993).

O estudo da expressão do gene *FMR1* levou, em 1993, à identificação, por RT-PCR, de 12 variantes de RNA produzidas em diversos tecidos, aparentemente sem especificidade, principalmente no encéfalo e gônadas (Eichler *et al*, 1993; Ashley *et al*, 1993; Verkerk *et al*, 1993). Verkerk e cols (1993) mostraram que estas variantes são geradas por quatro tipos de *splicing* alternativo do transcrito primário deste gene. Em sua análise, Ashley e cols (1993) incluiu um quinto tipo de *splicing* alternativo do *FMR1* no *splicing* alternativo do *FMR1*. Mais tarde, onze dessas variantes de transcrito do *FMR1* foram identificadas por clonagem de cDNA de culturas primárias de neurônios humanos fetais, mostrando níveis de expressão relativamente distintos (Huang *et al*, 1996). Foi observado posteriormente que estas variantes, tanto em cérebro quanto em outros tecidos poderiam ter níveis de expressão distintos durante o desenvolvimento. Estes e outros estudos baseados em averiguação de RNA ajudaram a definir a organização genômica do gene *FMR1*, identificando o éxon 12, até então não descrito, e os sítios receptores alternativos de *splicing* nos éxons 15 e 17. Dos 17 éxons do gene *FMR1*, aqueles envolvidos em eventos de *splicing* alternativo concentram-se na porção 3' do gene e possuem os sítios de *splicing* com sequências mais distantes dos consensos (Eichler *et al*, 1993). Entre estes, os éxons 12 e 14 são do tipo cassete, enquanto os éxon 15 e 17 possuem três e dois sítios receptores de *splicing*, respectivamente, alterando a extensão de sua sequência transcrita incluída (Fig. 5a). A combinação destes eventos gera 24 variantes possíveis de RNA que podem dar origem a 20 isoformas não redundantes da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP) codificada pelo *FMR1* (Tabela 2, Sittler *et al*, 1996).

Figura 5: **(A)** Representação esquemática do gene *FMR1* mostrando tamanhos de éxons (em verde) e íntrons (barras pretas). Indicada em azul está a região codificadora do gene, enquanto em amarelo as regiões não codificadoras (UTRs) a 5' e a 3'. **(B)** Detalhe da região 3' terminal do gene a partir do éxon 10. Os éxons estão representados em verde e íntrons em preto. As linhas azuis e laranjas representam os respectivos padrões de *splicing* dos éxons alternativos 12, 14, 15 e 17. Os éxons 12 e 14 são éxons cassette, podendo ter toda sua sequência incluída ou excluída do transcrito final. Os éxons 15 e 17 tem sítios doadores de *splicing* (5') alternativos (3 e 2 respectivamente), tendo a inclusão condicional de segmentos representados em amarelo e laranja para o éxon 15 e em azul para o éxon 17.

1º sítio recep. <i>splicing</i> do exon 17			2º sítio recep. <i>splicing</i> do exon 17		
Δ Exon 12			Δ Exon 12		
Exon 15	a	ISO 1 (71,1)	ISO 7 (68,9)	ISO 13 (69,1)	ISO 17 (66,9)
	b	ISO 2 (69,9)	ISO 8 (67,7)	ISO 14 (67,9)	ISO 18 (65,7)
	c	ISO 3 (68,4)	ISO 9 (66,2)	ISO 15 (66,4)	ISO 19 (64,2)
	Δ14*a	ISO 4 (50,9)	ISO 10 (48,7)	(ISO 4)	(ISO 10)
	Δ14*b	ISO 5 (49,5)	ISO 11 (47,3)	(ISO 5)	(ISO 11)
	Δ14*c	ISO 6 (61,0)	ISO 12 (58,8)	ISO 16 (59,0)	ISO 20 (56,8)

Tabela 2: Tabela exibindo as isoformas da FMRP esperadas pela tradução das variantes de transcrito do *FMR1* com ou sem (Δ) os éxons 12 e 14, com uso do primeiro ou segundo sítio receptor de *splicing* do éxon 17 ou um dos três sítios receptores de *splicing* do éxon 15 (a, b e c). Encontram-se entre parênteses a massa molecular (KiloDaltons, KDa) estimada para cada isoforma. Com a exclusão do éxon 14 a nova região potencialmente formada para as isoformas 4, 5, 10 e 11 apresenta um códon de parada na tradução antes do éxon 17. Desta forma, os transcritos gerados pelo uso do primeiro ou segundo sítio receptor de *splicing* do éxon 17 criam isoformas redundantes. As isoformas estão identificadas por cores em 5 grupos, determinados pela proximidade da massas moleculares calculadas para cada isoforma. Fonte: Sitler *et al*, 1996.

A FMRP tem 632 resíduos de aminoácidos e 71,1 kDa em sua isoforma maior, é parte de uma família protéica com as proteínas FXR1P e FXR2P, codificadas respectivamente pelos genes autossômicos, 1 e 2, relacionados ao X Frágil, *FXR1* e *FXR2*. Os três membros desta família possuem grande similaridade de sequência entre si, cerca de 55%, codificam para proteínas com domínios funcionais principais, compartilhados, que interagem entre si no núcleo e no citoplasma, como hetero- ou homodímeros (Zhang *et al*, 1995; Kirkpatrick *et al*, 2001). Estes domínios protéicos são responsáveis pela interação da FMRP com outros elementos protéicos e ribonucléicos, definindo suas funções no SNC.

Figura 6: Alinhamento das proteínas da família da FMRP. A FMRP possui respectivamente 86% e 70% de similaridade na região compartilhada com as outras integrantes da família, FXR1 e FXR2. Estas não possuem a sequência codificada pelos éxons 10 a 12 e 17 do *FMR1*.

A proteína FMRP faz parte de um complexo ribonucleoprotéico e liga-se, de maneira seletiva, a estruturas de quartetos de guanina, quartetos G, de RNA. A FMRP apresenta sinais de importação (codificado pelo éxon 5) e de exportação nuclear (codificado pelo éxon 14), três domínios de ligação ao RNA, sendo dois do tipo KH (homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear, hnRNP K, codificados pelos éxons 8, 9 e 13) e, o terceiro, um domínio arginina-glicina-glicina (RGG, codificado pelo éxon 16), além de dois domínios *agenet* (codificados pelos éxons 3 e 4) (Bardoni *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1997; Darnell *et al.*, 2001; Maurer-Stroh *et al.*, 2003). O segmento codificado pelos éxons 10 a 12 do *FMR1* está ausente nas proteínas FXR1 e FXR2, o que sugere uma relevância funcional, diferencial para a FMRP (Fig. 6).

No SNC, a expressão da FMRP é especialmente elevada em neurônios do hipocampo, córtexes cerebral e cerebelar, relacionando-se diretamente às síndromes neurológicas, SXF e FXTAS. A partir de diversos estudos para averiguar interações protéicas e distribuição subcelular da FMRP, propôs-se que, uma vez sintetizada, ela entre no núcleo celular, onde forma complexos ribonucleoprotéicos, que deixam o núcleo e são transportados aos dendritos. Em neurônios hipocampais e corticais, a FMRP predomina nas espinhas dendríticas, que são evaginações da membrana pós-sináptica sujeitas a alterações morfológicas, dinâmicas, relacionadas à função sináptica e plasticidade neuronal, que são dependentes de síntese protéica (Jontes e Smith., 2000). Nas espinhas dendríticas, a FMRP deve funcionar como repressora traducional de modo relacionado à função sináptica. Cérebros de pacientes com a SXF e de camundongos nocautes do *Fmr1* apresentam anormalidades das espinhas dendríticas, que se mostram mais longas, finas e densas do que o normal, sugerindo que a FMRP deva ter uma função na maturação e/ou eliminação sináptica (Comery *et al.*, 1997; Nimchinsky *et al.*, 2001). Esta diferença morfológica das espinhas dendríticas é significativa somente na primeira semana do desenvolvimento pós-natal, período em que a expressão do *Fmr1* de camundongo é alta (Nimchinsky *et al.*, 2001).

Como a FMRP, o RNAm do *FMR1* também se localiza nos terminais dendríticos, onde ambos se associam (Weiler *et al.*, 1997; Greenough *et al.*, 2001). Várias outras mensagens foram identificadas como alvo da regulação pela FMRP (Brown *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2001). A FMRP apresenta distribuição polissomal e a grânulos de estresse, citoplasmáticos, onde ela deve inibir a tradução de RNAm, de maneira específica e seletiva (Li *et al.*, 2001). O modelo corrente tem a RNAi como a via principal de atuação da FMRP na regulação pós-transcricional da expressão gênica, uma vez que se demonstrou que esta proteína interage com componentes do complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC), além de microRNAs, em *Drosophila* e mamíferos. Nesse modelo, a FMRP liga-se ao RNAm específico e recruta o complexo RISC e microRNAs, facilitando o reconhecimento entre microRNAs e seus alvos (Fig. 7; Jin *et al.*, 2004).

Figura 7: Modelo sintetizando as funções propostas para a proteína FMRP no neurônio. A proteína FMRP, sintetizada no citoplasma, entra no núcleo devido ao seu sinal de importação nuclear, onde interage com seus alvos de RNAm e outras proteínas. O complexo ribonucleoprotéico da FMRP sai do núcleo mediado pelo sinal de exportação nuclear da FMRP e outras proteínas. No complexo, os RNAm podem ser inativados por alterações conformacionais ou interação da FMRP com integrantes do complexo RISC. O complexo é transportado ao longo do dendrito ligado a proteínas motoras associadas ao citoesqueleto. Na região da sinapse do neurônio pós-sináptico, os RNAm são traduzidos mediante sinalização por neurotransmissão que inibe a FMRP por fosforilação.

Fonte: Jin *et al*, 2004

A exclusão do éxon 14 dos transcritos do *FMR1* é um evento aparentemente raro, embora ainda não tenha sido feita uma análise semi-quantitativa de tal expressão. Sua exclusão muda a moldura de leitura da tradução e cria possibilidade de que estas mensagens sejam degradadas. Super-expressão dos transcritos sem o éxon 14 mostram acúmulo da proteína de fusão no núcleo celular uma vez que o éxon 14 codifica para o único sinal de exportação nuclear da FMRP. Outros experimentos de super-expressão destas isoformas revelaram alteração proteômica da célula transfectada.

O encurtamento do éxon 15 do *FMR1* pelo uso de sítios receptores de *splicing* alternativos faz com que isoformas da FMRP sintetizadas a partir desse RNAm apresentem alteração de metilação e do controle de interação com proteínas. Por outro lado, um estudo recente demonstrou que a sequência de DNA contida entre o primeiro e terceiro sítios de *splicing* do éxon 15 do *FMR1* é transcrita em uma estrutura de RNA de quarteto G. Esta sequência constitui um acentuador exônico do *splicing* do éxon 15. Embora os autores não tenham comprovado por experimentos de *splicing in vitro*, os dados são sugestivos da existência de um ESE nessa região.

A sequência do éxon 12 do *FMR1* está ausente nos genes parálogos *FXR1* e *FXR2* e nos genes ortólogos de invertebrados. A exclusão do éxon 12 do *FMR1* não muda a moldura de leitura da tradução. Sua inclusão acrescenta 21 resíduos de aminoácidos cuja função permanece ainda obscura. Sabemos, pelo desenvolvimento em nosso laboratório de anticorpos que reconhecem especificamente este peptídeo codificado pelo éxon 12 do *FMR1*, que as isoformas que o contêm são traduzidas no SNC de rato (dados não publicados). É importante investigar se estas isoformas têm alteração funcional em relação às demais isoformas da FMRP que não expressam o éxon 12, um projeto em desenvolvimento em nosso laboratório. Da mesma forma, é essencial analisar o padrão de expressão do éxon 12 do *FMR1* no SNC e como a inclusão e exclusão deste éxon nos transcritos do *FMR1* são regulados.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é avaliar a expressão do éxon 12 do gene Fmr1 do rato e buscar pelos elementos em *cis* regulatórios do seu *splicing*.

A definição de padrões de exclusão ou inclusão exônica dos transcritos de Fmr1 em diferentes estruturas do SNC é importante à seleção de tecidos a serem estudados experimentalmente, como na identificação de elementos em *cis* ou em *trans* regulatórios do *splicing*. Com o objetivo de analisar a expressão do éxon 12 do Fmr1 em córtex frontal, hipocampo e cerebelo no período embrionário e início do desenvolvimento pós-natal do rato, quando a expressão do Fmr1 é sabidamente muito alta (Verkerk *et al*, 1993). Amostras de cDNA destes tecidos foram obtidas de ratos no décimo nono dia embrionário (E19) e no segundo dia pós-natal (P2) e analisadas pela técnica de RT-PCR em tempo real (*Real-Time RT-PCR*) com iniciadores específicos para as variantes maduras que incluem o éxon 12 de Fmr1.

A exclusão do éxon 12 do Fmr1 do transcrito primário ou sua exclusão do RNAm deve depender da interação entre proteínas (elementos em *trans*) e seqüência transcrita (elementos em *cis*) de maneira regulada pela sinalização intracelular. Na busca por seqüências em *cis* candidatas à regulação do *splicing* do éxon 12 do Fmr1 de rato, construímos um mini-gene de seqüência genômica parcial do gene e analisamos sua expressão em células com ele transfectadas. Um padrão de inclusão e exclusão do éxon 12 foi avaliado e depois comparado ao de outros clones contendo deleções parciais feitas a partir do clone original.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Análise por RT-PCR em tempo real dos padrões de expressão das isoformas de Fmr1:

I.I Animais e obtenção de tecidos

Ratos Wistar foram obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP e sacrificados em câmaras de CO₂ (protocolos aprovados pelo comitê de ética do IB-USP para projetos mais abrangentes no laboratório: 2004 e 2008). O sexo de animais no segundo dia pós-natal (P2) foi discriminado pela distância entre genitália e ânus (maior em machos) pela equipe do Centro de Bioterismo. Para os embriões, período em que a distinção da genitália é difícil, foi realizada sexagem molecular como descrito adiante. Os indivíduos machos foram separados para o estudo e as fêmeas para obtenção de DNA e de cDNA para a padronização da RT-PCR. Após sacrifício da rata prenha (décimo nono dia), os embriões foram decapitados. Ratos em P2, sacrificados, foram também decapitados. A extração do encéfalo seguiu-se incisão sagital, remoção da pele, cartilagem craniana e meninges. Os encéfalos removidos foram colocados em placas de Petri contendo 10mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato), onde foi realizada dissecação do córtex cerebral frontal, hipocampo e cerebelo. Os tecidos específicos do cérebro de cada animal, lavados em PBS, foram transferidos para criotubos individuais e congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram conservadas em freezer a -80°C.

I.II Preparo de água DEPC estéril

Dietilpirocarbonato (DEPC) foi adicionado à água ultrapura (1/1000). A solução foi misturada vigorosamente, incubada a 37°C por 16 horas, ao abrigo da luz, e autoclavada por 15 minutos.

I.III Extração de RNA total

O RNA total foi extraído pelo método de cloreto de lítio e uréia, em que, 1mL de solução de LiCl/Uréia (LiCl 3M e Uréia 6M) foi adicionado a cada criotubo contendo tecido congelado, homogeneizado em jato em seringa (10ml) com agulha de 8mm. As soluções foram mantidas a 4°C, durante 16 horas, em microtubos (1,5mL) quando foram centrifugados por uma hora a 16.000 x G a 4°C. O sobrenadante foi descartado com micropipetador (para amostras de indivíduos E19 o sobrenadante foi estocado para extração de DNA genômico). Foram adicionados ao precipitado 700µL de TES (Tris HCl a 0,1M, pH 7,4, EDTA a 2mM, SDS a 0,1%, solução preparada com água tratada com DEPC e filtrada), a solução Foi homogeneizada com pipeta e acrescentados 700µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e novamente homogeneizando. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 16.000 x G a temperatura ambiente. A fase superior foi transferida a um novo tubo ao qual foram adicionados 700µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 16.000 x G à temperatura ambiente. A fase superior foi transferida a um novo tubo, uma alíquota de 10µL foi retirada para controle em gel e ao restante foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 16.000 x G a temperatura ambiente. A fase superior foi coletada e adicionou-se 10% do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e dois volumes de etanol absoluto gelado. Amostras de RNA precipitado foram estocadas a -80°C até serem utilizadas.

I.IV Extração de DNA genômico

O sobrenadante obtido da lise celular durante extração de RNA de tecidos de ratos em E19 foi submetido à extração de DNA genômico. A este sobrenadante foram adicionados 10% do seu volume de acetato de sódio a 3M, pH 5,2 e dois volumes de etanol absoluto gelado. Após 16 horas a -80°C, os tubos foram centrifugados a 16.000 x G a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado em

250µL de etanol 80% gelado e centrifugado a 16.000 x G a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos secos ao ar por 30 minutos. O precipitado de DNA foi ressuspenso em 50µL de água ultrapura. Dez µL de cada amostra de DNA foram aplicados em gel de agarose a 2% para quantificação como padrão de dosagem *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) realizando eletroforese a 100V por 15 minutos em tampão TBE 1X (Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). As amostras foram coradas com brometo de etídio (2,5mM) e observadas à luz ultravioleta.

I.V Sexagem molecular

DNA (1µL) de cada amostra dos animais em E19 foi utilizado em reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores (TSPY-1S: 5'-ACAATCCTGGGTTGAGGATG-3'; TSPY-1A: 5'-GTGCACACAGCCAGTTGAAG-3') específicos para o gene Tspy do cromossomo Y de rato. A reação foi realizada em volume final de 10µL em tampão (Invitrogen, Carlsbad CA) a 1X, MgCl₂ a 1.5mM (Invitrogen, Carlsbad CA), 200µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), DMSO a 10%, cada iniciador a 0,5µM e 1U de polimerase *Taq* de DNA (Invitrogen, Carlsbad CA). Em termociclador, após uma desnaturação a 94 °C por dois minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 54 °C por 30 segundos e 68 °C por um minuto. A extensão final foi a 68 °C por sete minutos. A observação dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (2,5mM), à luz ultravioleta, após eletroforese em tampão TBE 1X a 100V por 20 minutos. O padrão de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad CA) foi aplicado no mesmo gel.

I.VI Quantificação de RNA

Amostras de etanol contendo RNA precipitado (100µL) foram centrifugados a 16.000 x G a 4 °C durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 250µL de etanol 80% gelado. Os tubos foram centrifugados a 16.000 x G a 4 °C durante dez minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos

secos ao ar por 30 minutos. O DNA foi ressuspensão em 50µL de água tratada com DEPC. A dosagem do RNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, aplicando 2,5, 5, e 10µL de cada amostra por canaleta. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X aplicando corrente de 50V por 30 minutos. Brometo de etídio foi adicionado ao gel anteriormente a polimerização (1/10.000) para observação das amostras à luz ultravioleta. O padrão de tamanho molecular *Low Mass DNA Ladder* foi aplicado no mesmo gel para a quantificação do RNA.

I.VII Síntese de cDNA

Dois microgramas de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA com o sistema *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad CA). Volumes de etanol contendo 2µg de RNA precipitado foram centrifugados como descrito acima e o RNA ressuspensão em 23µL de H₂O-DEPC. Amostras foram transferidas para microtubos de microcentrífuga de 0,2mL, onde foram adicionados 3µL de tampão de reação DNaseI (Invitrogen, Carlsbad CA) e 4µL de *DNaseI/Amplification Grade* (Invitrogen, Carlsbad CA). As amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, a elas foram adicionados 4µL de EDTA a 25mM e aquecidas por dez minutos a 65°C para inativação da DNaseI. Foram adicionados imediatamente as amostras de RNA 3µL de oligoDT (500µg/ml) e 2µL de iniciadores aleatórios (50µg/ml), incubados a 70°C por dez minutos, para hibridação dos iniciadores, adicionados à reação 7µL de tampão de PCR 10X, 7µL de MgCl₂ a 25mM, 3,5µL de dNTP mix a 10mM, 7µL de DTT a 0,1M e 4,5µL de água DEPC. As amostras foram centrifugadas e recolocadas rapidamente no termociclador a 42°C por cinco minutos. Foram adicionados 2µL da transcriptase reversa *SuperScript III* seguidos de incubação a 42°C por 50 minutos em termociclador. As amostras foram aquecidas a 70°C por 15 minutos e adicionados 2µL de RNase H, seguido de incubação a 37°C, por 20 minutos. As amostras de cDNA foram estocadas a -20°C.

I.VIII Teste dos cDNAs

Para testar o cDNA sintetizado foram realizadas reações RT-PCR (PCR após reação com a transcriptase reversa). A primeira reação utilizou iniciadores (RACT-1S: 5'-GTCAGAAGGACTCCTACG-3'; RACT-1A: 5'-CTTCATGGTGCTAGGAGC-3') específicos para o gene da actina beta de rato. A segunda reação utilizou iniciadores (FRAX-4S: 5'-ACAAAGGAAAACACCCATTTT-3'; FRAX-4A: 5'-TGGTTGCAGCCCATCTACGC-3') que hibridam respectivamente nos éxons 11 e 17 do gene *Fmr1* de rato. As reações foram realizadas em volume total de 10µL contendo tampão Taq (Invitrogen, Carlsbad CA) a 1X, MgCl₂ a 1.5mM (Invitrogen, Carlsbad CA), 200µM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, DMSO a 10%, cada um dos iniciadores a 0.1µM e 0.5U de polimerase *Taq* de DNA (Invitrogen, Carlsbad CA). Em termociclador, após uma desnaturação a 94°C por dois minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por um minuto. A extensão final foi realizada a 68°C por sete minutos. A observação dos produtos foi feita em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (2,5mM) e observadas à luz ultravioleta após eletroforese em tampão TBE 1X, a 100V, por 15 minutos. O Padrão de peso molecular *O' GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus* (Fermentas) foi aplicado no mesmo gel.

I.IX Reação de PCR em tempo real

Para a reação de PCR em tempo real, os iniciadores de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o *software Primer 3* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www), sua especificidade verificada através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), e sintetizados pela IDT (Coralville IA). Os oligonucleotídeos FRAX-13S (5'-AGTTGTGAGGGTGAGGATCG-3'), FRAX-12A (5'-TTGGAAGGTAGGGAAGTTGG-3') e FRAX-13A (5'-ACAATTGATGAAACCACTAACACC-3') hibridam respectivamente no éxons 10, 11 e

12 do Fmr1. Os iniciadores foram diluídos a 2mM e testados em reações de amplificação (PCR) qualitativas, como descrito acima.

A análise da expressão gênica foi feita através da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) no Instituto do Coração, InCor, FM-USP, com colaboração da Dra. Silvana Chiavegatto. As reações de qPCR foram feitas no equipamento Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Concord, Austrália). O qPCR determina o Ct para cada amostra, ou seja, o ciclo de amplificação em que o acúmulo de fluorescência na amostra atinge a linha de detecção arbitrária (*threshold*). O resultado é coletado durante a fase exponencial de amplificação, que ocorre quando a emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado, ou concentração da amostra. Os oligonucleotídeos *sense* e *antisense* específicos para cada um dos genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os tratamentos) foram cedidos pela Dra. Silvana Chiavegatto. Foram testados três genes para controle interno, Ppia (ciclofilina), Gapdh (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e Actb (beta-actina), amplificados respectivamente com os iniciadores, Ppiar-1S (5'-AATGCTGGACCAAACACAAA-3') e Ppiar-1A (5'-CCTTCTTTCACCTTCCCAA-3'), Gapdhr-1S (5'-AGGAGCGAGACCCCACTAAC-3') e Gapdhr-1A (5'-GTGGTTCACCCCATCACAA-3') e Actbr-1S (5'-GTGGGAATGGGTCAGAAGG-3') e Actbr-1A (5'-GGTCATCTTTTCACGGTTGG-3'). As reações continham 200nM de iniciadores, sais, desoxinucleotídeos, a polimerase *AmpliTaq Gold* de DNA, o composto fluorescente *Sybr Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX (Applied Biosystems), otimizados para um volume final de 20µl. Para a escolha da concentração ideal do cDNA obtido das amostras a ser amplificado, foram feitas cinco diluições seriadas, 50ng/µL, 25ng/µL, 12.5ng/µL, 6.25ng/µL e 3.125ng/µL. Após a análise da curva-padrão de amplificação com as diluições para cada par de iniciadores, escolheu-se a concentração de 12,5ng/µL, aquela com maior eficiência para a concentração de trabalho. As reações foram incubadas a 95°C, por 10 minutos,

para a ativação da polimerase *AmpliTaq Gold* de DNA, seguido por 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 60 segundos a 60°C para hibridação, extensão e coleta do sinal de fluorescência. Para cada corrida tivemos o controle negativos NTC (ausência do DNA) e o cDNA de cada amostra referente ao grupo controle e experimental amplificadas em triplicatas. Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de um ciclo de dissociação (95°C por 15 segundos, estabilização a 60°C, seguido de aumento gradual de temperatura de 2°C por minuto). Assim, somente foram utilizados os primers cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido à temperatura correta. O *software* RG-6000 (Corbett Research, Concord, Austrália) foi usado para gerar a curva-padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação e as planilhas contendo os dados brutos de fluorescência através dos quais foram calculados os valores de Ct para todas as amostras amplificadas com cada par de oligonucleotídeos. Para cada estrutura cerebral e idade, a quantidade de transcrito, referente ao RNAm, de cada amplicom foi determinada a partir do Ct da amostra em análises diretas ou através da normalização dos resultados brutos pela expressão de genes que não se alteraram nessas regiões. Para cada região cerebral foram testados genes de referência: *Ppia* (ciclofilina), *Gapdh* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e *Actb* (b-actina). Utilizou-se o aplet *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), que através de comparações pareadas sugere os genes mais estáveis em cada amostra. Através da análise dos resultados gerados por este *software* e pela observação das amplificações de padronização, foi determinado que o gene da ciclofilina é o mais indicado para a normalização dos resultados de expressão.

A quantidade de transcrito em cada amostra foi determinada, relativamente, baseada no Ct de cada amostra normalizado pelo seu Ct na reação com os oligos específicos para o gene controle. As relações matemáticas utilizadas foram aplicadas por meio de matrix modificada cedida pela Dra. Silvana Chiavegatto.

II. Análises *in silico* para busca de elementos regulatórios:

Análises *in silico* nas seqüências genômicas do Fmr1, na região do início do íntron 11 ao final do íntron 12, foram realizadas para identificar segmentos candidatos a reguladores do *splicing* do éxon 12. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática virtuais disponíveis na rede (*ESE Finder* - Release 3.0: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>; *Acescan2*: <http://genes.mit.edu/acescan2/index.html>; *ESR Search*: <http://ast.bioinfo.tau.ac.il/ESR.htm>; *ASD - Alternative Splicing*: <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi?method=7>) que utilizam algoritmos para busca de elementos na seqüência submetida que possuem a maior probabilidade de atuar como reguladores em *cis* do *splicing*. Estas ferramentas utilizam métodos de busca e bancos de dados contendo elementos regulatórios publicados por diferentes grupos de pesquisa (*ESE Finder* - Release 3.0: Smith *et al*, 2006; Cartegni *et al*, 2003; *Acescan2*: Wang *et al*, 2004; Yeo *et al*, 2004; *ESR Search*: Goren *et al*, 2006; Fairbrother *et al*, 2002; Zhang & Chasin, 2004; Wang *et al*, 2004; *EBI-ASD - Alternative Splicing*: Stamm *et al*, 2006; Thanaraj *et al*, 2004). Utilizando os parâmetros originais de cada programa, foram realizadas buscas específicas utilizando as seqüências dos íntrons 11 e 12 e do éxon 12 do *FMR1* humano, de camundongo e de rato. As buscas foram realizadas em cada ferramenta de acordo com os bancos de dados disponíveis em cada uma. Para as ferramentas *ESE Finder* e *ESR Search*, que utilizam como referência seqüências exônicas humanas, foi submetida à seqüência humana do éxon 12. Com a ferramenta *Acescan2* foram feitas buscas separadamente com as seqüências dos íntrons e do éxon 12 humanas e murinas, sempre selecionando apenas elementos da espécie correspondente. Para *ASD - Alternative Splicing* foram submetidas às seqüências intrônicas e exônicas das três espécies. Os resultados para esta ferramenta são apresentados listando todos os elementos identificados presentes no banco de dados que incluem todas as espécies, desta

forma os resultados foram posteriormente triados para manter apenas elementos identificados na espécie submetida.

III. Clonagem de segmento genômico do Fmr1: Produção de um mini-gene:

III.I Extração de DNA de leucócitos

Três mililitros de sangue coletados de rata adulta, prenha em E19, sacrificada em câmara de CO₂ foram utilizados para extração de DNA genômico. Foram adicionados ao sangue 40mL de solução de lise (sacarose a 0,32M, Tris-HCl a 10mM, pH 7.4, MgCl₂ a 5mM e Triton-X-100 a 1%) e homogeneizado a solução por inversão. Amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 16.000 x G a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 4.5mL de solução de NaCl a 0.075M, EDTA a 0.8mM, pH8.0) e SDS 5%. Após homogeneização foram adicionados 50µL de Proteinase K (10mg/mL) e a solução foi incubada a 42°C por 3 em tubo de vidro de 15mL, ao qual foram adicionados 5mL de fenol e homogeneizado. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 16.000 x G a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo tubo onde foi submetido a duas extrações com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), como descrito. À fase superior obtida (~5mL) foram adicionados 500µL de KCl a 2M e 12mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado. O DNA precipitado foi coletado com capilar de vidro e lavado em um novo tubo contendo etanol a 70% gelado. O DNA foi transferido para um novo tubo contendo 500µL de TE, incubado a 65°C por 30 minutos e à temperatura ambiente por 16 horas. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria calculando a absorbância da amostra a 260nm. As amostras foram conservadas a -20°C.

III.II Amplificação do segmento genômico do éxon 11 ao éxon 12 do Fmr1

A amplificação dos segmentos genômicos foi realizada por PCR, com iniciadores específicos para o gene Fmr1, definindo um segmento de 2849 pares de bases que

abrange da primeira base do éxon 11 à última do éxon 13 (ECORVFRAX-11S: 5'-CCAGGGGATATCGGAAAATTTGCCACCAAGTTCC-3', NOTFRAX-10A: 5'-CCAGGGGCGCCGCCTACTTTAAGTAGTTCAGGTGATAATCCAA-3'). Os iniciadores *sense* e *antisense* continham sítios de restrição (sublinhados) para as enzimas *EcoRV* e *NotI* respectivamente.

A reação foi realizada em volume total de 20µL contendo 20ng de DNA genômico de rato, tampão de reação a 1X, cada iniciador a 0,5µM, e 0,5U da polimerase *Accuprime Pfx* de DNA (Invitrogen, Carlsbad CA). Em termociclador, após uma desnaturação a 94°C por dois minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por quatro minutos e 30 segundos. A extensão final foi realizada a 68°C por sete minutos. Dez reações independentes foram reunidas em um tubo e cinco microtubos submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0.8% em tampão TBE 1X à 100V por 15 minutos, corado com brometo de etídio (0,75mg/mL) e observadas à luz ultravioleta. O Padrão de tamanho e peso molecular *High Mass DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad CA) foi aplicado no mesmo gel.

III.III Purificação do produto de PCR

As amostras amplificadas por PCR foram purificadas com o sistema *Illustra GFX* (GE Healthcare) de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. Amplificações dos dois insertos (200µL) foram divididas em dois tubos (100µL), cada um purificado separadamente em uma coluna de afinidade por DNA *GFX Microspin*. As colunas foram eluídas no final do procedimento em 30µL de tampão de eluição aquecido. O volume recuperado da purificação por coluna foi aplicado em gel de agarose de mais baixo ponto de fusão a 0,7%. A solução contendo agarose diluída em tampão TBE foi incubada em banho a 60°C por 1 hora e o gel polimerizado por uma hora a temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas no gel assim como o padrão de peso molecular *Low Mass DNA Ladder*, submetidas à eletroforese em

tampão TBE 1X a 25V durante uma hora e a 50V por mais uma hora. O gel foi corado com brometo de etídio (2,5mM) e observado à luz ultravioleta. As bandas referentes aos insertos foram recortadas com lâmina de aço em transiluminador de luz ultravioleta. Fragmentos de gel contendo DNA foram transferidos para tubos de 1,5mL e novamente purificados em colunas *GFX Microspin*, eluídas com 30μL de tampão de eluição aquecido. As amostras coletadas foram estocadas a -20°C.

III.IV Adição de adenosina terminal

Reação realizada com produtos de PCR não digeridos purificados contendo 10X Taq Buffer (Invitrogen, Carlsbad CA) a 1X, dATP (Desoxitrifosfato de Adenosina) a 200μM e 0.5U de Taq (Invitrogen, Carlsbad CA) em volume de 10μL. A reação foi incubada em banho por 15 minutos a 72°C.

III.V Clonagem com o sistema TOPO

A clonagem do segmento genômico do Fmr1 foi feita de modo não direcional no vetor TOPO TA (PCR 2.1-TOPO) (Invitrogen, Carlsbad CA) e, posteriormente, o inserto do clone recombinante obtido foi subclonado de modo direcional no vetor pcDNA3 (Xinl, Gonzalez, Agosti, *et al*, 1998).

Produtos de PCR não digeridos, purificados em gel de agarose de baixo ponto de fusão após adição de adenosina terminal, foram clonados com o sistema TOPO TA com o vetor pCR2.1-TOPO. Cada produto de PCR foi clonado em reação de 6μL contendo 4μL do produto de PCR. Reações foram incubadas a 23°C por 30 minutos. Solução de ligação foi usada para transformar bactérias DH5α *One Shot® Chemically Competent E. Coli* (Invitrogen, Carlsbad CA), com incubação em gelo por 30 minutos antes do choque térmico. 50μL de cada solução foram espalhados em placas de cultura de bactéria pré-aquecidas a 37°C contendo meio Luria Broth (LB) (Bacto-Triptona 10g/L, Bacto-Yeast 5g/L e NaCl 10g/L, pH 7.0) com agar a 1%. O restante de cada solução foi espalhado em placas separadas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas e guardadas a 4°C.

III.VI Triagem das colônias

Colônias isoladas crescidas em placas com meio LB agar foram colhidas em ambiente estéril e transferidas para tubos plásticos de 15mL contendo 2mL de meio LB líquido com Ampicilina (50µg/mL). Os tubos foram incubados sob agitação a 37°C por 16 horas. 1µL de cada meio contendo bactérias foi utilizado em reação de PCR de 10µL contendo tampão Taq (Invitrogen) a 1X, MgCl₂ a 1.5mM (Invitrogen), cada dNTP a 200µM, DMSO a 10%, cada iniciador a 0.1µM e 0.5U de polimerase *Taq* de DNA (Invitrogen, Carlsbad CA). Em termociclador, após desnaturação a 94°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 68°C por 10 minutos. Em uma das reações o volume do meio de cultura (LB) contendo bactérias foi substituído por 1µL (20ng) de DNA genômico de rato, e foi usada como controle positivo. A visualização dos produtos foi feita em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio (2,5mM) e observados à luz ultravioleta após eletroforese com tampão TBE 1X à 100V por 15 minutos. O peso molecular Low Mass DNA Ladder aplicado juntamente com as amostras para determinação da extensão dos produtos.

Para a triagem dos clones gerados pelo sistema TOPO que contém a construção com o éxon 12 de *Fmr1* foram utilizados iniciadores (ECORVFRAX-11S: 5'-CCAGGGATATCGGAAAATTTGCCACCAAGTTCC-3', FRAX-13A: 5'-ACAATTGATGAAACCACTAACACC-3') específicos para o inserto.

Os iniciadores utilizados para a construção contendo o segmento do éxon 12 de *Fmr1* no vetor pcDNA3 foram ECORVFRAX-11S e FRAX-13A, e são específicos para o inserto. O par de iniciadores PCDNA-1S: 5'-CACTATAGGGAGACCCATGGAC-3', PCDNA-1A: 5'-CTGATCAGCGAGCTCTAGCA-3' é específico para a sequência do vetor.

III.VII Extração do plasmídio

A extração dos plasmídios das colônias positivas para os insertos foi realizada pelo método de lise alcalina. Um mililitro do meio LB contendo colônias isoladas foi

transferido para um tubo de 1.5ml que foram centrifugados por 5 minutos a 4°C e 16.000 x G. O sobrenadante foi removido e as bactérias ressuspensas em 100µL de solução 1 (Glicose 0.05M, EDTA 0.01M, Tris 0.05M) gelada homogeneizada em vortex. As soluções foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e adicionados 200µL de solução 2 (NaOH 0.2M, SDS 1%) a temperatura ambiente preparada no dia, que foi homogeneizada invertendo o tubo. As soluções foram incubadas em gelo por 5 minutos e foram adicionados 150µL de solução 3 (Kac 3M, Ácido acético 11.5%) gelada, soluções homogeneizadas invertendo o tubo e incubadas em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 16.000 x G a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 500µL de fenol/clorofórmio (1:1). As soluções foram vortexadas e centrifugadas por 5 minutos a 16.000 x G a temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (1:24). As soluções foram vortexadas e centrifugadas por 5 minutos a 16.000 x G a temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado 1mL de etanol 100% a temperatura ambiente. As amostras foram guardadas imediatamente a -80°C durante 16 horas e então centrifugadas a temperatura ambiente por 20 minutos a 16.000 x G. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 100µL de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente a 16.000 x G por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e os tubos secos ao ar por 30 minutos. As amostras foram ressuspensas em 30µL de TE e incubadas por 20 minutos a 37°C em banho. Foram adicionados 5µL de RNase e as amostras foram incubadas em banho a 37°C por 30 minutos. Amostras foram estocadas a -20°C.

III.VIII Quantificação do plasmídio

Um microlitro de cada plasmídio purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0.8% juntamente com o padrão de tamanho e peso molecular High Mass

DNA Ladder em tampão TBE 1X durante 40 minutos a 100V. As amostras foram coradas com brometo de etídio (2,5mM) e observadas à luz ultravioleta

III.IX Digestão do plasmídio para averiguar inserto

Dois microlitros de cada amostra de plasmídios purificados foram digeridos em volume final de 20µL, tampão de reação #3 1X, 10U de *EcoRV* e 15U de *NotI*. As reações foram incubadas em banho a 37°C por 4 horas e aplicadas em gel de agarose a 0.8% ao lado do padrão de tamanho e peso molecular *High Mass DNA Ladder* para eletroforese em tampão TBE 1X durante 45 minutos a 100V. As amostras foram coradas com brometo de etídio (2,5mM) e observadas à luz ultravioleta.

III.X Purificação do inserto para subclonagem

Para subclonar os vetores produzidos no sistema TOPO, colônias positivas foram submetidas a reações de extração de plasmídio por lise alcalina como descrito acima. Os plasmídios foram digeridos com as enzimas *EcoRV* e *NotI* como descrito anteriormente e submetidos à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 0,7% para isolar a banda referente ao inserto, purificada pelo sistema *Illustra GFX*, como já descrito.

III.XI Digestão e desfosforilação do vetor de clonagem pcDNA3

Para a clonagem do fragmento contendo o éxon 12 do *Fmr1*, cinco microgramas do vetor pcDNA3 foram utilizados para a reação de digestão com as enzimas de restrição *EcoRV* e *NotI* como descrito acima. Para a clonagem das construções contendo deleções, 10 microgramas do mesmo vetor foram digeridos apenas com a enzima *EcoRV* e em reação separada com as enzimas *BstXI* e *NotI* (NEB) em reações de 100µL contendo 10µL de NEBuffer 3, BSA a 100µg/ml e 3µL de cada enzima. As reações foram incubadas por 12 horas a 37°C. Após purificação com Etanol, os vetores pcDNA3 digeridos foram ressuspenso em 89µL de água ultrapura, utilizados em reação de desfosforilação realizada em volume final de 100µL. Estas reações foram realizadas com 1µL de Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (Invitrogen)

diluído em 9µL de Dilution Buffer (Invitrogen), 10µL de tampão de desfosforilação a 10X, incubada a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 1µL de CIAP diluído e a reação incubada a 55°C por 45 minutos. Foi adicionado 1µL de EDTA 0.5M a reação incubada a 65°C por 15 minutos. Adicionados 100µL de fenol/clorofórmio (1:1) às amostras homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 16.000 x G por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado com pipeta e transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Amostras homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 16.000 x G por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado com pipeta e transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 100µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 16.000 x G por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado com pipeta e transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 200µL de etanol 100% gelado e 10µL de acetato de sódio 3M pH 5.2. Reações incubadas a -20°C por 16 horas e centrifugadas a 16.000 x G por 20 minutos à 4°C. O Sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100µL de etanol 70% gelado, centrifugando a 16.000 x G por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos secos ao ar por 30 minutos. Amostras foram ressuspensas em 50µL de água ultrapura.

III.XII Quantificação de vetor e inserto

Dois microlitros de amostras purificadas de insertos digeridos e não digeridos e do vetor pcDNA3 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% ao lado do padrão de tamanho e massa molecular *High Mass DNA Ladder*. Após coloração com brometo de etídio as amostras foram observadas à luz ultravioleta sua concentração calculada pela comparação com o padrão molecular.

III.XIII Ligação

Vetor pcDNA3 e insertos quantificados foram misturados em proporção molar de 5:1 e incubados a 65°C por cinco minutos. A reação de ligação ocorreu em volume final de 20µL, contendo 4µL de tampão de reação da DNA Ligase a 5X (Invitrogen, Carlsbad CA) e 2µL de T4 DNA Ligase (Invitrogen, Carlsbad CA), e incubadas em banho a 42°C por 5 minutos e homogeneizadas em vortex. As soluções foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e então a 12°C por 16 horas. Solução de teste foi preparada substituindo o volume de inserto por água ultrapura.

III.XIV Preparo de células competentes pelo CaCl₂

Bactérias *E.Coli* DH5α semeadas em uma placa de petri contendo meio LB agar sem antibiótico foram mantidas em estufa a 37°C por 16 horas. Colônias foram transferidas da placa para um tubo plástico de 15mL contendo 10mL de meio LB líquido e crescidas com agitação a 37°C por 16 horas. O volume final do tubo foi transferido para um erlenmeyer autoclavado com capacidade de 2 Litros contendo 500mL de meio LB líquido sem antibiótico que foi vedado e colocado sob agitação por 4 horas. Um microlitro do meio foi utilizado para quantificação no espectrofotômetro à luz visível a 600nm usando meio LB estéril como normalizador para verificar densidade óptica (O.D.). Ao atingir a O.D. entre 0,4 e 0,6 o meio de cultura foi centrifugado em tubos plásticos de 50mL a 16.000 x G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e todas as bactérias ressuspensas em 50mL de TFBII (acetato de potássio 0.03M, MnCl₂ 0.05M, KCl 0.1M, CaCl₂ 0.01M, 15% de Glicerol) filtrado gelado, em um único tubo centrifugado a 16.000 x G a 4°C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas gentilmente em 20mL de TFBII (MOPS 0.02M, CaCl₂ 0.075M, KCl 0.01M, 15% de Glicerol) filtrado gelado. Cerca de 300mL da solução de bactérias feitas competentes foram adicionados a criotubos pré-resfriados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

III.XV Transformação bacteriana por choque térmico

Adicionados 100µL de células DH5α competentes descongeladas em gelo a reação de ligação incubando em gelo por 30 minutos. As soluções foram incubadas em banho a 37°C por exatos 5 minutos e recolocadas imediatamente em gelo. Volume transferido para tubos plásticos de 15mL contendo 1mL de meio LB e incubado em agitador por 1 hora a 37°C. Volume transferido para tubos de microcentrifuga centrifugados por 2 minutos a 16.000 x G a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 100µL de meio LB, distribuído em placas contendo meio LB com agar a 1% e Ampicilina pré-aquecidas em estufa a 37°C. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 16 horas e guardadas a 4°C.

III.XVI Triagem das colônias contendo o vetor pcDNA3

A triagem das colônias contendo o inserto genômico subclonado no vetor pcDNA3 foi feita por PCR como descrito anteriormente usando os iniciadores específicos para este vetor PCDNA-1S (5'-CACTATAGGGAGACCCATGGAC-3') e PCDNA-1A (5'-CTGATCAGCGAGCTCTAGCA-3') que se encontram respectivamente a 100pb a 5' e a 3' do sítio de clonagem múltipla deste vetor. As colônias consideradas positivas pela PCR foram submetidas à extração de plasmídeo e digestão com as enzimas *EcoRV* e *NotI*, seguido de eletroforese, como descrito anteriormente, para a observação do inserto isolado.

III.XVII Seqüenciamento do plasmídeo

O seqüenciamento das construções foi realizado a partir de produto amplificado por PCR em reação de 10µL contendo 1µL de plasmídeo purificado de colônias positivas, tampão a 1X, MgCl₂ a 1.5mM (Invitrogen, Carlsbad CA), cada dNTP a 200µM, DMSO a 10%, cada iniciador a 0.1µM e 0.5U de polimerase *Taq* de DNA (Invitrogen, Carlsbad CA). Em termociclador, após desnaturação a 94°C por 2 minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por 1

minuto. A extensão final foi realizada a 68°C por 10 minutos. Os iniciadores utilizados foram aqueles específicos para o vetor pcDNA3 (PCDNA-1S e PCDNA-1A). O produto desta amplificação foi purificado com o sistema *Illustra GFX* (GE Healthcare) como descrito anteriormente. As reações de seqüenciamento foram realizadas em volume de 10µL contendo 4µL de *DYEnamic ET Terminator Sequencing Premix* (GE Healthcare), 2,5µL de cada iniciador a 2µM e 2µL do produto amplificado. Os iniciadores sentido (que hibridam com a fita molde do DNA) utilizados para o seqüenciamento (FRAX-18S GCGTTCAGGCTTCTGTGTTT; FRAX-19S TTCCTGCATTTGCCTTATCA; FRAX-20S TGATGTTCTTCAAATTCAGCCTA; FRAX-21S CTCCTACACCTTGCCAATCA; FRAX-22S TTGAGTTTTTAGATTTGTATCCTTGG) cobrem a extensão do inserto separados 500pb entre si. Em termociclador, as amostras foram submetidas a 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 52°C por 15 segundos e 60°C por 1 Minuto. Após a reação de amplificação, foram adicionados aos produtos de seqüenciamento 25µL de etanol 100% gelado. As soluções foram centrifugadas a 4°C e 16.000 x G por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e 100µL de etanol 70% gelado foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 4°C e 16.000 x G por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras secas em estufa a 37°C por 6 horas. As amostras foram ressuspensas em 10µL de *Loading Solution for MegaBace* (GE Healthcare) e a solução foi aplicada no seqüenciador automático Megabace 1000.

III.XVIII Estoque de colônias

700µL de meio LB contendo células positivas para as construções foram transferidas para criotubos aos quais se adicionou 300µL de Glicerol 87%. Os criotubos foram congelados imediatamente com nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

III.XIX Extração de plasmídios

As construções com pcDNA3 que tiveram a presença do inserto confirmada pela digestão e sequência sem inserção de mutações confirmada por sequenciamento foram extraídos por reação de lise alcalina com o sistema *Midiprep Kit* (Qiagen). 2μL do produto purificado foram aplicados em gel de agarose a 0,8%, submetido a eletroforese por 30 minutos a 100V, corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta. O padrão de peso molecular *High Mass DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad CA) foi usado para inferir a concentração da amostra.

III.XX Produção da construção contendo deleção

A deleção dirigida na construção contendo o éxon alternativo 12 foi realizada com enzimas de restrição a partir de desenho experimental baseado em mapas de restrição do vetor e do segmento genômico criados com a ferramenta computacional *Webcutter* (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>). As enzimas utilizadas foram adquiridas da *New England Biolabs* (NEB) e Promega a partir de insertos purificados de colônias transformantes para as clonagens com as construções inalteradas. A variante contendo deleção foi clonada em bactérias e posteriormente transfectada em células de mamíferos seguindo os mesmos protocolos empregados para a construção original.

A construção contendo deleção foi gerada utilizando inserto contendo o éxon 12 purificado a partir de vetor pcDNA3 criado na subclonagem. O inserto foi isolado do vetor pcDNA3 por digestão dupla com as enzimas *NotI* e *BstXI* (NEB) em reação de 50μL contendo 5μL de NEBuffer 3, BSA a 100μg/ml e 4μL de cada enzima. A reação foi incubada por 12 horas a 37°C e purificada em gel de agarose de baixo ponto de fusão com o sistema *Illustra GFX*, isolando a banda de migração maior referente ao inserto. Esta construção foi utilizada para gerar a variante deletada, obtida como descrito abaixo.

Clone gFX11X13Δi12:

Para a deleção, a construção foi digerida com 1μL da enzima *XmnI*, 5μL de *NEBuffer 2* (NEB) e BSA a 100μg/ml, em reação de volume final 50μL. A reação foi incubada a 37 °C por 6 horas e purificada em agarose de baixo ponto de fusão para isolar as bandas de 680pb e 2009pb que foram ligadas nas proporções molares 5:1 e 2:1, ao vetor pcDNA3.1, digerido com as enzimas *BstXI* e *NotI* como previamente descrito. Um resumo da deleção é apresentado na Figura 8 e na tabela 3.

Clone	Digestão	Purificação com <i>Low Melt</i>	Ligação
gFX11X13Δi12	<i>XmnI</i>	bandas de 680pb e 2009pb	Vetor pcDNA3 digerido com <i>BstXI</i> e <i>NotI</i>

Tabela 3: Resumo das etapas para a construção dos vetores contendo o éxon 12 de *Fmr1* com diferentes deleções dirigidas.

gFX11X13Δi12

Figura 8: Representação esquemática das deleções realizadas na construção genômica contendo o éxon 12. As barras azuis representam a sequência do éxon 12, flanqueado pelos íntrons 11 e 12 representados em verde. Os éxons 11 e 13 não estão representados.

III.XXI Clonagem das construções contendo deleções

As 4 construções contendo as deleções foram transformadas em bactérias DH5α quimiocompetentes por choque térmico. As colônias resultantes foram selecionadas por PCR utilizando os iniciadores específicos para o vetor pcDNA3 (PCDNA-1S e PCDNA-1A). Os plasmídios das colônias contendo as seqüências desejadas foram extraídos das bactérias por lise alcalina (Midiprep).

III.XXII Transfecção em células de rato

Plasmídios pcDNA3 purificados contendo as construções que compreendem o éxon 12 e não recombinantes foram transfectadas em células C6 de rato. As células foram mantidas em cultura em placa de 10cm com meio DMEM (FBS a 10%, com ou sem P/S/G) até cerca de 60 a 80% de confluência. Na véspera, o meio foi substituído por DMEM contendo FBS a 5% (P/S/G). 15µg ou 30µg de plasmídio purificado (Midiprep)

foram diluídos em 1,5mL de DMEM mínimo, sem soro, sem P/S/G. A solução foi misturada gentilmente e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram acrescentados 45µL de Lipofectamine LTX (Invitrogen) e a solução foi misturada gentilmente e posteriormente incubada a temperatura ambiente por 25 minutos. O meio das células foi substituído por 4,5mL de meio DMEM (FBS 10%, P/S/G) novo. Após 25 minutos de formação dos complexos DNA-lipofectamine, foi acrescentado a mistura às células. A reação foi incubada à 37°C, com CO₂ a 5%, por 12 ou 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS-A e raspadas com raspador estéril. Em tubos de 15mL as células foram coletadas por centrifugação a 16.000 x G por 8 minutos a 4°C, desprezando o sobrenadante.

III.XXIII Análise da expressão das construções

As células C6 transfectadas com a construções original, vetor não recombinante ou construção deletada foram prontamente submetidas a extração de RNA total por método de Cloreto de Lítio e Uréia como descrito anteriormente. O RNA extraído foi utilizado para síntese de cDNA com SuperScript III (Invitrogen) como descrito, o qual foi submetido a amplificação específica por PCR para determinar a presença de transcritos referentes a expressão dos plasmídios transfectados. A reação de PCR utilizou iniciador específico para a região do vetor pcDNA3.1 adjacente ao inserto transcrita para identificação do RNAm (*FLAG*) (*FLAG-S*: 5'-TACGAGGACGATGACGATGA-3') e para a seqüência do éxon 13 (*FLAG-13R*: 5'-GGCATTAGCGATGCTGTCTT-3'). A reação foi realizada com volume total de 10µL com tampão (Invitrogen) a 1X, MgCl₂ 1.5mM (Invitrogen), 200µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), DMSO a 10%, cada iniciador a 0,1µM e 0,5U de polimerase *Taq* de DNA (Invitrogen, Carlsbad CA). Em termociclador, após uma desnaturação a 94°C por dois minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por um minuto. A Extensão final foi a 68°C por sete minutos. A visualização dos produtos foi feita em gel de agarose

0,8% com brometo de etídio (2,5mM) observando as amostras à luz ultravioleta após eletroforese em tampão TBE 1X a 100V por 30 minutos. O padrão de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) foi aplicado juntamente com as amostras.

RESULTADOS

I. Estudo do padrão de expressão do éxon 12 de Fmr1:

O éxon 12 do gene Fmr1 foi identificado em transcritos de cérebro, no entanto seu padrão de expressão ainda não é conhecido. A determinação de variações nos níveis de inclusão deste éxon em diferentes áreas do encéfalo e em diferentes etapas pode indicar processos regulados que sugerem uma função para este segmento.

I.I Obtenção das amostras

Para averiguar este padrão de expressão foram utilizados ratos Wistar machos, com 19 dias de desenvolvimento embrionário (E19) ou no segundo dia pós-natal (P2) foram sacrificados por saturação de CO₂ para extração do encéfalo, a partir do qual foram dissecados hipocampo, córtex cerebral frontal e cerebelo). Foram selecionados para o estudo oito animais machos de cada idade, sendo que a sexagem dos animais em P2 foi feita à inspeção visual dos indivíduos, enquanto a dos animais em E19 por reação de PCR, devido a dificuldade na distinção da genitália externa nesta idade. Para a sexagem molecular realizada por PCR, utilizamos iniciadores específicos para o gene Tspy do cromossomo Y de rato, a partir de DNA extraído do encéfalo dos animais. Os animais foram diferenciados a partir da análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos desta reação (Fig 9). Foram considerados machos, os animais cujo produto de PCR apresentou 600 pares de bases (pb). Estes animais foram selecionados para o restante do estudo.

Figura 9: Gel de agarose a 2% em que foram submetidos a eletroforese 10 μ L de produto de PCR amplificados com iniciadores do gene Tspy. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio.. As amostras que apresentam amplificação de um produto de 600pb (seta) são referentes aos indivíduos machos (2, 3, 4, 5, 8, 9, 10,11). As bandas de migração mais lenta (ponta de seta) correspondem ao DNA genômico. O padrão de tamanho e peso molecular Low Mass DNA Ladder foi aplicado ao lado das amostras (M)

As diferentes regiões do encéfalo dos animais selecionados foram individualmente submetidas a extração de RNA total, que foi mantido precipitado em etanol a -80°C. Alíquotas de 100 μ L de etanol contendo RNA precipitado foram centrifugadas e todo o RNA obtido foi ressuscitado e dosado em gel de agarose, para evitar dosagem concomitante de DNA genômico. As amostras de RNA foram aplicadas no gel de agarose em três concentrações diferentes para determinar a massa de RNA por comparação com as bandas de massa conhecida do padrão *High Mass DNA Ladder* (*Invitrogen*), o que permitiu extrapolar a concentração de RNA total na solução de etanol original (Fig 10). A partir destas quantificações, volume de etanol equivalente a 2 μ g de RNA total foi centrifugado e ressuscitado para ser utilizado na reação de síntese de cDNA. Devido à presença, em intensidades variáveis, de DNA genômico

nas amostras de RNA purificadas (Fig. 10), estas foram submetidas a tratamento com DNaseI, antes da reação de síntese de cDNA pelo sistema *SuperScript III® First Strand Synthesis System for RT-PCR*.

Figura 10: Exemplo de dosagem de RNA em gel de agarose 0,8% em que foram submetidos a eletroforese 10µL de RNA total purificado a partir de córtex frontal de um animal em diferentes diluições (2=diluído 4X, 3=diluído 2X e 4=não diluído). Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio. O padrão de tamanho e peso molecular High Mass DNA Ladder foi aplicado ao lado das amostras (M). As bandas de RNA (18S e 28S) estão indicadas, assim como o DNA genômico.

Após síntese do cDNA, a qualidade de cada amostra foi averiguada por PCR com iniciadores específicos para o gene da actina-beta de rato (Fig. 11 A). A presença nestas amostras de transcritos referentes ao *Fmr1* foi posteriormente confirmada por PCR utilizando iniciadores específicos para região invariável deste gene (iniciadores hibridando nos éxons 10 e 11) (Fig. 11 B). Os oligonucleotídeos sintetizados

especificamente para o estudo de expressão por PCR em tempo real hibridaram-se respectivamente nos éxons 12 e 13 do Fmr1 e foram testados em reações de PCR não quantitativo, averiguados em gel de agarose para comprovar a especificidade dos produtos amplificados (Fig 11 B e C).

Figura 11: Exemplo de teste das amostras de cDNA em géis de agarose 0,8% nos quais foram submetidos a eletroforese amostras dos produtos de PCR realizados com iniciadores que amplificam o gene da actina beta de rato (A: 1, 2, 3 e 4); a região constante do gene Fmr1 (B: 1, 2, 3 e 4) e um segmento do cDNA do Fmr1 que inclui partes dos éxons 12 e 13 (C: 1, 2, 3 e 4). As reações mostradas foram realizadas utilizando cDNA. Géis corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta. Os padrões de tamanho e peso molecular Low Mass DNA Ladder (A 1), O' Gene Ruler 1Kb (B 1) e 123 bp Mass Ladder (C 1) foram aplicados juntamente com as amostras. Tamanhos de DNA estão indicados em pb à esquerda de cada figura. Ao lado das figuras B e C estão indicados o local de hibridação dos iniciadores (setas) em relação aos éxons do Fmr1 (blocos).

I.II Estudo da expressão por PCR em tempo real

As amostras de cDNA das regiões encefálicas dos animais foram analisadas por PCR em tempo real em equipamento automatizado utilizando iniciadores específicos para éxons 10 e 11 do gene *Fmr1* (segmento invariável), e iniciadores específicos para o éxon 12, que, com iniciadores hibridando no éxon 13, definiu um amplicom de intensidade variável. As reações com os iniciadores para a região constante foram utilizadas como controle interno, representando o nível de expressão combinado de todas as variantes de RNAm do gene *Fmr1*, enquanto as reações com os iniciadores específicos para o éxon 12 visavam averiguar os níveis de expressão apenas das variantes de transcrito que incluíam esta sequência.

I.II.I Expressão gênica no córtex

A partir dos dados de expressão gerados foram criados gráficos para comparar os valores referentes aos diferentes amplicons, os quais foram submetidos a análise estatística pelo teste *t* (de *student*) para comparação em pares. Para todas as amostras foram realizadas duas comparações, uma utilizando os níveis de transcrição dos amplicons referentes aos éxons invariáveis de *fmr1* como referência, sem normalizador externo, e uma utilizando o gene da Ciclofilina como normalizador. Nas amostras extraídas do córtex cerebral dos animais, cujos dados não foram normalizados pela Ciclofilina (Fig 12 A), os níveis de expressão para o conjunto de variantes do *Fmr1*, representado por “*Fmr1*” apresentam grande similaridade entre as duas idades observadas. Por outro lado, os níveis de expressão referentes apenas às variantes que incluem o éxon 12, representadas por “*Fmr1* E12”, apresenta um aumento significativo da idade embrionária (E19) à pós-natal (P2), quando estas variantes correspondem a cerca da metade de todas aquelas expressas pelo *Fmr1*. Esta diferença mostrou-se significativa (teste *t* de *student*; 52,11 x 11,15; n=8; p=0,0015). Na análise utilizando a Ciclofilina como normalizador observou-se uma tendência, entre E19 e P2, à diminuição dos níveis dos transcritos do *Fmr1* que não alcançou significância estatística (teste *t* de *student*; 1,17 x 0,88; n=8; p=0,19). Nesta

análise normalizada foi observada a mesma relação de aumento da inclusão do éxon 12 durante o desenvolvimento (teste *t* de *student*; 0,76 x 0,22; n=8, p=0,006).

Figura 12: **(A)**. Níveis de expressão não normalizados para os amplicons variável (Fmr1 E12) e invariável (Fmr1) em região cerebral cortical de animais em idade pré-natal (E19) e pós-natal (P2). **(B)**. Análise similar normalizando todos os valores aos níveis de expressão do gene da Ciclofilina de rato. Significância: ** p<0,01. Barras correspondem ao erro padrão.

I.II.II Expressão gênica no hipocampo

A análise dos níveis de expressão do Fmr1 no hipocampo utilizando o amplicom do controle interno revelou baixa inclusão do éxon 12 nos transcritos (Fig 13). É importante observar que, no hipocampo, os animais em P2 apresentam níveis de expressão mais elevados que em E19 (teste *t* de *student*; 33,7 x 134,3; n=8; p=0,0035). Observou-se também uma tendência ao aumento da inclusão do éxon 12 nos transcritos do Fmr1, entre E19 e P2 (teste *t* de *student*; 7,8 x 19,1; n=8; p=0,06).

Figura 13: Níveis de expressão não normalizados para os amplicons variável (Fmr1 E12) e invariável (Fmr1) em região hipocampal de animais em idade pré-natal (E19) e pós-natal (P2). Significância: ** $p < 0,01$. Barras correspondem ao erro padrão.

Os dados referentes a expressão no hipocampo dos animais quando normalizados pela Ciclofilina foram considerados não coerentes com a análise apresentada na figura 14 e portanto não apresentados. A distorção dos dados após a normalização com este gene foi resultado do seu nível de expressão significativamente reduzido no hipocampo de animais em idade Pré-natal (E19) em relação a outras regiões e idade em que o nível de expressão foi homogêneo.

Figura 14: Níveis de expressão do gene da Ciclofilina, em E19 e P2, no hipocampo, córtex frontal e cerebelo. Barras correspondem ao erro padrão.

I.II.III Expressão gênica no cerebelo

As amostras provenientes do cerebelo de animais com dois dias de vida (P2) foram utilizadas para avaliação dos níveis gerais de expressão do Fmr1 e da inclusão do éxon 12 em seus transcritos. Não dispúnhamos de tecido cerebelar em E19. É possível observar que em P2 não há grande variação dos níveis do RNAm do Fmr1 e que há níveis razoáveis de inclusão do éxon 12 do Fmr1 que flutuam entre 20% e 50%, respectivamente para as amostras não normalizadas e normalizadas (Fig 15).

Figura 15: **(A)**. Níveis de expressão não normalizados no cerebelo para os amplicons variável (Fmr1 E12) e invariável (Fmr1) em animais no segundo dia pós-natal (P2) no cerebelo. **(B)**. Mesma análise utilizando o gene da Ciclofilina como normalizador. Barras correspondem ao erro padrão.

I.II.IV Avaliação geral do estudo da expressão do éxon 12 do Fmr1

A razão entre os valores obtidos da expressão do amplicom variável ("Fmr1 E12") e o amplicom invariável foi calculada para cada área do encéfalo de cada animal nas duas idades. Esta representa outra forma de averiguação dos dados, em que, efetivamente, se analisa qual é a taxa de inclusão do éxon 12 nos transcritos do Fmr1 e se há variação significativa entre E19 e P2. Estes dados foram sintetizados em um gráfico (Fig 16), em que estão discriminadas o percentual de inclusão do éxon 12 em relação à expressão global de Fmr1. Os dados mostram que no hipocampo, as variantes que contêm a sequência do éxon 12 constituem no período embrionário (E19) 22% de todas as isoformas de Fmr1, valor que diminui para quase a metade após cinco dias de desenvolvimento, representando 13% das isoformas em P2. Esta diminuição da participação das variantes que incluem o éxon 12 é estatisticamente

significativa segundo o teste *t* de *student* ($0,22 \times 0,13$; $n=8$; $p=0.016$). Para os valores referentes às regiões corticais dos animais, uma tendência inversa pôde ser observada. No período pré-natal (E19), as variantes cerebro-corticais que incluem o éxon 12 tiveram uma participação na expressão global do Fmr1 (11%) menor do que a observada no hipocampo (22%), o que foi sustentado estatisticamente (teste *t* de *student*; $0,22 \times 0,11$; $n=8$; $P=0.004$). Durante o desenvolvimento, os níveis de inclusão do éxon 12 nas variantes do Fmr1 aumentou consideravelmente, fazendo com que os transcritos que contém a seqüência deste éxon correspondesse a mais da metade de todas as variantes produzidas pelo gene (57%). Este aumento foi estatisticamente significativo pelo teste *t* de *student* ($0,11 \times 0,57$; $n=8$; $p<0,0001$), assim como foi significativa a diferença de inclusão do éxon 12 em córtex em relação a hipocampo e cerebelo para a idade pós-natal (P2) (teste *t* de *student*; $0,57 \times 0,13$; $n=8$; $p<0,0001$ e $0,57 \times 0,20$; $n=8$; $p<0,0001$ respectivamente). Para os dados do cerebelo, os níveis de participação das variantes que incluem o éxon 12 se encontram em um nível intermediário entre os do córtex e hipocampo em E19 e hipocampo em P2 (20%).

Figura 16: Gráfico mostrando para cada área do encéfalo, de cada idade, o percentual da inclusão do éxon 12 nos transcritos do Fmr1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barras correspondem ao erro padrão.

II. Análises *in silico* das seqüências genômicas do Fmr1:

A disponibilização de bancos de dados de seqüências expressas (EST) para diversas espécies permitiu, nos últimos anos estudos globais de hibridação *in silico* com seqüências genômicas que identificaram um grande número de eventos de *splicing*. Recentemente, estudos em larga escala com *microarrays* utilizando sondas para junções exônicas incrementaram os bancos de dados de eventos de *splicing*

conhecidos. A análise destes eventos permitiu a identificação de motivos de RNA relacionados a regulação do *splicing* (Blencowe, 2006). Dispõe-se atualmente de ferramentas computacionais que utilizam estes bancos de dados de motivos de regulação para várias espécies, para identificar em seqüências de DNA, segmentos exônicos e intrônicos que podem participar da regulação do *splicing* de éxons próximos. A identificação destes segmentos candidatos na seqüência do clone genômico do Fmr1 permite a seleção de regiões cuja deleção possui maior probabilidade de causar padrões alterados de expressão exônica em células transfectadas.

As buscas utilizaram as ferramentas *Acscan2*, *ESE Finder 3*, *ESR Search* e *ASD – Alternative Splicing* e foram realizadas para a seqüência do éxon 12 do Fmr1 e para as seqüências intrônicas que o flanqueiam, sendo o íntron 11 (476pb) e os 500pb a 5' do íntron 12. As buscas foram realizadas separadamente para ratos, camundongos e humanos, comparando as seqüências de cada espécie com o banco de dados específico para a mesma.

II.1 Busca por ESE e ESI no éxon 12

Para a busca na seqüência do éxon 12 foram utilizadas as quatro ferramentas, uma vez que todas possuem bancos de dados para este tipo de seqüência. A ferramenta *Acscan2* identificou no éxon 12 elementos candidatos a acentuadores e inibidores do *splicing* (Fig. 17). Da mesma forma, utilizando *ASD – Alternative Splicing*, apenas uma seqüência exônica silenciadora foi identificada (Fig. 18). Para as duas ferramentas não há identificação de quais os possíveis elementos em *trans* relacionados.

TAGTGG
 TTAGTG
 GTTAGT
 TGTTAG
 GTGTTA AGTTGT
 GTGTTAGTGGCTTCATCAGTTGTAGCAGGGGAATCCCAGAAACCTGAAGGCTTGGCAG
|.....|.....|.....|.....|.....|.....
 10 20 30 40 50 60

[illegible]

GTGTTAGTGGCTTCATCAGTTGTAGCAGGGGAATCCCAGAAACCTGAACTCAAGGCTTGGCAG
.....|.....|.....|.....|.....|.....
 10 20 30 40 50 60

71

A ferramenta ESE Finder, que busca especificamente acentuadores, identificou nas 63 bases do éxon 12 do Fmr1 diversas seqüências candidatas a atuarem na regulação do *splicing*, discriminando-as com um sistema de cores por elemento protéico em *trans* ligante e relacionando-as por probabilidade de ligação (Fig. 19). O fator regulador em *trans* denomina a seqüência em *cis*, que é o motivo de RNA para ligação à respectiva proteína. Embora os resultados sejam processados *in silico* em relação à seqüência de DNA, deve-se lembrar que a ligação *in vivo* e *in vitro* se dá entre RNA e proteína. A região com a maior densidade de candidatos identificados com probabilidades mais altas situa-se entre as bases 31 e 46 do éxon 12 e mostra potencial para interação com proteínas SF2/ASF e SC35.

Figura 19: Representação gráfica dos resultados das análises *in silico* realizadas com a ferramenta ESE Finder de busca por ESEs regulatórios do *splicing* do **éxon 12 do Fmr1 humano**. No eixo horizontal está representada a seqüência do éxon 12 que foi utilizada nesta busca na qual estão indicadas as posições dos nucleotídeos inicial, final, 31 e 46. Sobre a seqüência estão posicionadas colunas cujas larguras delimitam a extensão de uma seqüência candidata a elemento regulatório do *splicing*. A cor de cada barra representa uma categoria de regulador distinta como apresentado na legenda. A altura de cada barra é determinada pelo valor no eixo vertical referente a probabilidade relativa de cada elemento identificado de participar na regulação do *splicing* do éxon.

A ferramenta ESRsearch, também específica para seqüências exônicas, identificou elementos candidatos a acentuadores e silenciadores no éxon 12 do Fmr1 humano. Seqüências com função conhecida sobre o *splicing* foram identificadas por um sistema de cor, enquanto aquelas com função não determinada foram apenas localizadas sobre o éxon. Nesta ferramenta não é apresentado valor de probabilidade ou ligante em *trans* conhecido.

Figura 20: Representação gráfica dos resultados das análises *in silico* realizadas com a ferramenta ESR search de busca por elementos exônicos regulatórios do *splicing* do **éxon 12 do Fmr1 humano**. Sobre a seqüência do éxon 12 estão localizados os elementos candidatos a regulação do *splicing*. Os elementos em azul representam silenciadores de *splicing* enquanto os em vermelho os acentuadores. Os elementos em cinza não possuem informações suficientes para determinar sua atuação na regulação do *splicing*.

As mesmas buscas realizadas a partir da seqüência humana foram realizadas na seqüência do éxon 12 do Fmr1 de camundongo, utilizando os bancos de dados específicos para a espécie. Apenas as ferramentas *Acscan2* e ASD – Alternative *Splicing* possuem bancos de dados para esta espécie, das quais a última não retornou nenhum resultado. Na busca com *Acscan2*, apenas acentuadores exônicos foram identificados (Fig. 21), apresentando sobreposição quase total com os resultados no éxon 12 do *FMR1* humano (Fig 17).

Figura 21: Representação gráfica dos resultados das análises *in silico* realizadas com a ferramenta *Acescan2* para o éxon 12 do Fmr1 murino. Sobre a sequência do éxon estão localizados segmentos candidatos a acentuadores do *splicing*.

A busca utilizando a sequência do éxon 12 do Fmr1 de rato foi realizada apenas com ASD – Alternative *Splicing*, a única ferramenta com banco de dados específico para esta espécie, no entanto a análise não retornou nenhum resultado.

II.II Busca de ISE e ISS no íntron 11

Análises semelhantes foram realizadas isoladamente para os íntrons que flanqueiam o éxon 12 (respectivamente, íntron 11 e íntron 12). A sequência completa do íntron 11 do Fmr1, que possui menos de 500pb, foi submetida à análise utilizando as ferramentas que possuem bancos de dados para elementos regulatórios intrônicos, *Acescan2* e ASD - Alternative *Splicing*, para humano, camundongo e rato.

Com a ferramenta *Acescan2* foram identificados no íntron 11 do *FMR1* humano apenas elementos acentuadores do *splicing* (Fig. 22).

Figura 22: Representação gráfica dos resultados da análise *in silico* realizada com a ferramenta *Acescan2* para o íntron 11 do Fmr1 humano. Sobre a sequência do íntron estão localizados segmentos candidatos a acentuadores do *splicing*.

Com a ferramenta ASD – Alternative *Splicing* foram identificados na sequência do íntron 11 humano apenas elementos acentuadores de *splicing* (Fig. 23).

Match at 70 nts (100 sim%) (intronic) ISE - amyloid precursor protein, exon 8	query subject	ATGTTT ggtatTTTTgGATGTTTtctctg
Match at 79 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN gatgttttctCTGGttagacttgt
Match at 323 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN aatacaccttCTGTtagttgcatt
Match at 375 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN ctaattttctCTGTttgaactaat
Match at 389 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN ttgaactaatCTGTttagaaatgg
Match at 414 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN tttaaaagtcCTGCagtgaagtc
Match at 428 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN agtgaagtcCTGCgttcaggctt
Match at 442 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN gttcaggcttCTGTgtatcgtttg
Match at 489 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN attccttataCTGCtttag
Match at 218 nts (100 sim%) (intronic) ISE - beta tropomyosin intron 6	query subject	WGGG cacaaaataaTGGGgttgcattta
Match at 400 nts (100 sim%) (intronic) ISE - beta tropomyosin intron 6	query subject	WGGG tgtttagaaaTGGGtttaaaagtc

Figura 23: Representação gráfica dos resultados da análise *in silico* realizada com a ferramenta ASD – Alternative *Splicing* para o íntron 11 do FMR1 humano. Sobre a sequência do íntron estão localizados segmentos candidatos a acentuadores do *splicing*.

[illegible]

78

A mesma análise *in silico* foi realizada para o íntron 11 do Fmr1 de rato com a única ferramenta que dispõe de banco de dado para esta espécie, ASD – Alternative *Splicing*. Esta busca identificou apenas um elemento regulatório intrônico acentuador de *splicing* (Fig. 25), que tem como ligantes em *trans* reconhecidos as proteínas SF2/ASF e hnRNP H.

Match at 229 nts (100 sim%) (intronic) ISE - <u>thyroid hormone</u> <u>receptor , exon 9</u>	query subject	GGGTG tttctgttgaGGGTGgacttttttt
--	------------------	------------------------------------

Figura 25: Representação gráfica dos resultados da análise *in silico* realizada com a ferramenta ASD – Alternative *Splicing* para o íntron 11 do Fmr1 de rato. Sobre a sequência do íntron está localizado o segmento candidato a acentuador do *splicing*.

II.III Busca por ISE e ISS no íntron 12

Para as buscas de elementos regulatórios de *splicing* no íntron 12 de Fmr1 foram utilizados os 500pb a 5' deste íntron, região mais provável para a presença de elementos que influenciam a inclusão éxon 12. Foram utilizadas nesta análise as duas ferramentas que possuem bancos de dados para busca de seqüências intrônicas, *Acescan2* e ASD – Alternative *Splicing*, para as seqüências de humano, camundongo e rato.

Na busca com *Acescan2* foram identificados apenas elementos acentuadores de *splicing* (Fig. 26).

A ferramenta ASD – Alternative *Splicing* identificou no íntron 12 do *FMR1* humano diversas seqüências candidatas a elementos acentuadores de *splicing* e apenas uma com potencial para atuar como silenciador intrônico, nenhuma delas com ligantes em *trans* conhecidos (Fig. 27).

Match at 45 nts (100 sim%) (intronic) ISE - amyloid precursor protein, exon 8	query subject	ATGTTT ttatatattttaATGTTTattcccccttg
Match at 487 nts (100 sim%) (intronic) ISE - amyloid precursor protein, exon 8	query subject	ATGTTT ttaaacaatagATGTTTatttggtt
Match at 97 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN ggattaggggaCTGGagggaggagt
Match at 137 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN atccattgccCTGGagttaaagct
Match at 252 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN ttaagccataCTGAagtactttga
Match at 271 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN tttgagttctCTGAacattctcgt
Match at 321 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN caggtttactCTGCctggaatgct
Match at 325 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN tttactctgcCTGGAatgcttttt
Match at 421 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN accccccttgaCTGGttcaagagcc
Match at 443 nts (100 sim%) (intronic) ISE - dmpk, exon 16	query subject	CTGN ccttcccccttCTGTtttgcaatgt
Match at 92 nts (100 sim%) (intronic) ISE - beta tropomyosin intron 6	query subject	WGGG cctcaggattAGGGactggaggga
Match at 101 nts (100 sim%) (intronic) ISE - beta tropomyosin intron 6	query subject	WGGG tagggactggAGGGaggagtgttt
Match at 116 nts (100 sim%) (intronic) ISE - beta tropomyosin intron 6	query subject	WGGG ggagtgtttgTGGGtatgtggatc
Match at 87 nts (100 sim%) (intronic) ISE - gh-1 intron 3	query subject	GGNNNNGGG atgatcctcaGGATTAGGGactggaggga
Match at 452 nts (100 sim%) (intronic) ESS - pcca: propionyl coenzyme a carboxylase, alpha polypeptide(intron2)	query subject	AATGTG tctgtttttgcAATGTGctcaccctca

Figura 27: Representação gráfica dos resultados da análise *in silico* realizada com a ferramenta ASD – Alternative *Splicing* para o íntron 12 do *FMR1* humano. Sobre a seqüência do íntron estão localizados segmentos candidatos a reguladores do *splicing*. Está indicado com um retângulo o único elemento identificado candidato a silenciador de *splicing*.

Para o íntron 12 murino foi também identificada apenas uma sequência candidata a elemento silenciador de *splicing* com a ferramenta ASD – Alternative *Splicing* (Fig. 29). Este elemento tem diversos ligantes em *trans* já identificados, PTB/nPTB, KSRP, FBP, hnRNP H e hnRNP F.

```

Match at 92 nts
(100 sim%)   query           GGGGGCTG
(intronic) ISS - subject    cctcatgggttGGGGGCTGgttgaggagt
c-src. exon n1

```

Figura 29: Representação gráfica do resultado da análise *in silico* realizada com a ferramenta ASD – Alternative *Splicing* para o íntron 12 do Fmr1 de camundongo. Sobre a sequência do íntron está localizado o segmento candidato a silenciador do *splicing*.

A busca por elementos na sequência do íntron 12 do Fmr1 de rato foi realizada com a única ferramenta que possui banco de dados para elementos intrônicos desta espécie, no entanto a análise não retornou nenhum resultado.

III. Estudo da expressão do mini-gene do éxon 12 do Fmr1:

III.I Obtenção do clone de Fmr1 tipo selvagem

Para estudar a regulação do *splicing* do éxon 12 do Fmr1 foi criado um mini-gene, que consiste em um segmento genômico do Fmr1 contendo o éxon de interesse e os dois éxons adjacentes (Fig. 30). Este segmento, amplificado por PCR, foi ligado direcionalmente em um vetor de expressão clonado em bactéria e posteriormente transfectado em célula animal. A expressão deste vetor gera um RNA contendo o segmento de Fmr1 clonado flanqueado por uma região 3' não traduzida e uma

sequência (*FLAG*) a 5' contida no vetor. A maquinaria de *splicing* da célula pode gerar possivelmente dois transcritos maduros, que diferem pela inclusão do éxon 12. O estudo do RNAm da célula permite averiguar o padrão de expressão deste mini-gene (Fig. 30).

Fig. 30: Representação esquemática do inserto do vetor PCDNA3 que consistirá o mini-gene gerado com o segmento do *Fmr1* que inclui da primeira base do éxon 11 a última do éxon 13. O RNA produzido a partir deste mini-gene inclui o segmento clonado flanqueado por uma sequência não traduzida a 3' e uma sequência sinal (*FLAG*) a 5' originados do vetor utilizado. O *splicing* deste RNA pode gerar transcritos maduros que incluem ou excluem o éxon 12. Os números nas caixas indicam os segmentos expressos.

Para a construção do mini-gene contendo parte da sequência genômica do *Fmr1* que abrange do éxon 11 ao éxon 13, DNA genômico de fêmeas de *Rattus Norvegicus* foi utilizado em reações de amplificação por PCR. Nesta reação, com iniciadores específicos que flanqueiam a região clonada e polimerase de alta fidelidade para evitar a introdução *in vitro* de erros de sequência, obtivemos produto de tamanho esperado (2849pb), como observado em eletroforese em gel de agarose (Fig 31).

Figura 31: Gel de agarose a 0,8% em que foram submetidos a eletroforese 10 μ L de produto de PCR da amplificação do segmento genômico utilizado na construção do clone. (1) Segmento genômico que compreende os éxons 11 ao 13 do Fmr1 com tamanho esperado de 2849pb. Padrão de tamanho e peso molecular *High Mass DNA Ladder*, cujas bandas de 3Kb e 2Kb estão indicadas (M). Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

O DNA amplificado foi clonado no vetor TOPO PCR 2.1 em *Escherichia coli* DH5 α e o DNA plasmidial dos clones foi submetido à PCR para identificar aquelas recombinantes (Fig. 32). 20 colônias foram analisadas pela PCR com iniciadores que hibridavam no inserto. Destas, 14 apresentaram produto de PCR do tamanho esperado. DNA plasmidial foi purificado e submetido à digestão dupla com as enzimas *EcoRV* e *NotI*, cujos sítios de restrição haviam sido inseridos na sequência dos iniciadores usados na amplificação do DNA genômico do Fmr1.

Figura 32: **(A)**. Gel de agarose a 2% em que foram submetidos à eletroforese 10µL de produtos de PCR das reações para triagem das colônias de bactéria transformadas com produtos da ligação do vetor TOPO e produto de PCR (Fmr1 X11 a X13) (1 a 20). Os iniciadores eram internos ao inserto e definiam um produto de 631pb. Amostras de DNA genômico de ratas adultas na reação de PCR como controle positivo (21 e 22). Uma reação de PCR no qual não foi aplicado amostra de DNA ou bactéria foi utilizada como controle negativo (23). (M) Padrão de tamanho e peso molecular *100bp DNA Ladder*, cuja banda de tamanho 600pb esta indicada, região em que se observa também o produto de PCR (631pb) de colônias positivas. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

(B). Gel de agarose a 0,8% em que foram submetidos a eletroforese 10µL de amostras de plasmídios extraídas de dez colônias positivas pela triagem por PCR. Amostras não digeridas (N) apresentam bandas com migração mais rápida no gel de agarose (1, 2, 3, 9 e 10) ou lenta (4, 5, 6, 7 e 8). Amostras digeridas com *EcoRV* e *NotI* (D) mostraram a banda do vetor linearizado (~5Kb) indicada como "V". a ausência de outra banda para amostras digeridas (1, 2, 3 e 10) indicam que estes clones não são recombinantes. Amostras 4 a 8 são de clones recombinantes como indicado pela presença de banda de cerca de 3Kb (I) do tamanho esperado do produto de PCR do Fmr1 (X11 a X13). A amostra 9 é provavelmente recombinante que sofreu contaminação. (M) Padrão de tamanho e peso molecular *High Mass DNA Ladder*, cujas bandas de tamanhos 3Kb, 4Kb, 6Kb e 10Kb estão indicadas. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

Uma das colônias transformantes (Fig 32, clone 4) foi selecionada para subclonagem em vetor pcDNA3 com as enzimas *EcoRV* e *NotI*. O vetor pcDNA3.1 é um vetor de expressão em células de mamíferos, cuja transcrição a 5' do sítio de clonagem múltipla é dirigida pelo promotor do citomegalovirus (CMV). O vetor contém um códon de iniciação de tradução seguido da região codificadora para o marcador *FLAG*, o sítio de clonagem múltipla, códons de parada de tradução em várias molduras de leitura e sítios de poliadenilação. A escolha da clonagem seqüencial, inicialmente no vetor TOPO PCR 2.1 e posteriormente ao vetor pcDNA3.1, deve-se à maior eficiência de clonagem no primeiro vetor.

As colônias de bactéria, geradas a partir da transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5 α competentes com produtos de ligação do vetor pcDNA3.1 e inserto purificado da digestão do clone TOPO recombinante, foram triadas em reações de PCR utilizando iniciadores específicos para o segmento clonado, identificando cerca de 80% pela amplificação de um produto de 631pb (Fig. 33). DNA plasmidial foi purificado de cinco colônias selecionadas a partir da triagem por PCR.

Figura 33: **(A)**. Gel de agarose a 2% em que foram submetidos a eletroforese 10µL de produtos de PCR das reações para triagem de 20 colônias de bactéria transformadas com produtos de ligação do vetor pcDNA3.1 e fragmento do Fmr1 (1 a 20). O tamanho esperado para estas bandas é 631pb. Uma reação de PCR no qual não foi aplicado DNA foi utilizada como controle negativo (21). (M) Padrão de tamanho e peso molecular *Low Mass DNA Ladder*, cuja banda de tamanho 800pb esta indicada. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta. Os resultados indicam quize colônias recombinantes.

(B). Gel de agarose a 0,8% em que foram submetidos a eletroforese 10µL de amostras de plasmídios extraídas de bactérias. Amostras não digeridas (N) mostraram o mesmo padrão de migração em gel de agarose. As amostras digeridas com *EcoRV* e *NotI* (D) mostraram bandas com tamanhos esperados referentes ao vetor de clonagem pcDNA3.1 (~5,5Kb) e segmento genômico (~3Kb) (indicados na figura). (M) Padrão de tamanho e peso molecular *High Mass DNA Ladder*, cujas bandas de tamanhos 3Kb, 6Kb e 10Kb estão indicadas. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

O segmento do inserto, no clone recombinante, foi inteiramente seqüenciado, bem como sua junção com o vetor pcDNA3.1, sem apresentar qualquer variação em relação à seqüência do *Genbank* (Nº de acesso: NC_005120; Fig. 34).

Figura 34: Exemplo de seqüenciamento parcial da seqüência do clone contendo o segmento genômico de Fmr1 ligado ao vetor pcDNA3.1. O eletroferograma mostra perfil de bandas a partir do seqüenciamento realizado com iniciador específico para o vetor. A seqüência na linha superior é a de referência (para o vetor, em preto, e para o inserto em vermelho). O sítio de restrição para *EcoRV* encontra-se sublinhado.

III.II Expressão do clone gFX11X13 em células C6: Análise dos produtos de *splicing*

O clone gFX11X13 foi usado para transfectar células imortalizadas de glioma de rato, C6, que foram escolhidas por ser da mesma espécie do gene em estudo. Após 24 horas a expressão heteróloga foi avaliada por RT-PCR. As transfecções foram realizadas em triplicatas e com controles negativos (pcDNA3.1 não recombinante). O transcrito total produzido pelo clone deveria conter uma região 5' UTR, região

codificadora do *FLAG*, éxons 11, 12 e 13 do Fmr1 e 3' UTR. O teste dos transcritos por RT-PCR tinha um iniciador específico à sequência do vetor (*FLAG*) e outro à sequência clonada (éxon 13 do Fmr1). Este par de iniciadores distingue a amplificação do RNAm superexpresso, não reconhecendo a expressão do Fmr1 endógeno. O amplicom para transcritos com o éxon 12 definiu um segmento de 323pb, enquanto os produtos de RT-PCR a partir de transcritos sem o éxon 12 têm um tamanho esperado de 260pb. O uso de antibióticos e soro, a incubação por 12 ou 48 horas e o dobro da quantidade de plasmídeo não alteraram os resultados (dados não mostrados). Uma terceira banda de tamanho ligeiramente maior que a banda equivalente à inclusão do éxon 12 foi observada (Fig. 35 B).

Figura 35: Géis de agarose a 2% nos quais foram submetidos a eletroforese produtos de PCR amplificados a partir das amostras de cDNA de células C6 transfectadas com vetores recombinantes e não recombinantes. **(A)**. Reação de PCR que utilizou iniciadores específicos para a sequência do gene *Fmr1*, mostrando presença de transcritos endógenos deste gene nas amostras de cDNA das células recombinantes (1 a 3) e não recombinantes (4 a 6). (7) Controle negativo. (M) Padrão de tamanho e peso molecular *Low Mass DNA Ladder*, cuja banda de tamanho de 800pb está indicada.

(B). Reação de PCR com iniciadores específicos para os transcritos de vetor pcDNA3.1 recombinante, usando cDNA de células C6 transfectadas com clones recombinantes (1 a 3) e não recombinantes (4 a 6). (7) Controle negativo. (M) Padrão de tamanho e peso molecular *50bp Mass Ladder*, cuja banda de 350pb está indicada. As setas indicam bandas de tamanho esperado para transcritos com e sem o éxon 12, conforme diagrama à esquerda da figura, no qual as setas representam os iniciadores. Ponta de seta indica banda aparentemente inespecífica. Após eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta.

Figura 36: Géis de agarose a 2% nos quais foram submetidos a eletroforese produtos de PCR amplificados a partir das amostras de cDNA de células C6 transfectadas com vetores recombinantes e não recombinantes. **(A)**. Reação de PCR que utilizou iniciadores específicos para a sequência do vetor pcDNA3.1. Células transfectadas com vetores recombinantes (1 a 3) e não recombinantes (4 a 6). (7) Controle negativo. (M) Padrão de tamanho e peso molecular *50bp Mass Ladder*, cuja banda de tamanho 550pb está indicada. As setas indicam bandas de tamanho esperado para transcritos com e sem o éxon 12, conforme diagrama à esquerda da figura, no qual as setas representam os iniciadores. Ponta de seta indica banda aparentemente inespecífica

(B). Reação de PCR com iniciadores específicos para a sequência do Fmr1 incluída no vetor. Células C6 transfectadas com vetores recombinantes (1 a 3) e não recombinantes (4 a 6). (7) Controle negativo. (M) Padrão de tamanho e peso molecular *50bp Mass Ladder*, cuja banda de 300pb está indicada. As setas indicam bandas de tamanho esperado para transcritos com e sem o éxon 12, conforme diagrama à esquerda da figura, no qual as setas representam os iniciadores. Ponta de seta indica banda aparentemente inespecífica. Após eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta.

III.III Deleções do clone gFX11X13

O clone original, gFX11X13, foi deletado na região inicial do íntron 12 do Fmr1 para a criação do clone gFX11X13 Δ i12. este clone foi originalmente produzido em bactérias (Fig. 37) e posteriormente transfectado em células C6, cuja expressão foi analisada por RT-PCR (Fig. 39).

Figura 37: Gel de agarose a 0,8% no qual foram submetidos a eletroforese produtos de PCR amplificados a partir das colônias de bactéria da transformação referente a construção deletada. Cerca de metade das colônias (1, 3 e 5) triadas apresentaram o produto de amplificação com o tamanho esperado (~2300pb). (M) Padrão de tamanho e peso molecular *Low Mass DNA Ladder*, cuja banda de 2kb está indicada. Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

O seqüenciamento deste clone mostrou que a porção do íntron 12 foi removida assim como esperado e que nenhuma alteração de nucleotídeo adicional foi introduzida na seqüência (Fig. 39).

Figura 38: Exemplo de parte do seqüenciamento realizado para averiguar a seqüência do clone contendo o segmento genômico de Fmr1 ligado ao vetor pcDNA3 contendo deleção no início do íntron 12. O eletroferograma mostra seqüenciamento realizado com iniciador específico para o inserto, alinhado a seqüência de referência da construção acima. Na seqüência de referência os caracteres em preto representam o final da seqüência do éxon 12, enquanto os caracteres em vermelho representam o início do íntron 12 antes da região deletada e os caracteres em azul representam a seqüência ainda do íntron 12 após o segmento deletado.

O estudo da expressão do clone gFX11X13Δi12 foi realizado com os iniciadores específicos para a sequência *FLAG* e para o éxon 13, assim como foi feito para o clone gFX11X13 (Fig. 35 B). A comparação da expressão destes dois clones mostrou o mesmo padrão de bandas, porém para o clone gFX11X13Δi12 observamos diminuição da intensidade das bandas referentes a variante que inclui o éxon 12 e aumento da intensidade das bandas referentes a variante que exclui este éxon do *Fmr1*;

Figura 39: Gel de agarose a 2% no qual foram submetidos a eletroforese produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para os transcritos do vetor pcDNA3.1. Amostras de cDNA de células de mamífero transfectadas com o clone não deletado (gFX11X13) (1 a 3) e com o clone mutante (gFX11X13d) (4 a 6). (7) Controle negativo. (M) Padrão de tamanho e peso molecular *50bp Mass Ladder*, cuja banda de tamanho 350pb está indicada. As setas indicam bandas de tamanho esperado para transcritos com e sem o éxon 12, conforme diagrama à esquerda da figura, no qual as setas representam os iniciadores. Ponta de seta indica banda aparentemente inespecífica. Após eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

DISCUSSÃO

O hnRNA de grande parte dos genes de mamíferos apresenta diversos sítios passíveis de participarem de *splicing* alternativo, tendo potencial para gerar um enorme número de transcritos a partir de um gene. Uma questão que se apresenta é qual a proporção destas variantes irá de fato ter repercussão funcional. A geração destas variantes pode ter diferentes consequências, como demonstrado (Blencowe, 2006).

O desenvolvimento, em nosso laboratório, de um anticorpo policlonal que reconhece as isoformas da FMRP contendo o segmento codificado pelo éxon 12 do Fmr1 revelou que estas isoformas são expressas no SNC do rato (dados não publicados), o que justifica o estudo da expressão semi-quantitativa e do mecanismo de regulação da inclusão deste éxon.

Neste trabalho, mostramos por RT-PCR em tempo real que a inclusão do éxon 12 do Fmr1 é regulada no córtex cerebral de rato entre os dias E19 e P2. Estes dados indicam que o córtex cerebral frontal de ratos, no segundo dia pós-natal, é uma boa fonte de proteínas ativadoras da inclusão do éxon 12 no RNAm do Fmr1 e que este tecido pode, por isso, ser usado no futuro na busca por esses fatores em *trans* reguladores do *splicing* do éxon 12 do Fmr1. Nas análises, normalizada e não normalizada, da expressão do éxon 12 do Fmr1 no córtex cerebral frontal, não se observou aumento do conjunto das mensagens do Fmr1 concomitante ao aumento significativo da inclusão do éxon 12. Isto mostra que esta diferença de expressão do éxon 12 não é um reflexo do aumento transcricional do Fmr1. Será interessante investigar se os níveis de inclusão do éxon 12 se mantêm altos no RNAm do Fmr1 ao longo do desenvolvimento pós-natal.

Os mecanismos de regulação da meia-vida do RNAm são complexos e vários são os fatores determinando o destino desta molécula entre sua degradação ou permanência citoplasmática, na qual há ainda a definição entre atividade ou silenciamento traducional (Lejeune & Maquat, 2005). Um aspecto a ser avaliado é se

os níveis de transcritos do Fmr1 contendo o éxon 12 se correlacionam aos níveis de expressão de isoformas da FMRP contendo o segmento codificado pelo éxon 12, no córtex cerebral frontal em P2.

No hipocampo dos animais testados observamos um aumento na expressão geral do Fmr1 entre E19 e P2. Observou-se paralelamente, no mesmo período e tecido, uma tendência à exclusão do éxon 12. Estes dados gerados para o hipocampo não puderam ser comparados aos controles internos usualmente empregados neste tipo de estudo. O gene da Ciclofilina A de rato foi selecionado entre outros testados (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, Gapdh, Actina beta, Actb) por apresentar menor variabilidade de expressão, mas apresentou posteriormente diferença de expressão no hipocampo entre as duas idades (Fig. 14), distorcendo os dados do Fmr1 quando normalizados. A escolha de um gene normalizador é fundamental à reprodutibilidade e confiabilidade dos dados de PCR em tempo real. A expressão de um bom gene normalizador não deve variar entre as amostras. Não encontramos estudos relacionando a expressão do gene da Ciclofilina A no hipocampo, neste período do desenvolvimento. É possível que o gene da Ciclofilina A tenha expressão variável, ainda não demonstrada, em hipocampo embrionário, o que não o classifica como um bom normalizador em estudos de RT-PCR em tempo real nestas condições, embora seja muito usado em outras idades. Desta forma, no nosso estudo, os cDNAs dos indivíduos poderiam ser submetidos a análises com novos controles internos para confirmação dos resultados ou avaliados sem normalização. Mantivemos nossas análises sem normalização basicamente por três razões. Em primeiro lugar, os dados do conjunto de transcritos do Fmr1 no hipocampo correlacionaram-se bem com outros já relatados (Hinds et al., 1993; Verkerk ET al., 1993; Nimchinsky et al., 2001). Em segundo lugar, a significância dos dados em tecidos como córtex cerebral se manteve, com ou sem normalização e; finalmente, sendo a FMRP um regulador traducional envolvido com morfologia de espinhas dendríticas por remodelamento de actina (Reeve et al., 2005), muitos genes de expressão constitutiva comumente utilizados

como o da Actina beta, podem, neste caso, ser regulados e, por isso, inadequados, tornando difícil a busca pelo gene normalizador ideal.

Córtex cerebral e hipocampo são estruturas encefálicas mais comumente utilizadas na análise do Fmr1, dadas a alta expressão deste gene nestes tecidos e sua importância funcional no aprendizado, cuja disfunção no início do desenvolvimento é o retardo mental (Hinds et al., 1993). O estudo da expressão do Fmr1 no córtex cerebral e hipocampo no final do período embrionário e início do desenvolvimento pós-natal é importante, pois esta é uma fase em que se observa maior disfunção de plasticidade de espinhas dendríticas no córtex cerebral do camundongo nocaute do Fmr1 (Nimchinsky et al., 2001). O remodelamento de espinhas dendríticas em neurônios piramidais do córtex cerebral foi proposto como a base celular da aprendizagem e memória. Neste sistema, o desenvolvimento pós-natal precoce, anormal é um componente fundamental para estabelecimento de desordens como o retardo mental (Desai et al., 2006). No entanto, o amadurecimento de espinhas dendríticas segue um curso próprio a cada região encefálica (Harris et al., 1992). Acredita-se que a deficiência da FMRP tenha consequências neuro-anatômicas também específicas a cada estrutura do SNC, como demonstrado por Grossman e cols (2006) pela morfologia distinta de espinhas dendríticas entre as duas estruturas encefálicas do camundongo nocaute do Fmr1. Do ponto de vista fisiológico, foi também sugerido que estes camundongos tenham disfunções moleculares não congruentes, como depressão sináptica a longo termo (LTD) aumentada no hipocampo e potenciação sináptica a longo termo (LTP) diminuída no córtex cerebral (Huber et al., 2002; Li et al., 2002; Larson et al., 2005). LTP é uma forma duradoura de plasticidade sináptica relacionada à formação de memória, que se opõe à LTD. Apesar de estes resultados terem basicamente o mesmo efeito, interferindo na formação de memória, seus aspectos moleculares diferem. Diante destas observações da literatura científica e dos nossos resultados da expressão do éxon 12 do Fmr1 em P2, de maneira antagônica entre córtex cerebral e hipocampo, avaliamos que uma alternativa a estudos

funcionais sobre as isoformas da FMRP que expressam este éxon possa ser relacionada aos mecanismos de eliminação sináptica no córtex cerebral. O segmento da FMRP codificado pelos éxons 10 ao 12 do *Fmr1* parece relacionar-se à formação de uma alça variável na estrutura do segundo domínio KH da FMRP (Valverde ET al., 2007). Assim, é possível que a variação do comprimento desta alça variável da FMRP, pela inclusão ou exclusão do éxon 12 nos transcritos do *Fmr1*, modifique o padrão de ligação da FMRP aos RNAs-alvo, uma hipótese a ser testada.

A taxa de inclusão do éxon 12 no cerebelo, para o qual só dispúnhamos de amostras em P2, mostrou-se semelhante à da maioria observada, exceto do córtex cerebral em P2. Hinds e cols (1993) revelaram por hibridação *in situ* de tecidos de camundongo adulto que o *Fmr1* tem expressão relativamente alta nas camadas granulares do córtex cerebelar e hipocampo, seguido do córtex cerebral. Homens portadores de pré-mutação do *FMR1* podem desenvolver FXTAS, cujas manifestações compreendem ataxia, um sinal clínico de disfunção cerebelar (Greco *et al*, 2006). Desta forma, a expressão do *Fmr1* no cerebelo do animal adulto deve ser examinada futuramente, procurando-se relacioná-la aos déficits observados nos pacientes. Embora mais negligenciada, a contribuição do cerebelo no aprendizado relacionado à FMRP foi sugerida pela observação de déficits de aprendizagem motora em camundongos nocautes do *Fmr1* (Koekkoek et al., 2005).

O tamanho sub-ótimo de éxons, abaixo de 130pb, é um fator que tem sido relacionado à mais alta frequência de *splicing* alternativo e uso de elementos acessórios reguladores do *splicing* (Carlo et al, 1996). Embora esta tenha sido uma possibilidade levantada durante o trabalho, a diferença de inclusão do éxon 12 entre as três estruturas do SNC sugere uma regulação fina deste *splicing* com relevância funcional no córtex frontal, o que não pode ser explicado exclusivamente pelo tamanho sub-ótimo deste éxon.

A produção do mini-gene gFX11X13, que contém a sequência genômica do início do éxon 11 ao final do éxon 13 do *Fmr1* de rato, permitiu o estudo do padrão de

splicing do éxon 12 superexpresso em células do SNC desta mesma espécie, C6, proveniente de glioma de rato. A análise por RT-PCR dos transcritos produzidos nestas células transfectadas, utilizando iniciadores específicos para o vetor, mostrou duas bandas, cujos tamanhos correspondem ao esperado para RNAm expressos a partir desta construção, incluindo (323pb) e excluindo (260pb) o éxon 12, mais uma banda de origem não determinada (Fig. 35 B). Este produto, de tamanho maior do que a variante incluindo o éxon 12, não é observado em células não recombinantes neste experimento com iniciadores específicos para o vetor, porém está presente quando se usa iniciadores que hibridam nos éxons 11 e 13 do gene *Fmr1*. O terceiro produto de PCR foi também observado na amplificação de transcritos endógenos da célula, descartando erros de emparelhamento de iniciadores ou influência da sequência do vetor no processo de *splicing*. Embora, as soluções tenham sido renovadas a partir dos estoques, não podemos descartar que tenha havido contaminação. Como esta terceira banda é maior do que as outras duas esperadas, uma possibilidade seria a inclusão de um segmento intrônico curto por alteração de sequência, considerando-o como um quarto éxon, não identificado. No entanto, o *splicing* alternativo do *Fmr1* já foi amplamente investigado por RT-PCR e tal variante não foi identificada. Além disso, a sequência das duas fitas não identificou nenhuma alteração de sequência. Pode ainda constituir uma alteração de *splicing* produzida pela linhagem da C6 que, além de ser imortalizada, é proveniente de um tumor, contendo certamente várias alterações genômicas. O seqüenciamento deste produto de PCR esclarecerá sua natureza.

A razão da escolha do organismo *Rattus norvegicus* como fonte de material biológico para experimentos em nosso laboratório foi sua fácil obtenção, ter o gene *Fmr1* conservado, e encéfalo consideravelmente maior do que o de camundongo para utilização em experimentos de culturas celulares e ensaios protéicos, facilitando sua dissecação. A expressão de mini-genes depende logicamente do organismo e tipo celular utilizado, uma vez que o elemento em *cis* só será identificado se a proteína expressa naquela célula, elemento em *trans*, se ligar a ele (Cooper, 2005). Um tipo

celular adequado para ser aplicado a este trabalho são neurônios corticais de rato, a partir de culturas primárias, uma vez que estas células são do organismo e tecido de interesse e não são transformadas. No entanto, a obtenção de culturas primárias, puras, de neurônios não é viável e o índice de transfecção destas células é muito baixo e pouco reprodutível. Desta forma, escolhemos as células C6 que são derivadas de glioma de rato, nas quais obtivemos um padrão preferencial de inclusão do éxon 12 do Fmr1. Uma alternativa é a utilização da linhagem imortalizada PC12, originária de feocromocitoma de rato, que permite certa diferenciação neuronal *in vitro* e apresenta índices de transfecção um pouco mais elevados. De todo modo, mesmo tipos celulares não relacionados ao modelo biológico, podem expressar os elementos em *trans* e fornecer resultados. Consideramos ainda o uso de um novo tipo celular nos experimentos, procurando identificar também um padrão de exclusão preferencial para prosseguir em paralelo rumo à identificação de elementos silenciadores e seus repressores do *splicing* do éxon 12 do Fmr1.

As análises *in silico* de buscas por elementos regulatórios em *cis* do *splicing* do éxon 12, realizadas para humanos, camundongo e rato, mostraram alguma similaridade entre os resultados para estas três espécies. As primeiras 200 bases do íntron 12 apresentaram boa densidade de elementos candidatos a regular o *splicing*, principalmente ISE (Fig. 26), padrão semelhante ao observado para as mesmas análises realizadas com a sequência murina (Fig. 28). Esta região tem alta similaridade entre as sequências de DNA do íntron 12, humano, murino e de rato (dados não mostrados), o que constitui um fator importante a ser considerado na busca por elementos reguladores do *splicing*, uma vez que sequências similares em ou próximas a éxons que sofrem *splicing* alternativo, de modo conservado, têm mais alta probabilidade de abrigar acentuadores e silenciadores de *splicing*.

De acordo com o resultado obtido *in vitro* com o mini-gene, inclusão preferencial do éxon 12 do Fmr1, esperamos com a deleção do clone original identificar sequências abrigando acentuadores do *splicing*. Deleção da base seis a 169 do íntron 12 foi

realizada com sucesso, gerando o clone gFX11X13 Δ i12, cujo padrão de expressão, em células C6 com ele transfectadas, ficou invertido, passando a apresentar exclusão preferencial do éxon 12 do Fmr1. A ausência de um padrão absoluto de inclusão ou exclusão exônica nas células transfectadas com um dos dois clones, gFX11X13 ou gFX11X13 Δ i12, deve ser um reflexo do efeito combinatório do *splicing*.

Observando a sequência deletada (bases 9 a 169 do intron 12, Figs 26 e 28), percebe-se que, apesar da alta similaridade entre as sequências dos três organismos nesta região, não há tanta sobreposição dos resultados *in silico*. O resultado coincidente mais evidente são os elementos adjacentes, deslocados, TTCCCC e CCCCTT, por volta da base 50 deste íntron que, no transcrito equivale a UUCCCC e CCCCUU. De acordo com a Tabela 1, observa-se que a sequência desses elementos não se assemelha muito aos consensos, podendo constituir um elemento degenerado, rico nas bases pirimídicas U e C. Temos hoje estes elementos UUCCCC e CCCCUU como nossos candidatos a sofrerem mutagênese dirigida e serem então testados no mesmo tipo de ensaio *in vitro* aqui demonstrado.

A busca por elementos regulatórios no éxon 12 do Fmr1 identificou, em humanos e camundongos, candidatos a ESE na região central do éxon (entre os nucleotídeos 30 e 50) com as ferramentas usadas. Pela alta concordância dos resultados de ESE *in silico*, uma deleção no mini-gene compreendendo os elementos identificados é desejável, mas tecnicamente difícil pela baixa disponibilidade de sítios de restrição únicos nesta região do mini-gene. Outra alternativa é a realização direta da mutagênese dirigida.

A falta de identificação *in silico* de alguns tipos de elementos regulatórios do *splicing*, específicos para o transcriptoma de rato, deve-se ao fato de haver menos estudos neste sentido neste organismo. A maior disponibilidade de dados experimentais tende a enriquecer os bancos de dados, disponibilizando dados *in silico* para várias espécies e aumento da correlação de seus resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelson, J. (1979). RNA processing and the intervening sequence problem. *Annu Rev Biochem* **48**: 1035-69.
- Abitbol, M., C. Menini, A. L. Delezoide, T. Rhyner, M. Vekemans and J. Mallet (1993). Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet* **4**(2): 147-53.
- Abril, J. F., R. Castelo and R. Guigo (2005). Comparison of splice sites in mammals and chicken. *Genome Res* **15**(1): 111-9.
- Adinolfi, S., A. Ramos, S. R. Martin, F. Dal Piaz, P. Pucci, B. Bardoni, J. L. Mandel and A. Pastore (2003). The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry* **42**(35): 10437-44.
- Ahn, S. H., M. Kim and S. Buratowski (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* **13**(1): 67-76.
- Alberts, B. J., A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P (2002). Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition, Garland.
- Aloni, Y., R. Dhar, O. Laub, M. Horowitz and G. Khoury (1977). Novel mechanism for RNA maturation: the leader sequences of simian virus 40 mRNA are not transcribed adjacent to the coding sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(9): 3686-90.
- Alt, F. W., A. L. Bothwell, M. Knapp, E. Siden, E. Mather, M. Koshland and D. Baltimore (1980). Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* **20**(2): 293-301.
- Amara, S. G., V. Jonas, M. G. Rosenfeld, E. S. Ong and R. M. Evans (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* **298**(5871): 240-4.
- Amrani, N., M. S. Sachs and A. Jacobson (2006). Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 415-25.
- Antar, L. N., R. Afroz, J. B. Dictenberg, R. C. Carroll and G. J. Bassell (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**(11): 2648-55.
- Antar, L. N., J. B. Dictenberg, M. Plociniak, R. Afroz and G. J. Bassell (2005). Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav* **4**(6): 350-9.
- Apweiler, R., M. J. Martin, C. O'Donovan and M. Pruess (2003). Managing core resources for genomics and proteomics. *Pharmacogenomics* **4**(3): 343-50.
- Artamonova, I and M. S. Gelfand (2007). Comparative genomics and evolution of alternative splicing: the pessimists' science. *Chem Rev* **107**(8): 3407-30.
- Ashley, C. T., J. S. Sutcliffe, C. B. Kunst, H. A. Leiner, E. E. Eichler, D. L. Nelson and S. T. Warren (1993). Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet* **4**(3): 244-51.
- Ashley, C. T., Jr., K. D. Wilkinson, D. Reines and S. T. Warren (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**(5133): 563-6.
- Ast, G. (2004). How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* **5**(10): 773-82.
- Baker, B. S. (1989). Sex in flies: the splice of life. *Nature* **340**(6234): 521-4.
- Bakker, C. E., Y. de Diego Otero, C. Bontekoe, P. Raghoe, T. Luteijn, A. T. Hoogeveen, B. A. Oostra and R. Willemsen (2000). Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res* **258**(1): 162-70.

- Barbee, S. A., P. S. Estes, A. M. Cziko, J. Hillebrand, R. A. Luedeman, J. M. Collier, N. Johnson, I. C. Howlett, C. Geng, R. Ueda, et al. (2006). Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**(6): 997-1009.
- Bardoni, B., L. Davidovic, M. Bensaid and E. W. Khandjian (2006). The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. *Expert Rev Mol Med* **8**(8): 1-16.
- Bardoni, B. and J. L. Mandel (2002). Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev* **12**(3): 284-93.
- Bardoni, B., J. L. Mandel and G. S. Fisch (2000). FMR1 gene and fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **97**(2): 153-63.
- Bardoni, B., A. Schenck and J. L. Mandel (2001). The Fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull* **56**(3-4): 375-82.
- Bardoni, B., A. Sittler, Y. Shen and J. L. Mandel (1997). Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. *Neurobiol Dis* **4**(5): 329-36.
- Baxeavanis, A. D. (2003). Using Genomic Databases for Sequence-Based Biological discovery. *Molecular Medicine* **9**(12): 185-192.
- Bell, M. V., M. C. Hirst, Y. Nakahori, R. N. MacKinnon, A. Roche, T. J. Flint, P. A. Jacobs, N. Tommerup, L. Tranebjaerg, U. Froster-Iskenius, et al. (1991). Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* **64**(4): 861-6.
- Bentley, D. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 347-51.
- Berezikov, E., W. J. Chung, J. Willis, E. Cuppen and E. C. Lai (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* **28**(2): 328-36.
- Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(8): 3171-5.
- Berget, S. M. and B. L. Robberson (1986). U1, U2, and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for in vitro splicing but not polyadenylation. *Cell* **46**(5): 691-6.
- Berglund, J. A., N. Abovich and M. Rosbash (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev* **12**(6): 858-67.
- Berglund, J. A., K. Chua, N. Abovich, R. Reed and M. Rosbash (1997). The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**(5): 781-7.
- Berglund, J. A., M. L. Fleming and M. Rosbash (1998). The KH domain of the branchpoint sequence binding protein determines specificity for the pre-mRNA branchpoint sequence. *Rna* **4**(8): 998-1006.
- Berry-Kravis, E., L. Abrams, S. M. Coffey, D. A. Hall, C. Greco, L. W. Gane, J. Grigsby, J. A. Bourgeois, B. Finucane, S. Jacquemont, et al. (2007). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. *Mov Disord* **22**(14): 2018-30, quiz 2140.
- Bingham, J. L., P. E. Carrigan, L. J. Miller and S. Srinivasan (2008). Extent and diversity of human alternative splicing established by complementary database annotation and microarray analysis. *Omics* **12**(1): 83-92.
- Birney, E., T. D. Andrews, P. Bevan, M. Caccamo, Y. Chen, L. Clarke, G. Coates, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, et al. (2004). An overview of Ensembl. *Genome Res* **14**(5): 925-8.
- Birney, E., J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, Z. Weng, M. Snyder, E. T. Dermitzakis, R. E. Thurman, et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**(7146): 799-816.
- Birzele, F., G. Csaba and R. Zimmer (2008). Alternative splicing and protein structure

- evolution. *Nucleic Acids Res* **36**(2): 550-8.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* **72**: 291-336.
- Black, D. L. and J. A. Steitz (1986). Pre-mRNA splicing in vitro requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **46**(5): 697-704.
- Blake, C. C. (1978). X-ray sequencing of proteins by refinement. *Nature* **274**(5670): 420-1.
- Blake, C. C. (1979). Exons encode protein functional units. *Nature* **277**(5698): 598.
- Blanchard, J. M., J. Weber, W. Jelinek and J. E. Darnell (1978). In vitro RNA-RNA splicing in adenovirus 2 mRNA formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(11): 5344-8.
- Blencowe, B. J. (2005). Splicing on the brain. *Nat Genet* **37**(8): 796-7.
- Blencowe, B. J. (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**(1): 37-47.
- Bono, H. and Y. Okazaki (2002). Functional transcriptomes: comparative analysis of biological pathways and processes in eukaryotes to infer genetic networks among transcripts. *Curr Opin Struct Biol* **12**(3): 355-61.
- Bourquin, J. P., I. Stagljar, P. Meier, P. Moosmann, J. Silke, T. Baechi, O. Georgiev and W. Schaffner (1997). A serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* **25**(11): 2055-61.
- Brack, C. and S. Tonegawa (1977). Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5652-6.
- Breathnach, R., J. L. Mandel and P. Chambon (1977). Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* **270**(5635): 314-9.
- Brett, D., J. Hanke, G. Lehmann, S. Haase, S. Delbruck, S. Krueger, J. Reich and P. Bork (2000). EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms. *FEBS Lett* **474**(1): 83-6.
- Brett, D., H. Pospisil, J. Valcarcel, J. Reich and P. Bork (2002). Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet* **30**(1): 29-30.
- Bringmann, P. and R. Luhrmann (1986). Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *Embo J* **5**(13): 3509-16.
- Bringmann, P., R. Reuter, J. Rinke, B. Appel, R. Bald and R. Luhrmann (1983). 5'-terminal caps of snRNAs are accessible for reaction with 2,2,7-trimethylguanosine-specific antibody in intact snRNPs. *J Biol Chem* **258**(5): 2745-7.
- Bringmann, P., J. Rinke, B. Appel, R. Reuter and R. Luhrmann (1983). Purification of snRNPs U1, U2, U4, U5 and U6 with 2,2,7-trimethylguanosine-specific antibody and definition of their constituent proteins reacting with anti-Sm and anti-(U1)RNP antisera. *Embo J* **2**(7): 1129-35.
- Brody, E. and J. Abelson (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**(4702): 963-7.
- Brown, V., P. Jin, S. Ceman, J. C. Darnell, W. T. O'Donnell, S. A. Tenenbaum, X. Jin, Y. Feng, K. D. Wilkinson, J. D. Keene, et al. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**(4): 477-87.
- Burset, M., I. A. Seledtsov and V. V. Solovyev (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* **28**(21): 4364-75.
- Burset, M., I. A. Seledtsov and V. V. Solovyev (2001). SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Res* **29**(1): 255-9.
- Calvo, O. and J. L. Manley (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the

- promoter. *Genes Dev* **17**(11): 1321-7.
- Carlo, T., D. A. Sterner and S. M. Berget (1996). An intron splicing enhancer containing a G-rich repeat facilitates inclusion of a vertebrate micro-exon. *Rna* **2**(4): 342-53.
- Cartegni, L., S. L. Chew and A. R. Krainer (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**(4): 285-98.
- Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M. Q. Zhang and A. R. Krainer (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3568-71.
- Castren, M., T. Tervonen, V. Karkkainen, S. Heinonen, E. Castren, K. Larsson, C. E. Bakker, B. A. Oostra and K. Akerman (2005). Altered differentiation of neural stem cells in fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17834-9.
- Catterall, J. F., B. W. O'Malley, M. A. Robertson, R. Staden, Y. Tanaka and G. G. Brownlee (1978). Nucleotide sequence homology at 12 intron-exon junctions in the chick ovalbumin gene. *Nature* **275**(5680): 510-3.
- Caudy, A. A., M. Myers, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16**(19): 2491-6.
- Cech, T. R. (1986). The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* **44**(2): 207-10.
- Chakalova, L., E. Debrand, J. A. Mitchell, C. S. Osborne and P. Fraser (2005). Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet* **6**(9): 669-77.
- Chang, Y. F., J. S. Imam and M. F. Wilkinson (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* **76**: 51-74.
- Chmiel, N. H., D. C. Rio and J. A. Doudna (2006). Distinct contributions of KH domains to substrate binding affinity of *Drosophila* P-element somatic inhibitor protein. *Rna* **12**(2): 283-91.
- Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**(1): 1-8.
- Chow, L. T., J. M. Roberts, J. B. Lewis and T. R. Broker (1977). A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell* **11**(4): 819-36.
- Churbanov, A., I. B. Rogozin, J. S. Deogun and H. Ali (2006). Method of predicting splice sites based on signal interactions. *Biol Direct* **1**: 10.
- Chusainow, J., P. M. Ajuh, L. Trinkle-Mulcahy, J. E. Sleeman, J. Ellenberg and A. I. Lamond (2005). FRET analyses of the U2AF complex localize the U2AF35/U2AF65 interaction in vivo and reveal a novel self-interaction of U2AF35. *Rna* **11**(8): 1201-14.
- Clark, F. and T. A. Thanaraj (2002). Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human. *Hum Mol Genet* **11**(4): 451-64.
- Claverie, J. M. (2001). Gene number. What if there are only 30,000 human genes? *Science* **291**(5507): 1255-7.
- Cochrane, G., P. Aldebert, N. Althorpe, M. Andersson, W. Baker, A. Baldwin, K. Bates, S. Bhattacharyya, P. Browne, A. van den Broek, et al. (2006). EMBL Nucleotide Sequence Database: developments in 2005. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D10-5.
- Cochrane, G., K. Bates, R. Apweiler, Y. Tateno, J. Mashima, T. Kosuge, I. K. Mizrachi, S. Schafer and M. Fetchko (2006). Evidence standards in experimental and inferential INSDC Third Party Annotation data. *Omics* **10**(2): 105-13.
- Coffee, B., F. Zhang, S. Ceman, S. T. Warren and D. Reines (2002). Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x

- syndrome. *Am J Hum Genet* **71**(4): 923-32.
- Collins, F. S., M. Morgan and A. Patrinos (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* **300**(5617): 286-90.
- Comery, T. A., J. B. Harris, P. J. Willems, B. A. Oostra, S. A. Irwin, I. J. Weiler and W. T. Greenough (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5401-4.
- Cooper, T. A. (2005). Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods* **37**(4): 331-40.
- Cooper, T. A. and C. P. Ordahl (1989). Nucleotide substitutions within the cardiac troponin T alternative exon disrupt pre-mRNA alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **17**(19): 7905-21.
- Coutinho-Mansfield, G. C., Y. Xue, Y. Zhang and X. D. Fu (2007). PTB/nPTB switch: a post-transcriptional mechanism for programming neuronal differentiation. *Genes Dev* **21**(13): 1573-7.
- Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* **204**(4390): 264-71.
- Croft, L., S. Schandorff, F. Clark, K. Burrage, P. Arctander and J. S. Mattick (2000). ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nat Genet* **24**(4): 340-1.
- Cummings, C. J. and H. Y. Zoghbi (2000). Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* **9**(6): 909-16.
- Custodio, N., M. Antoniou and M. Carmo-Fonseca (2006). Abundance of the largest subunit of RNA polymerase II in the nucleus is regulated by nucleo-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* **312**(13): 2557-67.
- Darnell, J. C., K. B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S. T. Warren and R. B. Darnell (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**(4): 489-99.
- Darnell, J. C., O. Mostovetsky and R. B. Darnell (2005). FMRP RNA targets: identification and validation. *Genes Brain Behav* **4**(6): 341-9.
- Darnell, R. B. (1996). Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4529-36.
- Davidovic, L., X. H. Jaglin, A. M. Lepagnol-Bestel, S. Tremblay, M. Simonneau, B. Bardoni and E. W. Khandjian (2007). The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet* **16**(24): 3047-58.
- de Almeida, S. F. and M. Carmo-Fonseca (2008). The CTD role in cotranscriptional RNA processing and surveillance. *FEBS Lett* **582**(14): 1971-6.
- De Diego Otero, Y., L. A. Severijnen, G. van Cappellen, M. Schrier, B. Oostra and R. Willemsen (2002). Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **22**(23): 8332-41.
- de Moor, C. H., H. Meijer and S. Lissenden (2005). Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* **16**(1): 49-58.
- Denman, R. B. and Y. J. Sung (2002). Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(4): 1063-9.
- Denoeud, F., P. Kapranov, C. Ucla, A. Frankish, R. Castelo, J. Drenkow, J. Lagarde, T. Alioto, C. Manzano, J. Chrast, et al. (2007). Prominent use of distal 5' transcription start sites and discovery of a large number of additional exons in ENCODE regions. *Genome Res* **17**(6): 746-59.
- DeNoto, F. M., D. D. Moore and H. M. Goodman (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **9**(15): 3719-30.
- Desai, N. S., T. M. Casimiro, S. M. Gruber and P. W. Vanderklish (2006). Early postnatal plasticity in neocortex of Fmr1 knockout mice. *J Neurophysiol* **96**(4):

- 1734-45.
- Di Prospero, N. A. and K. H. Fischbeck (2005). Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat Rev Genet* **6**(10): 756-65.
- Didiot, M. C., Z. Tian, C. Schaeffer, M. Subramanian, J. L. Mandel and H. Moine (2008). The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *Nucleic Acids Res.*
- Ding, X. Z., I. T. Paulsen, A. K. Bhattacharjee, M. P. Nikolich, G. Myers and D. L. Hoover (2006). A high efficiency cloning and expression system for proteomic analysis. *Proteomics* **6**(14): 4038-46.
- Doel, M. T., M. Houghton, E. A. Cook and N. H. Carey (1977). The presence of ovalbumin mRNA coding sequences in multiple restriction fragments of chicken DNA. *Nucleic Acids Res* **4**(11): 3701-13.
- Dolzanskaya, N., G. Merz and R. B. Denman (2006). Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* **45**(34): 10385-93.
- Dredge, B. K. and R. B. Darnell (2003). Nova regulates GABA(A) receptor gamma2 alternative splicing via a distal downstream UCAU-rich intronic splicing enhancer. *Mol Cell Biol* **23**(13): 4687-700.
- Dunham, I. (2000). The gene guessing game. *Yeast* **17**(3): 218-24.
- Dunn, A. R. and J. A. Hassell (1977). A novel method to map transcripts: evidence for homology between an adenovirus mRNA and discrete multiple regions of the viral genome. *Cell* **12**(1): 23-36.
- Early, P., J. Rogers, M. Davis, K. Calame, M. Bond, R. Wall and L. Hood (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**(2): 313-9.
- Eberhart, D. E., H. E. Malter, Y. Feng and S. T. Warren (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* **5**(8): 1083-91.
- Eichler, E. E., S. Richards, R. A. Gibbs and D. L. Nelson (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* **2**(8): 1147-53.
- Enger, M. D. and R. A. Walters (1970). Isolation of low molecular weight, methylated ribonucleic acids from 10S to 30S particles of Chinese hamster cell fractions. *Biochemistry* **9**(18): 3551-62.
- Ewing, B. and P. Green (2000). Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet* **25**(2): 232-4.
- Eyras, E., M. Caccamo, V. Curwen and M. Clamp (2004). ESTGenes: alternative splicing from ESTs in Ensembl. *Genome Res* **14**(5): 976-87.
- Fairbrother, W. G., R. F. Yeh, P. A. Sharp and C. B. Burge (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* **297**(5583): 1007-13.
- Farrer, T., A. B. Roller, W. J. Kent and A. M. Zahler (2002). Analysis of the role of *Caenorhabditis elegans* GC-AG introns in regulated splicing. *Nucleic Acids Res* **30**(15): 3360-7.
- Feng, Y., C. A. Gutekunst, D. E. Eberhart, H. Yi, S. T. Warren and S. M. Hersch (1997). Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* **17**(5): 1539-47.
- Ferreira, E. N., P. A. Galante, D. M. Carraro and S. J. de Souza (2007). Alternative splicing: a bioinformatics perspective. *Mol Biosyst* **3**(7): 473-7.
- Field, D., N. Morrison, J. Selengut and P. Sterk (2006). Meeting report: eGenomics: Cataloguing our Complete Genome Collection II. *Omics* **10**(2): 100-4.
- Fields, S. (2001). Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science* **291**(5507): 1221-4.
- Forch, P., O. Puig, N. Kedersha, C. Martinez, S. Granneman, B. Seraphin, P. Anderson and J. Valcarcel (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **6**(5): 1089-98.
- Frank, A. C., H. Amiri and S. G. Andersson (2002). Genome deterioration: loss of

- repeated sequences and accumulation of junk DNA. *Genetica* **115**(1): 1-12.
- Frazier, M. E., G. M. Johnson, D. G. Thomassen, C. E. Oliver and A. Patrinos (2003). Realizing the potential of the genome revolution: the genomes to life program. *Science* **300**(5617): 290-3.
- Friendewey, D. and W. Keller (1985). Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. *Cell* **42**(1): 355-67.
- Fridell, R. A., R. E. Benson, J. Hua, H. P. Bogerd and B. R. Cullen (1996). A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. *Embo J* **15**(19): 5408-14.
- Fu, X. D. and T. Maniatis (1992). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* **256**(5056): 535-8.
- Fu, Y. H., D. P. Kuhl, A. Pizzuti, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, S. Richards, A. J. Verkerk, J. J. Holden, R. G. Fenwick, Jr., S. T. Warren, et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**(6): 1047-58.
- Furdon, P. J. and R. Kole (1988). The length of the downstream exon and the substitution of specific sequences affect pre-mRNA splicing in vitro. *Mol Cell Biol* **8**(2): 860-6.
- Furey, T. S. (2006). Comparison of human (and other) genome browsers. *Hum Genomics* **2**(4): 266-70.
- Gabriel, S. B., S. F. Schaffner, H. Nguyen, J. M. Moore, J. Roy, B. Blumenstiel, J. Higgins, M. DeFelice, A. Lochner, M. Faggart, et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* **296**(5576): 2225-9.
- Gabus, C., R. Mazroui, S. Tremblay, E. W. Khandjian and J. L. Darlix (2004). The fragile X mental retardation protein has nucleic acid chaperone properties. *Nucleic Acids Res* **32**(7): 2129-37.
- Gabut, M., S. Chaudhry and B. J. Blencowe (2008). SnapShot: The splicing regulatory machinery. *Cell* **133**(1): 192 e1.
- Galas, D. J. (2001). Sequence interpretation. Making sense of the sequence. *Science* **291**(5507): 1257-60.
- Galiana-Arnoux, D., F. Del Gatto-Konczak, M. C. Gesnel and R. Breathnach (2005). Intronic UGG repeats coordinate splicing of CD44 alternative exons v8 and v9. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(2): 667-73.
- Galperin, M. Y. (2006). The Molecular Biology Database Collection: 2006 update. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D3-5.
- Garriga, G. and A. M. Lambowitz (1986). Protein-dependent splicing of a group I intron in ribonucleoprotein particles and soluble fractions. *Cell* **46**(5): 669-80.
- Gawande, B., M. D. Robida, A. Rahn and R. Singh (2006). Drosophila Sex-lethal protein mediates polyadenylation switching in the female germline. *Embo J* **25**(6): 1263-72.
- Ge, H., P. Zuo and J. L. Manley (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators. *Cell* **66**(2): 373-82.
- Geslain, R. and L. Ribas de Pouplana (2004). Regulation of RNA function by aminoacylation and editing? *Trends Genet* **20**(12): 604-10.
- Gheldof, N., T. M. Tabuchi and J. Dekker (2006). The active FMR1 promoter is associated with a large domain of altered chromatin conformation with embedded local histone modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33): 12463-8.
- Gibbs, R. A., G. M. Weinstock, M. L. Metzker, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, S. Scherer, G. Scott, D. Steffen, K. C. Worley, P. E. Burch, et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**(6982): 493-521.
- Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**(5645): 501.
- Glover, T. W., M. F. Arlt, A. M. Casper and S. G. Durkin (2005). Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**: R197-205.
- Goldenberg, C. J. (1984). In vitro-synthesized adenovirus 2 messenger RNA

- precursors are accurately spliced by nuclear extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(15): 4707-11.
- Goren, A., O. Ram, M. Amit, H. Keren, G. Lev-Maor, I. Vig, T. Pupko and G. Ast (2006). Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell* **22**(6): 769-81.
- Grabowski, P. J. (2000). Genetic evidence for a Nova regulator of alternative splicing in the brain. *Neuron* **25**(2): 254-6.
- Grabowski, P. J. and D. L. Black (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol* **65**(3): 289-308.
- Grabowski, P. J., R. A. Padgett and P. A. Sharp (1984). Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* **37**(2): 415-27.
- Grabowski, P. J., S. R. Seiler and P. A. Sharp (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **42**(1): 345-53.
- Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* **17**(2): 100-7.
- Graveley, B. R., K. J. Hertel and T. Maniatis (2001). The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *Rna* **7**(6): 806-18.
- Gray, A. C., J. Raingo and D. Lipscombe (2007). Neuronal calcium channels: splicing for optimal performance. *Cell Calcium* **42**(4-5): 409-17.
- Greco, C. M., R. F. Berman, R. M. Martin, F. Tassone, P. H. Schwartz, A. Chang, B. D. Trapp, C. Iwahashi, J. Brunberg, J. Grigsby, et al. (2006). Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain* **129**(Pt 1): 243-55.
- Green, M. R., T. Maniatis and D. A. Melton (1983). Human beta-globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in *Xenopus* oocyte nuclei. *Cell* **32**(3): 681-94.
- Greenough, W. T., A. Y. Klintsova, S. A. Irwin, R. Galvez, K. E. Bates and I. J. Weiler (2001). Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7101-6.
- Grossman, A. W., G. M. Aldridge, I. J. Weiler and W. T. Greenough (2006). Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond. *J Neurosci* **26**(27): 7151-5.
- Guthrie, C. and B. Patterson (1988). Spliceosomal snRNAs. *Annu Rev Genet* **22**: 387-419.
- Haddad, L. A., M. J. Aguiar, S. S. Costa, R. C. Mingroni-Netto, A. M. Vianna-Morgante and S. D. Pena (1999). Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet* **84**(3): 198-201.
- Hagerman, P. J. and R. J. Hagerman (2004). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **10**(1): 25-30.
- Hagerman, R. J. (1992). Annotation: fragile X syndrome: advances and controversy. *J Child Psychol Psychiatry* **33**(7): 1127-39.
- Hagerman, R. J. and P. J. Hagerman (2002). The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev* **12**(3): 278-83.
- Hagerman, R. J., M. Leehey, W. Heinrichs, F. Tassone, R. Wilson, J. Hills, J. Grigsby, B. Gage and P. J. Hagerman (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* **57**(1): 127-30.
- Hall-Pogar, T., S. Liang, L. K. Hague and C. S. Lutz (2007). Specific trans-acting proteins interact with auxiliary RNA polyadenylation elements in the COX-2 3'-UTR. *Rna* **13**(7): 1103-15.
- Hamacher, M., R. Apweiler, G. Arnold, A. Becker, M. Bluggel, O. Carrette, C. Colvis, M. J. Dunn, T. Frohlich, M. Fountoulakis, et al. (2006). HUPO Brain Proteome Project: summary of the pilot phase and introduction of a comprehensive data reprocessing strategy. *Proteomics* **6**(18): 4890-8.
- Hamacher, M., C. Stephan, M. Bluggel, D. Chamrad, G. Korting, L. Martens, M. Muller, H. Hermjakob, D. Parkinson, A. Dowsey, et al. (2006). The HUPO Brain

- Proteome Project jamboree: centralised summary of the pilot studies. *Proteomics* **6**(6): 1719-21.
- Han, X. D., B. R. Powell, J. L. Phalin and F. F. Chehab (2006). Mosaicism for a full mutation, premutation, and deletion of the CGG repeats results in 22% FMRP and elevated FMR1 mRNA levels in a high-functioning fragile X male. *Am J Med Genet A* **140**(13): 1463-71.
- Handa, V., T. Saha and K. Usdin (2003). The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer. *Nucleic Acids Res* **31**(21): 6243-8.
- Hanke, J., D. Brett, I. Zastrow, A. Aydin, S. Delbruck, G. Lehmann, F. Luft, J. Reich and P. Bork (1999). Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception? *Trends Genet* **15**(10): 389-90.
- Hansen, R. S., S. M. Gartler, C. R. Scott, S. H. Chen and C. D. Laird (1992). Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* **1**(8): 571-8.
- Harris, K. M., F. E. Jensen and B. Tsao (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* **12**(7): 2685-705.
- Harrison, P. M., A. Kumar, N. Lang, M. Snyder and M. Gerstein (2002). A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res* **30**(5): 1083-90.
- Hayashizaki, Y. and M. Kanamori (2004). Dynamic transcriptome of mice. *Trends Biotechnol* **22**(4): 161-7.
- Haynes, C. and L. M. Iakoucheva (2006). Serine/arginine-rich splicing factors belong to a class of intrinsically disordered proteins. *Nucleic Acids Res* **34**(1): 305-12.
- Heitz, D., F. Rousseau, D. Devys, S. Saccone, H. Abderrahim, D. Le Paslier, D. Cohen, A. Vincent, D. Toniolo, G. Della Valle, et al. (1991). Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island. *Science* **251**(4998): 1236-9.
- Hermjakob, H. (2006). The HUPO proteomics standards initiative--overcoming the fragmentation of proteomics data. *Proteomics* **6 Suppl 2**: 34-8.
- Hernandez, N. and W. Keller (1983). Splicing of in vitro synthesized messenger RNA precursors in HeLa cell extracts. *Cell* **35**(1): 89-99.
- Hessl, D., F. Tassone, D. Z. Loesch, E. Berry-Kravis, M. A. Leehey, L. W. Gane, I. Barbato, C. Rice, E. Gould, D. A. Hall, et al. (2005). Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **139B**(1): 115-21.
- Hinds, H. L., C. T. Ashley, J. S. Sutcliffe, D. L. Nelson, S. T. Warren, D. E. Housman and M. Schalling (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* **3**(1): 36-43.
- Hinterberger, M., I. Pettersson and J. A. Steitz (1983). Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5, and U6 RNAs. *J Biol Chem* **258**(4): 2604-13.
- Hodge, M. R. and M. G. Cumsky (1989). Splicing of a yeast intron containing an unusual 5' junction sequence. *Mol Cell Biol* **9**(6): 2765-70.
- Hodnett, J. L. and H. Busch (1968). Isolation and characterization of uridylic acid-rich 7 S ribonucleic acid of rat liver nuclei. *J Biol Chem* **243**(24): 6334-42.
- Holste, D. and U. Ohler (2008). Strategies for identifying RNA splicing regulatory motifs and predicting alternative splicing events. *PLoS Comput Biol* **4**(1): e21.
- Horowitz, D. S., E. J. Lee, S. A. Mabon and T. Misteli (2002). A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *Embo J* **21**(3): 470-80.
- Howard, E. F. (1978). Small nuclear RNA molecules in nuclear ribonucleoprotein complexes from mouse erythroleukemia cells. *Biochemistry* **17**(16): 3228-36.

- Hu, L., Y. Chen, S. Evers and Y. Shen (2005). Expression of fragile X mental retardation-1 gene with nuclear export signal mutation changes the expression profiling of mouse cerebella immortal neuronal cell. *Proteomics* **5**(15): 3979-90.
- Huang, T., L. Y. Li, Y. Shen, X. B. Qin, Z. L. Pang and G. Y. Wu (1996). Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons. *Am J Med Genet* **64**(2): 252-5.
- Hubbard, T., D. Barker, E. Birney, G. Cameron, Y. Chen, L. Clark, T. Cox, J. Cuff, V. Curwen, T. Down, et al. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res* **30**(1): 38-41.
- Hubbard, T. J., B. L. Aken, K. Beal, B. Ballester, M. Caccamo, Y. Chen, L. Clarke, G. Coates, F. Cunningham, T. Cutts, et al. (2007). Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D610-7.
- Huber, K. M., S. M. Gallagher, S. T. Warren and M. F. Bear (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11): 7746-50.
- Huot, M. E., R. Mazroui, P. Leclerc and E. W. Khandjian (2001). Developmental expression of the fragile X-related 1 proteins in mouse testis: association with microtubule elements. *Hum Mol Genet* **10**(24): 2803-11.
- IHGSC (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**(7011): 931-45.
- Ishizuka, A., M. C. Siomi and H. Siomi (2002). A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**(19): 2497-508.
- Iwahashi, C. K., D. H. Yasui, H. J. An, C. M. Greco, F. Tassone, K. Nannan, B. Babineau, C. B. Lebrilla, R. J. Hagerman and P. J. Hagerman (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain* **129**(Pt 1): 256-71.
- Jasny, B. R. (2003). Building on the DNA Revolution. *Science* **300**(5617): 277.
- Jeffreys, A. J. and R. A. Flavell (1977). The rabbit beta-globin gene contains a large large insert in the coding sequence. *Cell* **12**(4): 1097-108.
- Jensen, K. B., B. K. Dredge, G. Stefani, R. Zhong, R. J. Buckanovich, H. J. Okano, Y. Y. Yang and R. B. Darnell (2000). Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* **25**(2): 359-71.
- Jin, P., R. S. Alisch and S. T. Warren (2004). RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* **6**(11): 1048-53.
- Jin, P., R. Duan, A. Qurashi, Y. Qin, D. Tian, T. C. Rosser, H. Liu, Y. Feng and S. T. Warren (2007). Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron* **55**(4): 556-64.
- Jin, P. and S. T. Warren (2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* **9**(6): 901-8.
- Johnson, J. M., J. Castle, P. Garrett-Engele, Z. Kan, P. M. Loerch, C. D. Armour, R. Santos, E. E. Schadt, R. Stoughton and D. D. Shoemaker (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* **302**(5653): 2141-4.
- Jontes, J. D. and S. J. Smith (2000). Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* **27**(1): 11-4.
- Kanapin, A., R. Apweiler, M. Biswas, W. Fleischmann, Y. Karavidopoulou, P. Kersey, E. V. Kriventseva, V. Mittard, N. Mulder, T. Oinn, et al. (2002). Interactive InterPro-based comparisons of proteins in whole genomes. *Bioinformatics* **18**(2): 374-5.
- Kanz, C., P. Aldebert, N. Althorpe, W. Baker, A. Baldwin, K. Bates, P. Browne, A. van den Broek, M. Castro, G. Cochrane, et al. (2005). The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D29-33.
- Katayama, S., M. Kanamori and Y. Hayashizaki (2004). Integrated analysis of the genome and the transcriptome by FANTOM. *Brief Bioinform* **5**(3): 249-58.

- Kaufmann, W. E. and A. L. Reiss (1999). Molecular and cellular genetics of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **88**(1): 11-24.
- Keeling, K. M., J. Salas-Marco, L. Z. Osherovich and D. M. Bedwell (2006). Tpa1p is part of an mRNP complex that influences translation termination, mRNA deadenylation, and mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**(14): 5237-48.
- Kerrien, S., Y. Alam-Faruque, B. Aranda, I. Bancarz, A. Bridge, C. Derow, E. Dimmer, M. Feuermann, A. Friedrichsen, R. Huntley, et al. (2007). IntAct--open source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D561-5.
- Kersey, P., L. Bower, L. Morris, A. Horne, R. Petryszak, C. Kanz, A. Kanapin, U. Das, K. Michoud, I. Phan, et al. (2005). Integr8 and Genome Reviews: integrated views of complete genomes and proteomes. *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D297-302.
- Kersey, P., H. Hermjakob and R. Apweiler (2000). VARSPLIC: alternatively-spliced protein sequences derived from SWISS-PROT and TrEMBL. *Bioinformatics* **16**(11): 1048-9.
- Khalil, A. M., M. A. Faghihi, F. Modarresi, S. P. Brothers and C. Wahlestedt (2008). A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS ONE* **3**(1): e1486.
- Khandjian, E. W. (1999). Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein. *Biochem Cell Biol* **77**(4): 331-42.
- Khandjian, E. W., F. Corbin, S. Woerly and F. Rousseau (1996). The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* **12**(1): 91-3.
- Khandjian, E. W., A. Fortin, A. Thibodeau, S. Tremblay, F. Cote, D. Devys, J. L. Mandel and F. Rousseau (1995). A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet* **4**(5): 783-9.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**(2): 259-72.
- Kim, E., A. Magen and G. Ast (2007). Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **35**(1): 125-31.
- Kim, H., R. Klein, J. Majewski and J. Ott (2004). Estimating rates of alternative splicing in mammals and invertebrates. *Nat Genet* **36**(9): 915-6; author reply 916-7.
- Kim, S. H. and R. J. Lin (1993). Pre-mRNA splicing within an assembled yeast spliceosome requires an RNA-dependent ATPase and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(3): 888-92.
- Kinlaw, C. S., S. K. Dusing-Swartz and S. M. Berget (1982). Human U1 and U2 small nuclear ribonucleoproteins contain common and unique polypeptides. *Mol Cell Biol* **2**(10): 1159-66.
- Kinlaw, C. S., B. L. Robberson and S. M. Berget (1983). Fractionation and characterization of human small nuclear ribonucleoproteins containing U1 and U2 RNAs. *J Biol Chem* **258**(11): 7181-9.
- Kirkpatrick, L. L., K. A. McIlwain and D. L. Nelson (2001). Comparative genomic sequence analysis of the FXR gene family: FMR1, FXR1, and FXR2. *Genomics* **78**(3): 169-77.
- Kitamura-Abe, S., H. Itoh, T. Washio, A. Tsutsumi and M. Tomita (2004). Characterization of the splice sites in GT-AG and GC-AG introns in higher eukaryotes using full-length cDNAs. *J Bioinform Comput Biol* **2**(2): 309-31.
- Koekkoek, S. K., K. Yamaguchi, B. A. Milojkovic, B. R. Dortland, T. J. Ruigrok, R. Maex, W. De Graaf, A. E. Smit, F. VanderWerf, C. E. Bakker, et al. (2005). Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron* **47**(3): 339-52.
- Konarska, M. M., P. J. Grabowski, R. A. Padgett and P. A. Sharp (1985).

- Characterization of the branch site in lariat RNAs produced by splicing of mRNA precursors. *Nature* **313**(6003): 552-7.
- Konarska, M. M., R. A. Padgett and P. A. Sharp (1985). Trans splicing of mRNA precursors in vitro. *Cell* **42**(1): 165-71.
- Konarska, M. M. and P. A. Sharp (1987). Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* **49**(6): 763-74.
- Kornblihtt, A. R. (2005). Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 262-8.
- Krainer, A. R. and T. Maniatis (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **42**(3): 725-36.
- Krainer, A. R., T. Maniatis, B. Ruskin and M. R. Green (1984). Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. *Cell* **36**(4): 993-1005.
- Kramer, A. and U. Utans (1991). Three protein factors (SF1, SF3 and U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *Embo J* **10**(6): 1503-9.
- Krawczak, M., J. Reiss and D. N. Cooper (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* **90**(1-2): 41-54.
- Kremer, E. J., M. Pritchard, M. Lynch, S. Yu, K. Holman, E. Baker, S. T. Warren, D. Schlessinger, G. R. Sutherland and R. I. Richards (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* **252**(5013): 1711-4.
- Kremer, E. J., S. Yu, M. Pritchard, R. Nagaraja, D. Heitz, M. Lynch, E. Baker, V. J. Hyland, R. D. Little, M. Wada, et al. (1991). Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X. *Am J Hum Genet* **49**(3): 656-61.
- Kriventseva, E. V., I. Koch, R. Apweiler, M. Vingron, P. Bork, M. S. Gelfand and S. Sunyaev (2003). Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends Genet* **19**(3): 124-8.
- Kulikova, T., R. Akhtar, P. Aldebert, N. Althorpe, M. Andersson, A. Baldwin, K. Bates, S. Bhattacharyya, L. Bower, P. Browne, et al. (2007). EMBL Nucleotide Sequence Database in 2006. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D16-20.
- Kulikova, T., P. Aldebert, N. Althorpe, W. Baker, K. Bates, P. Browne, A. van den Broek, G. Cochrane, K. Duggan, R. Eberhardt, et al. (2004). The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D27-30.
- Ladd, P. D., L. E. Smith, N. A. Rabaia, J. M. Moore, S. A. Georges, R. S. Hansen, R. J. Hagerman, F. Tassone, S. J. Tapscott and G. N. Filippova (2007). An antisense transcript spanning the CGG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Hum Mol Genet* **16**(24): 3174-87.
- Laggerbauer, B., D. Ostareck, E. M. Keidel, A. Ostareck-Lederer and U. Fischer (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* **10**(4): 329-38.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Lareau, L. F., R. E. Green, R. S. Bhatnagar and S. E. Brenner (2004). The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* **14**(3): 273-82.
- Larson, J., R. E. Jessen, D. Kim, A. K. Fine and J. du Hoffmann (2005). Age-dependent and selective impairment of long-term potentiation in the anterior piriform cortex of mice lacking the fragile X mental retardation protein. *J Neurosci* **25**(41): 9460-9.
- Lawn, R. M., E. F. Fritsch, R. C. Parker, G. Blake and T. Maniatis (1978). The isolation and characterization of linked delta- and beta-globin genes from a cloned library

- of human DNA. *Cell* **15**(4): 1157-74.
- Le Texier, V., J. J. Riethoven, V. Kumanduri, C. Gopalakrishnan, F. Lopez, D. Gautheret and T. A. Thanaraj (2006). AltTrans: transcript pattern variants annotated for both alternative splicing and alternative polyadenylation. *BMC Bioinformatics* **7**: 169.
- Lee, C. J. and K. Irizarry (2003). Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation. *Biol Psychiatry* **54**(8): 771-6.
- Lee, V., E. Camon, E. Dimmer, D. Barrell and R. Apweiler (2005). Who tangoes with GOA?-Use of Gene Ontology Annotation (GOA) for biological interpretation of 'omics' data and for validation of automatic annotation tools. *In Silico Biol* **5**(1): 5-8.
- Lejeune, F. and L. E. Maquat (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 309-15.
- Lerner, M. R., J. A. Boyle, S. M. Mount, S. L. Wolin and J. A. Steitz (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**(5743): 220-4.
- Lerner, M. R. and J. A. Steitz (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5495-9.
- Li, J., M. R. Pelletier, J. L. Perez Velazquez and P. L. Carlen (2002). Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with fragile X mental retardation protein deficiency. *Mol Cell Neurosci* **19**(2): 138-51.
- Li, Q., J. A. Lee and D. L. Black (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* **8**(11): 819-31.
- Li, Z., Y. Zhang, L. Ku, K. D. Wilkinson, S. T. Warren and Y. Feng (2001). The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* **29**(11): 2276-83.
- Lim, J. H., A. B. Booker and J. R. Fallon (2005). Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *J Cell Physiol* **205**(2): 170-5.
- Lin, C. L., S. Leu, M. C. Lu and P. Ouyang (2004). Over-expression of SR-cyclophilin, an interaction partner of nuclear pinin, releases SR family splicing factors from nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun* **321**(3): 638-47.
- Lin, H., W. Zhu, J. C. Silva, X. Gu and C. R. Buell (2006). Intron gain and loss in segmentally duplicated genes in rice. *Genome Biol* **7**(5): R41.
- Lin, J. C. and W. Y. Tarn (2005). Exon selection in alpha-tropomyosin mRNA is regulated by the antagonistic action of RBM4 and PTB. *Mol Cell Biol* **25**(22): 10111-21.
- Lin, S. L., D. Chang, D. Y. Wu and S. Y. Ying (2003). A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun* **310**(3): 754-60.
- Lin, S. L., D. Chang and S. Y. Ying (2005). Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene* **356**: 32-8.
- Lin, S. L., S. J. Chang and S. Y. Ying (2006). First in vivo evidence of microRNA-induced fragile X mental retardation syndrome. *Mol Psychiatry* **11**(7): 616-7.
- Ling, S. C., P. S. Fahrner, W. T. Greenough and V. I. Gelfand (2004). Transport of *Drosophila* fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(50): 17428-33.
- Lipscombe, D. (2005). Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol* **15**(3): 358-63.
- Lonberg, N. and W. Gilbert (1985). Intron/exon structure of the chicken pyruvate kinase gene. *Cell* **40**(1): 81-90.
- Lorkovic, Z. J., S. Lopato, M. Pexa, R. Lehner and A. Barta (2004). Interactions of Arabidopsis RS domain containing cyclophilins with SR proteins and U1 and U11 small nuclear ribonucleoprotein-specific proteins suggest their involvement

- in pre-mRNA Splicing. *J Biol Chem* **279**(32): 33890-8.
- Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* **21**(3): 231-44.
- Makalowski, W. (2001). The human genome structure and organization. *Acta Biochim Pol* **48**(3): 587-98.
- Maniatis, T. and R. Reed (1987). The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**(6106): 673-8.
- Maniatis, T. and B. Tasic (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**(6894): 236-43.
- Marzluff, W. F. (2007). U2 snRNP: not just for poly(A) mRNAs. *Mol Cell* **28**(3): 353-4.
- Matlin, A. J., F. Clark and C. W. Smith (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(5): 386-98.
- Maurer-Stroh, S., N. J. Dickens, L. Hughes-Davies, T. Kouzarides, F. Eisenhaber and C. P. Ponting (2003). The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* **28**(2): 69-74.
- Mayeda, A. and A. R. Krainer (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**(2): 365-75.
- Mayeda, A., A. M. Zahler, A. R. Krainer and M. B. Roth (1992). Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1301-4.
- Mazroui, R., M. E. Huot, S. Tremblay, C. Filion, Y. Labelle and E. W. Khandjian (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* **11**(24): 3007-17.
- Meng, F., O. Zolova, N. A. Kokorina, A. Dobretsova and P. A. Wight (2005). Characterization of an intronic enhancer that regulates myelin proteolipid protein (Plp) gene expression in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* **82**(3): 346-56.
- Merendino, L., S. Guth, D. Bilbao, C. Martinez and J. Valcarcel (1999). Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG. *Nature* **402**(6763): 838-41.
- Meshorer, E. and T. Misteli (2005). Splicing misplaced. *Cell* **122**(3): 317-8.
- Mironov, A. A., J. W. Fickett and M. S. Gelfand (1999). Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res* **9**(12): 1288-93.
- Mischak, H. (2007). Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin. Appl.* **1**: 148-156.
- Modrek, B. and C. Lee (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* **30**(1): 13-9.
- Modrek, B., A. Resch, C. Grasso and C. Lee (2001). Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2850-9.
- Moore, M. J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**(5740): 1514-8.
- Morgan, B. A., W. A. Johnson and J. Hirsh (1986). Regulated splicing produces different forms of dopa decarboxylase in the central nervous system and hypoderm of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **5**(12): 3335-42.
- Moroy, T. and F. Heyd (2007). The impact of alternative splicing in vivo: mouse models show the way. *Rna* **13**(8): 1155-71.
- Mortillaro, M. J. and R. Berezney (1998). Matrin CYP, an SR-rich cyclophilin that associates with the nuclear matrix and splicing factors. *J Biol Chem* **273**(14): 8183-92.
- Mueller, M., L. Martens and R. Apweiler (2007). Annotating the human proteome: beyond establishing a parts list. *Biochim Biophys Acta* **1774**(2): 175-91.
- Muramatsu, M., J. L. Hodnett and H. Busch (1966). Base composition of fractions of nuclear and nucleolar ribonucleic acid obtained by sedimentation and chromatography. *J Biol Chem* **241**(7): 1544-50.

- Murray, V. and R. Holliday (1979). Mechanism for RNA splicing of gene transcripts. *FEBS Lett* **106**(1): 5-7.
- Nakamura, T., A. W. Prestayko and H. Busch (1968). Studies on nucleolar 4 to 6 S ribonucleic acid of Novikoff hepatoma cells. *J Biol Chem* **243**(7): 1368-75.
- Naumann, F., R. Remus, B. Schmitz and W. Doerfler (2004). Gene structure and expression of the 5'-(CGG)(n)-3'-binding protein (CGGBP1). *Genomics* **83**(1): 106-18.
- Newman, A. (1987). Specific accessory sequences in *Saccharomyces cerevisiae* introns control assembly of pre-mRNAs into spliceosomes. *Embo J* **6**(12): 3833-9.
- Nimchinsky, E. A., A. M. Oberlander and K. Svoboda (2001). Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci* **21**(14): 5139-46.
- Oberle, I., F. Rousseau, D. Heitz, C. Kretz, D. Devys, A. Hanauer, J. Boue, M. F. Bertheas and J. L. Mandel (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**(5010): 1097-102.
- O'Donovan, C., R. Apweiler and A. Bairoch (2001). The human proteomics initiative (HPI). *Trends Biotechnol* **19**(5): 178-81.
- Ohashi, S., K. Koike, A. Omori, S. Ichinose, S. Ohara, S. Kobayashi, T. A. Sato and K. Anzai (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* **277**(40): 37804-10.
- Ohshima, Y., M. Itoh, N. Okada and T. Miyata (1981). Novel models for RNA splicing that involve a small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7): 4471-4.
- Oostra, B. A. (2002). Functions of the fragile X protein. *Trends Mol Med* **8**(3): 102-3.
- Oostra, B. A. and R. Willemsen (2003). A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**: R249-57.
- Orchard, S., R. Apweiler, R. Barkovich, D. Field, J. S. Garavelli, D. Horn, A. Jones, P. Jones, R. Julian, R. McNally, et al. (2006). Proteomics and Beyond: a report on the 3rd Annual Spring Workshop of the HUPO-PSI 21-23 April 2006, San Francisco, CA, USA. *Proteomics* **6**(16): 4439-43.
- Orchard, S., H. Hermjakob, C. Taylor, R. Aebersold and R. Apweiler (2005). Human Proteome Organisation Proteomics Standards Initiative. Pre-Congress Initiative. *Proteomics* **5**(18): 4651-2.
- Osborne, C. S., L. Chakalova, K. E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J. A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, et al. (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* **36**(10): 1065-71.
- Padgett, R. A., P. J. Grabowski, M. M. Konarska, S. Seiler and P. A. Sharp (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* **55**: 1119-50.
- Padgett, R. A., S. F. Hardy and P. A. Sharp (1983). Splicing of adenovirus RNA in a cell-free transcription system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(17): 5230-4.
- Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy and P. A. Sharp (1984). Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**(4665): 898-903.
- Padgett, R. A., S. M. Mount, J. A. Steitz and P. A. Sharp (1983). Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **35**(1): 101-7.
- Pandit, S., D. Wang and X. D. Fu (2008). Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 260-5.
- Parker, R., P. G. Siliciano and C. Guthrie (1987). Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell* **49**(2): 229-39.
- Pattyn, F., P. Robbrecht, A. De Paepe, F. Speleman and J. Vandesompele (2006). RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database, major update

2006. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D684-8.
- Pattyn, F., F. Speleman, A. De Paepe and J. Vandesompele (2003). RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 122-3.
- Pederson, T. and N. G. Davis (1980). Messenger RNA processing and nuclear structure: isolation of nuclear ribonucleoprotein particles containing beta-globin messenger RNA precursors. *J Cell Biol* **87**(1): 47-54.
- Pennisi, E. (2001). The human genome. *Science* **291**(5507): 1177-80.
- Pertea, M., X. Lin and S. L. Salzberg (2001). GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* **29**(5): 1185-90.
- Piccioni, F., V. Zappavigna and A. C. Verrotti (2005). Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. *C R Biol* **328**(10-11): 863-81.
- Poon, P. M., Q. L. Chen, N. Zhong, S. T. Lam, K. Y. Lai, C. K. Wong and C. P. Pang (2006). AGG interspersed analysis of the FMR1 CGG repeats in mental retardation of unspecified cause. *Clin Biochem* **39**(3): 244-8.
- Pospisil, H., A. Herrmann, R. H. Bortfeldt and J. G. Reich (2004). EASED: Extended Alternatively Spliced EST Database. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D70-4.
- Pozdnyakova, I. and L. Regan (2005). New insights into Fragile X syndrome. Relating genotype to phenotype at the molecular level. *Febs J* **272**(3): 872-8.
- Primerano, B., F. Tassone, R. J. Hagerman, P. Hagerman, F. Amaldi and C. Bagni (2002). Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *Rna* **8**(12): 1482-8.
- Proudfoot, N. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* **25**(6): 290-3.
- Proudfoot, N. J., A. Furger and M. J. Dye (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**(4): 501-12.
- Quackenbush, J. (2001). The power of public access: the human genome project and the scientific process. *Nat Genet* **29**(1): 4-6.
- Raharjo, S. B., N. Emoto, K. Ikeda, R. Sato, M. Yokoyama and M. Matsuo (2001). Alternative splicing regulates the endoplasmic reticulum localization or secretion of soluble secreted endopeptidase. *J Biol Chem* **276**(27): 25612-20.
- Raj, N. B., T. S. Ro-Choi and H. Busch (1975). Nuclear ribonucleoprotein complexes containing U1 and U2 RNA. *Biochemistry* **14**(20): 4380-5.
- Ramos, A., D. Hollingworth, S. Adinolfi, M. Castets, G. Kelly, T. A. Frenkiel, B. Bardoni and A. Pastore (2006). The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. *Structure* **14**(1): 21-31.
- Reeve, S. P., L. Bassetto, G. K. Genova, Y. Kleyner, M. Leyssen, F. R. Jackson and B. A. Hassan (2005). The Drosophila fragile X mental retardation protein controls actin dynamics by directly regulating profilin in the brain. *Curr Biol* **15**(12): 1156-63.
- Reis, E. M., R. Louro, H. I. Nakaya and S. Verjovski-Almeida (2005). As antisense RNA gets intronic. *Omics* **9**(1): 2-12.
- Richards, B. W., P. E. Sylvester and C. Brooker (1981). Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. *J Ment Defic Res* **25 Pt 4**: 253-6.
- Roberts, L. (2001). The human genome. Controversial from the start. *Science* **291**(5507): 1182-8.
- Rodriguez-Revenga, L., M. Mila, C. Rosenberg, A. Lamb and C. Lee (2007). Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genet Med* **9**(9): 600-6.
- Roest Crollius, H., O. Jaillon, A. Bernot, C. Dasilva, L. Bouneau, C. Fischer, C. Fizames, P. Wincker, P. Brottier, F. Quetier, et al. (2000). Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using Tetraodon nigroviridis DNA sequence. *Nat Genet* **25**(2): 235-8.

- Rogers, J. and R. Wall (1980). A mechanism for RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4): 1877-9.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, et al. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**(5461): 2204-15.
- Ruskin, B., A. R. Krainer, T. Maniatis and M. R. Green (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**(1): 317-31.
- Ruskin, B., P. D. Zamore and M. R. Green (1988). A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* **52**(2): 207-19.
- Ryan, K., K. G. Murthy, S. Kaneko and J. L. Manley (2002). Requirements of the RNA polymerase II C-terminal domain for reconstituting pre-mRNA 3' cleavage. *Mol Cell Biol* **22**(6): 1684-92.
- Sambrook, J. (1977). Adenovirus amazes at Cold Spring Harbor. *Nature* **268**(5616): 101-4.
- Schellenberg, M. J., D. B. Ritchie and A. M. MacMillan (2008). Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci* **33**(6): 243-6.
- Schenkel, J., C. E. Sekeris, A. Alonso and E. K. Bautz (1988). RNA-binding properties of hnRNP proteins. *Eur J Biochem* **171**(3): 565-9.
- Scherer, L. J. and J. J. Rossi (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* **21**(12): 1457-65.
- Schrier, M., L. A. Severijnen, S. Reis, M. Rife, S. van't Padje, G. van Cappellen, B. A. Oostra and R. Willemsen (2004). Transport kinetics of FMRP containing the I304N mutation of severe fragile X syndrome in neurites of living rat PC12 cells. *Exp Neurol* **189**(2): 343-53.
- Shah, T., E. de Villiers, V. Nene, B. Hass, E. Taracha, M. J. Gardner, C. Sansom, R. Pelle and R. Bishop (2006). Using the transcriptome to annotate the genome revisited: application of massively parallel signature sequencing (MPSS). *Gene* **366**(1): 104-8.
- Shapiro, L., J. Love and D. R. Colman (2007). Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci* **30**: 451-74.
- Shapiro, M. B. and P. Senapathy (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* **15**(17): 7155-74.
- Sharma, S. and D. L. Black (2006). Maps, codes, and sequence elements: can we predict the protein output from an alternatively spliced locus? *Neuron* **52**(4): 574-6.
- Sharp, P. A. and C. B. Burge (1997). Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell* **91**(7): 875-9.
- Shen, H. and M. R. Green (2006). RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans. *Genes Dev* **20**(13): 1755-65.
- Shen, H. and M. R. Green (2007). RS domain-splicing signal interactions in splicing of U12-type and U2-type introns. *Nat Struct Mol Biol* **14**(7): 597-603.
- Shen, H., J. L. Kan and M. R. Green (2004). Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol Cell* **13**(3): 367-76.
- Sherman, S. L., P. A. Jacobs, N. E. Morton, U. Froster-Iskenius, P. N. Howard-Peebles, K. B. Nielsen, M. W. Partington, G. R. Sutherland, G. Turner and M. Watson (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* **69**(4): 289-99.
- Sheth, N., X. Roca, M. L. Hastings, T. Roeder, A. R. Krainer and R. Sachidanandam (2006). Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **34**(14): 3955-67.

- Sheth, U. and R. Parker (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* **125**(6): 1095-109.
- Singh, N. N., E. J. Androphy and R. N. Singh (2004). An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **315**(2): 381-8.
- Siomi, H., A. Ishizuka and M. C. Siomi (2004). RNA interference: a new mechanism by which FMRP acts in the normal brain? What can *Drosophila* teach us? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **10**(1): 68-74.
- Siomi, H., M. C. Siomi, R. L. Nussbaum and G. Dreyfuss (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**(2): 291-8.
- Siomi, M. C., Y. Zhang, H. Siomi and G. Dreyfuss (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol* **16**(7): 3825-32.
- Sittler, A., D. Devys, C. Weber and J. L. Mandel (1996). Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* **5**(1): 95-102.
- Smaglik, P. (2000). Researchers take a gamble on the human genome. *Nature* **405**(6784): 264.
- Smith, C. W. (2005). Alternative splicing--when two's a crowd. *Cell* **123**(1): 1-3.
- Smith, P. J., C. Zhang, J. Wang, S. L. Chew, M. Q. Zhang and A. R. Krainer (2006). An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* **15**(16): 2490-508.
- Soares, L. M., K. Zanier, C. Mackereth, M. Sattler and J. Valcarcel (2006). Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK. *Science* **312**(5782): 1961-5.
- Soeiro, R., H. C. Birnboim and J. E. Darnell (1966). Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA. II. Base composition and cellular localization of a heterogeneous RNA fraction. *J Mol Biol* **19**(2): 362-72.
- Sofola, O. A., P. Jin, Y. Qin, R. Duan, H. Liu, M. de Haro, D. L. Nelson and J. Botas (2007). RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS. *Neuron* **55**(4): 565-71.
- Sorek, R., R. Shamir and G. Ast (2004). How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet* **20**(2): 68-71.
- Southan, C. (2004). Has the yo-yo stopped? An assessment of human protein-coding gene number. *Proteomics* **4**(6): 1712-26.
- Spector, D. L., X. D. Fu and T. Maniatis (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *Embo J* **10**(11): 3467-81.
- Sri-Widada, J., J. P. Liautard, C. Brunel and P. Jeanteur (1983). Interaction of snRNAs with rapidly sedimenting nuclear sub-structures (hnRNPs) from HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **11**(19): 6631-46.
- Stamm, S., S. Ben-Ari, I. Rafalska, Y. Tang, Z. Zhang, D. Toiber, T. A. Thanaraj and H. Soreq (2005). Function of alternative splicing. *Gene* **344**: 1-20.
- Stamm, S., J. J. Riethoven, V. Le Texier, C. Gopalakrishnan, V. Kumanduri, Y. Tang, N. L. Barbosa-Morais and T. A. Thanaraj (2006). ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D46-55.
- Stetefeld, J. and M. A. Ruegg (2005). Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* **30**(9): 515-21.
- Stevenin, J., H. Gallinaro-Matringe, R. Gattoni and M. Jacob (1977). Complexity of the structure of particles containing heterogeneous nuclear RNA as demonstrated by ribonuclease treatment. *Eur J Biochem* **74**(3): 589-602.
- Stoesser, G., W. Baker, A. van den Broek, M. Garcia-Pastor, C. Kanz, T. Kulikova, R.

- Leinonen, Q. Lin, V. Lombard, R. Lopez, et al. (2003). The EMBL Nucleotide Sequence Database: major new developments. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 17-22.
- Strair, R. K., S. H. Yap and D. A. Shafritz (1977). Use of molecular hybridization to purify and analyze albumin messenger RNA from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(10): 4346-50.
- Sun, Q., A. Mayeda, R. K. Hampson, A. R. Krainer and F. M. Rottman (1993). General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. *Genes Dev* **7**(12B): 2598-608.
- Suzuki, H. (2006). Protein-protein interactions in the mammalian brain. *J Physiol* **575**(Pt 2): 373-7.
- Szabo, P., M. Purrello, M. Rocchi, N. Archidiacono, B. Alhadeff, G. Filippi, D. Toniolo, G. Martini, L. Luzzatto and M. Siniscalco (1984). Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(24): 7855-9.
- Tamanini, F., C. Bontekoe, C. E. Bakker, L. van Unen, B. Anar, R. Willemsen, M. Yoshida, H. Galjaard, B. A. Oostra and A. T. Hoogeveen (1999). Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet* **8**(5): 863-9.
- Tanaka, K., A. Watakabe and Y. Shimura (1994). Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol Cell Biol* **14**(2): 1347-54.
- Tange, T. O., C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel and J. Kjems (2001). The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *Embo J* **20**(20): 5748-58.
- Tarn, W. Y. and J. A. Steitz (1997). Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem Sci* **22**(4): 132-7.
- Tassone, F., A. Beilina, C. Carosi, S. Albertosi, C. Bagni, L. Li, K. Glover, D. Bentley and P. J. Hagerman (2007). Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. *Rna* **13**(4): 555-62.
- Tassone, F., R. J. Hagerman, A. K. Taylor, L. W. Gane, T. E. Godfrey and P. J. Hagerman (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* **66**(1): 6-15.
- Tazi, J., S. Durand and P. Jeanteur (2005). The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy. *Trends Biochem Sci* **30**(8): 469-78.
- Teferedegne, B., M. R. Green, Z. Guo and J. M. Boss (2006). Mechanism of action of a distal NF-kappaB-dependent enhancer. *Mol Cell Biol* **26**(15): 5759-70.
- Teigelkamp, S., T. Achsel, C. Mundt, S. F. Gothel, U. Cronshagen, W. S. Lane, M. Marahiel and R. Luhrmann (1998). The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *Rna* **4**(2): 127-41.
- Terracciano, A., P. Chiurazzi and G. Neri (2005). Fragile X syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **137C**(1): 32-7.
- Thanaraj, T. A. (2000). Positional characterisation of false positives from computational prediction of human splice sites. *Nucleic Acids Res* **28**(3): 744-54.
- Thanaraj, T. A. and F. Clark (2001). Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res* **29**(12): 2581-93.
- Thanaraj, T. A., F. Clark and J. Muilu (2003). Conservation of human alternative splice events in mouse. *Nucleic Acids Res* **31**(10): 2544-52.
- Thanaraj, T. A., A. Robinson, J. Muilu and J. J. Riethoven (2000). Paradigm shifts in the approaches for gene annotation. *Brief Bioinform* **1**(4): 324-9.
- Thanaraj, T. A. and A. J. Robinson (2000). Prediction of exact boundaries of exons. *Brief Bioinform* **1**(4): 343-56.
- Thanaraj, T. A. and S. Stamm (2003). Prediction and statistical analysis of alternatively

- spliced exons. *Prog Mol Subcell Biol* **31**: 1-31.
- Thanaraj, T. A., S. Stamm, F. Clark, J. J. Riethoven, V. Le Texier and J. Muilu (2004). ASD: the Alternative Splicing Database. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D64-9.
- Tijsterman, M. and R. H. Plasterk (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* **117**(1): 1-3.
- Tilghman, S. M., D. C. Tiemeier, J. G. Seidman, B. M. Peterlin, M. Sullivan, J. V. Maizel and P. Leder (1978). Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse beta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(2): 725-9.
- Till, S., E. Lejeune, R. Thermann, M. Bortfeld, M. Hothorn, D. Enderle, C. Heinrich, M. W. Hentze and A. G. Ladurner (2007). A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* **14**(10): 897-903.
- Tonegawa, S., A. M. Maxam, R. Tizard, O. Bernard and W. Gilbert (1978). Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(3): 1485-9.
- Ule, J. and R. B. Darnell (2006). RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **16**(1): 102-10.
- Ule, J., G. Stefani, A. Mele, M. Ruggiu, X. Wang, B. Taneri, T. Gaasterland, B. J. Blencowe and R. B. Darnell (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* **444**(7119): 580-6.
- Ule, J., A. Ule, J. Spencer, A. Williams, J. S. Hu, M. Cline, H. Wang, T. Clark, C. Fraser, M. Ruggiu, et al. (2005). Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nat Genet* **37**(8): 844-52.
- Ureta-Vidal, A., L. Ettwiller and E. Birney (2003). Comparative genomics: genome-wide analysis in metazoan eukaryotes. *Nat Rev Genet* **4**(4): 251-62.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, G. J. Hannon and R. Parker (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* **20**(5): 515-24.
- Valverde, R., I. Pozdnyakova, T. Kajander, J. Venkatraman and L. Regan (2007). Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. *Structure* **15**(9): 1090-8.
- van den Berg, J., A. van Ooyen, N. Mantei, A. Schambeck, G. Grosveld, R. A. Flavell and C. Weissmann (1978). Comparison of cloned rabbit and mouse beta-globin genes showing strong evolutionary divergence of two homologous pairs of introns. *Nature* **276**(5683): 37-44.
- Van Esch, H. (2006). The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet* **49**(1): 1-8.
- Vanderklish, P. W. and G. M. Edelman (2005). Differential translation and fragile X syndrome. *Genes Brain Behav* **4**(6): 360-84.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.
- Venkatesh, B., E. F. Kirkness, Y. H. Loh, A. L. Halpern, A. P. Lee, J. Johnson, N. Dandona, L. D. Viswanathan, A. Tay, J. C. Venter, et al. (2006). Ancient noncoding elements conserved in the human genome. *Science* **314**(5807): 1892.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**(5507): 1304-51.
- Verheij, C., C. E. Bakker, E. de Graaff, J. Keulemans, R. Willemsen, A. J. Verkerk, H. Galjaard, A. J. Reuser, A. T. Hoogeveen and B. A. Oostra (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**(6431): 722-4.

- Verheij, C., E. de Graaff, C. E. Bakker, R. Willemsen, P. J. Willems, N. Meijer, H. Galjaard, A. J. Reuser, B. A. Oostra and A. T. Hoogeveen (1995). Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet* **4**(5): 895-901.
- Verkerk, A. J., E. de Graaff, K. De Boulle, E. E. Eichler, D. S. Konecki, E. Reyniers, A. Manca, A. Poustka, P. J. Willems, D. L. Nelson, et al. (1993). Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* **2**(8): 1348.
- Verkerk, A. J., M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria, F. P. Zhang, et al. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**(5): 905-14.
- Vianna-Morgante, A. M. (1999). Twinning and premature ovarian failure in premutation fragile X carriers. *Am J Med Genet* **83**(4): 326.
- Vianna-Morgante, A. M. and S. S. Costa (2000). Premature ovarian failure is associated with maternally and paternally inherited premutation in Brazilian families with fragile X. *Am J Hum Genet* **67**(1): 254-5; author reply 256-8.
- Vianna-Morgante, A. M., S. S. Costa, A. S. Pares and I. T. Verreschi (1996). FRAXA premutation associated with premature ovarian failure. *Am J Med Genet* **64**(2): 373-5.
- Vogel, G. (2001). The human genome. Objection #2: why sequence the junk? *Science* **291**(5507): 1184.
- Wang, H., J. B. Dictenberg, L. Ku, W. Li, G. J. Bassell and Y. Feng (2008). Dynamic Association of the Fragile X Mental Retardation Protein as a Messenger Ribonucleoprotein between Microtubules and Polyribosomes. *Mol Biol Cell* **19**(1): 105-14.
- Wang, J., P. J. Smith, A. R. Krainer and M. Q. Zhang (2005). Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res* **33**(16): 5053-62.
- Wang, M. and A. Marin (2006). Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene* **366**(2): 219-27.
- Wang, Y. C., M. L. Lin, S. J. Lin, Y. C. Li and S. Y. Li (1997). Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome. *Hum Mutat* **10**(5): 393-9.
- Wang, Z., M. E. Rolish, G. Yeo, V. Tung, M. Mawson and C. B. Burge (2004). Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* **119**(6): 831-45.
- Wang, Z., X. Xiao, E. Van Nostrand and C. B. Burge (2006). General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control. *Mol Cell* **23**(1): 61-70.
- Weiler, I. J., S. A. Irwin, A. Y. Klintsova, C. M. Spencer, A. D. Brazelton, K. Miyashiro, T. A. Comery, B. Patel, J. Eberwine and W. T. Greenough (1997). Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5395-400.
- Weinberg, R. A., U. Loening, M. Willems and S. Penman (1967). Acrylamide gel electrophoresis of HeLa cell nucleolar RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(3): 1088-95.
- Weinberg, R. A. and S. Penman (1968). Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. *J Mol Biol* **38**(3): 289-304.
- Weinstock, R., R. Sweet, M. Weiss, H. Cedar and R. Axel (1978). Intragenic DNA spacers interrupt the ovalbumin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(3): 1299-303.
- Wen, F., F. Li, H. Xia, X. Lu, X. Zhang and Y. Li (2004). The impact of very short alternative splicing on protein structures and functions in the human genome. *Trends Genet* **20**(5): 232-6.
- Will, C. L. and R. Luhrmann (2005). Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biol Chem* **386**(8): 713-24.

- Williams, A. M. and S. A. Martinis (2006). Mutational unmasking of a tRNA-dependent pathway for preventing genetic code ambiguity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3586-91.
- Williamson, R. (1977). An approach to the understanding of messenger ribonucleic acid synthesis, processing and regulation in eukaryotes. *Biochem Soc Symp*(42): 99-102.
- Willingham, A. T. and T. R. Gingeras (2006). TUF love for "junk" DNA. *Cell* **125**(7): 1215-20.
- Wilton, S. D. and S. Fletcher (2005). RNA splicing manipulation: strategies to modify gene expression for a variety of therapeutic outcomes. *Curr Gene Ther* **5**(5): 467-83.
- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**(1): 75-85.
- Wu, S., C. M. Romfo, T. W. Nilsen and M. R. Green (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**(6763): 832-5.
- Xiao, S., S. Tjostheim, T. Sanelli, J. R. McLean, P. Horne, Y. Fan, J. Ravits, M. J. Strong and J. Robertson (2008). An aggregate-inducing peripherin isoform generated through intron retention is upregulated in amyotrophic lateral sclerosis and associated with disease pathology. *J Neurosci* **28**(8): 1833-40.
- Xing, Y. and C. Lee (2006). Alternative splicing and RNA selection pressure-- evolutionary consequences for eukaryotic genomes. *Nat Rev Genet* **7**(7): 499-509.
- Yamamori, T. (1992). Molecular mechanisms for generation of neural diversity and specificity: roles of polypeptide factors in development of postmitotic neurons. *Neurosci Res* **12**(5): 545-82.
- Yang, V. W., M. R. Lerner, J. A. Steitz and S. J. Flint (1981). A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(3): 1371-5.
- Yeo, G., D. Holste, G. Kreiman and C. B. Burge (2004). Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol* **5**(10): R74.
- Yeo, G., S. Hoon, B. Venkatesh and C. B. Burge (2004). Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44): 15700-5.
- Yokoyama, S. (2003). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* **7**(1): 39-43.
- Yu, S., M. Pritchard, E. Kremer, M. Lynch, J. Nancarrow, E. Baker, K. Holman, J. C. Mulley, S. T. Warren, D. Schlessinger, et al. (1991). Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* **252**(5010): 1179-81.
- Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk and M. B. Roth (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* **6**(5): 837-47.
- Zalfa, F., M. Giorgi, B. Primerano, A. Moro, A. Di Penta, S. Reis, B. Oostra and C. Bagni (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**(3): 317-27.
- Zamore, P. D. and M. R. Green (1989). Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9243-7.
- Zarnescu, D. C., G. Shan, S. T. Warren and P. Jin (2005). Come FLY with us: toward understanding fragile X syndrome. *Genes Brain Behav* **4**(6): 385-92.
- Zhang, X. H. and L. A. Chasin (2004). Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev* **18**(11): 1241-50.
- Zhang, Y., J. P. O'Connor, M. C. Siomi, S. Srinivasan, A. Dutra, R. L. Nussbaum and G. Dreyfuss (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *Embo J* **14**(21): 5358-66.
- Zhou, Z., L. J. Licklider, S. P. Gygi and R. Reed (2002). Comprehensive proteomic

- analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**(6903): 182-5.
- Zipursky, S. L., W. M. Wojtowicz and D. Hattori (2006). Got diversity? Wiring the fly brain with Dscam. *Trends Biochem Sci* **31**(10): 581-8.
- Zorio, D. A. and T. Blumenthal (1999). Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **402**(6763): 835-8.
- Zorio, D. A. and T. Blumenthal (1999). U2AF35 is encoded by an essential gene clustered in an operon with RRM/cyclophilin in *Caenorhabditis elegans*. *Rna* **5**(4): 487-94.
- Zumwalt, M., A. Ludwig, P. J. Hagerman and T. Dieckmann (2007). Secondary structure and dynamics of the r(CGG) repeat in the mRNA of the fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene. *RNA Biol* **4**(2): 93-100.
- Zuniga, A., J. Juan, M. Mila and A. Guerrero (2005). Expansion of an intermediate allele of the FMR1 gene in only two generations. *Clin Genet* **68**(5): 471-3.