Fernando Janczur Velloso

**Variabilidade do domínio KH-2 da proteína do retardo
mental do X frágil (FMRP)**

**SÃO PAULO
2013**

Fernando Janczur Velloso

**Variabilidade do domínio KH-2 da proteína do retardo
mental do X frágil (FMRP)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

SÃO PAULO

2013

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP

VELLOSO, FERNANDO JANCZUR

Variabilidade do domínio KH-2 da proteína do retardo
mental do X frágil (FMRP)

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

1. Gene do Retardo Mental do X Frágil 2. *Splicing* alternativo 3.
Proteína do Retardo Mental do X Frágil 4. Domínio KH

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética
de Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora

À minha família, Alcir, Christine e Julia

À Juliana, minha grande companheira

Agradecimentos

À minha família pelo grande apoio, incentivo e confiança.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana A. Haddad, pelo amadurecimento científico.

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

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto pela colaboração e supervisão no desenvolvimento e análise dos experimentos de imunoistoquímica e imunofluorescência.

Ao Adilson Silva Alves (ICB-USP), pelo suporte ao criostato e experimentos de imunoistoquímica.

À Profa. Dra. Lea T Grinberg e a biomédica Edilaine Tampelini Santos do laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento (GEROLAB), pela colaboração, fornecimento de amostras de cérebro humano e discussão dos experimentos.

Aos Profs. Dr Henning Ulrich (IQ-USP) e Dra Telma Schwindt (ICB-USP) e à bióloga Alexandra Saona-Marín, pela colaboração no desenvolvimento de experimentos de neuroesferas.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto (IB-USP), os biólogos Thiago Gerônimo Alegria e Simone Vidigal Alves, pela colaboração no desenvolvimento e análise dos experimentos de cromatografia de exclusão molecular e cultura de bactérias.

Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro e o biólogo Waldir Caldeira, pela realização das análises de microscopia confocal.

Aos Profs. Dra. Regina Célia Mingronni Netto, Dra. Angela M Vianna Morgante e Dr. Eduardo Gorab, pelo apoio e uso das instalações de seus laboratórios.

Aos Profs. Dr Édouard Khandjian (Université du Laval, Québec, Canadá) e Dra. Barbara Bardoni (Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, França) pelas sugestões aos experimentos com complexos ribonucleoproteicos.

À Profa. Dra. Mary Sogayar (IQ-USP) pelo incentivo e enriquecimento científico na disciplina “Biologia Molecular da Transformação Maligna”.

Às Profas. Dra. Maria Rita dos Santos Passos-Bueno e Dra Mariz Vainzhof (IB-USP) pelo uso das instalações do Centro de Estudos do Genoma Humano.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva: Fátima, Teresa, Mara, Paulo Rogério e Maraisa pelo suporte ao longo destes anos.

Aos ex-alunos do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva Larissa Fontes, Rafaella Nascimento e Leonardo Capelli pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de laboratório: Marcelo Valpeteris, Luiz Gustavo Dufner e Daniele Rosado pelo convívio diário e também por estarem sempre disponíveis a me auxiliar em meus experimentos.

À Ana Carla Batissoco e a sua família pela amizade e incentivo.

À Deborah Azzi-Nogueira pela grande e sincera amizade e pelo seu apoio ao longo de todos esses anos.

À Juliana Corrêa por todo seu amor, companheirismo, dedicação e paciência. E por estar sempre presente na minha vida, dentro e fora do laboratório.

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo à orientadora (FAPESP Proc. 2008/53857-8 e 2011/14329-9) e do Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ao aluno.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XX
PREFÁCIO.....	XXIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A proteína FMRP e a família FXR.....	4
1.2. Funções e distribuição subcelular da FMRP.....	10
1.3. Domínios funcionais da proteína FMRP.....	14
1.3.1. Domínio Tudor.....	15
1.3.2. Domínio RGG.....	17
1.3.3. Domínios KH.....	18
1.4. FMRP em células progenitoras.....	23
1.5. Variabilidade de tamanho da alça variável do domínio KH-2 da FMRP.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Animais e obtenção de encéfalos.....	28
3.1.2. Amostras de tecido cerebral humano.....	29
3.1.3. Linhagens celulares imortalizadas.....	30
3.1.4. Anticorpos.....	30
3.1.5. Oligonucleotídeos.....	32
3.2. Métodos.....	34
3.2.1. Pré-adsorção do anticorpo 3460.....	34
3.2.2. Imunoistoquímica.....	34
3.2.3. Imunofluorescência indireta de tecido.....	36
3.2.4. Análise dos níveis de RNAm de transcritos do <i>FMR1</i>	37
3.2.4.1. Preparo de água-DEPC estéril.....	37
3.2.4.2. Extração de RNA total.....	37
3.2.4.3. Extração de DNA genômico.....	38
3.2.4.4. Sexagem molecular.....	39
3.2.4.5. Extração de RNA total a partir de cérebro humano.....	40
3.2.4.6. Quantificação de RNA.....	40

3.2.4.7. Síntese de cDNA.....	41
3.2.4.8. Teste dos cDNAs.....	42
3.2.4.9. Reação de qRT-PCR.....	42
3.2.5. Lisados de córtex cerebral de rato.....	44
3.2.6. Cromatografia de exclusão molecular.....	45
3.2.7. <i>Western blotting</i>	46
3.2.8. Cultivo em suspensão de células progenitoras neuro-gliais da vesícula telencefálica de rato em E14	47
3.2.9. Imunofluorescência indireta de células	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Distribuição de isoformas FMRP ₊₁₂ ISO no encéfalo de rato em P12.....	51
4.2. Expressão do éxon 12 do <i>Fmr1</i> na vesícula telencefálica de rato em E14.....	86
4.3. Expressão das FMRP ₊₁₂ ISO no desenvolvimento telencefálico embrionário.....	91
4.4. Expressão <i>in vitro</i> das FMRP ₊₁₂ ISO em precursores de neurônios e após diferenciação neuronal.....	101
4.5. O éxon 12 do <i>FMR1</i> no córtex cerebral frontal humano em envelhecimento.....	107
4.6. Avaliação de retenção intrônica em transcritos do <i>FMR1</i>	112
5. DISCUSSÃO.....	114
5.1. A expressão da FMRP entre os períodos embrionário e pós- natal do animal jovem.....	117
5.2. A FMRP e o córtex cerebral.....	125
5.3. A FMRP e o cerebelo.....	131
5.4. A FMRP e o hipocampo.....	132
5.5. A FMRP e células-tronco neurais pós-natais.....	137
5.6. A FMRP no envelhecimento cerebral	139
5.7. A configuração longa da alça variável do domínio KH-2 da FMRP	141
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
7. ANEXO .Manuscrito em preparação.....	164

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática do gene <i>FMR1</i>	2
Figura 2: Alinhamento das proteínas da família FXR.....	5
Figura 3: Modelo da atuação funcional da proteína FMRP no neurônio	14
Figura 4: Representação esquemática dos domínios de ligação a RNA da proteína FMRP.....	24
Figura 5: Padronização da pré-adsorção do anticorpo p3460.....	54
Figura 6: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	58
Figura 7: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	59
Figura 8: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	61
Figura 9: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	62
Figura 10: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	63
Figura 11: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	65
Figura 12: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	66
Figura 13: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	68
Figura 14: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	70
Figura 15: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	71
Figura 16: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	72
Figura 17: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	73
Figura 18: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	74
Figura 19: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12.....	75
Figura 20: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12 com coloração Giemsa.....	77
Figura 21: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12 com coloração Giemsa.....	78
Figura 22: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12 com coloração Giemsa.....	80
Figura 23: Imunofluorescência em encéfalos de rato em em P12.....	81
Figura 24: Análise de cromatografia de filtração em gel (HPLC) em lisado obtido de córtex frontal de ratos em P12.....	86
Figura 25: Níveis relativos de expressão do transcrito do gene <i>Fmr1</i> no período embrionário.....	90
Figura 26: Análise de <i>Western blotting</i> da proteína FMRP no período	

embrionário.....	92
Figura 27: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário.....	94
Figura 28: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário.....	96
Figura 29: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário.....	97
Figura 30: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário.....	98
Figura 31: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário.....	100
Figura 32: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário.....	101
Figura 33: Imunofluorescência em precursores neuronais.....	102
Figura 34: Imunofluorescência em precursores neuronais.....	104
Figura 35: Imunofluorescência em precursores neuronais.....	106
Figura 36: Níveis relativos de expressão dos transcritos do gene <i>FMR1</i> no córtex cerebral frontal humano em envelhecimento.....	110
Figura 37: Imunoistoquímica em tecidos de córtex cerebral frontal humano em envelhecimento.....	112
Figura 38: Esquema demonstrando a regulação por fosforilação da FMRP na repressão traducional.....	123
Figura 39: Esquema demonstrando a maturação das espinhas dendríticas e a formação de sinapses.....	134

Índice de tabelas

Tabela 1: Isoformas da proteína FMRP.....	3
Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas diferentes etapas do estudo de expressão dos transcritos do gene <i>Fmr1</i>	33
Tabela 3: Resumo das marcações específicas com anticorpos 7G1-1 e soro imune 3460 e, encéfalo de rato em P12.....	75

Lista de acrônimos

C – grau Celsius	DNA – ácido desoxirribonucléico
ABC – avidina-biotina-peroxidase	dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato
BEH-GEEC – Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral	dsRNA – RNA dupla fita
bFGF – fator de crescimento de fibroblasto básico	dTTP – 2' desoxitimidina 5' trifosfato
BLAST – <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
BSA – albumina sérica bovina	EGF – fator de crescimento epidérmico
CAPPesq – Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	FBS – soro fetal bovino
cDNA – DNA complementar	FM-USP – Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo
CDR – <i>Clinical Dementia Rating Scale</i>	<i>FMR1</i> – Gene do Retardo Mental do X Frágil
CEUA – Comissão de Ética em Uso Experimental de Animais	FMR1-ISO1-DDK-His e FMR1-ISO7-DDK-His
CGG – repetições citosina-guanina-guanina	FMRP – Proteína do Retardo Mental do X Frágil
CMV – citomegalovírus	FMRP ₋₁₂ ISO – isoformas da FMRP que não expressam a sequência codificada pelo éxon 12 do gene <i>Fmr1</i>
CO ₂ – dióxido de carbono	FMRP ₊₁₂ ISO – isoformas da FMRP que expressam a sequência codificada pelo éxon 12 do gene <i>Fmr1</i>
CpG – dinucleotídeos citosina-guanina ligados covalentemente	FXPOI – insuficiência ovariana primária associada ao X frágil
CSM – sítio de clonagem múltipla	FXTAS – síndrome de ataxia e tremor associada ao X frágil
Ct – ciclo de <i>threshold</i>	<i>g</i> – unidade de aceleração gravitacional
DAB – diaminobenzidina	GSD – tampão constituído por glicina-SDS-DTT
dATP – 2' desoxiadenosina 5' trifosfato	HCl – ácido clorídrico
dCTP – 2' desoxicitidina 5' trifosfato	HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
DEPC – Dietilpirocarbonato	HPLC – cromatografia líquida de alta performance
dGTP – desoxiguanosina 5' trifosfato	
DIV – dias <i>in vitro</i>	
DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco	
DMSO – dimetilsulfóxido	

IB-USP – Instituto de Biologia da
Universidade de São Paulo

IgG – imunoglobulina G

kb – quilobase

KCl – cloreto de potássio

kDa – quilodáton

KH-1 – domínio homólogo à
ribonucleoproteína heterogênea
nuclear K, hnRNP K, do tipo 1

KH-2 – domínio homólogo à
ribonucleoproteína heterogênea
nuclear K, hnRNP K, do tipo 2

KH₂PO₄ - potássio di-hidrogenofosfato

KOH – hidróxido de potássio

LiCl – cloreto de lítio

M – molar

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

Na₂HPO₄ - hidrogenofosfato dissódico

NaCl – cloreto de sódio

Ni⁺² – Ion Níquel+2

NP-40 – NP-40 Tipo-Tergitol

oligo(dT) – oligo desoxitimina

OMIM – *Online Mendelian Inheritance
in Man*

p – probabilidade

P/S/G – Penicilina-streptomicina-
glutamina

pb – pares de base

PB – tampão fosfato

PBS – tampão fosfato salino

pcDNA3.1 – Vetor contendo epitopo
FLAG

pCMV6-AC-DDK-His – Vetor contendo
epítomos FLAG e Polihistidina

PCR – reação em cadeia da
polimerase

PFA – paraformaldeído

pH – potencial hidrogeniônico

Ppia – Peptidilprolil Isomerase A

qPCR – PCR quantitativo

qRT-PCR – RT-PCR quantitativo

RNA – ácido ribonucleico

RNP – Ribonucleoproteína

ROX – Carboxi-X-rodamina

RT-PCR – reação da transcriptase
reversa seguida por PCR

SDS – dodecyl sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de
poliacrilamida desnaturante

SXF – síndrome do X frágil

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – tampão constituído de tris base,
ácido bórico e EDTA

TBS-T – tampão tris salino adicionado
de tween

TCA – ácido tricloroacético

TES – tampão constituído de tris,
EDTA e SDS

TRITC – *Tetramethylrhodamine
isothiocyanate*

Tspy – Proteína específica de Testículo
Ligada ao Y

U – unidade

USP – Universidade de São Paulo

UTR – região não-traduzida de um
gene

µg – microgramas

µL – microlitro

µM – micromolar

Resumo

A proteína do retardo mental do X frágil (FMRP), codificada pelo gene do *Retardo Mental do X Frágil* (do inglês, *Fragile Mental Retardation 1*, *FMR1*) tem expressão significativa no encéfalo, gônadas e células proliferativas. A FMRP é uma proteína ligante de RNA, repressora traducional, que transita entre o núcleo celular, grânulos citoplasmáticos e polissomos. Sua associação a RNA pode se dar pelos domínios Tudor N-terminais, dois domínios centrais, com homologia à heteronucleoproteína K (KH) ou motivos RGG, ricos em arginina (R) e glicina (G), C-terminais. A abolição da expressão da FMRP por mutações no gene *FMR1* é a causa mais frequente de deficiência intelectual hereditária entre homens.

Transcritos desse gene sofrem *splicing* alternativo de quatro éxons, podendo gerar até 20 isoformas não redundantes da FMRP. A tradução de RNAm do *FMR1* contendo o éxon 12 causa uma extensão em fase, em 21 aminoácidos na alça variável do segundo domínio KH (KH-2) da FMRP, cujos padrão de expressão e função ainda são desconhecidos. Embora a FMRP tenha alta similaridade com duas proteínas parálogas, proteínas relacionadas à FMRP, FRX1P e FXR2P, ela apresenta algumas características de expressão e função que lhes são próprias. A longa alça variável do domínio KH-2, por exemplo, não é observada nas parálogas e é característica somente de ortólogas da FMRP em mamíferos. Assim, é possível que o estudo deste segmento da proteína traga informações funcionais específicas para o encéfalo de mamífero.

Demonstramos anteriormente, por qRT-PCR, que, em transcritos do *Fmr1* de rato, a expressão da sequência do éxon 12 é regulada ao longo do desenvolvimento pós-natal precoce, de forma diferencialmente positiva no córtex cerebral frontal e cerebelo, em relação ao hipocampo. No presente trabalho, aprofundamos esses estudos, tendo como objetivo a análise cuidadosa da expressão desse éxon em isoformas da FMRP (FMRP₊₁₂ISO), pelo uso de um anticorpo dirigido ao segmento codificado por ele, em encéfalos do décimo segundo dia pós-natal (P12, controle positivo) ou embrionários. Para tal, foram realizadas análises por imunoistoquímica e, em P12, ensaios de

cromatografia de exclusão molecular de partículas ribonucleoproteicas. Análises de níveis de RNAm e proteicos em fase embrionária (E12 a E20) do encéfalo do rato foram também conduzidas *in vivo* e *in vitro*, em cultivo primário de neuroesferas em suspensão, a partir da dissociação de vesículas telencefálicas de ratos em E14.

Os dados de imunoistoquímica de encéfalo de ratos em P12 indicaram que (i) as camadas granular externa e a camada piramidal externa do córtex cerebral e as células de Purkinje no cerebelo são mais ricas em FMRP₊₁₂ISO; (ii) o giro denteado e CA3 foram fontes de FMRP₊₁₂ISO no hipocampo, porém em mais baixa intensidade; e (iii) o conjunto das isoformas da FMRP, incluindo as FMRP₊₁₂ISO, foram expressas em região periventricular dos ventrículos laterais em período pós-natal, sugestivo de células-tronco neurais do adulto ou recém diferenciadas. No córtex cerebral, as FMRP₊₁₂ISO foram expressas em áreas motora (segmento rostródorsal), sensorial (segmentos dorsolaterais a laterais), auditiva (segmentos dorsolaterais), olfatória (córtex piriforme) e visual (segmentos ventrolaterais), além da área do cíngulo (segmentos mediais) de ambos os hemisférios cerebrais. Os dados também confirmaram que, em P12, as FMRP₊₁₂ISO têm expressão mais pronunciada no córtex cerebral e cerebelo do que no hipocampo. À cromatografia, as FMRP₊₁₂ISO tiveram o mesmo padrão de distribuição que o conjunto das isoformas da FMRP, fracionando em complexos ribonucleoproteicos maiores que 600 kDa.

De modo geral, a expressão das FMRP₊₁₂ISO foi baixa em E12 e E14. Houve concordância entre as análises por qRT-PCR, *Western blotting* e imunoistoquímica, corroborando a baixa expressão do éxon 12 do *FMR1* na vesículas telencefálicas em E14. Observamos por imunoistoquímica poucas células sugestivas de progenitoras, na base do neuroepitélio, que expressassem FMRP₊₁₂ISO ou outras isoformas da FMRP. O córtex cerebral em E20 foi raramente positivo para FMRP₊₁₂ISO ou o conjunto das isoformas da FMRP. Por outro lado, células da camada mais superficial da placa cortical, indicativa de ser a camada I, mostraram expressão de isoformas da FMRP sem o segmento codificado pelo éxon 12 do *Fmr1* em E18 e da FMRP, incluindo as FMRP₊₁₂ISO, em E20, de forma contínua em várias regiões corticais.

Em neuroesferas em suspensão, a expressão das FMRP₊₁₂ISO foi muito baixa enquanto isoformas da FMRP, supostamente com a alça variável de KH-2 em sua conformação curta, tiveram alta expressão nessas células. Desde as primeiras 24 horas sob condições de diferenciação neuronal *in vitro*, células de neuroesferas aumentaram a expressão das FMRP₊₁₂ISO, que se mantiveram alta no período analisado (12 dias *in vitro*), colocalizando-se com outras isoformas da FMRP. A expressão do éxon 12 do *FMR1* no córtex cerebral frontal, humano, em envelhecimento foi baixa pela análise de RNAm, enquanto o total de transcritos deste gene apresentou-se em níveis significativos.

Nossos dados sugerem que a expressão do éxon 12 do *Fmr1* é mais significativa para FMRP₊₁₂ISO em células neuronais, durante um período crítico de sinaptogênese, no primeiro mês pós-natal do rato. O tecido telencefálico, embrionário não se mostrou uma fonte rica dessas isoformas, principalmente em células indiferenciadas, que foram francamente negativas.

Abstract

Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), codified by Fragile Mental Retardation 1 (*FMR1*) gene, is significantly expressed in the brain, gonads and proliferative cells. FMRP is an RNA-binding protein and acts as a translation repressor, which transits between cell nucleus, cytoplasmic granules and polysomes. Its association with RNA occurs via several domains, namely: N-terminal Tudor domains; two central domains with K-heteronucleoprotein (KH) homology; and C-terminal RGG motifs, that are rich in arginine (R) and glycine (G). The absence of FMRP expression triggered by mutations in the *FMR1* gene is the most frequent cause of hereditary intellectual disability in human men.

Four *FMR1* exons may undergo alternative splicing, generating up to 20 non-redundant FMRP isoforms. The translation of the *FMR1* mRNA containing exon 12 leads to an in-phase extension of 21 amino acids in the variable loop on FMRP the second KH domain (KH-2). The pattern of expression and function of this isoform are unknown. Although FMRP is highly similar to two paralogous proteins, FMRP-related proteins FRX1P and FRX2P, it presents some unique expression and function characteristics. The long variable loop of the KH-2 domain, for example, is not observed in these paralogs and is a hallmark of FMRP mammalian orthologs. Therefore, the study of this protein segment can potentially bring information about its function specifically in the mammalian brain.

Using qRT-PCR and Western blotting, we previously demonstrated that, for rat *Fmr1* transcripts, the expression of sequences containing exon 12 is

regulated during early postnatal development. In this period, expression of these segments in the frontal cerebral cortex and in the cerebellum is higher when compared to hippocampus expression. In the present work, we deepened these studies with the objective of carefully analysing the expression of FMRP isoforms containing FMRP exon 12 (FMRP₊₁₂ISO). For this purpose, we employed rat postnatal brains at the twelfth postnatal day (P12, used as a positive control) and rat embryo brain in immunohistochemistry assays with antibodies detecting peptides codified by exon 12. In this strategy, we also carried out molecular exclusion chromatography of ribonucleoproteins particles with lysates from rat P12 encephalon. Analysis of mRNA and protein levels in rat brain in the embryonic period [embryonic days 12 to 20 (E12 to E20)] were conducted *in vivo* and *in vitro*, in neurosphere suspension primary cultures, obtained by dissociation of telencephalic vesicles from E14 rats.

Immunohistochemical data from P12 rat brain indicated that (i) the granular external layers and pyramidal external layer in the brain cortex and Purkinje cells in the cerebellum are richer in FMRP₊₁₂ISO; (ii) in the hippocampus, FMRP₊₁₂ISO can be found in dentate gyrus and CA3, although in lesser intensities; and (iii) FMRP isoforms, including FMRP₊₁₂ISO, are expressed in the periventricular regions from the lateral ventricles, suggesting their expression in adult neural stem cells or in differentiating cells. In the cerebral cortex, FMRP₊₁₂ISO are expressed in motor areas (rostradorsal segment) and in sensorial areas (dorsolateral and lateral segments), specifically in auditory (dorsolateral segments), olfactory (piriform cortex) and visual (ventrolateral segments) areas, besides expression in the cingulate area (medial segment) in both hemispheres. Our data also confirmed that, in P12

brain, cerebral cortex and cerebellum have higher FMRP+₁₂ISO expression when compared to the hippocampus. Chromatography data indicated that FMRP+₁₂ISO have the same pattern of distribution than the FMRP isoform group, fractionating in ribonucleoproteic complexes heavier than 600kDa.

Altogether, FMRP+₁₂ISO expression is low in E12 and E14 rat brain. qRT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry data were concordant, corroborating the low expression of exon 12 in E14 telencephalic vesicles. In immunohistochemistry images, we observed few cells with progenitor phenotype, at the basal neuroepithelium, expressing FMRP+₁₂ISO or other FMRP isoforms. In E20, cerebral cortex was rarely positive for FMRP+₁₂ISO or other FMRP isoforms. Still, cells in the superficial layer of the cortical plate, possibly layer 1, were positive for FMRP isoforms that do not contain the segment codified by exon 12 in E18, brains and positive for the ensemble of FMRP, isoforms, FMRP+₁₂ISO included, in E20 brains, in continuous portions of several cortical regions.

In suspension neurosphere cultures, FMRP+₁₂ISO expression was very low, while the expression of FMRP isoforms, supposedly with the variable loop of KH-2 in its short conformation, was high in. After 24 hours under neuron differentiation conditions *in vitro*, neurosphere cells showed increasing expression of FMRP+₁₂ISO, which remained high during the period analyzed (12 days *in vitro*), co-localizing with other FMRP isoforms. Preliminary assays using RNA interference *in vitro* in an immortalized glioma cell lineage (C6), disclosed a double-stranded RNA, among two tested samples, with the ability to suppress exon 12 containing *Fmr1* mRNA. The expression of *FMR1* transcripts

containing exon 12 in aging human brain frontal cortex was low, while total *FMR1* transcripts levels were significant.

Our data suggest that the expression of exon 12 from *Fmr1* is more significant in rat neuronal cells during a critical period of synaptogenesis in the first postnatal month. The embryonic telencephalic tissue is not rich in FMRP₊₁₂ISO, which were notably absent from undifferentiated cells.

Prefácio

A proteína do retardo mental do X frágil (FMRP) é codificada pelo gene do *Retardo Mental do X Frágil* (do inglês, *Fragile Mental retardation 1*, *FMR1*) e tem expressão significativa no encéfalo, gônadas e células proliferativas (BAKKER et al., 2000; EICHLER et al., 1993; HINDS et al., 1993). Foi detectada, após o desenvolvimento de anticorpos a ela dirigidos, como um grupo de isoformas com 60 a 95 kDa após eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (VERHEIJ et al., 1993, 1995), que são produzidas mais provavelmente em virtude do *splicing* alternativo dos éxons 12, 14, 15 ou 17 do *FMR1* (ASHLEY et al., 1993; VERKERK et al., 1993). A FMRP contém domínios encontrados em proteínas ligantes de RNA (ASHLEY et al., 1993; SIOMI et al., 1993) e tem atividade reguladora da tradução de RNAs mensageiros (RNAm) de forma relacionada à função sináptica (HUBER et al., 2002). O *splicing* alternativo dos transcritos do *FMR1* pode modificar tais domínios da FMRP.

O enfoque deste trabalho é a análise da expressão de isoformas da FMRP que expressam o éxon 12 do gene *FMR1* em células e tecidos, sob condições fisiológicas. As alterações do gene *FMR1* não são nosso objeto de estudo. No entanto, dada a alta prevalência de três afecções clínicas, distintas, causadas por mutações no gene *FMR1*, estas serão brevemente apresentadas neste Prefácio, buscando-se evidenciar a importância desse gene.

O gene *FMR1* compreende cerca de 38 quilobases (Kb), 17 éxons e expressa um RNAm de aproximadamente 4.4 Kb, composto por uma região 5' não traduzida (5'-UTR) de 0.2 Kb, uma região codificante de 1.9 Kb e uma

região 3' não traduzida (3'-UTR) de 2.3 Kb. O gene *FMR1* mapeia-se em Xq27.3 e mutações que abolem a sua expressão podem causar a síndrome do X frágil (SXF), a causa mais frequente de deficiência intelectual hereditária, entre homens (OMIM: #300624) (FU et al., 1991; VERKERK et al., 1991; YU et al., 1991).

A SXF apresenta herança ligada ao cromossomo X e prevalência de um em cada 4.000 homens e uma em cada 8.000 mulheres (TURNER et al., 1996). Apresenta-se clinicamente com atraso no desenvolvimento neuro-psicomotor e da linguagem, culminando em deficiência intelectual de graus moderado a grave, transtornos do comportamento e, menos comumente, crises convulsivas (LUBS et al., 1984; LUBS, 1969). As características faciais, mais distintas em homens, incluem mento proeminente, fronte estreita e alta e pavilhões auriculares com tamanho aumentado e em abano. Estas características físicas se tornam mais acentuadas com a idade, podendo ser observadas, mais frequentemente a partir da puberdade, fase na qual 80% dos homens afetados pela síndrome podem apresentar macrorquidia (MERYASH et al., 1984). Outros sinais podem ainda se apresentar em diversos pacientes como alterações do tecido conjuntivo, evidenciadas por hipoplasia da cartilagem auricular e hiperextensibilidade das articulações (HAGERMAN et al., 1984). Devido ao mapeamento do gene no cromossomo X, os sinais da SXF apresentam-se mais comumente em homens do que em mulheres, nas quais a penetrância depende da proporção de inativação do cromossomo X normal (LOESCH; HAY, 1988).

O tipo de mutação que, na grande maioria dos casos, causa a SXF localiza-se em uma região de repetições polimórficas de unidades de

trinucleotídeos de citosina-guanina-guanina (CGG), na região 5' do gene *FMR1*, que é transcrita, mas não traduzida. Entre indivíduos da população geral, o número de repetições varia entre 6 e 40 (alelos comuns), sendo os alelos mais comuns aqueles com 29 e 30 trinucleotídeos. Indivíduos afetados pela SXF apresentam mais de 200 trincas CGG, alelos classificados como mutação completa. Essa expansão no número de repetições acima de 200 leva à metilação da ilha CpG em que se encontram, impedindo o acoplamento da maquinaria de transcrição e resultando no silenciamento do gene. Alelos que possuem entre 55 e 200 repetições são denominados pré-mutação e, apesar de não estarem metilados e não comprometerem a transcrição do gene, eles são instáveis à transmissão materna podendo se expandir a mutação completa (DEVYS et al., 1993). Alelos intermediários contêm entre 41 e 54 trincas CGG e, embora não apresentem a instabilidade meiótica de pré-mutações, podem sofrer expansões ao número de trincas destas, com maior frequência do que alelos comuns (MONTAGNON et al., 1994).

Cerca de 30% dos homens portadores de pré-mutações, usualmente os avôs maternos de meninos afetados pela SXF, desenvolvem uma condição clínica de início tardio, caracterizada por tremor de intenção progressivo, marcha atáxica, declínio cognitivo, neuropatia periférica e disfunção autônoma, denominada síndrome de ataxia e tremor associada ao X frágil (FXTAS; OMIM: 300623) (HAGERMAN et al., 2001). A doença é progressiva e tem, em geral, seus sinais iniciais pela manifestação do tremor, seguido pela ataxia. A média de idade para manifestação do tremor é em torno de 62 anos (47 – 78 anos) e para a ataxia de 63 anos (39 – 78 anos) (TASSONE et al., 2007). Ao longo de uma década, a marcha atáxica se agrava, o que pode causar quedas do

paciente e necessidade de auxílio para a deambulação (LEEHEY et al., 2007). Em poucos casos, o declínio cognitivo pode preceder os sinais motores ou ser um achado isolado (GONÇALVES et al., 2007; GRIGSBY et al., 2006; SÉVIN et al., 2009). Outros transtornos, como de comportamento, notavelmente sintomas obsessivo-compulsivos ou esquizoides, já foram observados em portadores da pré-mutação, com ou sem FXTAS (HESSL et al., 2005). As mulheres são menos frequentemente afetadas pela FXTAS, principalmente pelo desvio de inativação do cromossomo X (BERRY-KRAVIS et al., 2003; JACQUEMONT et al., 2004).

O número das repetições CGG correlaciona com a idade de manifestação dos sinais motores de FXTAS, mas não com a gravidade (TASSONE et al., 2007). A idade de manifestação do declínio cognitivo relaciona-se diretamente com o número de repetições CGG dentro da faixa de pré-mutação, de forma independente de FXTAS (GONÇALVES et al., 2007; SÉVIN et al., 2009). Outra relação direta foi descrita entre o número de repetições CGG e inclusões intranucleares eosinófilas em neurônios e astrócitos do encéfalo de pacientes com FXTAS (GRECO et al., 2006; JACQUEMONT et al., 2003).

Ao contrário das mutações completas do *FMR1* que causam a SXF, alelos de pré-mutações exibem atividade transcricional (DEVYS et al., 1993; FENG et al., 1995). Curiosamente, os níveis de RNAm do *FMR1* estão aumentados em células do sistema nervoso central de pacientes com FXTAS, sem, entretanto, qualquer alteração significativa dos níveis da proteína FMRP (GRECO et al., 2006; HESSL et al., 2005). Diante desses dados e do achado

do RNAm do próprio *FMR1* nas inclusões neuronais e astrocíticas nesses pacientes, propôs-se um modelo patogênético de toxicidade pelo RNAm do *FMR1*, no qual alças de repetições CGG na região 5' do transcrito seriam determinantes do processo patológico através do recrutamento molecular, estresse oxidativo e formação de inclusões intracelulares (GARCIA-AROCENA; HAGERMAN, 2010).

Mulheres portadoras de alelos pré-mutados ou intermediários podem apresentar insuficiência ovariana primária associada ao X - Frágil (FXPOI) (HUNTER et al., 2008), caracterizada pela menopausa precoce, antes dos 40 anos de idade. Nestas mulheres, a disfunção ovariana parece ser dependente do número de repetições CGG, embora esta correlação não seja linear, tendo em vista que portadoras da pré-mutação com variações de 80-100 repetições podem apresentar manifestação precoce de FXPOI. Os mecanismos moleculares inerentes à insuficiência ovariana causada pelo RNAm com repetições CGG ainda são desconhecidos. A hipótese de toxicidade deste RNAm sugerido para a patologia da FXTAS pode ser relevante também para disfunção ovariana observada na FXPOI (LU et al., 2012).

1. Introdução

Após a clonagem posicional do gene do *Retardo Mental do X Frágil 1* (*FMR1*), em 1991 (FU et al., 1991; KREMER et al., 1991; OBERLE et al., 1991; VERKERK et al., 1991; YU et al., 1991), a caracterização do seu RNAm em tecidos variados levou à identificação inicial de doze variantes de transcritos, expressos em diferentes tecidos humanos (ASHLEY et al., 1993; EICHLER et al., 1993; VERKERK et al., 1993). A clonagem do cDNA do *FMR1* expresso em neurônios, cultivados a partir do córtex cerebral de um feto humano de dez semanas, revelou onze transcritos distintos (HUANG et al., 1996). No total, foram observados seis eventos de *splicing* alternativo em diferentes éxons no transcrito primário do gene *Fmr1*, responsáveis por gerar essa variabilidade (ASHLEY et al., 1993; VERKERK et al., 1993). Os éxons envolvidos em eventos de *splicing* alternativo concentram-se na metade 3' codificante do gene, sendo eles os éxons 10, 12, 14, 15 e 17.

Um sítio alternativo receptor de *splicing* foi descrito *in silico* no éxon 10 do *FMR1* humano, embora sem verificação experimental (EICHLER et al., 1993). Os éxons 12 e 14, denominados éxons-cassete, podem ser integralmente incluídos no ou excluídos do transcrito. Os éxons 15 e 17 possuem três e dois sítios receptores de *splicing*, respectivamente, podendo alterar a extensão da sequência de éxon incluída no RNAm (Fig. 1). Sabe-se, hoje, que a combinação dos eventos de *splicing* alternativo dos éxons 12, 14, 15 e 17 do *Fmr1* tem possibilidade de gerar 24 variantes de RNAm que podem dar origem a 20 isoformas não redundantes da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP), cujas massas moleculares estimadas variam de 47,3 a 71,1 quilodáltons (SITTLER et al., 1996).

Brackett e colaboradores amplificaram pela reação em cadeia da polimerase (PCR), após transcrição reversa (RT-PCR), doze transcritos diferentes do *Fmr1* de camundongo. A partir de diluições sucessivas desses, analisaram de forma semi-quantitativa os níveis de expressão de cada um, sem, no entanto, avaliar individualmente os éxons que sofrem *splicing* alternativo. Identificou-se alguma expressão para cada um deles, em diversas regiões do encéfalo, durante o desenvolvimento e em células de cultivo primário. Demonstrou-se também que os transcritos variáveis interagem com polirribossomos, indicando que estejam associados à maquinaria de tradução (BRACKETT et al., 2013).

Figura 1: Representação esquemática do gene *FMR1* mostrando os éxons (em verde) e íntrons (barras pretas). 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 cassete, podendo ter toda sua sequência incluída ou excluída do transcrito final. Os éxons 15 e 17 tem sítios doadores de *splicing* alternativos localizados a 5'. Em amarelo, vermelho e verde estão representados os três sítios alternativos de *splicing* do éxon 15 e em azul e verde os dois sítios alternativos do éxon 17.

Transcritos de RNAm com localização dendrítica podem conter íntrons em sua sequência, que não foram removidos durante o *splicing* no núcleo. Foi demonstrado que grande parte destes transcritos com retenção intrônica possuem em seus íntrons elementos retrotranspostos do tipo SINE (do inglês, *short interspersed element*), que podem alterar a localização dos RNAs em que se encontram para a região dendrítica. Foi proposto que a retenção destes íntrons é um evento regulado que altera a distribuição destes transcritos. Nos

transcritos maduros do gene *Fmr1*, foi descrita retenção dos íntrons 1, 7 e 12 em culturas primárias de neurônios obtidas a partir da dissociação de córtex cerebral de camundongo (BUCKLEY et al., 2011).

		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 1: Tabela identificando 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 (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 prematura da tradução antes do éxon 17. Nestes casos, 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 cinco grupos, determinados pela proximidade da massas moleculares calculadas para cada isoforma (verde claro para isoformas de 47,3 a 50,9 kDa; azul para isoformas de 56,8 a 61 kDa; marrom para as que têm massa estimada entre 64,2 e 66,9 kDa; alaranjado para aquelas com 67,7 a 69,9 kDa; e vermelho para a sequência completa originando a isoforma de massa estimada em 71,1 kDa). Fonte: Sitler *et al*, 1996.

1.1 A proteína FMRP e a família FXR

Em vertebrados, a proteína FMRP (632 aminoácidos) faz parte da família FXR (do inglês, *fragile X-related proteins*) formada também pelas proteínas FXR1P (621 aminoácidos) e FXR2P (673 aminoácidos), codificadas

pelos genes autossômicos *FXR1* (3q28) e *FXR2* (17p13.1), respectivamente. Em *Drosophila melanogaster*, há apenas um membro desta família, a proteína dFMRP, cuja similaridade é mais alta com a FMRP (64% com a FMRP; 55% com a FXR2P; e 36% com a FXR1P), sendo a região C-terminal a menos conservada (WAN et al., 2000). Em leveduras e *Caenorhabditis elegans* não são encontrados representantes desta família (CURRIE; BROWN, 1999; SHTANG; PERRY; PERCY, 1999). Em vertebrados, os genes *FMR1*, *FXR1* e *FXR2* têm ortólogos em várias espécies como *Xenopus* (BLONDEN et al., 2005), *Danio rerio* (zebrafish) (TUCKER; RICHARDS; LARDELLI, 2004), mamíferos (LAVAL et al., 1992) e outros organismos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Em camundongos, as proteínas desta família apresentam similaridade geral de 55% entre si, sendo a região N-terminal a de maior homologia (86% entre FMRP e FXR1P e 70% entre FMRP e FXR2P, Figura 2). A região C-terminal apresenta similaridade mais baixa, com apenas 6% dos resíduos conservados (TAMANINI et al., 1999). Em transcritos do *FXR1*, demonstrou-se também a possibilidade de *splicing* alternativo dos éxons equivalentes aos éxons 14, 15 e 17 do *FMR1* (DUBÉ; HUOT; KHANDJIAN, 2000; KIRKPATRICK; MCILWAIN; NELSON, 1999). O segmento do éxon 12 do *FMR1* está ausente nos genes parálogos e nos ortólogos de invertebrados (KIRKPATRICK; MCILWAIN; NELSON, 2001).

As proteínas da família FXR são encontradas em vários tecidos durante o desenvolvimento e apresentam, em alguns deles, um padrão de expressão distinto.

A clonagem de 2,8 Kb de sequência de DNA a 5' do *FMR1* em um vetor para expressão do gene repórter *lacZ* gerou cinco linhagens transgênicas de

camundongo. Nestas, observou-se a expressão do gene repórter no encéfalo embrionário e, no adulto, sobretudo no hipocampo, camada granular do cerebelo, células de Leydig e espermatozônias no testículo, alguns epitélios, células do córtex das adrenais e foliculares do ovário (HERGERSBERG et al., 1995).

Figura 2: Alinhamento gráfico das proteínas da família FXR na espécie humana e em *Drosophila*. Os domínios funcionais KH-1, KH-2 e RGG estão discriminados nas três integrantes da família. Em humanos, a região N-terminal apresenta similaridade de 73% entre as três proteínas, sendo a região dos domínios KH a de maior similaridade (90%). (NLS, sinal de localização nuclear; NES sinal de exportação nuclear; NoS: sinal de localização nucleolar). Fonte: Kirkpatrick *et al.*, 2001

O RNAm do *Fmr1* foi observado por hibridação *in situ* no embrião de camundongo, sendo detectado a partir do décimo dia embrionário (E10), em todos os tecidos. Após esse período, em E13, E14 e E19, a expressão decaiu em alguns tecidos, tornando-se mais baixa e específica. Esse padrão é mais evidente no camundongo adulto, que mantém níveis mais altos de expressão no encéfalo, testículos, ovários, esôfago, timo e baço (DEVYS et al., 1993;

HINDS et al., 1993). Bächner e colaboradores utilizaram a mesma técnica e observaram expressão elevada em células germinativas, em proliferação do camundongo, macho ou fêmea (BÄCHNER et al., 1993).

No embrião humano de oito a nove semanas, o RNAm do *FMR1* é detectado em células proliferativas e pós-mitóticas, migratórias do sistema nervoso. No sistema nervoso central (SNC), células periventriculares são coradas de forma menos intensa do que as de camadas mais superficiais, como as zonas marginal e intermediária. Há marcação também na camada neuroblástica interna do cálice ótico da retina, o qual formará o nervo ótico. Nesse período, a expressão do *FMR1* é também elevada em estruturas cartilaginosas, no mesênquima cefálico (periencefálico, mandibular e língua) e no fígado (ABITBOL et al., 1993).

No encéfalo do feto humano de 25 semanas, intensa marcação do RNAm do *FMR1* foi observada nas zonas ventricular e subventricular e na placa cortical. Nesta, células das camadas mais profundas (III-VI) expressaram o *FMR1* em níveis mais altos do que aquelas da camada II. Células da camada I também expressaram esse gene na vigésima quinta semana gestacional do feto humano. O núcleo basal magnocelular apresentou intensa marcação. No hipocampo, a intensidade da marcação foi alta e distribuiu-se igualmente ao longo do corno de Ammon (CA), em suas regiões CA1, CA2 e CA3. O giro denteado também foi positivo. Os hemisférios cerebelares, o núcleo denteado e o vérmis apresentaram-se marcados. Nos hemisférios cerebelares, as células de Purkinje foram as mais intensamente marcadas. Em geral, as células positivas para o *FMR1* tinham morfologia neuronal (ABITBOL et al., 1993; AGULHON et al., 1999).

Da mesma forma, a proteína FMRP humana foi observada predominantemente no cérebro, gônadas e epitélio do adulto. No encéfalo, a FMRP é predominantemente neuronal e citoplasmática, enquanto que nos testículos é expressa principalmente em espermatogônias e, nos ovários, em ovócitos e células da granulosa (AGULHON et al., 1999; BÄCHNER et al., 1993; DEVYS et al., 1993; KHANDJIAN et al., 1995; TAMANINI et al., 1997; VERHEIJ et al., 1993). No cerebelo, as células de Purkinje são as mais intensamente marcadas pelo anticorpo anti-FMRP, embora coloração proeminente seja também observada na camada granular. No córtex cerebral, a FMRP distribui-se a neurônios. A imunocoloração está presente em órgãos epiteliais, embora de forma menos significativa do que em neurônios. Nas células epiteliais, a presença da FMRP é mais evidente em células proliferativas (DEVYS et al., 1993). Nas primeiras semanas pós-natais do rato, os níveis de expressão da FMRP aumentam em resposta à atividade neuronal do hipocampo e córtex cerebral, de forma dependente de exposição a um ambiente complexo ou estímulos sensoriais, específicos, respectivamente (IRWIN et al., 2000, 2005; TODD; MACK, 2000; TODD; MALTER; MACK, 2003).

A localização da FMRP parece ser primariamente pós-sináptica, no início do período pós-natal no cérebro de roedores (FENG et al., 1997; GREENOUGH et al., 2001), podendo também ser encontrada em compartimentos pré-sinápticos (CHRISTIE et al., 2009; FENG et al., 1997). Em neurônios hipocampais e corticais, a FMRP predomina em espinhas dendríticas, evaginações da membrana pós-sináptica de neurônios excitatórios, que estão sujeitas a alterações morfológicas dinâmicas, relacionadas à função sináptica e

plasticidade neuronal, de forma dependente de síntese proteica (JONTES; SMITH, 2000).

O camundongo modelo para a síndrome do X frágil (SXF) tem o gene *Fmr1* deletado (KO) e apresenta disfunção de aprendizado, memória e social (BAKKER; VERHEIJ; WILLEMSSEN, 1994). Cérebros de pacientes com a SXF e de camundongos KO do *Fmr1* apresentam espinhas dendríticas dismórficas, mais longas, finas e em maior número do que em humanos portadores de alelos comuns ou pré-mutações e do que camundongos de tipo-selvagem, sugerindo que a FMRP deva ter função na maturação e eliminação sináptica (COMERY; HARRIS, 1997; NIMCHINSKY; OBERLANDER; SVOBODA, 2001).

FXR1P é amplamente encontrada no cérebro, músculo esquelético e cardíaco (BAKKER et al., 2000) e, em testículos, é predominantemente expressa em espermátides (BAKKER et al., 2000; TAMANINI et al., 1997). O camundongo KO do *Fxr1* exibe um fenótipo relacionado a disfunção muscular esquelética (MIENTJES et al., 2004).

No cérebro e ovário, a FXR2P tem um padrão de distribuição semelhante à FMRP, embora em intensidade mais baixa (BAKKER et al., 2000). Embora o camundongo KO do *Fxr2* não apresente alterações anatomo-patológicas no encéfalo, mostra disfunções de comportamento semelhantes às dos camundongos KO do *Fmr1* (BONTEKOE et al., 2002).

Avaliações comparativas das proteínas FMRP, FXR1P e FXR2P, em tecido murino e humano, realizada por imunoistoquímica, revelou que, no encéfalo, as três proteínas têm distribuição celular semelhante, como descrito acima para a FMRP, embora FXR1P tenha sido observada de maneira isolada em neurônios

motores do tronco encefálico. A imunomarcação com conjugação a ouro e observação à microscopia eletrônica revelou as três proteínas no citoplasma de neurônios hipocâmpais, associadas a polissomos. Somente a FXR1P foi detectada no núcleo de neurônios hipocâmpais (BAKKER et al., 2000; TAMANINI et al., 1997).

Zhang e colaboradores isolaram o clone de cDNA de *FXR2* em um ensaio do duplo híbrido da levedura que tinha como isca a expressão do clone de cDNA do *FMR1*. Além da clonagem do *FXR2*, esses dados indicavam interação entre FMRP e FXR2P, a qual foi confirmada por precipitação por afinidade *in vitro* e co-imunoprecipitação *in vivo* (ZHANG et al., 1995). O gene *Fxr1* foi identificado por similaridade com a sonda de *FMR1* em uma triagem de biblioteca de cDNA de *Xenopus laevis* (SIOMI et al., 1995). Zhang e colaboradores (1995) demonstraram que, além de interagir com a FXR2P, a FMRP tem habilidade para formar heterodímero com a FXR1P e homodímeros. Siomi e colaboradores demonstraram que a sequência codificada pelo éxon 7 do *FMR1* é necessária à formação de homodímeros ou heterodímeros (SIOMI et al., 1996). Ensaio de cromatografia de exclusão molecular revelaram que dímeros FXR fracionam em complexos maiores que 600 kDa e que altas concentrações de sal rompem esses complexos, deixando-os com cerca de 200 a 300 kDa (TAMANINI; UNEN; BAKKER, 1999).

1.2 Funções e distribuição subcelular da FMRP

Dois sinais de localização subcelular permitem que a FMRP, FXR1P e FXR2P trafeguem entre o núcleo e o citoplasma, auxiliando na sua localização intracelular. O primeiro, o sinal de localização nuclear (NLS), é codificado pelo éxon 5 do *Fmr1* e os resíduos localizados nas posições 114-117 da proteína

são essenciais para sua função (EBERHART et al., 1996). O sinal de exportação nuclear (NES) é codificado pelo éxon 14, sendo que os primeiros 17 aminoácidos codificados por este éxon, especialmente os dois resíduos de leucina localizados nas posições 430 e 432 da FMRP são fundamentais para a funcionalidade do NES (EBERHART et al., 1996; FRIDELL et al., 1996). Este motivo possui uma região rica em leucina semelhante ao NES encontrado na proteína Rev do vírus HIV-1 e permite a transferência para o citoplasma das proteínas que o detêm, através da ligação ao fator de exportação nuclear exportina 1 (FORNEROD et al., 1997; ULLMAN; POWERS; FORBES, 1997).

A exclusão do éxon 14 devido ao *splicing* alternativo de transcritos do *FMR1* leva à retenção nuclear da FMRP superexpressa (BARDONI et al., 1997; EBERHART et al., 1996; FENG et al., 1997; SITTLER et al., 1996). Um estudo por microscopia eletrônica e imunomarcação demonstrou a presença da FMRP nos poros nucleares, consistente com a hipótese de trânsito entre núcleo e citoplasma. O mesmo grupo demonstrou que cerca de 4% da FMRP distribui-se ao núcleo celular (FENG et al., 1997).

FMRP, FXR1P e FXR2P apresentam capacidade de ligação a RNA (SIOMI et al., 1993). As três proteínas apresentam maior afinidade por polirribonucleotídeos de guanina e uracila do que adenina e citidina (BROWN et al., 1998; ZHANG et al., 1995). FMRP foi demonstrada como uma repressora traducional *in vitro* (LAGGERBAUER et al., 2001) e *in vivo* (WEILER et al., 2004).

Em células em cultura, foi demonstrado que FMRP, FXR1P e FXR2P distribuem-se entre polissomos e grânulos de partículas ribonucleoproteicas (RNP) (CORBIN et al., 1997; FENG et al., 1997; KHANDJIAN et al., 2004,

1996; MAZROUI et al., 2002; WEILER et al., 1997). Se por um lado, estresses celulares como oxidativos podem transferir complexos moleculares contendo a FMRP de polissomos a grânulos intracelulares (KIM et al., 2006), por outro, receptores metabotópicos ativados por glutamato acionam uma resposta intracelular que desloca grânulos de RNP com FMRP à densidade sináptica (ANTAR et al., 2004; ASCHRAFI et al., 2005; FERRARI et al., 2007). Estudos revelaram que a FMRP é dispensável para a formação de grânulos de RNP citoplasmáticos (GAREAU et al., 2013), embora sua região N-terminal seja necessária ao deslocamento dessa proteína entre os grânulos e polissomos (GAREAU et al., 2013). O transporte da FMRP em RNPs é realizado livre de polissomos e mediado por cinesinas que interagem com tubulinas (ANTAR et al., 2005; DAVIDOVIC et al., 2007; DE DIEGO OTERO et al., 2002; LING et al., 2004; OHASHI et al., 2002; WANG et al., 2008, 2008).

Resíduos de serina e arginina, codificados pelo éxon 15 do *FMR1*, são alvos de fosforilação e metilação, respectivamente. Estas modificações pós-traducionais regulam a atividade da FMRP e a interação com RNAs e proteínas. A FMRP é alvo de metil-transferases, de forma co-traducional, e esta modificação parece ser importante para a interação com determinados RNAs endógenos e homorribopolímeros (DENMAN; DOLZHANSKAYA; SUNG, 2004; DENMAN; SUNG, 2002). A metilação não afeta a localização celular da FMRP, mas parece regular a sua capacidade de dimerização com a FXR1P, tanto *in vitro* como *in vivo* (DOLZHANSKAYA; MERZ; DENMAN, 2006). O encurtamento do éxon 15 devido ao uso diferencial dos três sítios alternativos de *splicing* presentes neste éxon altera o padrão de metilação da FMRP e leva

a mudanças no perfil de interação com RNAs e proteínas (DOLZHANSKAYA; MERZ; ALETTA, 2006).

A regulação da função da FMRP no SNC está diretamente relacionada ao seu estado de fosforilação. Quando desfosforilada, a FMRP se associa a polirribossomos ativos, permitindo a tradução de seus RNAs-alvo. Entretanto, a sua fosforilação leva à inibição da atividade traducional destas mensagens (CEMAN et al., 2003). Demonstrou-se que a fosforilação *in vivo* da FMRP ocorre no resíduo de serina localizado na posição 500, regulando sua atividade repressora traducional e sua distribuição sináptica no SNC (COFFEE et al., 2011). Nesta via de regulação, a FMRP é alvo da fosfatase 2A (PP2A), enquanto sua fosforilação é feita pela cinase S6K1, integrante da via de sinalização regulada pelo alvo da rapamicina em mamíferos, mTOR (NARAYANAN et al., 2008).

A via endógena de interferência pelo RNA (RNAi) está diretamente envolvida no mecanismo da FMRP sobre a regulação traducional da expressão gênica, durante o desenvolvimento neuronal e formação sináptica. Nesta via, a transcrição de genes para microRNAs (miR) gera transcritos contendo grampos que são processados por uma endonuclease nuclear, denominada drosha, produzindo transcritos em fita dupla que são transportados ao citoplasma e, então, processados pela dicer, permitindo a desnaturação das duas fitas de RNA pelo complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC) e sua hibridação ao RNAm alvo (COLLINS; CHENG, 2005).

Demonstrou-se que a FMRP interage com componentes da enzima dicer, de RISC e miR, em *Drosophila* e mamíferos. Em células neuronais murinas, a FMRP interage com eIF2C2 (*Argonaute 2*), ortóloga da proteína argonauta 2 de

mamíferos e parte de RISC, e se associa ao miR-125a, miR-125b e miR-132 (EDBAUER et al., 2010; JIN et al., 2004). Quando fosforilada, a FMRP não mais interage com componentes de dicer (CHEEVER; CEMAN, 2009), mas pode se associar ao complexo inibitório eIF2C2/miR-125a. Entre os alvos de miR-125^a está por exemplo PSD95 (Proteína de densidade sináptica 95) (MUDDASHETTY et al., 2011). Quando a estimulação dos receptores de glutamato (mGluR) leva à desfosforilação da FMRP, o complexo RISC-miR é liberado, permitindo a tradução do transcrito (MUDDASHETTY et al., 2011).

Corroborado pelas evidências acima, o modelo geral de função da FMRP propõe que, após a sua síntese no citoplasma, a FMRP, através do NLS, se dirija ao núcleo, onde deve interagir com seus alvos de RNAm específicos, formando RNPs (EBERHART et al., 1996; KIM; BELLINI; CEMAN, 2009). A FMRP é então exportada para o citoplasma (FRIDELL et al., 1996; WILLEMSSEN et al., 1996), onde interage com ribossomos de forma dependente de RNA (DARNELL; FRASER, 2005). No citoplasma, a FMRP reprime a expressão dos RNAs aos quais está ligada e serve como adaptadora no transporte para a região pós-sináptica, de forma dependente de microtúbulos. Mediante estímulo sináptico, ocorre mudança de seu perfil de fosforilação e a FMRP permite a tradução dos RNAs a ela associados. Este mecanismo permite a célula criar um repositório de transcritos na região pós-sináptica que podem ser prontamente traduzidos em resposta a um estímulo fisiológico (Fig. 3).

1.3 Domínios funcionais da proteína FMRP

A análise *in silico* de diferentes isoformas da FMRP geradas pelos eventos de *splicing* alternativo revelou que este pode criar diferenças nos

domínios funcionais da proteína. A interação de proteínas com outras macromoléculas é regulada pela presença de domínios funcionais. Domínios previstos para a FMRP, presentes em outras proteínas, foram demonstrados nestas como ligantes de RNA. Estes incluem dois domínios Tudor, N-terminais (codificados pelos éxons 3 e 4), dois domínios do tipo KH (homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K, hnRNP K, codificados pelos éxons 8 a 13), centrais e um domínio rico em arginina-glicina-glicina (RGG, codificado pelo éxon 15), C-terminal (BARDONI et al., 1997; DARNELL et al., 2001; FENG et al., 1997; MAURER-STROH et al., 2003). Estes domínios, bem como os motivos de localização subcelular descritos anteriormente, são conservados nas proteínas parálogas autossômicas, FXR1P e FXR2P (Fig. 2). Por outro lado, a FMRP apresenta algumas funções não redundantes com os membros da família FXR.

Figura 3: Esquema representando um modelo que resume 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: Bagni *et al*, 2005

1.3.1 Domínio Tudor

Adinolfi e colaboradores (1999, 2003) demonstraram que a porção N-terminal da FMRP (resíduos 1-214) possui capacidade de ligação a RNAs (ADINOLFI; BAGNI; MUSCO, 1999; ADINOLFI et al., 2003). Estes resíduos da FMRP compõem dois domínios da mesma espécie, denominado por Maurer-Stroh e cols (2003) como Agenet, mas que havia sido descrito em plantas e *Drosophila* como domínio Tudor (MAURER-STROH et al., 2003). Cada um desses domínios, hoje reconhecidos como Tudor (<http://www.pdb.org> e <http://pfam.janelia.org>), forma cinco folhas β definindo um módulo em barril que se emparelha com o outro, compondo o domínio N-terminal da FMRP (NDF), uma unidade estrutural com dobramento independente (ADINOLFI et al., 2003; RAMOS et al., 2006). Embora propriedades funcionais diferentes tenham sido associadas a cada um dos dois domínios Tudor, definidos respectivamente pelos resíduos 3 a 50 e 63 a 113 da FMRP, eles têm sido considerados juntos como uma unidade funcional (ADAMS-CIOABA et al., 2010).

Resíduos do segundo domínio Tudor são necessários para a associação com a proteína de 82 kDa que interage com a FMRP (82-FIP), que se distribui entre o núcleo celular e os polissomos citoplasmáticos (ADINOLFI et al., 2003; RAMOS et al., 2006). Dada sua distribuição nuclear, 82-FIP é também denominada NUFIP-2 (proteína nuclear 2 que interage com a FMRP).

O RNA não codificador, citoplasmático, com expressão no cérebro, BC1 (do inglês, *brain cytoplasmic RNA1*) e seu ortólogo em primatas, BC200, associam-se ao NDF. Neste, a região da FMRP necessária para a interação inclui o segundo domínio Tudor e estende-se além do NDF, compreendendo o segmento de 83 resíduos, imediatamente C-terminal a ele, que inclui o NLS. Em BC1/BC200, o grampo em 5' é o alvo dessa interação (ZALFA et al., 2005). BC1/BC200, ao se ligar à FMRP, mascara seu NLS, impedindo a reentrada da FMRP ao núcleo celular (ZALFA et al., 2003). Contendo 154 bases em *Mus musculus* e um sinal para localização em dendritos em sua extremidade 5', BC1 é transportado rapidamente aos dendritos em estudos *in vitro* (MUSLIMOV et al., 1997), embora ele não seja suficiente para o transporte de RNAs a essas estruturas (KHANAM et al., 2007). BC1/BC200 liga-se também à proteína ligante da cauda poliadenilada (KHANAM et al., 2006). Assim, BC1/BC200 poderia atuar como uma molécula adaptadora entre a FMRP e seu RNAm alvo, auxiliando a seleção de transcritos para a repressão traducional, também ocorrendo para FXR1P e FXR2P (NAPOLI et al., 2008; ZALFA et al., 2003, 2005). A modificação pós-transcricional de BC1 por metilação do oxigênio 2' da ribose diminui a afinidade pela FMRP (LACOUX et al., 2012). Entretanto, a melhor elucidação dos mecanismos específicos de uma possível interação entre FMRP e o ncRNA BC1 ainda é necessária tendo em vista que diferentes grupos de pesquisa não obtiveram sucesso em reproduzir esse modelo (IACOANGELI et al., 2008; YAN; DENMAN, 2011).

1.3.2 Domínio RGG

O domínio RGG da FMRP é caracterizado por ser rico em arginina (R) e glicina (G), codificadas pelo éxon 15 do *FMR1* (resíduos 527-552). Apesar de

ser parcialmente conservado nas proteínas FXR1P e FXR2P, demonstrou-se que na FMRP este domínio apresenta capacidade de ligação a estruturas específicas de RNA denominadas quarteto em G (DARNELL et al., 2011; SCHAEFFER et al., 2001). Estes quartetos permitem a ligação da FMRP ao seu próprio RNAm, sugerindo que ela possa ter um controle pós-transcricional da sua própria mensagem (SCHAEFFER et al., 2001). O reconhecimento dos quartetos em G de RNA é altamente específico e parece ser mediado, principalmente, pelos resíduos de arginina localizados nas posições 533 e 538 da FMRP de camundongos que parecem ser relevantes também para a associação da FMRP a polirribossomos (BLACKWELL; ZHANG; CEMAN, 2010; PHAN et al., 2011). A ausência deste domínio altera a distribuição da FMRP aos polirribossomos, mas não impede esta ligação (MAZROUI et al., 2003). No cérebro, a FMRP se liga, de maneira seletiva, a um percentual significativo de RNAm (BROWN et al., 2001; DARNELL et al., 2001; MIYASHIRO et al., 2003) e grande parte dos ligantes já descritos possuem os quartetos em G.

Um estudo utilizando sequenciamento em larga escala identificou 842 transcritos de RNAm que interagem com a FMRP no cérebro (DARNELL et al., 2011). Destes transcritos, 24% representavam RNAs previamente identificados como alvos da FMRP (BROWN et al., 2001; DARNELL et al., 2001; MIYASHIRO et al., 2003). Em contraste com os trabalhos anteriores, mostrou-se que 66% dos sítios de ligação da FMRP nestes mRNAs estavam localizados na região codificadora, sugerindo que não existe especificidade de sequência nesta interação (DARNELL et al., 2011). Uma hipótese para conciliar estes resultados é de que a FMRP poderia interagir com estes transcritos ainda

no núcleo, utilizando estruturas específicas como os quartetos em G (KIM; BELLINI; CEMAN, 2009; TAMANINI et al., 1999). Uma vez transportados para o citoplasma, estes RNAs ligados a FMRP iniciariam o processo de tradução, com a FMRP interagindo com o ribossomo e se deslocando ao longo da sequência codificadora deste mRNA (BLACKWELL; CEMAN, 2011).

1.3.3 Domínios KH

Os domínios KH apresentam diferenças estruturais entre procariotos e eucariotos, embora ambos compartilhem a organização básica de um segmento mínimo composto por uma folha-beta, seguida por duas hélices-alfa, unidas por uma sequência conservada de quatro resíduos, e uma segunda folha-beta. Domínios KH em eucariotos contêm ainda uma alça de sequência e tamanho variáveis entre espécies, denominada alça variável, que liga o motivo central a outra folha-beta seguida de uma hélice-alfa (BRYKAILO; CORBETT; FRIDOVICH-KEIL, 2007; SIOMI et al., 1994; VALVERDE et al., 2007)

O domínio KH confere interações específicas a RNA e DNA de fita simples, estando presente em diversas proteínas importantes em processos de regulação gênica, como fatores de transcrição, reguladores de *splicing* e reguladores pós-transcricionais de expressão. Domínios KH são responsáveis pela ligação da proteína *Splicing factor 1* (SF1) ao ponto de ramificação nos íntrons de RNAs não processados, permitindo a ligação do restante da maquinaria do spliceossomo (LIU et al., 2001). Domínios KH estão também presentes em proteínas como *Quaking*, que regula processos de diferenciação neuronal (ABERG et al., 2006; CHEN et al., 2007), sinalização celular e mielinização (LAROCQUE et al., 2002); e Sam68, um importante regulador de processos de *splicing* alternativo (PEDROTTI et al., 2010; VALACCA et al.,

2010). Todas estas importantes reguladoras da expressão gênica compartilham entre si, além das semelhanças funcionais, alças variáveis de domínios KH com extensões similares, entre 24 e 28 resíduos. A semelhança entre seus domínios KH classifica-as na família STAR (*signal transduction activator of RNA metabolism*), cujos membros podem apresentar de um a vários domínios KH, que cooperam para a interação com RNA e são indispensáveis para suas funções. Análises da ultraestrutura do domínio KH mostram que este apresenta duas superfícies opostas, uma com folhas-beta e outra com hélices-alfa. A interação do KH com nucleotídeos se dá na fenda hidrofóbica formada entre as duas superfícies, onde se encontra a região conservada e a alça variável se projetando externamente (LIU et al., 2001; MAGUIRE et al., 2005; STALEY, 2002). A região da alça variável envolve o segmento de nucleotídeos que é reconhecido pelo KH, estabilizando a interação e, portanto, é importante na função de proteínas que contêm o domínio.

A proteína FMRP possui dois domínios KH que são referidos como KH-1 e KH-2. KH-1 é formado pelos resíduos 205 ao 280 (codificados pelos éxons 8 a 9 do *FMR1*), enquanto KH-2 é constituído pelos resíduos 281 ao 422 (codificados pelos éxons 9 ao 13). O domínio KH-2 da FMRP possui a alça variável mais longa já identificada entre proteínas humanas com domínios KH. A expressão do éxon 12 do *FMR1*, que é regulada por *splicing* alternativo, pode ainda acrescentar 21 resíduos de aminoácidos à alça variável, sem mudar a moldura de leitura da tradução (VALVERDE et al., 2007).

O domínio KH-2 é importante para as funções neuronais da FMRP. É responsável pela interação da FMRP com polirribossomos no citoplasma, como demonstrado em células em cultivo (CORBIN et al., 1997), *in vivo* (FENG et al.,

1997) e *in vitro* (KHANDJIAN et al., 2004). Esta interação da FMRP com polirribossomos é fundamental para sua função sináptica. Sua perda resulta em alterações morfológicas e disfunções semelhantes às observadas na ausência da FMRP (DAVIDOVIC et al., 2007; EL FATIMY et al., 2012; ZANG et al., 2009). O domínio KH-2 ainda confere a ligação da FMRP a diversos complexos ribonucleoproteicos de grande massa no citoplasma, podendo ou não estar relacionada a ribossomos (SCHRIER et al., 2004).

Demonstrou-se que o domínio KH-2 da FMRP liga-se *in vitro* a uma estrutura secundária de RNA, os complexos em beijo (do inglês, *Kissing complex*; KcRNA). A ligação a estas estruturas de RNA impede a ligação da FMRP a polirribossomos *in vitro*, devido à competição no sítio de ligação localizado no resíduo 304, sugerindo que *in vivo* o KcRNA é o mediador entre a ligação da FMRP aos polirribossomos (DARNELL; FRASER, 2005). A alça variável mais longa do KH-2 da FMRP, gerada a partir dos transcritos que incluem a sequência do éxon 12 do *FMR1*, mantém a especificidade de ligação aos RNAs contendo estruturas em complexos em beijo. No entanto, esta ligação perde a estabilidade *in vitro* rapidamente, deixando de ser detectada em um período de 24 horas, quando as outras isoformas da FMRP com alça mais curta ainda são totalmente funcionais (DARNELL et al., 2009). Isto sugere que a expressão do éxon 12 do *FMR1* diminua a estabilidade de todo domínio KH-2 da FMRP, fazendo com que a inclusão regulada deste éxon represente um efeito dominante negativo às interações da FMRP. É possível que formação específica de heterodímeros seja necessária à sua estabilidade.

Uma mutação no *FMR1* humano (p.I304N), que causa a substituição de uma isoleucina por uma asparagina em motivo conservado de KH-2, leva à

manifestação e fenótipo grave da SXF (BOULLE; VERKERK; REYNIERS, 1993). O modelo animal, *knock-in* (KI), que contém esta mutação é uma fenocópia do KO do *Fmr1*, tanto em padrões comportamentais quanto morfológicos e eletrofisiológicos (ZHANG et al., 2009). A análise bioquímica desta mutação mostra que interação do domínio com ácidos nucleicos perde a estabilidade (MARINO; ACHSEL, 2013). O estudo do modelo animal, assim como da isoforma mutada *in vitro*, mostrou que a *FMRP* contendo a mutação p.I304N perde a capacidade de interagir com polirribossomos, tanto *in vitro* (SIOMI et al., 1994) quanto em células do modelo animal e de um paciente com mutação p.I304N espontânea (FENG et al., 1997; MAZROUI et al., 2003). Na presença desta mutação, a *FMRP* não interage a ribossomos. A presença desta mutação impede ainda a interação da *FMRP* com os complexos ribonucleoprotéicos de grande massa com os quais ela é normalmente observada no citoplasma. Por outro lado, a mutação p.I304N não interfere com o transporte ativo dependente de microtúbulos da *FMRP* para os neuritos. As isoformas contendo a p.I304N são observadas nos neuritos isolados (SCHRIER et al., 2004) ou associadas a grânulos pequenos (WANG et al., 2008), enquanto a isoforma da *FMRP* tipo-selvagem pode ser observada associada a grânulos grandes contendo RNAs. A presença da mutação impede a interação da *FMRP* com RNAs contendo *kcRNA*, o que pode explicar a ausência de interação com polirribossomos (DARNELL; FRASER, 2005). O modelo murino para p.I304N exibe ainda alterações na plasticidade sináptica do hipocampo durante o desenvolvimento neuronal semelhantes as observadas na ausência da *FMRP*, sugerindo que estas sejam primárias no

desenvolvimento da SXF, e evidenciando a importância das interações mediadas pelo KH-2 em processos fisiológicos.

Um estudo que empregou sequenciamento em larga escala para identificar RNAs que interagem com diferentes isoformas da *FMRP* detectou transcritos de mais de 6.000 genes (ASCANO et al., 2012). Mais da metade destes transcritos interagem com a FMRP principalmente em motivos conservados, identificados como ACUK e WGGA. A FMRP contendo a mutação p.I304N, neste estudo, mostrou interação com uma população de RNAs mais restrita do que a de isoformas do tipo-selvagem. Os transcritos ausentes na população de interações da FMRP mutada eram principalmente aqueles contendo a sequência conservada ACUK, indicando que este motivo deva ser um alvo do domínio KH-2 da FMRP. Foram também comparadas isoformas da FMRP que diferiam pela presença da região codificada pelo éxon 12 do *FMR1* no domínio KH-2. A população de transcritos que interagiu com a isoforma completa, que expressa esse éxon, era semelhante àquela que interagiu com a isoforma que não o expressava, mas portava a mutação p.I304N. Estes dados indicam que o aumento da alça variável no domínio KH-2 da FMRP, causado pela inclusão do éxon 12 em transcritos do *FMR1*, deva alterar o padrão de interação deste domínio com RNA (ASCANO et al., 2012).

1.4 FMRP em células progenitoras

Nos últimos anos, a FMRP vem sendo estudada em modelos diferentes de células-tronco e progenitoras, permitindo a avaliação dos efeitos da ausência da FMRP durante a diferenciação neuronal. Em *Drosophila*, a perda do ortólogo do *FMR1* (*dFmr1*) causa depleção das células progenitoras, devido

ao descontrolo no início da diferenciação e da capacidade proliferativa, tanto na linha germinativa (YANG et al., 2007) quanto em neurônios (CALLAN et al., 2010), de forma dependente de RNAs reguladores (YANG et al., 2009).

O impacto da depleção da FMRP foi também observado em células humanas progenitoras neurais (hNPCs) derivadas de cérebros fetais. Ao longo da diferenciação neuronal, a FMRP é altamente expressa em células progenitoras comprometidas às linhagens neuronais e gliais, onde regula vários transcritos (BHATTACHARYYA et al., 2008; PACEY; DOERING, 2007). No entanto, os efeitos sobre a neurogênese ainda são um assunto controverso. As células-tronco neurais do adulto, provenientes dos ventrículos laterais, e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), sem expressão da FMRP, parecem ter mais células em diferenciação, a maioria delas com alterações morfológicas características de neurônios sem expressão do *FMR1* (CASTRÉN et al., 2005; SHERIDAN et al., 2011). Por outro lado, as células-tronco neurais do adulto, derivadas de córtex cerebral, apresentaram proliferação e neurogênese normais. As diferenças observadas em cada modelo podem corresponder à regulação específica da FMRP em diferentes áreas cerebrais e estágios de desenvolvimento (BHATTACHARYYA et al., 2008). Células de neonatos de dois modelos de camundongo (KO e KI do *Fmr1*) parecem acumular-se na zona subventricular em desenvolvimento do neocórtex (CASTRÉN et al., 2005; CUNNINGHAM et al., 2010).

1.5 Variabilidade de tamanho da alça variável do domínio KH-2 da FMRP

A alça variável do domínio KH-2 da FMRP tem sua extensão modificada pela inclusão condicional do éxon 12 em transcritos do *FMR1*, regulada por

splicing alternativo. A sequência do éxon 12 do *FMR1* está ausente nos genes parálogos *FXR1* e *FXR2* e em ortólogos de invertebrados (KIRKPATRICK; MCILWAIN; NELSON, 2001) (Fig. 4).

Figura 4: Representação esquemática demonstrando os cinco domínios com capacidade de ligação a RNA da proteína FMRP, sendo eles: dois domínios Agenet/Tudor localizados na porção N-terminal, dois domínios centrais do tipo KH (codificados pelos éxons 9-13) e um domínio RGG. A alça variável do domínio KH-2 é codificada pelos éxons 11 (linha contínua) e 12 (linha pontilhada). A inclusão, por *splicing* alternativo, do éxon 12 nos transcritos do gene *FMR1* resulta no aumento do comprimento da alça variável domínio KH-2. (SLN, sinal de localização nuclear; SEN sinal de exportação nuclear; NoS: sinal de localização nucleolar).

Entre vertebrados, o éxon 12 do *FMR1* está presente invariavelmente em mamíferos e, além destes, só foi observada em uma espécie de réptil (Anexo 1). Em 31 espécies de mamíferos analisadas, a alça variável de KH-2 da FMRP era codificada pelos éxons 11 e 12 do *FMR1*. Em 30 destas espécies, o éxon 12 codifica para 21 aminoácidos. Em uma delas, há 20 aminoácidos codificados. Em nenhuma delas, a inclusão do éxon 12 em transcritos do *FMR1* sai de fase de leitura da tradução. Considerando-se 25 resíduos de aminoácidos codificados do final do éxon 11 ao início do éxon 13

do *FMR1*, incluindo todo o éxon 12, 80% (20/25) são conservados entre mamíferos (Anexo 1, Suppl. Fig. 1B). Análises de banco de dados de sequências de etiquetas expressas (do inglês, *expressed sequence tags*, EST) disponíveis no banco de dados de ESTs (dbEST, <http://www.ncbi.nih.nlm.gov/dbEST>) indicam que o éxon 12 do *FMR1* sofre splicing alternativo em pelo menos sete espécies (*Ornithorhynchus anatinus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Macaca fascicularis* and *Homo sapiens*).

Estudos preliminares sugerem que a expressão do éxon 12 do *FMR1*, causando a extensão da alça variável do domínio KH-2 da FMRP, deva ter um efeito supressor da associação a RNA (ASCANO et al., 2012; DARNELL et al., 2009). Dados *in silico* mostram que este segmento é próprio da FMRP de mamíferos e inexistente nas parálogas, FXR1P e FXR2P. Desta forma, é importante avaliar se as isoformas que contêm o segmento codificado pelo éxon 12 do *FMR1* são expressas de forma significativa no encéfalo de mamíferos e em células progenitoras, como já demonstrado para o conjunto das isoformas da FMRP.

Demonstramos inicialmente, por RT-PCR em tempo real e *Western blotting*, que, em transcritos do *Fmr1* de rato, a expressão da sequência do éxon 12 é regulada ao longo do desenvolvimento pós-natal precoce, de forma diferencialmente positiva no córtex cerebral frontal e no cerebelo, em relação ao hipocampo (VELLOSO, 2008) (Anexo 1). No presente trabalho, continuamos esses estudos, tendo como objetivo a análise cuidadosa da expressão deste éxon em isoformas da FMRP, pelo uso de um anticorpo dirigido ao segmento codificado por ele, em encéfalos do décimo segundo dia pós-natal (controle

positivo) de ratos ou embrionários. Análises dos níveis de RNAm e proteicos em fase embrionária (E12 a E20) do encéfalo do rato foram também conduzidas *in vivo* e *in vitro*, em cultivo primário a partir do tecido nesse estágio do desenvolvimento.

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a análise da expressão do éxon 12 do gene *FMR1* e das isoformas da FMRP que o expressam em encéfalo de rato.

Tivemos os seguintes objetivos específicos:

- I. Analisar a distribuição das isoformas da FMRP que expressam a sequência codificada pelo éxon 12 do gene *Fmr1* (FMRP₊₁₂ISO) no encéfalo de rato em período pós-natal precoce;
- II. Caracterizar a presença das isoformas da FMRP e do subgrupo das FMRP₊₁₂ISO em complexos macromoleculares do córtex cerebral de rato em P12, através de cromatografia de exclusão molecular;
- III. Avaliar a expressão do éxon 12 do *FMR1* em encéfalos de ratos em desenvolvimento embrionário e córtex cerebral humano, em envelhecimento;
- IV. Determinar a distribuição histológica das FMRP₊₁₂ISO em encéfalos de ratos em desenvolvimento embrionário;
- V. Determinar a expressão das FMRP₊₁₂ISO em precursores de neurônios cultivados a partir da vesícula telencefálica de ratos em E14; e

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Animais e obtenção de encéfalos

Ratas Wistar prenhas nos dias embrionários (E) E12, E14, E16, E18, E19 ou E20 foram obtidas do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP para fornecimento de embriões. Para obtermos animais em P12, após o nascimento, os animais foram mantidos no laboratório junto com a mãe. Os animais foram mantidos em gaiolas adequadas, sala climatizada, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimento. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Experimental de Animais (CEUA-IBUSP, protocolos 077/2010 e 119/2010).

Para obtenção de tecido para análise proteica ou ribonucleica, a eutanásia foi em câmara de CO₂. Após sacrifício das ratas prenhas ou ratos em P12, os embriões isolados ou neonatos foram decapitados e os encéfalos lavados três vezes em placas de Petri contendo 10mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato, composta por NaCl a 137 mM, KCl a 2.7 mM, Na₂HPO₄ a 10 mM e KH₂PO₄ a 1.8 mM). À dissecação do tecido de animal em E14, E15 ou E16, em placa de Petri com PBS, a região rostral do encéfalo foi isolada com pinça do restante do encéfalo, obtendo-se as vesículas telencefálicas. Para extração do encéfalo de animais em E18, E19, E20 ou P12, seguiu-se incisão sagital, remoção da pele e meninges e isolamento da porção rostral, cinzenta do encéfalo, correspondente ao córtex cerebral frontal. As amostras foram lavadas duas vezes em PBS, transferidas para microtubos individuais e prontamente submetidas a extração de RNA total. Para extratos

proteicos, amostras foram combinadas em *pool* no mesmo microtubo e submetidas ao lisado celular.

Para imunoistoquímica e imunofluorescência indireta, ratos no décimo segundo dia pós natal (P12) e ratas prenhas com embriões nas idades E12, E14, E16, E18 e E20 foram profundamente anestesiados com quetamina e xilazina (100mg/Kg e 25mg/Kg de massa corpórea, respectivamente) e perfundidos via transcardíaca com solução salina tamponada [NaCl a 0,9% em tampão fosfato a 0,1M (PB, NaH₂PO₄ 23mM e Na₂HPO₄ a 77mM) e com paraformaldeído (PFA) a 4% em PB a 4 C (1mL/g, tanto pra salina quanto pra PFA). Após dissecação, os encéfalos dos animais P12 e dos embriões foram pós-fixados em PFA a 4%, por seis horas, a 4 C; crioprotégidos em sacarose a 30%, por 48 horas, a 4 C e cortados em criostato (seções de 14µm).

3.1.2 Amostras de tecido cerebral humano

Em colaboração com o Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEH-GEEC) da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP), analisamos a expressão das variantes do *FMR1* contendo o éxon 12, em tecidos de córtex cerebral frontal, procedentes de autópsia de indivíduos do sexo masculino, com 65 a 80 anos de idade, que, ao exame anatomo-patológico, não tenham apresentado alterações vasculares ou presentes em quadros de demência.

O BEH-GEEC coleta casos provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos de São Paulo. Protocolos clínicos são utilizados para analisar o *status* funcional do indivíduo, através de um informante. Os protocolos estão aprovados pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo (CAPPesq). As amostras encefálicas são processadas conforme protocolo-padrão. A avaliação neuropatológica segue critérios internacionais com uso de imunoistoquímica. Como critério de inclusão para o presente estudo, cada indivíduo: (a) teve idade entre 65 e 80 anos (média de 71 anos); (b) era do sexo masculino; (c) teve consentimento livre e esclarecido por escrito dos familiares, através do termo pré-estabelecido; (d) não teve causa de morte cerebral primária, ou seja, não foi por acidente vascular cerebral, traumatismo craniano, meningite, tumores etc; (e) não deve ter passado por situações que pudessem causar lesões cerebrais isquêmicas secundárias, como por exemplo, encefalopatia anóxica de longa duração; (f) não era portador de comorbidades que possam prejudicar a função cognitiva; (g) tinha obrigatoriamente um cuidador primário ou responsável capaz de fornecer as informações; (h) estava no nível zero da escala de avaliação de demência clínica (do inglês, *Clinical Dementia Rating Scale*, CDR); e (i) classificação dos tecidos na escala Braak com pontuação menor que 3, isto é, sem acometimento cortical, estágio pré-clínico (Braak e Braak, 1991).

3.1.3 Linhagens celulares imortalizadas

Linhagem celular C6 (ATTC CCL-107) imortalizada a partir de glioma de rato foi gentilmente cedida pelo Prof Carlos F Menck (Instituto de Ciências Biológicas, USP) na passagem 19.

3.1.4 Anticorpos

Para imunofluorescência, imunoistoquímica e *Western Blotting*, usamos os soros imune e pré-imune do coelho 3460, obtido pela Invitrogen (Carlsbad CA) para nosso laboratório, a partir da administração intraperitoneal do peptídeo GGPQKPEPKAWQ, codificado pelo éxon 12 do *Fmr1*, cuja

caracterização encontra-se no Anexo 1. O soro imune do coelho 3460 passou a ser denominado como soro imune 3460. Os clones do soro imune 3460 que reconhecem especificamente o peptídeo GGPQKPEPKAWQ foram purificados por afinidade ao peptídeo, como descrito no Anexo 1. Esta fração purificada foi denominada p3460. O anticorpo monoclonal anti-FMRP, 7G1-1, desenvolvido por Stephen T. Warren (Emory University, Atlanta GA), foi obtido do *Developmental Studies Hybridoma Bank*, que tem apoio do *Institute of Child Health and Human Development* (NICHD, Bethesda MD) e é mantido pela Universidade de Iowa (Department of Biology, Iowa City, IA). Utilizamos também o anticorpo monoclonal anti-FMRP, 1C3, desenvolvido em camundongo, pelo mesmo pesquisador e comercializado por Chemicon/Millipore (Billerica, MA). Os anticorpos 7G1-1 e 1C3 reconhecem regiões constantes a todas as isoformas da FMRP, respectivamente os segmentos codificados pelo éxon 11 e pelo éxon 10 do *Fmr1*. Os anticorpos 1C3 e 7G1-1 foram utilizados em ensaios de *Western blotting* e em estudos de imunomarcação de tecidos e células, respectivamente. O anticorpo monoclonal anti-tubulina gama (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi utilizado para a normalização dos níveis proteicos entre os lisados utilizados.

Os anticorpos secundários para *Western blotting* eram conjugados à peroxidase de raiz forte (*whole antibody, Sheep Anti-Mouse IgG–Horseradish Peroxidase*, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Os anticorpos secundários para imunofluorescência de tecidos eram conjugados a FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) e TRITC (*Tetramethylrhodamine isothiocyanate*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e os para imunofluorescência indireta de células eram conjugados a Alexa-Fluor 488 e Alexa-Fluor 594 (Jackson

Immunoresearch, West Grove, PA). Para imunoistoquímica, os anticorpos secundários usados foram o anti-coelho feito em cabra e o anti-camundongo feito em cabra, ambos conjugados a biotina (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA).

3.1.5 Oligonucleotídeos

Iniciadores de oligonucleotídeos utilizados em experimentos de RT-PCR quantitativa foram desenhados com o *software Beacon Designer* (http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html), sua especificidade verificada através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), e sintetizados pela IDT (Coralville, IA). Os oligonucleotídeos para os ensaios de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) do transcriptoma de rato foram FRAX-13S, FRAX-12A e FRAX-13A. Aqueles para o genoma de rato foram TSPY-1S, TSPY-1A, RACT-1S, RACT-1A. Os oligonucleotídeos para qRT-PCR do transcriptoma humano foram HFMR1-8S, HFMR1-9A, HFMR1-5A, HFMR1-9S, HFMR1-10A, HPPIA-1S e HPPIA-1A.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas diferentes etapas do estudo de expressão dos transcritos do gene *Fmr1*

<i>Inciadores para PCR em cDNA de rato</i>		
<i>TSPY-1S</i>	5'-ACAATCCTGGGTTGAGGATG-3'	
<i>TSPY-1A</i>	5'-GTGCACACAGCCAGTTGAAG-3'	300pb
<i>RACT-1S</i>	5'-GTCAGAAGGACTCCTACG-3'	
<i>RACT-1A</i>	5'-CTTCATGGTGCTAGGAGC-3'	836pb
<i>FRAX-13S</i>	5'-AGTTGTGAGGGTGAGGATCG-3'	
<i>FRAX-12A</i>	5'-TTGGAAGGTAGGGAACCTTGG-3'	87pb
<i>FRAX-13A</i>	5'-ACAATTGATGAAACCACTAACACC-3'	210pb
<i>Ppiar-1S</i>	5'-AATGCTGGACCAAACACAAA-3'	
<i>Ppiar-1A</i>	5'-CCTTCTTTCACCTTCCCAA-3'	101pb
<i>Inciadores para PCR em cDNA humano</i>		
<i>HFMR1-8S</i>	5'-GCTGATTCAGGAGATTGTGGA-3'	
<i>HFMR1-9A</i>	5'-CTGGGGCATTAGGTCCAAC-3'	146pb
<i>HFMR1-5A</i>	5'-AGCCGACTACCTTCACTGGA-3'	909pb (Com HFMR-8S)
<i>HFMR1-9S</i>	5'-GGACCTAATGCCCCAGAAGA-3'	
<i>HFMR1-10A</i>	5'-TCTGGGATTCCCCTGCTAC-3'	130pb
<i>HPPIA-1S</i>	5'-AATGCTGGACCCAACACAAA-3'	
<i>HPPIA-1A</i>	5'-GGCCTCCACAATATTCATGC-3'	120pb

*Tamanhos dos produtos esperados para PCR com pares de iniciadores de mesmo nome.

3.2 Métodos

3.2.1 Pré-adsorção do anticorpo 3460

Para controle da especificidade do sinal do soro imune 3460, fez-se sua pré-adsorção pelo peptídeo GGPQKPEPKAWQ (Life Technologies, Grand Island, NY). Soro imune foi diluído 100 vezes e incubado por 16 horas, a temperatura ambiente, sob agitação, com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ. Foram realizadas reações com 200µg, 400µg, 800µg e 1.600µg do peptídeo. As soluções com pré-adsorção foram diluídas para as concentrações utilizadas nas reações de imunistoquímica como descrito abaixo.

3.2.2 Imunoistoquímica

Encéfalos fixados como descritos na seção de Material foram transferidos para solução de sacarose a 30% e mantidos em geladeira por 48 horas para crioproteção. Encéfalos foram seccionados ao criostato (14µm) e coletados diretamente em lâminas gelatinizadas. As seções foram realizadas nos sentidos rostro-caudal e montadas sequencialmente em lâminas, a fim de se criar um panorama de todas as regiões encefálicas para estudo da distribuição das FMRP₊₁₂ISO. Para imunoistoquímica, as lâminas foram incubadas com os soros imune ou pré-imune 3460, diluídos 500 vezes ou anticorpo 7G1-1 diluído 2.000 vezes, em triton X-100 a 0,3%, em PB (fosfato de sódio monobásico, anidro a 50mM e fosfato de sódio dibásico, anidro a 50mM) a 0,1M, e soro normal de cabra (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 5%, durante 16 horas. Todas as incubações foram feitas a temperatura ambiente e em ambiente úmido. Após três lavagens por 10 minutos em PB a 0,1M, as lâminas foram incubadas, por duas horas, com o anticorpo secundário conjugado a

biotina, diluído 200 vezes em PB a 0,1M, triton X-100 a 0,3%. Após três lavagens por 10 minutos, cada, em PB a 0,1M, as lâminas foram incubadas com as soluções A e B do *Kit* ABC (avidina-biotina-peroxidase, Abcam, Cambridge, MA) a 1:100 em PB a 0,1M, contendo NaCl a 400mM e triton X-100 a 0,3%, por 2 horas. Após mais três lavagens por 10 minutos em PB a 0,1M, as lâminas foram reveladas por incubação em diaminobenzidina (DAB) a 25% em PB a 0,1M, por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio a 0,3% e as lâminas permaneceram sob agitação até que fosse possível observar a marcação na coloração castanha. Mais 1 mL de peróxido de hidrogênio a 0,3% foi adicionado antes de as lâminas serem lavadas por três vezes, por 10 minutos cada, em PB a 0,1M.

Lâminas foram deixadas para secar em placa quente por 16 horas. Opcionalmente foi realizada marcação com Giemsa, que consistiu em colocar as lâminas, após imunomarcação, em uma solução 1:1 de etanol 95%:clorofórmio por uma hora e então reidratar os cortes gradativamente em etanol a 90% (5 minutos), etanol a 70% (5 minutos) e água destilada (5 minutos). As lâminas foram colocadas em solução de Giemsa (azure blue a 5%, Millipore, Billerica, MA) e PBS (1:1) por 10 minutos. As lâminas foram colocadas em etanol a 95% (20 segundos) para diferenciar a coloração, lavadas em PBS e, posteriormente, em solução de molibdato de amônio a 1% para fixar a coloração, por 10 minutos.

Para todas as reações, imunomarcação com ou sem Giemsa, as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em tetróxido de ósmio a 0,05%, por 20 segundos, então submetidas a bateria de desidratação gradativa: etanol a 70% (5 minutos), etanol a 90% (5 minutos), dois banhos de etanol a 100% (5

minutos cada), e solução clareadora (xilol, duas lavagens de 5 minutos cada). As lâminas foram cobertas com lamínula usando meio de montagem Permount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

As imagens das lâminas foram capturadas em microscópio óptico invertido (Axiovert 4C, Zeiss, Alemanha) e organizadas em relação a suas posições no encéfalo de rato. As imagens são apresentadas neste trabalho ordenadas de acordo com suas coordenadas no plano sagital, cujo ponto de referência é o Bregma, interseção das suturas sagital e coronal. As referências de estruturas do encéfalo de rato em cada coordenada estereotóxica foram obtidas do atlas *The rat brain in stereotaxic coordinates* (PAXINOS; WATSON, 2007). As micrografias utilizadas como referência para estruturas do encéfalo durante o desenvolvimento embrionário foram obtidas no atlas *Neocortical Development* (BAYER; ALTMAN, 1991)

3.2.3 Imunofluorescência indireta de tecido

Encéfalos de ratos jovens em P12 fixados tiveram seus cortes organizados em lâminas como descrito na seção anterior. As lâminas com os cortes foram lavadas duas vezes por 10 minutos em tampão fosfato a 0,1M. O soro imune 3460 e o anticorpo 7G1-1 foram diluídos cem e mil vezes, respectivamente, em solução de triton X-100 a 0,3%, em PB e soro normal do hospedeiro do anticorpo secundário a 5%, para bloqueio de ligações inespecíficas. Cem µL da solução de anticorpo foram adicionados a cada lâmina, mantida em caixa de incubação úmida por 16 horas. Lâminas foram lavadas três vezes por 10 minutos cada em PB a 0,1M e incubadas com os anticorpos secundários gerados em cabra que reconhecem anticorpos de coelho e camundongo, e são conjugados aos fluoróforos FITC (*Fluorescein*

Isothiocyanate) e TRITC (*Tetramethylrhodamine isothiocyanate*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) respectivamente, diluídos cem vezes em PB a 0,1M. Após incubação por duas horas em caixa de incubação úmida, sob abrigo da luz, os cortes foram lavados três vezes por 10 minutos cada, em PB a 0,1M, protegidos da luz. As lâminas foram fechadas com glicerol carbonato (carbonato de sódio a 150mM; bicarbonato de sódio a 300mM; glicerol a 3%) e lamínulas que foram vedadas com esmalte. Lâminas foram mantidas a 4 C, protegidas da luz até a obtenção das imagens. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência com filtros apropriados para os fluoróforos utilizados. Seções z foram obtidas ao microscópio confocal LSM410 (Zeiss, Alemanha) e as imagens agrupadas.

3.2.4 Análise dos níveis de RNAm de transcritos do *FMR1*

A análise dos níveis dos transcritos do *FMR1* foi realizada por RT-PCR semi-quantitativa (qRT-PCR) e ocorreu de acordo com os seguintes passos:

3.2.4.1 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.

3.2.4.2 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 a 3M e ureia a 6M) foi adicionado a cada microtubo, contendo um *pool* de vesículas telencefálicas da cria de duas fêmeas, 100mg de córtex cerebral imediatamente após sua extração ou precipitado de células (C6 ou neuroesfera), e homogeneizado em jato de

seringa (10 mL) com agulha de 8mm. As soluções foram mantidas a 4 °C, durante 16 horas, em microtubos (1,5 mL) quando foram centrifugados por uma hora a 16.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado com micropipetador (para amostras de indivíduos em E14 ou 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-DEPC). A solução foi homogeneizada com pipeta e foram acrescentados 700µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e novamente homogeneizado. 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 a 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 adicionaram-se 10% do volume de acetato de sódio a 3M, pH 5,2 e dois volumes de etanol absoluto gelado. Amostras de RNA em etanol foram estocadas a -80 °C até serem utilizadas.

3.2.4.3 Extração de DNA genômico

O sobrenadante obtido da lise celular durante extração de RNA de tecidos em E14 e 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 250 μ L de etanol a 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 diluído em 50 μ L de água destilada e deionizada (milliQ, Millipore, Billerica, MA). Dez μ L de cada amostra de DNA foram aplicados em gel de agarose a 2% para quantificação com o padrão de dosagem *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies, Grand Island, NY) após eletroforese a 100V por 15 minutos em tampão TBE 1X (tris-base a 89mM, ácido bórico a 89mM, EDTA a 2mM). As amostras foram coradas com brometo de etídio (2,5mM) e observadas à luz ultravioleta.

3.2.4.4 Sexagem molecular

DNA (1 μ L) de cada amostra dos animais em E14 ou E19 foi utilizado em reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores TSPY-1S e TSPY-1A (Tabela 2) específicos para o gene *Tspy* do cromossomo Y de rato. A reação foi realizada em volume final de 10 μ L em tampão (Life Technologies, Grand Island, NY) a 1X, MgCl₂ a 1.5mM (Life Technologies, Grand Island, NY), 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), DMSO a 10%, cada iniciador a 0,5 μ M e 1U de polimerase *Taq* de DNA (Life Technologies, Grand Island, NY). 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 e massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies, Grand Island, NY) foi aplicado no mesmo gel.

3.2.4.5 Extração de RNA total a partir de cérebro humano

Cinquenta µg de córtex cerebral, frontal, humano foram colocados em tubos do homogeneizador automático Precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, França) com 1mL de trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) e homogeneizados em três ciclos de 20 segundos. O homogeneizado foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente (15 C-30 C). A fase superior foi transferida para um tubo de 1,5mL e 200µL de clorofórmio foram adicionados. A solução foi homogeneizada vigorosamente por 15 segundos, incubada à temperatura ambiente por três minutos e centrifugada à 4 C a 12.000 x *g* por 15 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo de 1,5mL ao qual foi adicionado volume igual de etanol a 70%. Setecentos µL da amostra foram transferidos para uma coluna do sistema RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemanha), adaptada em tubo de 2mL. A coluna foi centrifugada por 15 segundos a 8.000 x *g* à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com os tampões que acompanham o sistema conforme o protocolo sugerido pelo fabricante e o RNA eluido com 50µL de água-DEPC. As amostras de RNA humano foram dosadas em ensaios de eletroforese em gel de agarose à 1%. As massas de cada amostras foram comparadas com padrão de massa e tamanho molecular *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies, Grand Island, NY).

3.2.4.6 Quantificação de RNA

Amostras de etanol contendo RNA de rato (100µL) foram centrifugadas a 16.000 x *g* a 4 C durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 250µL de etanol a 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 ressuspenso em 50 μ L de água-DEPC. A dosagem do RNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, aplicando-se 2,5, 5, e 10 μ L de cada amostra por canaleta. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X a 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* (Life Technologies, Grand Island, NY) foi aplicado no mesmo gel para a quantificação do RNA.

3.2.4.7 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* (Life Technologies, Grand Island, NY). Volumes de etanol contendo 2 μ g de RNA precipitado foram centrifugados como descrito acima e o RNA ressuspenso em 23 μ L de água-DEPC. Amostras foram transferidas para microtubos de microcentrífuga de 0,2mL, onde foram adicionados 3 μ L de tampão próprio para reação e 4 μ L de *DNAseI Amplification-Grade* (Life Technologies, Grand Island, NY). As amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, a elas foram adicionados 4 μ L de EDTA a 25mM e aquecidas por dez minutos a 65 C para inativação da DNAseI. Às amostras de RNA digeridas por DNAseI foram adicionados imediatamente 3 μ L de oligodT (500 μ g/mL) e 2 μ L de iniciadores aleatórios (50 μ g/mL), mistura que foi incubada a 70 C por dez minutos para hibridação dos iniciadores. À reação foram acrescentados 7 μ L de tampão de PCR 10X, 7 μ L de MgCl₂ a 25mM, 3.5 μ L de dNTP mix a 10mM, 7 μ L de Ditiotretitol a 0,1M e 4.5 μ L de água-DEPC. As amostras foram centrifugadas

e recolocadas rapidamente no termociclador a 42 C por cinco minutos. Foram adicionados 2 µL 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 a elas foram adicionados 2µL de RNase H, seguido de incubação a 37 C, por 20 minutos. As amostras de cDNA foram estocadas a -20 C.

3.2.4.8 Teste dos cDNAs

Para testar o cDNA sintetizado foram realizadas reações de RT-PCR. A primeira reação utilizou iniciadores RACT-1S e RACT-1A (Tabela 2) específicos para o gene da actina beta de rato. As reações foram realizadas em volume total de 10µL contendo tampão *Taq* (Life Technologies, Grand Island, NY) a 1X, MgCl₂ a 1.5mM (Life Technologies, Grand Island, NY), 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 (Life Technologies, Grand Island, NY). 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.

3.2.4.9 Reação de qRT-PCR

Para a reação de qRT-PCR foram usados os iniciadores FRAX-13S, FRAX-12A e FRAX-13A (Tabela 2) que hibridam respectivamente nos éxons 10, 11 e 12 dos genes *Fmr1* de rato e do *FMR1* humano. Os pares de iniciadores foram desenvolvidos de forma que cada oligonucleotídeo tenha

especificidade para um éxon diferente do gene e que o segmento entre eles contenha na sequência genômica um íntron. Cada oligonucleotídeo foi diluído a 2 mM para reações de qRT-PCR.

A análise da expressão gênica foi feita através da qRT-PCR no equipamento Rotor Gene 3000 (*Corbett Research*, Concord, Austrália), em colaboração com a Dra. Silvana Chiavegatto. A qRT-PCR 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. O gene *Ppia* (ciclofilina) foi selecionado como normalizador para experimentos de rato e com amostras humanas, sendo amplificado pelos oligonucleotídeos específicos Ppiar-1S e Ppiar-1A ou HPPIA-1S e HPPIA-1A, respectivamente (Tabela 2). As reações continham iniciadores para a concentração final de 200 nM e a solução *SYBR Green Master Mix* (Life Technologies, Grand Island, NY), que contém sais, desoxinucleotídeos, a polimerase *AmpliTaQ Gold* de DNA, os compostos fluorescentes *Sybr Green I* e ROX, como referência passiva. Reações foram otimizados para um volume final de 20 μ L. Para a escolha da concentração ideal do cDNA obtido das amostras a ser amplificado, foram feitas cinco diluições seriadas: 50 ng/ μ L, 25 ng/ μ L, 12.5 ng/ μ L, 6.25 ng/ μ L e 3.125 ng/ μ L. Estas diluições foram utilizadas para análise da curva-padrão de amplificação com cada par de iniciadores. Escolheu-se a concentração de 12,5ng/ μ L por ser aquela a apresentar maior eficiência de amplificação. 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 negativo (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 iniciadores 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. A quantidade de transcrito em cada amostra foi relativamente determinada, baseada no *Ct* de cada amostra normalizado pelo seu *Ct* na reação com os oligonucleotídeos específicos para o gene controle (normalizador). As relações matemáticas utilizadas foram aplicadas por meio de matriz baseada no algoritmo $\Delta\Delta C_t$. As médias dos dados de expressão relativa obtidas foram comparadas em pares utilizando-se o teste estatístico *t* de Student (STUDENT, 1908).

3.2.5 Lisados de córtex cerebral de rato

Para obtenção de lisados de encéfalo (vesículas telencefálicas em E14 ou E16 e córtex cerebral em E18, E19 ou E20), o tecido foi passado por seringa (21 G1) em tampão de lise (NaCl a 150mM, Tris-HCl a 50mM, pH 8.0,

triton-X-100 a 1%, inibidor de protease *Complete Ultra Tablets, EDTA-free* (Roche, Mannheim, Alemanha) e inibidores de fosfatase (NaF a 1mM e Na₃VO₄ a 2mM), incubado em gelo por 30 minutos, centrifugado a 16.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante aliqotado e dosado com reagente de Bradford (Serva, Heidelberg, Alemanha) e congelado a -20 C. Córtices cerebrais de 50 ratos no décimo segundo dia de vida (P12) foram usados para extração de complexos proteicos sob condições para obtenção de partículas ribonucleoproteicas. Para extrato de partículas ribonucleoproteicas, seguimos as condições utilizadas para gradientes polissomais. O tecido foi lavado em PBS contendo cicloheximida a 50 µg/mL e transferido para homogeneizador de vidro di tipo Douncer e homogeneizado com tampão de lise (HEPES/KOH a 50 mM, acetato de potássio a 140 mM, acetato de magnésio a 4 mM, Ditiontreitol a 2,5 mM, sacarose a 320 mM, fluoreto de Sódio a 100 mM, EGTA a 2 mM, *complete protease inhibitor cocktail* 1X (Roche, Basel, Suíça), RNasin a 10U/mL e Igepal a 10% (NP-40, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 10%). Amostras foram incubadas por 20 min. em gelo e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4 C. O sobrenadante foi estocado a -80 C.

3.2.6 Cromatografia de exclusão molecular

Cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) foi realizada no laboratório do Prof Luís Eduardo Soares Netto (IB-USP) em um sistema HPLC (do inglês, *High pressure liquid chromatography*, Shimadzu, Kioto, Japão), equipado com um detector SPD-M10Avp *photodiode array* e um coletor de frações FRC-10A (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia MD), utilizando-se uma coluna BioSep SEC, S4000 (300 X 7,8 mm, faixa de exclusão de 15.000 a 1.500.000 Da em condições nativas, partículas de 5µm, poro de 500Å

e pH 2,5 a 7,5; Pheromenex, Torrance CA), equilibrada em tampão fosfato-sódio a 100mM, pH 7.0 e NaCl a 300mM, com fluxo isocrático a 0.5 mL/min. Para curvas de calibração e faixa de separação de massas, foi usado o padrão da BioRad *Gel Filtration Standard* (Biorad, Hercules, CA), que possui bandas com massas de 1,35, 17, 44, 158 e 670 kDa.

Cento e vinte miligramas de proteína do lisado celular de córtex cerebral de rato em P12 foram aplicados à coluna BIOSep SEC, S4000. Após coletar 70 frações de um mL cada, estas foram concentradas a 40% do seu volume inicial em tubos Centricon (Millipore, Billerica, MA). Para esta concentração, as amostras foram precipitadas adicionando-se ácido tricloro-acético (TCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 10% e incubando-se por 30 minutos em gelo. Amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g a 4C, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado em 500uL de TCA a 10%, a que se seguiu centrifugação nas mesmas condições. O precipitado das amostras foi lavado mais seis vezes com acetona a -20C, seco ao ar por 20 minutos e diluído em tampão ureia (tris a 45mM, pH 7,2; SDS a 0,9%; ureia a 32,4%). A solução foi diluída em tampão de amostra GSD para 1 vez (glicerol a 10%, SDS a 2%, ditiotretol a 1 mM, azul de bromofenol a 0,004%). Estas amostras foram prontamente submetidas a *Western blotting*.

3.2.7 Western blotting

Para a realização de *Western blotting*, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE (10%), transferidas para um filtro de nitrocelulose (45µm, BioRad, Hercules, CA) e reveladas no filtro com o corante vermelho de Ponceau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para controle da eficiência da transferência. As proteínas foram bloqueadas em TBS-T (Tris a 25 mM, NaCl a 140 mM, tween-

20 a 0,1%) contendo caseína a 1% e a membrana foi incubada com anticorpo p3460, 1C3 ou γ -tubulina diluídos 400, 1.000 e 40.000 vezes, respectivamente. A membrana foi lavada em TBS-T, incubada posteriormente com anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo, conjugado à peroxidase (GE Life Sciences, Piscataway NJ), lavada e revelada em filme radiográfico, após incubação com reagentes *ECL western blotting Prime* (GE Life Sciences, Piscataway NJ).

3.2.8 Cultivo em suspensão de células progenitoras neuro-gliais da vesícula telencefálica de rato em E14

Para cultura primária de precursores neuro-gliais derivados da vesícula telencefálica de ratos em E14, a região rostral isolada do encéfalo foi coletada em meio completo (DMEM:F12 (7:3) acrescido de piruvato de sódio 1X, B-27 a 2%, fator de crescimento epidérmico (EGF) a 20 ng/mL, fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) a 20 ng/mL, heparina a 5 μ g/mL, L-glutamina a 2 mM e antibióticos penicilina e estreptomicina 1X (Life Technologies, Grand Island, NY). Após o isolamento do tecido de todos os animais, os fragmentos se depositaram no fundo do tubo por gravidade e o meio foi removido por pipetagem. O tecido foi digerido em 3 mL de solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Life Technologies, Grand Island, NY) por 10 min., a 37 C. A reação foi parada pela adição de 3 mL de soro fetal bovino (FBS, Life Sciences, Brasil). Após a sedimentação do tecido no fundo do tubo, a solução foi removida e acrescentou-se 1 mL de meio completo. O tecido foi dissociado mecanicamente com pipetas com calibres decrescentes (5 mL, 2 mL, micropipetas com capacidade para 1000 μ L e 200 μ L) até a obtenção de uma solução homogênea e filtrado para remover debris celulares (filtro de 100 μ m,

BD Biosciences, Billerica MA). Foram utilizados 20 μ L do sobrenadante para observar, ao microscópio, a morfologia das células e contá-las em câmara de Neubauer. Dois milhões de células foram plaqueadas em garrafas de cultura de capacidade de 75 mL (T-75 não tratada para adesão celular, Corning NY), previamente revestidas com poly-2-hidroxietil-metacrilato (poli-HEMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para evitar adesão celular (SAVARY; HUGNOT; CHASSIGNEUX, 2007). As garrafas foram mantidas a 37 C e CO₂ a 5% e não houve troca de meio por quatro ou sete dias.

Para mudança de garrafa, neuroesferas e meio de cultura foram transferidos para um tubo de 50 mL (BD Biosciences, San Jose, CA) e centrifugados a 212 x g, por um min, a 4 C. O sobrenadante foi removido e, após uma lavagem em PBS, as células ressuspensas em 500 μ L de meio de cultura (composição de acordo com a indicação a seguir) e plaqueadas inteiras e mantidas a 37 C, CO₂ a 5%.

Para a sincronização das células de neuroesferas na fase G1 do ciclo celular, após uma semana *in vitro* (7 DIV) de cultivo primário, as esferas foram lavadas como descrito e mantidas íntegras, sem dissociação, em nova garrafa T75, revestida com poli-HEMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), contendo meio mínimo (DMEM:F12 (7:3) acrescido de piruvato de sódio 1X, B-27 a 2%, heparina a 5 μ g/mL, L-glutamina a 2 mM e antibióticos – sem EGF ou bFGF), onde foram mantidas por sete dias.

Para sincronização de células na fase S do ciclo celular, as células foram carenciadas como acima, embora por apenas 72 horas, e seguiu-se uma incubação por nove horas em meio completo e, em seguida, o tratamento com hidroximiureia para 1 mM em meio completo, mantido por 16 horas.

Para sincronização de células na fase M do ciclo celular, as células foram carenciadas por apenas 72 horas, e seguiu-se uma incubação por nove horas em meio completo e então o tratamento com nocodazol para 4 nM em meio completo, mantido por sete horas.

Para preparar neuroesferas para corte ao criostato, elas foram cuidadosamente coletadas, lavadas em PBS (centrifugação a 220 x g, 3 min.) e fixadas em solução em microtubo, em paraformaldeído a 4%, por 30 min, temperatura ambiente. Após lavadas três vezes em PBS, as neuroesferas foram ressuspensas em sacarose a 10% e mantidas por uma hora a 4 C. Outras três lavagens em PBS se seguiram e as esferas foram ressuspensas em sacarose a 20% em PBS, incubadas a 4 C, por 1 hora. As esferas lavadas três vezes em PBS foram suspensas em sacarose a 30% e mantidas por pelo menos 16 horas a 4 C. As esferas foram montadas em meio Tissue-tek® O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance CA) em fôrma, congeladas a -80 C e cortes de 10 a 12 µm foram realizados ao criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha) e capturados em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Os cortes em lâminas foram tratados em acetona gelada (-20 C) por dez min. e estocados a -80 C antes de serem submetidos à imunofluorescência indireta.

Para diferenciação neuronal, neuroesferas foram plaqueadas sob condições de aderência em placas revestidas com poli-D-lisina a 50 µg/mL (PDL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em PBS, por 16 horas e cultivadas em Neurobasal (Life Technologies, Grand Island, NY), B27 1X, heparina 2,5µg/mL, N-acetil-cisteína a 400 mM, insulina-transferrina-selênio 1X, glicose a 0,2%, glutamina a 2 mM e antibióticos, por 12 dias *in vitro* (DIV). A partir de 4 DIV, a

cada dois dias, 50% do meio foram substituídos por meio completo. Após fixação em paraformaldeído a 4%, por 20 min, a temperatura ambiente, as células foram submetidas à imunofluorescência indireta.

3.2.9 Imunofluorescência indireta de células

Para imunofluorescência indireta, células fixadas em lâminas (neuroesfera em suspensão) ou em lamínulas (diferenciadas) foram permeabilizadas em triton-X-100 a 0,3% em PBS, por 20 minutos, a temperatura ambiente, tratadas em glicina a 0,1M em PBS, por 20 min, e bloqueadas em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (livre de imunoglobulinas, Jackson Immunoresearch, West Grove PA) em PBS, por 60 min a temperatura ambiente. Os cortes ou células foram incubados com anticorpo primário diluído em PBS e BSA a 0,5%, por 16 horas, lavados em PBS, e posteriormente incubados com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo, diluído 400 vezes nas mesmas condições, por três horas. Após a última lavagem, as lamínulas foram montadas em lâmina contendo Vectashiled (Vector Laboratories, Burlingame CA) com o corante de ácido nucléico 4',6-diamidina-2-fenil-indol (DAPI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 1 µg/mL e seladas com esmalte. As imagens de imunofluorescência foram capturadas ao microscópio confocal LSM410 ou LSM510 (Zeiss, Germany).

4. Resultados

4.1. Distribuição de isoformas FMRP₊₁₂ISO no encéfalo de rato em P12

Em período anterior ao presente estudo, desenvolveu-se, em nosso laboratório, um anticorpo policlonal, a partir da imunização de um coelho (3460) com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ, que apresenta 12 dos 21 aminoácidos codificados pelo éxon 12 do *Fmr1*. Ao contrário do soro pré-imune, o soro imune de 3460 detecta o peptídeo GGPQKPEPKAWQ em ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) e *dot blot* e, ao *Western blotting*, as FMRP₊₁₂ISO superexpressa e endógena. Ensaio de ELISA realizados com soro de coelhos e o peptídeo antes da imunização ou quatro, oito ou dez semanas mais tarde revelaram títulos de <1:50, 1:18.946, >1:204.800 (Invitrogen, Calrsbad CA) e >1:204.800 Além disso, observa-se banda correspondente a 28 a 30 kDa (p28K) que não é identificada pelo soro pré-imune 3460 (Fig. 2 do Anexo 1).

A banda de p28K não é detectada pelos anticorpos comerciais, anti-FMRP, clones 1C3 e 7G1-1, que reconhecem porções invariáveis da FMRP, codificadas respectivamente pelos éxons 10 e 11 do *Fmr1* (BROWN et al., 2001; DEVYS et al., 1993). Esta mantém-se presente em *blots* de leucócitos de pacientes do sexo masculino com a SFX, nos quais a expressão do *FMR1* deve estar abolida (Fig. 2 do Anexo 1). A purificação de anticorpos anti-FMRP₊₁₂ISO do soro imune 3460 por afinidade com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ originou uma fração que denominamos p3460, a qual, em *Western blots*, reconhece proteínas que migram em SDS-PAGE de forma

semelhante às detectadas por 1C3 (Fig. 3 do Anexo 1). Entretanto, p3460 identifica também p28K. Estes dados sugerem que há clones de anticorpos no soro imune 3460 que reconhecem o peptídeo GGPQKPEPKAWQ e as FMRP₊₁₂ISO ou a p28K. Não há na literatura dados que sugiram que a FMRP sofra clivagem proteolítica. Por exemplo, um anticorpo comercial que reconhece a porção C-terminal da FMRP não reconhece a p28K (DEVYS et al., 1993). Assim, as evidências indicam que p28K não é produto da expressão do gene *FMR1*.

Como observado na Figura 5A, a reatividade do soro imune 3460 com as FMRP₊₁₂ISO (50 a 80 kDa) reduz-se em *Western blotting* após a adsorção dos anticorpos do mesmo com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ. De forma semelhante, observa-se com o soro imune 3460 pré-adsorvido a perda de intensidade de banda de *Western blotting* correspondente a p28K (Fig. 5A, Fig. 2 do Anexo 1). A pré-adsorção foi conduzida incubando-se o soro imune 3460 com quantidades crescentes do peptídeo GGPQKPEPKAWQ (200µg, 400µg, 800µg e 1600µg) que foi originalmente usado para imunizar o coelho 3460, então gerando o soro imune. Esta técnica visa saturar os anticorpos, em solução, com epítomos para os quais esses devem ser específicos. Como visto na Figura 5, o uso do anticorpo pré-adsorvido em *Western blotting* ou imunomarcação deve diminuir a intensidade de qualquer sinal específico em relação ao anticorpo que não foi pré-adsorvido. O desaparecimento da banda de p28K à pré-adsorção do soro imune 3460 com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ indica que o clone que reconhece a p28K detecta também o peptídeo e, mais provavelmente, foi gerado pela imunização do coelho.

Inicialmente, seções de encéfalo de rato em P12 foram utilizadas em análise de imunistoquímica de tecido do córtex cerebral dorso-frontal com o soro imune 3460 pré-adsorvido (Fig. 5). Os encéfalos nos quais foi usado soro imune 3460 pré-adsorvido apresentaram marcação progressivamente mais fraca nas mesmas regiões corticais, restando apenas um sinal cujo padrão não reproduzia o específico (Fig.. 5).

Figura 5: (A) *Western blotting* mostrando lisados de córtex cerebral de animais em P4 ou P6 em reação ao soro imune 3460, soro imune 3460 após incubação com o

peptídeo GGPQKPEPKAWQ ou soro 3460 purificado, conforme indicado. Os números a esquerda representam o padrão de migração de proteínas de massa (kDa) conhecida.

(B) Imagens de imunistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com soro imune 3460 (3460 IM), soro pré-imune 3460 (3460 PI), soro imune 3460 após incubação com diferentes concentrações do peptídeo GGPQKPEPKAWQ. As marcações na região cortical nos cortes pré-adsorvidos diminuem conforme o aumento da concentração do peptídeo GGPQKPEPKAWQ que bloqueia os epítomos específicos do anticorpo 3460. Barra de escala: 50µm.

Diante dessa reação cruzada, entendemos que o soro imune 3460 e p3460 possam ser usados em *Western blotting* para identificação das FMRP₊₁₂ISO, dadas as massas moleculares diferentes entre estas e a p28K. Para análises morfológicas, o soro imune 3460 ou p3460 deve ser usado com cautela, tendo sempre o anticorpo 1C3 ou 7G1-1, em amostras paralelas ou em marcação dupla, como controle positivo e, mantendo-se também o soro pré-imune como controle negativo.

Apresentamos aqui estudos de imunistoquímica com o soro imune 3460 e encéfalos de rato no décimo segundo dia pós-natal (P12), quando se observa alta expressão das FMRP₊₁₂ISO no córtex cerebral frontal e cerebelo (Fig. 3 do Anexo 1) e maturação sináptica de circuitos neurosensoriais (DESAI et al., 2006). Desta forma, animais em P12 foram utilizados nesta etapa do estudo, buscando-se padronizar as condições de imunistoquímica em um controle positivo e avaliar a distribuição das isoformas FMRP₊₁₂ISO no encéfalo de rato.

Enquanto o anticorpo 7G1-1 apresenta-se satisfatório em análises morfológicas, o anticorpo 1C3 é relativamente melhor ao *Western blotting*. Neste trabalho, análises por imunistoquímica foram conduzidas com o anticorpo monoclonal 7G1-1 ou os soros pré-imune ou imune 3460, em cortes

sequenciais. Um panorama de seções (14 µm) do encéfalo, em intervalos regulares, foi organizado em sequência rostro-caudal do encéfalo de rato em P12 e cada região teve amostras consecutivas marcadas com soro imune ou pré-imune 3460 ou anticorpo 7G1-1 (Fig.s 6 a 16). Marcações para 7G1-1 ou soro imune 3460 foram observadas em regiões limitadas do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. Os dados a seguir estão apresentados após consulta ao atlas de neuroanatomia de rato, de acordo com as coordenadas estereotáticas indicadas em relação ao bregma (ponto anatômico de interseção das suturas coronal e sagital) (PAXINOS; WATSON, 2007).

Na região mais rostral do córtex cerebral frontal (Bregma 5,16), não foi observada marcação em células com o anticorpo 7G1-1. Por outro lado, a mesma região quando marcada com o soro imune 3460 apresentou sinal em agrupamentos celulares com morfologia neuronal, principalmente na porção dorsolateral do hemisfério direito, correspondendo ao córtex motor secundário. Em cortes mais caudais, a marcação tornou-se simétrica. Este sinal, por não ser reprodutível com o anticorpo 7G1-1, é provavelmente resultado de marcação inespecífica do soro imune 3460. As amostras de tecido incubadas com o soro pré-imune 3460 não apresentaram sinal apreciável (Fig. 6), nem aquelas não expostas ao anticorpo primário (controle negativo como na Figura 5, dados não mostrados). Células epiteliais da meninge apareceram coradas no citoplasma e núcleo, por 7G1-1 e soro imune 3460, mas também pelo soro pré-imune 3460 (Fig. 6).

Em segmento mais caudal (Bregma 4,2), na região do córtex motor, um agrupamento celular, na superfície cortical, foi positivo para o anticorpo 7G1-1 no mesmo plano dorsal que o observado anteriormente com o soro imune

3460. Neste nível, o soro imune 3460 apresentou o padrão da marcação anterior, embora em intensidade baixa e de forma semelhante ao soro pré-imune 3460 (Fig. 6). Este padrão é distinto do detectado por 7G1-1.

Às coordenadas Bregma 3,24, o número de células marcadas e a intensidade da marcação por 7G1-1 aumentaram progressivamente em sentido caudal da região cortical, na área dorsolateral do hemisfério direito em que havia sido observado e surgiu na porção ventrolateral do mesmo hemisfério e no segmento ventrolateral do hemisfério esquerdo (Fig. 7). O segmento dorsolateral direito apresentou sinal francamente positivo com o soro imune 3460 em relação ao soro pré-imune 3460 (Fig. 7). Por outro lado, ambos os planos ventrolaterais foram claramente positivos para o soro imune 3460 (Fig. 7).

Figura 6: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 7: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Em uma coordenada mais caudal (Bregma 2,16), células marcadas pelo anticorpo 7G1-1 foram observadas com distribuição mais simétrica em relação aos hemisférios cerebrais, nos seguintes segmentos: dorsolateral, lateral e ventrolateral. Nas regiões ventrolateral e dorsolateral dos hemisférios esquerdo e direito, houve marcação semelhante para 7G1-1 (Figur. 8, A e G e Figura 9, A e G) e soro imune 3460 (Fig. 8, B e H e Figura 9, B e H), sendo negativo para o soro pré-imune 3460 (Fig. 8, C e I e Figura 9, C e I). O anticorpo 7G1-1 revelou marcação positiva no segmento lateral, de forma limitada, em ambos os hemisférios cerebrais (Fig. 8, D e Figura 9, D), tendo células observadas claramente também pelo soro imune 3460 no hemisfério esquerdo (Fig. 8, E) e em mais baixa intensidade no hemisfério direito (Fig. 9 E). Além de maior simetria lateral, como descrito acima, observou-se, neste nível, aumento da extensão de parênquima cerebral marcado, nesta coordenada em que o córtex cerebral somatossensorial ocupa maior território cortical. Os dados de marcação lateral ventrolateral por ambos os anticorpos relacionam-se à essa área. O segmento dorsolateral dos hemisférios equivalem à área motora primária.

Figura 8: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 9: Imagens de imunohistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Ainda nestas coordenadas (Bregma 2,16), houve marcação para 7G1-1 em dois segmentos mediais, um em cada hemisfério, correspondentes às

áreas do córtex cerebral cingulado 1 (no hemisfério esquerdo) e cingulado 2 (no hemisfério direito). Nessas áreas, houve marcação pelo soro imune 3460 que, embora de forma distinta em relação ao soro pré-imune 3460, foi de mais baixa intensidade do que 7G1-1 (Fig. 10).

Figura 10: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14μm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50μm.

A imunocoloração do córtex lateral, equivalente à área somatosensorial aumentou nas seções subsequentes (Bregma 1,28), incubadas com 7G1-1 ou soro imune 3460 (Fig. 11). A intensidade da marcação por 7G1-1 e soro imune 3460 do córtex cerebral diminuiu nas áreas do córtex cingulado (dados não mostrados), bem como a do segmento dorsolateral (Fig. 11). O córtex piriforme apresentou-se corado para 7G1-1 e o soro imune 3460 (dados não mostrados). Além destas, nessas coordenadas, foi possível observar marcação bastante pronunciada e de forma pseudoestratificada na região periventricular dos ventrículos laterais de ambos os hemisférios com o anticorpo 7G1-1. Embora o soro imune 3460 tenha sido positivo na mesma região e com a mesma distribuição, sua intensidade de marcação foi consideravelmente mais baixa do que com o anticorpo 7G1-1. O epêndima foi aparentemente positivo para 7G1-1, mas negativo para o soro imune 3460 (Fig. 12).

Figura 11: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotática em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral na região do ventrículo lateral, como indicado à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 12: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Um zoom de 4x é mostrado nos dois painéis inferiores representando as margens superiores dos ventrículos Barra de escala: 50µm.

Em Bregma 0,0, a região periventricular continuou a exibir marcação intensa com o anticorpo 7G1-1 e o soro imune 3460, nos ventrículos laterais de ambos os hemisférios cerebrais (Fig. 13). Foi também possível observar marcação de alta intensidade com o anticorpo 7G1-1 e soro imune 3460 na

região ventral do córtex cerebral, em área do córtex piriforme, que se mostrou negativa para o soro pré-imune 3460 (Fig. 13). O segmento lateral do hemisfério direito do córtex cerebral manteve-se positivo com a mesma intensidade para 7G1-1 e soro imune 3460 que observada anteriormente (dados não mostrados). A área do córtex cingulado apresentou-se fracamente positiva para 7G1-1 e o soro imune 3460 e negativa para o soro pré-imune 3460 (Fig. 13). Duas regiões corticais, localizando-se em áreas dorsolateral e ventrolateral do hemisfério esquerdo, mostraram inespecificidade com o soro 3460, pois foram positivas para ambos os soros imune e pré-imune 3460 e negativas para 7G1-1 (dados não mostrados).

Figura 13: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

A marcação periventricular por 7G1-1 diminuiu e não foi mais observada em seções mais caudais que apresentavam os ventrículos laterais (Bregma - 1,08) e o epêndima não foi corado por 7G1-1 ou pelo soro imune 3460 nestas coordenadas (dados não mostrados). A marcação do córtex piriforme manteve-se forte para 7G1-1 e mais fraca para o soro imune 3460. O núcleo endopiriforme foi positivo para ambos os anticorpos 7G1-1 e o soro imune 3460 (Fig. 14). Observou-se também que a área sensorial do hemisfério direito do córtex cerebral manteve-se positiva para 7G1-1 e o soro imune 3460 (Fig. 14). Nestas coordenadas, foi possível observar sinal positivo para 7G1-1 no plexo coroide, a qual foi negativa para o soro imune 3460 (dados não mostrados). A partir dessas seções, não foi realizada incubação com o soro pré-imune 3460.

Nas seções seguintes (Bregma -2,04), a marcação com o anticorpo 7G1-1 no segmento lateral manteve-se e ainda se relacionava à área somatossensorial. Esta região continuou exibindo sinal positivo quando marcada com o soro imune 3460, com menor intensidade. A marcação para 7G1-1 na região do plexo coroide também aumentou, mostrando-se positiva para o soro imune 3460. O córtex piriforme manteve-se fortemente positivo para 7G1-1 e, em mais baixa intensidade, para o soro imune 3460 (Fig. 15).

Figura 14: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 15: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460 (3460 IM), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

As seções obtidas com coordenadas estereotáticas entre -3,0 e -5,04 revelaram imunomarcações positivas para 7G1-1 e o soro imune 3460, nas partes dorsolaterais do córtex cerebral, inicialmente somente no hemisfério direito e, posteriormente, em ambos os hemisférios, correspondentes às áreas auditivas. Em geral, a intensidade obtida nas seções com o soro imune 3460 foi mais baixa do que com 7G1-1 (Fig. 16).

Figura 16: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460 (3460 IM), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotática em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 17: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460 (3460 IM), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotática em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral e hipocampo, com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Algumas regiões relacionadas ao hipocampo apresentaram-se marcadas para 7G1-1, como a fímbria, o córtex parahipocampal, o giro denteado e parte

de CA3. O soro imune 3460 identificou o giro denteado e CA3 mais fortemente do que 7G1-1. A fímbria e o córtex parahipocampal mostraram-se negativos para esse soro (Fig. 17).

Na região do córtex occipital (Bregma -7,08), observamos sinal para o anticorpo 7G1-1, de forma reproduzida pelo soro imune 3460 (Fig. 19).

Figura 18: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460 (3460 IM), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral, com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

No cerebelo (Bregma -9,0), observamos sinal fortemente positivo para 7G1-1 e soro imune 3460 nas células de Purkinje, bem como na camada granular subjacente. O soro pré-imune 3460 corou células de Purkinje de forma mais fraca que o soro imune 3460 (Fig. 18). Enquanto a imunocoloração com 7G1-1 mostrou intensidades de marcação semelhantes para as células de

Purkinje e da camada granular, o soro imune 3460 apresentou células de Purkinje mais bem marcadas do que as demais do cerebello (Fig. 19).

Figura 19: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460 (3460 IM), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotática em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do cerebello com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

A Tabela 3 resume os dados observados e indica as regiões em que as FMRP₊₁₂ISO são expressas.

Tabela 3: Resumo regiões em que foram observadas marcações específicas tanto com anticorpos 7G1-1 como com soro imune 3460, indicando as áreas de expressão das FMRP₊₁₂ISO no encéfalo de rato em P12. Nestas regiões não foi observado sinal significativo com o soro pré-imune 3460.

Coordenada estereotáxica	7G1-1/Soro imune 3460	Relação funcional
Bregma 2.16	Córtex cerebral (dorsolateral)	Área motora primária (neocórtex)
	Córtex cerebral (ventrolateral e lateral)	Área somatossensorial (neocórtex)
	Córtex cerebral (medial)	Área associativa (Cingulado, neocórtex)
Bregma 1.28	Córtex cerebral (dorsolateral)	Área motora primária (neocórtex)
	Córtex cerebral (ventrolateral e lateral)	Área somatossensorial (neocórtex)
	Córtex cerebral (medial)	Área associativa (Cingulado, neocórtex)
	Córtex cerebral (ventral - piriforme)	Área olfatória (paleocórtex)
	Zona periventricular	Área periventricular de ventrículos laterais
Bregma 0.0	Zona periventricular	Área periventricular de ventrículos laterais
	Córtex cerebral (ventrolateral e lateral)	Área somatossensorial (neocórtex)
	Córtex cerebral (ventral - piriforme)	Área olfatória (paleocórtex)
	Córtex cerebral (medial)	Área associativa (Cingulado, neocórtex)
Bregma -1.08	Córtex cerebral (ventral - piriforme)	Área olfatória (paleocórtex)
	Núcleo endopiriforme (ventral – piriforme)	Área olfatória (paleocórtex)
	Córtex cerebral (ventrolateral e lateral)	Área somatossensorial (neocórtex)
Bregma -2.04	Córtex cerebral (ventral - piriforme)	Área olfatória (paleocórtex)
	Córtex cerebral (lateral)	Área somatossensorial (neocórtex)
	Ventrículos	Plexo coróide
Bregma -3.0	Córtex cerebral (dorsolateral)	Área auditiva (neocórtex)

Bregma -4.08	Córtex cerebral (dorsolateral)	Área auditiva (neocórtex)
Bregma -5.04	Córtex cerebral (dorsolateral)	Área auditiva (neocórtex)
	Giro denteado e CA3	Hipocampo
Bregma -6.0	Córtex cerebral (occipital)	Área visual (neocórtex)
Bregma -7.08	Córtex cerebral (occipital)	Área visual (neocórtex)
Bregma -9.0	Células de Purkinje e camada granular	Cerebelo/Controle motor

Uma vez concluído este panorama, uma nova série de cortes transversais, obtidos a partir dos mesmos encéfalos de animais em P12, foi utilizada em experimentos de imunoistoquímica com os mesmos anticorpos previamente empregados, mas seguidos de coloração histológica com corante de Giemsa. A coloração de Giemsa permite delimitar com maior precisão as estruturas e camada de neurônios dentro de uma estrutura encefálica. Foram escolhidas três coordenadas em que se observaram anteriormente sinais positivos para 7G1-1 e soro imune 3460, em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo.

A observação dos cortes transversais do córtex cerebral (coordenadas de Bregma -4,08), permitiu identificar marcação positiva para o anticorpo 7G1-1 e soro imune 3460 nas camadas granulares externa (II) e piramidal externa (III), por vezes chegando à região superficial da camada granular interna (IV). Em nenhuma região do córtex cerebral foi observada marcação que atingisse a substância branca (Fig. 20).

Na região do hipocampo (Bregma -4,8), o anticorpo 7G1-1 marcou o giro denteado e, com um sinal menos intenso, a região CA3. O soro imune 3460 mostrou um padrão semelhante de marcação, com sinais mais pronunciados no giro denteado (Fig. 21).

Figura 20: Imagens de imunoistoquímica com coloração de fundo com Giemsa, realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do córtex cerebral. Barra de escala: 100µm.

Figura 21: Imagens de imunoistoquímica com coloração de fundo com Giemsa, realizadas em cortes de 14µm de encéfalos na região do hipocampo, de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotóxica em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do hipocampo. Barra de escala: 100µm.

No cerebelo (Bregma -9.0), as marcações com o anticorpo 7G1-1 e soro imune 3460 foram bastante intensas na camada que contém as células de Purkinje e camada de células granulares (Fig. 22).

As análises por imunofluorescência indireta com o soro imune 3460 e o anticorpo 7G1-1 revelaram co-expressão em neurônios do córtex cerebral frontal de rato (Fig. 23).

Figura 22: Imagens de imunoistoquímica com coloração de fundo com Giemsa, realizadas em cortes de 14 μ m de cerebelo de ratos em P12, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. O desenho no canto superior esquerdo representa a coordenada estereotática em que foi realizada a seção coronal em relação ao bregma. Estão apresentadas seções do cerebelo. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 23: Imunofluorescência indireta de cortes coronais de 12 μ m de encéfalo de rato em P12 em região do córtex cerebral, com anticorpo 7G1-1 e soro imune 3460, como indicado. O terceiro quadro mostra a sobreposição do sinal dos dois anticorpos com setas indicando neurônios onde o sinal em amarelo sugere a presença das isoformas FMRP₊₁₂ISO. Sabe-se que o anticorpo 3460 gera reação cruzada com p28k, o que deve explicar a coloração verde que não se sobrepõe ao vermelho além das imunoglobulinas presentes no soro pré-imune. Barras de escala: 50 μ m

Em resumo, os dados de imunistoquímica de encéfalo de ratos em P12 indicam que (i) as camadas granular externa e a camada piramidal externa do córtex cerebral e as células de Purkinje no cerebelo são mais ricas em FMRP₊₁₂ISO; (ii) o giro denteado e CA3 são fontes de FMRP₊₁₂ISO no hipocampo, porém em mais baixa intensidade; e (iii) o conjunto das isoformas da FMRP, incluindo as FMRP₊₁₂ISO, são expressas em região periventricular dos ventrículos laterais em período pós-natal, sugestivo de células-tronco neurais do adulto. No córtex cerebral, as FMRP₊₁₂ISO são expressas em áreas motora (lobo frontal), sensorial (lobo temporal), auditiva (lobo temporal), olfatória (córtex piriforme) e visual (lobo occipital), além da área do cíngulo (medial). Os dados também confirmam que em P12, as FMRP₊₁₂ISO têm expressão mais pronunciada no córtex cerebral e cerebelo do que no hipocampo.

Para verificar a distribuição das isoformas FMRP₊₁₂ISO a complexos macromoleculares que possam incluir os polirribossomos, realizamos cromatografia de exclusão molecular de lisados de encéfalo de rato em P12, em condições favoráveis a preservação destes complexos (Fig. 24). O perfil cromatográfico do lisado apresentou um enriquecimento em complexos com massa em cerca de 1000 kDa, condizente com os complexos de polirribossomos e outros picos menores entre 40 kDa e 150 kDa, onde devem se encontrar proteínas livres e complexos RNP pequenos (Fig. 24 A). Todas as frações da filtração foram coletadas, e aquelas correspondentes ao intervalo que compreende todos os picos observados à espectrometria foram usadas para detectar a presença do *pool* de isoformas da FMRP e das isoformas FMRP₊₁₂ISO. O anticorpo 1C3 detectou o *pool* de isoformas da FMRP, tanto

nas frações que continham grandes agregados de massa molecular correspondentes aos complexos polirribossomais, quanto nas frações onde a FMRP estaria livre (Fig. 28 B). O soro imune 3460 detectou padrão similar, mostrando a presença das isoformas FMRP₊₁₂ISO nas frações correspondentes aos polirribossomos e nas frações correspondentes a FMRP livre, não interagindo com RNPs. Nas frações polirribossomais, o soro imune 3460 detectou bandas de massas moleculares variando entre 40 kDa e 70 kDa, correspondente as isoformas FMRP₊₁₂ISO. O peptídeo de 28 kDa não foi identificado nestas frações, demonstrando que o mesmo não se distribui aos complexos macromoleculares.

(A) Perfil cromatográfico

(B) 1C3 (FMRP)

(C) Soro imune 3460 (FMRP₊₁₂ISO)

Figura 24: Análise de cromatografia de exclusão molecular (HPLC) de lisado obtido de córtex cerebral frontal de ratos em P12. O lisado foi obtido de forma a manter as interações com complexos macromoleculares da proteína FMRP. **(A)** Perfil cromatográfico das frações obtidas. Em verde, observa-se o padrão de massa molecular *Gel Filtration Standard* (Biorad) e em azul está representado o lisado de córtex cerebral frontal de rato em P12. Dois picos distintos podem ser observados no perfil do lisado de rato em regiões que correspondem a aproximadamente 800kDa e 200kDa. A amplitude de tempo da análise foi de 2 horas. **(B)** Análise de *Western Blotting* das diferentes frações geradas à cromatografia do lisado cerebral de ratos em P12, com o anticorpo monoclonal 1C3, que reconhece o conjunto total de isoformas da proteína FMRP. **(C)** Análise de *Western Blotting* das diferentes frações geradas na filtração em gel do lisado cerebral de ratos em P12, com o soro imune 3460, que reconhece o segmento codificado pelo éxon 12 do gene *Fmr1*.

4.2 Expressão do éxon 12 do *Fmr1* na vesícula telencefálica de rato em E14

Além de seu papel na eliminação e maturação de espinhas dendríticas (PAN et al., 2010), a FMRP foi implicada como reguladora da neurogênese no animal adulto (LAZAROV et al., 2011), em regiões como o bulbo olfatório e o giro denteado ventral, e durante a neurogênese cortical no desenvolvimento embrionário do camundongo (SAFFARY; XIE, 2011; TERVONEN et al., 2009). Na seção anterior, observamos imunomarcação por 7G1-1 e pelo soro imune 3460, na região periventricular ventro-rostral dos ventrículos laterais de ambos os hemisférios cerebrais. Nesta parte do trabalho, analisamos os níveis de inclusão do éxon 12 em transcritos do *Fmr1* e das FMRP₊₁₂ISO na vesícula telencefálica, no décimo quarto dia embrionário (E14), estrutura que inclui franca neurogênese nesse período. As FMRP₊₁₂ISO tiveram também sua distribuição avaliada *in vivo* no encéfalo do embrião de rato e *in vitro* em neuroesferas obtidas pela dissociação das vesículas telencefálicas em E14.

Para examinar os níveis de expressão relativos destes transcritos, utilizamos amostras recém-coletadas de RNA total de embriões machos, como

definido por sexagem por PCR de DNA genômico com amplicom para o gene *Sry*, do cromossomo Y do rato (dados não mostrados). Após transcrição reversa das amostras de RNA de indivíduos machos, realizamos RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) em equipamento automatizado, detectando, de forma independente, o sinal de fluorescência de dois produtos de amplificação (amplicons). Estes amplicons foram definidos por dois pares de iniciadores. O primeiro par é específico para um segmento constante do RNAm do *Fmr1* (éxons 10 e 11), representando a expressão combinada de todos os transcritos maduros do *Fmr1*. O segundo amplicom é definido por iniciadores que hibridam nos éxons 12 e 13, reconhecendo especificamente apenas os transcritos que darão origem às FMRP₊₁₂ISO (Fig. 29 A). A avaliação dos valores de expressão de cada um destes amplicons permite-nos verificar independentemente a expressão global do gene *Fmr1* ou somente os níveis dos transcritos que incluem o éxon 12. Para todos os animais, foram também obtidos valores de expressão do gene constitutivo da Ciclofilina (*Ppia*, *Entrez gene* 25518), os quais foram utilizados para normalizar a expressão dos demais amplicons. A normalização da expressão para cada animal consistiu em dividir seus valores obtidos para a amplificação de cada amplicon do *Fmr1* pelo valor de expressão de *Ppia*. Os valores normalizados para cada animal foram usados para constituir a média aritmética apresentada como valor relativo de expressão do amplicom. Valores de expressão do mesmo amplicom em grupos experimentais diferentes foram submetidos à análise estatística pelo teste *t* de Student. Este teste paramétrico compara dois grupos de valores que constituem médias.

Amostras de vesícula telencefálica, segmento precursor do neocórtex, de ratos em E14 e de córtex cerebral de animais em E19 foram analisadas. Havíamos demonstrado anteriormente baixos níveis de expressão do éxon 12 do *Fmr1* em córtex cerebral em E19 (Fig. 1 do Anexo 1). Assim, este grupo em E19 constituiu, no presente estudo, um controle para comparação com as amostras de vesícula telencefálica em E14.

Detectamos níveis consideráveis do conjunto que representa todos os transcritos do *Fmr1* e baixos níveis de expressão daqueles transcritos que incluem a sequência do éxon 12 (Fig. 25 B). Os níveis de expressão do amplicon *Fmr1* apresentaram-se semelhantes, quando comparadas as médias dos valores absolutos entre as duas idades, não havendo significância estatística (N=9; 56 vs. 52,2, teste *t* de Student; $p=0,571$). Os valores de expressão para os transcritos que incluem a sequência do éxon 12 aumentaram em cerca de 60% entre E14 e E19 (N=9; 4,7 vs. 7,5, teste *t* de Student; $p=0,046$).

O aumento significativo dos níveis de expressão do éxon 12 em E19 em relação a E14 reflete os níveis desse éxon em um conjunto limitado de transcritos do *Fmr1*. A regulação de sua inclusão durante o *splicing* do pré-RNA é realizada em passo independente do controle dos níveis gerais do conjunto de transcritos maduros do *Fmr1*, o qual se deve principalmente aos controles transcricional e de degradação de RNA. Desta forma, a taxa de inclusão do éxon 12 no RNA do *Fmr1* não pode ser inferida simplesmente a partir dos níveis totais do éxon 12 em transcritos. Essa taxa depende também dos níveis gerais do *Fmr1*. Uma situação possível, por exemplo, é a variação global dos níveis do total de transcritos do *Fmr1* poder reduzir ou aumentar o

número de mensagens de RNA que contenham o éxon 12, apesar dos níveis obtidos independentemente para este éxon manterem-se constantes.

Figura 25: **(A)** Diagrama representando os éxons do gene *Fmr1* de rato em caixas numeradas de acordo com a identificação de cada um. Os éxons de interesse para a análise por qRT-PCR estão em cores fortes, enquanto os demais estão em cinza. Os éxons representados em azul (10, 11 e 13) são constitutivos e o éxon 12, representado em vermelho, é variável. As setas representam a localização e orientação dos iniciadores delimitando os amplicons formados. **(B)** Gráfico obtido a partir dos dados dos níveis relativos de expressão de transcritos do *Fmr1* em vesícula telencefálica de ratos em E14 ou em córtex cerebral de ratos em E19. As colunas em azul ou vermelho representam, respectivamente, níveis de expressão normalizados para os amplicons do conjunto de transcritos do gene *Fmr1* (éxons 10 e 11) ou o subgrupo que inclui a sequência do éxon 12 do *Fmr1* (éxons 12 e 13). O asterisco (*) representa o resultado do teste t de *student* ($p=0,046$; 4,7 vs 7,5; $N=9$). **(C)** Inclusão (%) correspondente à razão entre a média dos valores absolutos de amplificação do éxon 12 e do total de transcritos do *Fmr1*, representado como dispersão de pontos para em que cada ponto representa um indivíduo. Os valores foram normalizados pela expressão do gene constitutivo para a Ciclofilina (*Ppia*). Barras correspondem ao erro padrão a partir dos resultados de nove indivíduos em cada grupo.

Assim, buscando-se estimar os valores de inclusão do éxon 12 no RNAm do *Fmr1* para cada indivíduo, obtivemos a razão entre níveis de expressão do éxon 12 e aqueles do conjunto de todos os transcritos maduros para esse gene, na vesícula telencefálica em E14 ou córtex cerebral em E19. A taxa de inclusão do éxon 12 no RNAm do *Fmr1* foi expressa em porcentagem. As taxas de inclusão foram estimadas em aproximadamente 9% para a vesícula telencefálica em E14 e 14% para o córtex cerebral em E19.

Para análise das FMRP₊₁₂ISO no mesmo período do desenvolvimento embrionário em que foi estudado pela qRT-PCR, realizamos *Western blotting* de vesícula telencefálica em E14 ou E16 e córtex cerebral em E18, E19 e E20, utilizando-se p3460, o soro pré-imune 3460 e o anticorpo 1C3. Os resultados apresentados para as três incubações são de amostras submetidas a SDS-PAGE no mesmo gel. Assim, o alinhamento dos três *blots* permitiu comparar bandas com a mesma mobilidade eletroforética. Um segundo gel foi utilizado para eletroforese das mesmas amostras, nas mesmas quantidades e, após

transferência a membrana de nitrocelulose, esta foi incubada com anticorpo anti- γ -tubulina para normalização.

Em geral, observa-se que a expressão da FMRP é baixa nas fases mais precoces do período embrionário, tornando-se mais expressiva ao final deste período. As isoformas FMRP₊₁₂ISO são observadas de forma mais expressiva a partir de E18 e sua expressão se mantém até o final da maturação embrionária (Fig. 26). Como observado, as bandas correspondentes às isoformas FMRP₊₁₂ISO, bem como a banda de 28kDa, não são detectadas pelo o soro pré-imune 3460.

Figura 26: Análise de *Western blotting* de vesícula telencefálica em E14 ou E16 e córtex cerebral em E18, E19 e E20, utilizando-se o anticorpo 1C3, p3460 e o soro pré-imune. Para a normalização das amostras utilizou-se o anticorpo γ -tubulina. As pontas de seta indicam as bandas correspondentes as FMRP₊₁₂ISO, reconhecidas tanto pelo anticorpo 1C3, quanto pelo p3460. Os asteriscos indicam as bandas inespecíficas, detectadas pelos dois anticorpos. A proteína de 28kDa, reconhecida apenas pelo

anticorpo p3460 está indicada. Observa-se uma maior expressão das isoformas FMRP₊₁₂ISO no final do período embrionário.

4.3 Expressão das FMRP₊₁₂ISO no desenvolvimento telencefálico embrionário

Para examinar a distribuição das isoformas FMRP₊₁₂ISO em encéfalos de ratos, em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (E12, E14, E16, E18, E20), realizamos imunistoquímica com os soros 3460 pré-imune, imune e imune pré-adsorvido, com o anticorpo 7G1-1 ou com omissão do anticorpo primário. Seguimos as mesmas condições experimentais padronizadas para as amostras de ratos em P12, nosso controle positivo (Seção anterior). São apresentados os resultados obtidos com o soro imune e pré-imune 3460 e o anticorpo 7G1-1.

Como apresentado na Figura 27, de modo geral, não observamos à imunistoquímica expressão do *Fmr1* em E12 ou E14, nas vesículas telencefálicas, estruturas preponderantes nesse período. Da mesma forma, não se observou expressão do *Fmr1* no neuroepitélio das duas vesículas olfatórias, em E14 (Fig. 27).

Figura 27: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14μm de encéfalos de ratos em E12 e E14, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. As micrografias de referência apresentam indicações de estruturas presentes nesta idade. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50μm.

Em E16, cortes coronais, rostrais revelaram aumento da marcação com o soro imune 3460 nas paredes lateral e medial das vesículas telencefálicas e na parede ventral da vesícula olfatória (Fig. 28). Não obtivemos dados para 7G1-1 nessas condições. Não se observou imunocoloração em segmentos mais caudais para 7G1-1 ou o soro imune 3460.

Em E18, não houve sinal detectável para 7G1-1 ou o soro imune 3460, nas paredes das duas vesículas telencefálicas para os segmentos mais rostrais. Em seções mais caudais, foi possível observar marcação positiva para 7G1-1 em células com morfologia neuronal, distribuídas em níveis diferentes ao longo do neuroepitélio, nos segmentos ventro-medial e ventro-lateral de ambas as vesículas telencefálicas (Fig. 29). Observaram-se no epitélio transicional células isoladas, positivas para 7G1-1 e o soro imune 3460, com corpo triangular, sugestivas de neurônios. A placa cortical, nesse dia embrionário, ainda se apresenta delgada em relação ao epitélio transicional. No segmento mais externo da placa cortical, observou-se coloração homogênea para 7G1-1, de baixa a média intensidade, concentrada no segmento dorsal dos hemisférios cerebrais. O soro imune 3460 não corou células na placa cortical, em E18 (Fig. 30).

Figura 28: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em E16, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. A micrografia de referência apresentam indicações de estruturas presentes nesta idade. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 29: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em E18, incubados com anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460 (3460 IM), como indicado. A micrografia de referência apresentam indicações de estruturas presentes nesta idade. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 30: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em E18, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. A micrografia de referência apresentam indicações de estruturas presentes nesta idade. Estão apresentadas seções do cérebro com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Entre E19 e E21, há um aumento considerável de espessura da placa cortical, tornando o córtex cerebral facilmente identificável (BAYER; ALTMAN, 1991). Em E20, poucos neurônios positivos para 7G1-1 foram observados no córtex cerebral. Entre estes, houve dois grupos, um dorsal no hemisfério direito e outro ventro-lateral, no hemisfério esquerdo, que apresentaram alguma reação com 7G1-1 e o soro imune 3460. Embora houvesse fraca coloração para o soro pré-imune 3460, as imagens indicam algumas células verdadeiramente positivas (Fig. 31). Entretanto, essa marcação foi de baixa intensidade. A superfície dorso-rostral apresentou-se marcada por 7G1-1 e o soro imune 3460, embora não analisada pelo soro pré-imune 3460 (Fig. 31). O hipocampo foi negativo para 7G1-1 e não pôde ser observado com o soro imune 3460. Uma estrutura justaposta, de modo dorsal, ao terceiro ventrículo e medial ao hipocampo foi marcada por 7G1-1 e o soro imune 3460. Como se observa, na mesma figura, o plexo coroide foi positivo para ambos, anticorpo e soro (Fig. 35). O cerebelo não foi examinado em E20. A região periventricular foi negativa para 7G1-1 e o soro imune 3460 (dados não mostrados).

Figura 31: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de encéfalos de ratos em E20, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. A micrografia de referência apresentam indicações de estruturas presentes nesta idade. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50µm.

Figura 32: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14 μ m de encéfalos de ratos em E20, incubados com anticorpo 7G1-1, soro imune 3460 (3460 IM) ou soro pré-imune 3460 (3460 PI), como indicado. A micrografia de referência apresentam indicações de estruturas presentes nesta idade. Estão apresentadas seções do córtex cerebral com cada região indicada à esquerda de cada grupo de imagens. Barra de escala: 50 μ m.

De modo geral, observamos poucas células sugestivas de progenitoras, na base do neuroepitélio, marcadas para 7G1-1 e o soro imune 3460. Poucas células com aspecto migratório ao longo do epitélio transicional foram observadas por 7G1-1 ou o soro imune 3460. Quando presentes, elas estavam agrupadas na mesma área. O córtex cerebral em E20 foi raramente positivo para cada anticorpo. Por outro lado, a camada mais superficial da placa cortical, indicativa de ser a camada I, mostrou-se levemente positiva para 7G1-1 (E18 e E20) e soro imune 3460 (E20), de forma contínua em vários segmentos corticais (Fig. 32).

4.4 Expressão *in vitro* das FMRP₊₁₂ISO em precursores de neurônios e após diferenciação neuronal

Nossos dados sobre a expressão *in vivo* do éxon 12 do *Fmr1* no encéfalo de rato revelaram uma expressão relativamente baixa desse éxon em E14, ao nível do RNAm. As FMRP₊₁₂ISO apresentaram uma expressão gradualmente crescente entre E12 e E20. Com o objetivo de verificar a relação entre a expressão da FMRP e do subgrupo das FMRP₊₁₂ISO e a manutenção do estado de pluripotência, o ciclo celular e o início da diferenciação neuronal, cultivamos neuroesferas a partir da dissociação da vesícula telencefálica do rato em E14.

Neuroesferas formaram-se pelo cultivo *in vitro*, como esperado, como colônias celulares, flutuantes de células progenitoras neuro-gliais, previamente caracterizadas no laboratório por (MARÍN, 2012). Em neuroesferas em suspensão, a expressão do conjunto das isoformas da FMRP, como observado pelo anticorpo 7G1-1, foi relativamente homogênea, com distribuição citoplasmática (Fig.s 33, 34 e 35), ao passo que a marcação com o soro imune 3460 foi baixa, sem atingir níveis de co-localização com imagens obtidas pelo anticorpo 7G1-1 (Fig. 33 A). É possível que pelo menos parte da fraca marcação observada para o soro 3460 imune, sem colocalização com 7G1-1, seja devida a reação inespecífica do anticorpo policlonal, por exemplo, com proteínas como a p28k, observada em *Western blotting* pelo mesmo soro (Seção Anterior e Anexo 1). Isso pode implicar em níveis ainda mais baixos do que os observados aqui para as FMRP₊₁₂ISO em neuroesferas obtidas da vesícula telencefálica em E14 (Fig. 34), de forma semelhante a que observamos *in vivo* para esta estrutura e período por qRT-PCR, *Western*

blotting e imunistoquímica. De qualquer forma, podemos afirmar que em relação à expressão do total das isoformas da FMRP, a expressão das FMRP₊₁₂ISO é em geral baixa em células de neuroesferas do sétimo dia de cultivo *in vitro* (DIV) em suspensão a partir da dissociação da vesícula telencefálica de rato em E14.

Figura 33: Imunofluorescência indireta de seções de 20 µm de neuroesferas em suspensão, cultivadas a partir da dissociação de vesículas telencefálicas de rato em E14, tratadas com anticorpo anti-p27^{kip1} (A) ou com anticorpo 7G1-1 e soro imune 3460, identificando o total das isoformas da FMRP (FMRP) ou as FMRP₊₁₂ISO, como indicado (B). As fases do ciclo celular (G1, S ou S/G2/M) estão indicadas de acordo com o tratamento recebido *in vitro* e com a distribuição subcelular de p27^{kip1} observado em (A). Barra de escala: 25 µm.

O inibidor de cinase dependente de ciclina (CDK^{INH}) 1B (*Entrez gene CDKN1B*), mais conhecido como p27 ou p27^{kip1} (do inglês, *kinase inhibitor*

protein 1 p27), é uma proteína que se liga a e previne a ativação de complexos CDK2-ciclina E ou CDK4-ciclina D, controlando a progressão do ciclo celular em G1. Um anticorpo dirigido à proteína p27^{kip1} foi utilizado como controle das fases do ciclo celular, uma vez que células carenciadas (transição G1/S) ou sincronizadas em S por hidroxiureia apresentam este CDK^{INH} no núcleo celular (POLYAK et al., 1994). Para haver a transição da célula de um estado quiescente à proliferação, há degradação de p27^{kip1} induzida por fosforilação dependente de CDK e ubiquitinação subsequente por complexo de ligase de ubiquitina. Espera-se que quando as células saem da fase S e entram na fase G2, p27^{kip1} seja degradado e, por isso, a marcação das células com seu anticorpo será consideravelmente reduzida até nova transição G1/S. Esses dados foram previamente padronizados, em nosso laboratório, por Saona (2012) e confirmados quando comparados ao conteúdo de DNA observado por citometria de fluxo com iodeto de propídeo (Saona, 2012). Nos painéis da esquerda da Figura 33, é possível observar que p27^{kip1} localizou-se no núcleo celular de forma exuberante em células carenciadas por sete DIV (transição G1/S) ou células sincronizadas por hidroxiureia (fase S, Figura 33 A).

Nocodazol é um agente anti-mitótico que se liga à tubulina β , interferindo na dinâmica de microtúbulos e função do fuso mitótico, parando o ciclo celular na transição G2/M (JORDAN; THROWER; WILSON, 1992). Sob as condições em que foi realizado o ensaio, nas culturas tratadas por nocodazol, um número considerável de células de neuroesferas mantiveram p27^{kip1} no núcleo celular, sugerindo que um tratamento mais longo devesse ter sido realizado para permitir que o ciclo celular avançasse mais. Por isso, consideramos que, com o tratamento com nocodazol, as células distribuíram-se em transição entre as

fase S ($p27^{kip1}$ no núcleo celular), G2 e M ($p27^{kip1}$ degradado, célula sem marcação).

À sincronização das células de neuroesferas nas fases G1 ou S do ciclo celular ou em S/G2/M, houve diminuição da marcação pelo soro imune 3460, nas fases G1 e S, enquanto a marcação para o total da proteína FMRP variou pouco (Fig. 33). Como apresentado, não podemos afirmar que essa diminuição de marcação pelo soro imune 3460 deveu-se à redução das $FMRP_{+12}ISO$. Dada a falta de colocalização entre os sinais obtidos pelo soro imune 3460 e o anticorpo 7G1-1, a marcação pelo soro imune sugere ser inespecífica.

Figura 34: Imunofluorescência indireta de neuroesferas aderidas a lamínulas, cultivadas sob condições de diferenciação neuronal *in vitro* por 24 horas, tratadas com anticorpo 7G1-1 e soro imune 3460, identificando o total das isoformas da FMRP (FMRP) ou as $FMRP_{+12}ISO$, respectivamente como indicado (A-C). (B) Do total de 27 seções obtidas ao microscópio confocal LSM410 (Zeiss, Alemanha), são mostradas as seções de número 2 (mais próxima à lamínula, onde neuroesferas foram aderidas), 8, 14, 20 e 25. Em (C), são mostradas seções consecutivas de número 6 a 11 com imunocoloração com anticorpo 7G1-1 (total de FMRP, FMRP) ou soro imune 3460 ($FMRP_{+12}ISO$). A composição das seis seções está mostrada nos três painéis verticais

à direita em (C). As setas indicam a mesma seção z obtida ao microscópio confocal, corada por 7G1-1 ou soro imune 3460, mostrando menor intensidade de coloração pelo soro imune 3460, em células do interior da esfera. Barra de escala: 50 μ m.

Os dados sobre a expressão das FMRP₊₁₂ISO *in vitro* relacionam-se aos obtidos *in vivo* em E14, mostrando baixa expressão dessas isoformas da FMRP. Neuroesferas de 7 DIV foram plaqueadas em condições de aderência à placa e cultivadas no meio de cultura próprio para diferenciação neuronal *in vitro*. No início do processo de diferenciação neuronal, 24 horas após a semeadura, as células foram submetidas a imunofluorescência indireta para marcação dupla com o soro imune 3460 e o anticorpo 7G1-1. Observou-se sinal difusamente citoplasmático para o conjunto das isoformas da FMRP, na grande maioria das células da esfera (Fig. 34 A). Para o soro imune 3460, a marcação foi também difusa no citoplasma, embora mais concentrada nas células da periferia da esfera. Buscando avaliar melhor essa distribuição, cinco das 26 seções z obtidas ao microscópio confocal (seções 2, 8, 14, 20 e 26) foram analisadas separadamente, suportando a observação de que as células no interior da esfera apresentam menor intensidade de sinal à marcação pelo soro imune 3460 do que pelo anticorpo 7G1-1, o qual pareceu ter identificado maior número de células da esfera (Fig. 34 B). A mesma observação foi obtida quando se analisou uma imagem obtida de somente as seções z de número 6 a 11 (Fig. 34 C). Esses dados indicam que a expressão das FMRP₊₁₂ISO aumenta no início da diferenciação neuronal *in vitro* e que se relaciona à esse processo celular, uma vez que as células periféricas são as primeiras a se diferenciar, enquanto as mais internas mantêm-se mais indiferenciadas (STRUCKHOFF; DEL VALLE, 2013).

Doze dias após a aderência à placa, as células foram novamente avaliadas sobre a expressão da FMRP e FMRP₊₁₂ISO. As células marcadas pelo soro imune 3460 e anticorpo 7G1-1 já apresentavam morfologia neuronal, com longos e finos processos emergindo de um corpo mais triangular. Houve ampla colocalização entre as duas marcações (Fig. 35), sugerindo que a expressão das FMRP₊₁₂ISO é predominante em células diferenciadas. Embora o soro pré-imune 3460 apresente também marcação mais forte nas células diferenciadas do que indiferenciadas deste ensaio, essa não se compara àquela observada com o soro imune 3460.

Figura 35: (A-D) Imunofluorescência indireta de seções de 20 µm de neuroesferas em suspensão, cultivadas a partir da dissociação de vesículas telencefálicas de rato em E14, tratadas com soro pré-imune 3460 (A), soro imune 3460 (B) ou anticorpo 7G1-1 (C), identificando o total das isoformas da FMRP (FMRP, C) ou as FMRP₊₁₂ISO (B), como indicado. (E-K) Imunofluorescência indireta de neuroesferas aderidas a

lamínulas, cultivadas sob condições de diferenciação neuronal *in vitro* por 1 ou 12 DIV, como indicado, tratadas com soro imune 3460 (**E, I**) ou anticorpo 7G1-1 (**F, J**) ou soro pré-imune (**H**). As imagens **D, G e K** são sobreposições respectivamente das imagens B e C, E e F e I e J. Barra de escala: suspensão: 20 µm; demais barras de escala: 50 µm.

4.5 O éxon 12 do *FMR1* no córtex cerebral frontal humano em envelhecimento

A organização genômica do gene *FMR1* é muito conservada em mamíferos (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>). O córtex cerebral em envelhecimento revelou-se um tecido importante para o estudo do *FMR1*, uma vez que está afetado em homens portadores de pré-mutações do *FMR1* que desenvolveram FXTAS (BERRY-KRAVIS et al., 2007; JACQUEMONT; FARZIN; HALL, 2004). Desta forma, investigamos a expressão do éxon 12 do *FMR1* humano, sem fins comparativos, em sete amostras de córtex cerebral, frontal, humano, em envelhecimento de indivíduos do sexo masculino, obtidas do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEH-GEEC) da Faculdade de medicina da USP (FMUSP).

As amostras de cDNA obtidas foram analisadas por qRT-PCR, buscando-se verificar a contribuição do éxon 12 do *FMR1* entre esses transcritos. A idade dos indivíduos variou de 65 a 80 anos. Todos situaram-se no nível zero da escala de avaliação de demência clínica (do inglês, *Clinical Dementia Rating Scale*), significando um estado saudável, sem perda de memória e boa orientação espacial e temporal. Os tecidos classificaram-se na escala Braak com pontuação menor que 3, isto é, sem acometimento cortical, estágio pré-clínico (Braak e Braak, 1991).

Quatro genes humanos com expressão reconhecidamente alta no tecido e faixa etária foram selecionados para serem testados como normalizadores por qRT-PCR: O gene da *Ciclofilina A* (*PPIA*; *Entrez Gene*: 5478) foi selecionado nesta etapa por seu ortólogo de rato ter sido utilizado previamente como normalizador para a qRT-PCR no estudo anterior. O gene da *Hipoxantina Fosforribosiltransferase 1* (*HPRT1*; *Entrez Gene*: 3251), *Actina Beta* (*ACTB*; *Entrez Gene*: 60) e *Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase* (*GAPDH*; *Entrez Gene*: 2597) foram também testados como normalizadores.

Todos os genes foram amplificados por dois pares independentes de iniciadores a fim de selecionar aqueles com a melhor eficiência de amplificação. Curvas de padronização, nas quais são amplificadas diluições conhecidas de cDNA, foram realizadas para todos os pares de iniciadores. Após as padronizações, o gene *PPIA* foi selecionado como normalizador para todas as reações de qRT-PCR, uma vez que este apresentou as menores variações de expressão (sem significância estatística) entre as amostras de córtex cerebral humano, em envelhecimento (dados não mostrados).

Como realizado para qRT-PCR em ratos, utilizamos iniciadores que hibridam nos éxons 10 e 11 do transcrito do *FMR1* humano, gerando um amplicon que representa o conjunto de todos os transcritos deste gene. Outro par de iniciadores, que hibridam nos éxons 12 e 13 do *FMR1*, definiu amplicon que identifica a sequência do éxon 12.

Nas amostras analisadas, os níveis de expressão do *FMR1* (N = 7, média dos valores = 151) mostraram-se bastante elevados, em relação à expressão dos transcritos que incluem o éxon 12 (N = 7, média dos valores = 12) (Fig. 36 A). A razão entre estes valores foi calculada individualmente para

cada indivíduo, produzindo um valor que expressa em porcentagem a fração dos transcritos nos quais o éxon 12 está presente. Neste conjunto de amostras, a média destes valores de inclusão foi ligeiramente mais baixo em relação àqueles observados durante a maturação cérebro-cortical murina (7%, variando de 3 a 14%; Figura 29 B) (Fig. 36 B).

Figura 36: (A) Diagrama representando os éxons do gene *FMR1* humano em caixas numeradas de acordo com a identificação de cada um. Os éxons de interesse para a

análise por qRT-PCR estão em cores fortes, enquanto os demais estão em cinza. Os éxons representados em azul (10, 11 e 13) são constitutivos e o éxon 12, representado em vermelho, é variável. As setas representam a localização e orientação dos iniciadores delimitando os amplicons formados. **(B)** Gráfico obtido a partir dos dados dos níveis relativos de expressão de transcritos do *FMR1* em córtex cerebral frontal em envelhecimento de sete indivíduos do sexo masculino. As colunas em azul ou vermelho representam, respectivamente, níveis de expressão normalizados para os amplicons do conjunto de transcritos do gene *FMR1* (éxons 10 e 11) ou o subgrupo que inclui a sequência do éxon 12 do *FMR1* (éxons 12 e 13). **(C)** Inclusão (%) correspondente à razão entre a média dos valores absolutos de amplificação do éxon 12 e do total de transcritos do *FMR1*, representado como dispersão de pontos para em que cada ponto representa um indivíduo. Os valores foram normalizados pela expressão do gene constitutivo para a Ciclofilina (*PPIA*). Barras correspondem ao erro padrão a partir dos resultados de sete indivíduos em cada grupo.

Cortes histológicos de amostras de córtex cerebral frontal em parafina dos mesmos indivíduos foram recebidas no laboratório e submetidos a imunohistoquímica com os anticorpos 7G1-1 e 1C3 e os soros imune ou pré-imune 3460. O anticorpo 7G1-1 revelou-se positivo nos somas neuronais e neuropilo. O anticorpo 1C3 apresentou coloração de baixa intensidade no soma neuronal. O soro imune bem como o soro pré-imune 3460 apresentaram padrões de sinal difuso nos corpos neuronais e concentrado no núcleo celular (Fig. 37). Isto pode se dever a clones de anticorpos do coelho presentes no soro do animal antes da imunização com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ. Após purificação do soro imune 3460 por afinidade com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ, o anticorpo p3460, em diversas diluições, apresentou padrão de coloração igual ao das amostras em que se omitiu o anticorpo primário. Desta forma, duas conclusões são possíveis. A quantidade de anticorpo p3460 obtida não permitiu uma diluição para detecção satisfatória por imunohistoquímica das FMRP₊₁₂ISO no tecido. A segunda possibilidade, mais provável, é que há baixa expressão das FMRP₊₁₂ISO no córtex cerebral,

frontal, humano, em envelhecimento, não sendo identificável por imunoistoquímica. No entanto, não pudemos confirmar esta hipótese, por *Western blotting*, por exemplo, uma vez que as proteínas obtidas de lisado de tecido humano, *postmortem*, fixado em formol não fornecem qualidade apreciável para o ensaio.

Figura 37: Imagens de imunoistoquímica realizadas em cortes de 14µm de córtex cerebral frontal humano, incubados com tampão (A, G, H, omissão do anticorpo primário, indicado como anticorpo secundário - C, camundongo ou R, coelho - ou como 'somente anticorpo secundário'), anticorpo 1C3 (B), soro pré-imune 3460 (C, 3460 pré-imune), soro imune 3460 (D, 3460 imune), anticorpo 7G1-1 (E) ou soro imune 3460 purificado por afinidade (F, p3460), como indicado. São apresentados resultados de dois experimentos diferentes, um (A-D) em que se avaliaram os soros imune e pré-imune em relação a 1C3, e outro (E-H) em que se avaliou 7G1-1 e p3460. Barra de escala: 50µm.

4.6 Avaliação de retenção intrônica em transcritos do *FMR1*

A retenção dos íntrons 1, 7 ou 12 do *FMR1* em seus transcritos maduros foi descrita em culturas primárias de neurônios obtidas a partir da dissociação de córtex cerebral de camundongo (BUCKLEY et al., 2011). Não foi investigada em outros tecidos, não se conhecendo, por isso, se constitui um artefato do

cultivo celular ou se é um evento detectável *in vivo*. Analisamos os níveis de expressão desses íntrons por qRT-PCR em transcritos do *FMR1* humano, nas sete amostras de córtex cerebral humano já analisadas para o éxon 12 do *FMR1*.

Os cDNAs das amostras foram submetidos a reações de qRT-PCR com iniciadores antissenso específicos para os íntrons 1, 7 ou 12, e iniciadores senso nos éxons subsequentes. Um arranjo similar de iniciadores foi gerado para o íntron 15, cuja retenção não foi observada no trabalho citado anteriormente, a fim de servir como controle negativo. DNA genômico foi usado como controle positivo para todas as reações, apresentando sinal de fluorescência bastante alto, conforme esperado. O gene *PPIA* foi usado para normalizar as reações.

Observamos níveis elevados de expressão do *FMR1* (N = 7, média dos valores = 231) a partir da amplificação com os iniciadores para os éxons 10 e 11. Os níveis de amplificação para os íntrons 1, 7, 12 ou 15 foram muito baixos (N = 7, médias dos valores: 0,1; 0,35; 0,51; 0,29 , respectivamente para os íntrons 1, 7, 12 e 15). A razão entre os valores para cada íntron e para os éxons 10 e 11 do *FMR1*, calculada separadamente para cada indivíduo, produziu frações que, em percentuais, mantiveram-se abaixo de 0,1%, indicando que, nas sete amostras de córtex cerebral frontal de indivíduos do sexo masculino (CDR zero e Braak < 3), a retenção dos íntrons do *FMR1* estudados é desprezível.

5 Discussão

O segmento codificado pelos éxons 11 e 12 do *FMR1* está ausente nos genes parálogos *FXR1* e *FXR2*, implicando-o em um papel funcional em potencial, ainda desconhecido, para as isoformas da FMRP traduzidas a partir dos transcritos que o apresentam. O efeito da expressão de transcritos do *FMR1* sem o éxon 12 é a produção de isoformas da FMRP com a configuração curta da alça variável do domínio KH-2. Esta configuração constitui a mais longa alça variável conhecida entre domínios KH humanos, contendo 44 aminoácidos. Com a inclusão do éxon 12 em transcritos do *FMR1*, 21 resíduos são acrescentados em fase a essa alça, tornando-a com 65 aminoácidos e potencial para se situar na face externa da FMRP (VALVERDE et al., 2007).

Entre as proteínas com alça variável longa em domínios KH, além da FMRP, estão as proteínas Sam68, *splicing factor-1* e *quaking 1*, cujas alças variáveis possuem capacidade de ligação a RNA (CHEN et al., 1997; LIU et al., 2001). No KH-2 da FMRP, observou-se que o segmento da alça variável apresenta menor conservação interespecífica, entre mamíferos, em comparação ao arranjo $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ do mesmo domínio. Mesmo assim, o segmento codificado pela junção entre os éxons 11 e 12 apresenta 13 resíduos conservados em uma sequência de 15 aminoácidos. Além disso, sete dos dez últimos aminoácidos codificados pelo éxon 12 são totalmente conservados entre mamíferos (Anexo 1). Estes dados sugerem que a expressão do éxon 12 do *FMR1* possa ser funcionalmente relevante para a FMRP de mamíferos. Coerentemente com essas observações, Eichler e cols (1993) identificaram que os sítios doador e receptor de *splicing* do éxon 12 do *FMR1* são bem conservados em relação à sequência-consenso, bem como a extensão do

ínton 11 e a sequência de seu trato de poli-pirimidina, elementos essenciais ao *splicing* constitutivo (EICHLER et al., 1993), ao contrário do que se observou para outros éxons alternativos desse gene. Desta forma, é possível que a inclusão ou a exclusão do éxon 12 do *FMR1* seja um evento regulado respectivamente por proteínas ativadoras ou repressoras de *splicing* com padrão de expressão específico ao tecido.

O soro imune 3460 foi desenvolvido em coelho a partir da imunização deste com o peptídeo GGPQKPEPKAWQ. A caracterização do soro imune 3460, em comparação ao soro pré-imune 3460, compreendeu ensaios de ELISA e *dot blot* usando o peptídeo, *Western blotting* com a FMRP recombinante ou endógena, incluindo lisado de leucócitos de pacientes com a SXF, como controle negativo. Para estudos de imunoistoquímica, empregamos também o soro imune 3460 após adsorção pelo peptídeo GGPQKPEPKAWQ. Além de reconhecer a FMRP, nossas análises demonstram que tanto o soro imune 3460 quanto o anticorpo dele purificado, p3460, reconhece uma proteína de 28 kDa, não relacionada à FMRP. No presente estudo, utilizamos o soro imune 3460 em diversas técnicas de imunomarcção em tecidos e células de animais em diferentes estágios do desenvolvimento, mostrando padrões de expressão e localização coerentes com nossos dados de RNAm e com outros dados sobre a FMRP (AKINS et al., 2012; CHRISTIE et al., 2009; VALENTINE et al., 2000).

A caracterização dos padrões de expressão e localização das isoformas FMRP₊₁₂ISO foi realizada por imunoistoquímica (IHQ) utilizando o soro imune 3460 para análise do encéfalo de ratos juvenis (P12). Sabe-se que nesta idade, a FMRP tem expressão abrangente no encéfalo, mas principalmente no

hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. A IHQ nos animais em P12 mostrou padrões de expressão nessas regiões bem definidas do encéfalo, coerentes com os sinais apresentados por pacientes SXF e FXTAS e animais KO do *Fmr1*. Nossas análises expandem este conhecimento inferindo sobre as estruturas que apresentam maior expressão das isoformas FMRP₊₁₂ISO (Tabela 3). Neste estudo de IHQ, analisamos a expressão do soro imune 3460 em paralelo ao o anticorpo comercial 7G1-1, a fim de verificar a coerência entre as duas marcações e diferenças potencialmente atribuídas à expressão de p28k ou de outros clones celulares produtores de anticorpos que estavam presentes no soro pré-imune do mesmo animal.

Em cérebros de ratos, todas as isoformas da *FMRP* possuem aparentemente níveis apreciáveis de expressão, porém, estes podem variar em até uma ordem de grandeza. Estudos baseados em RT-PCR não quantitativo mostraram que transcritos que não incluem o éxon 12 e aqueles que o incluem apresentam níveis de expressão similares nos estágios iniciais do desenvolvimento (E7 a E9), com pequena predominância dos sem o éxon 12 (XIE et al., 2009). A ausência do éxon 12 parece predominar entre E11 e E15, mas essa diferença diminui a partir de E17 e E18, com o aumento da expressão do éxon 12. Nossos dados, ao nível da proteína, corrobora os de Xie e cols (2009) sugerindo uma relação direta entre os níveis de RNAm do *Fmr1* contendo o éxon 12 e, ao nível proteico, das isoformas FMRP₊₁₂ISO, entre E16 e E18 (XIE et al., 2009).

Os dados de Xie e cols (2009) e Brackett e cols (2013) revelaram que, ao longo do desenvolvimento embrionário, a expressão dos transcritos do *Fmr1* como um todo aumenta consideravelmente (BRACKETT et al., 2013; XIE et al.,

2009). No período perinatal, a expressão dos transcritos do *Fmr1* diminui, com um equilíbrio entre aqueles que incluem ou não o éxon 12. Estes dados estão em concordância com evidências coletadas anteriormente a este trabalho, em que identificamos cerca de 50% dos transcritos de *Fmr1* com o éxon 12 no córtex cerebral em P2 em comparação a menos que 20% antes do nascimento (Anexo 1). A partir de P3, a expressão geral do *Fmr1* aumenta gradativamente, sempre exibindo maior prevalência dos transcritos sem o éxon 12. Em animais adultos, esta prevalência parece ser da ordem de 3:1 (BRACKETT et al., 2013; XIE et al., 2009). Foi também observado, em ratos adultos, que o nível de expressão de transcritos do *Fmr1* com o éxon 12 é mais alto em hipocampo e bulbo olfatório do que em córtex cerebral e cerebelo. Esta diferença pode ser devida ao fato de estes tecidos apresentarem populações de células em diferenciação (BRACKETT et al., 2013).

5.1 A expressão da FMRP entre os períodos embrionário e pós-natal do animal jovem

O desenvolvimento do encéfalo e a formação de memória e o aprendizado são dependentes da plasticidade sináptica. A manutenção prolongada de sinais de potencialização ou depressão de sinapses é determinante neste processo. Tais eventos são essenciais para o estabelecimento e permanência de sinapses saudáveis, bem como para a manutenção dos circuitos por elas formados. Em neurônios do córtex cerebral e cerebelo, bem como em neurônios hipocampais, a FMRP predomina no citoplasma de espinhas dendríticas, evaginações da membrana pós-sináptica de neurônios excitatórios. Estas estruturas estão sujeitas a alterações morfológicas dinâmicas, relacionadas à função sináptica e plasticidade

neuronal, que são dependentes de síntese protéica (JONTES; SMITH, 2000). Acredita-se que nas espinhas dendríticas, a FMRP deva funcionar como repressora traducional, sofrendo modificações pós-traducionais regulatórias em virtude da ativação sináptica.

A manutenção prolongada tanto da potencialização (LTP, *Long-Term Potentiation*) como da depressão (LTD, *Long-Term Depression*) neuronal é dependente da síntese proteica localizada que ocorre nas espinhas dendríticas (PFEIFFER; HUBER, 2006; SUTTON; SCHUMAN, 2005), o que permite uma resposta rápida aos sinais sinápticos. A LTP é regulada por pelo menos duas diferentes vias, que envolvem receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) ou receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). A FMRP participa da via de sinalização que regula a plasticidade sináptica mediante ativação das mGluRs, que ativam a tradução localizada. Animais KO do *Fmr1* têm LTD induzida por mGLUR aumentada no hipocampo, provavelmente devido a um aumento nas proteínas indutoras de LTD (HUBER et al., 2002; NOSYREVA; HUBER, 2006; WEILER et al., 1997). Entre as implicações neuronais relatadas no modelo KO e em pacientes portadores da SXF, um dos primeiros e mais bem caracterizados sinais está relacionado à formação de memória e aprendizado (BANERJEE et al., 2010). Entre as implicações morfológicas, os distúrbios de espinhas dendríticas foram inicialmente observados em neurônios do hipocampo (COMERY et al., 1997; NIMCHINSKY; OBERLANDER; SVOBODA, 2001). Estas observações estão em acordo com diversos trabalhos que mostram uma expressão acentuada da proteína FMRP no hipocampo, onde esta desenvolve importante papel na manutenção da plasticidade sináptica. A perda da repressão traducional devido à ausência da FMRP, tanto em

pacientes afetados pela SXF, como em modelos KO leva ao dismorfismo das espinhas dendríticas, que se apresentam mais longas, numerosas e finas (GALVEZ; GREENOUGH, 2005; GATTO; BROADIE, 2009; NIMCHINSKY; OBERLANDER; SVOBODA, 2001). Estas espinhas apresentam ainda falhas na resposta a sinais sinápticos aferentes e reciclagem acelerada, devido à instabilidade das sinapses formadas (CRUZ-MARTÍN et al., 2010; PAN et al., 2010). O processo de rápida reciclagem de vesículas foi descrito especificamente nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo de animais KO (DENG; SOJKA; KLYACHKO, 2011), na área subventricular (SVZ) (SCOTTO-LOMASSESE et al., 2011) e no córtex somatosensorial, onde estas espinhas apresentam menor sensibilidade aos estímulos sensoriais (PAN et al., 2010). Este processo é observado principalmente no período de desenvolvimento próximo a P14, mas já foi descrito em animais adultos (GALVEZ; GREENOUGH, 2005; PFEIFFER et al., 2010).

Nos complexos RNP, a FMRP exerce sua função de repressora da síntese proteica causando parada do ribossomo (DARNELL et al., 2011). A perda deste controle negativo da FMRP sobre os ribossomos é a causa do aumento de síntese proteica, generalizada, observado na SXF (GROSS; BASSELL, 2012; QIN et al., 2005). Este aumento generalizado tem origem na ausência de repressão primária da FMRP sobre seus alvos e é acompanhado pelos efeitos secundários que estes alvos desencadeiam nas células. Estas alterações são mais acentuadas no córtex cerebral e hipocampo, e principalmente, durante o período em que a sinaptogênese é mais intensa (HOEFFER et al., 2012; SCHÜTT et al., 2009). Este aumento de síntese proteica pode ser compensado *in vitro* pelo uso de repressores da tradução,

que resgatam fenótipo de perda de memória apresentado pelo modelo KO (BOLDUC et al., 2008) .

O primeiro mês de vida em camundongos representa o período mais importante da plasticidade sináptica. A formação dos novos circuitos é em grande parte dirigida pelos estímulos sensoriais que são apresentados logo após o nascimento. Estímulos óticos desencadeiam plasticidade no córtex cerebral em área visual dependente de sinalização glutamatérgica (FAGIOLINI; HENSCH, 2000; HENSCH et al., 1998), enquanto estímulos tácteis iniciam a formação de circuitos no córtex somatosensorial antes mesmo da abertura dos olhos (HENSCH, 2005; SADAKA et al., 2003), estímulos sonoros ativam a área auditiva cortical (DE VILLERS-SIDANI et al., 2007), bem como aqueles olfativos alcançando o córtex piriforme (LARSON et al., 2005). Estímulos motores atingem o córtex motor, bem como o cerebelo (HOELLINGER et al., 2013).

As vesículas telencefálicas em E14 são sítio de neurogênese ativa no embrião do rato (SAFFARY; XIE, 2011). Nestas, os níveis da expressão do éxon 12 nos transcritos do *Fmr1*, aferidos por qRT-PCR, mantiveram-se estatisticamente semelhante aos níveis em córtex cerebral em E19, os quais, em estudo anterior, mostraram-se significativamente inferiores aos da mesma estrutura em P2 (Anexo 1). Ao nível proteico, as FMRP₊₁₂ISO mostraram-se mais elevadas entre E16 e E20 do que entre E12 e E14 (Fig. 26). Estes dados correlacionaram-se aos de imunoistoquímica de embriões com a mesma idade gestacional (Fig. 27). Por outro lado, quando se observa o encéfalo de rato em P12, a marcação com ambos, o anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460, torna-se bem mais evidente e frequente, sobretudo no córtex cerebral (Figs. 6 a 22). De

fato, foi relatado por diferentes grupos que, ao longo das duas primeiras semanas pós-natais em ratos, as expressões do RNAm do *FMR1* e da proteína FMRP se elevam (AKINS et al., 2012; CHRISTIE et al., 2009; IRWIN et al., 2000, 2005; TODD; MACK, 2000; TODD; MALTER; MACK, 2003), de forma concordante com o período em que a sinaptogênese e a plasticidade neuronal se encontram em seu ápice (FIALA; FEINBERG, 1998; HARRIS; JENSEN; TSAO, 1992). A expressão da FMRP aumenta no córtex occipital após exposição do animal a ambientes complexos por 20 dias a partir de 30 dias de idade (IRWIN et al., 2005); no córtex somatosensorial, após estimulação de vibrissas com um pincel por 15 minutos (TODD; MACK, 2000; TODD; MALTER; MACK, 2003); em espinhas dendríticas em resposta à função sináptica glutamatérgica (WEILER et al., 1997). Este perfil de expressão gênica relaciona-se ao período crítico para a sinaptogênese. No caso da estimulação do córtex sensorial, como relatado, o aumento da expressão da FMRP é dependente da tradução e não da transcrição do gene (TODD; MALTER; MACK, 2003).

O nascimento define o início de um período crítico, quando propriedades neuronais são particularmente suscetíveis à modificação pela experiência. Este período crítico de sensibilidade mais generalizada descreve um intervalo no qual a presença de estímulos específicos internos e externos são necessários para o desenvolvimento normal do cérebro. Períodos críticos são caracterizados por competição funcional entre estímulos (genéticos e ambientais) e modificações estruturais como desenvolvimento e maturação de espinhas dendríticas. Períodos críticos têm início e duração específicos para cada sistema. Mesmo dentro do córtex cerebral, áreas altamente

especializadas como o córtex visual, o córtex auditivo e o córtex neurosensorial têm janelas distintas dentro do desenvolvimento pós-natal, críticas para promover a plasticidade sináptica.

Assim, nove facetas do período crítico podem ser distinguidas: (i) competição funcional entre estímulos genéticos e ambientais; (ii) a atividade elétrica tem um papel particular, sendo a maioria dos modelos celulares de plasticidade baseados na habilidade de potencializar ou reprimir a transmissão em sinapses individuais através de seus padrões de ativação; (iii) um período crítico pode ser definido por seus sistemas onde modificações estruturais se tornam essencialmente irreversíveis além de certa idade; (iv) a continuação do crescimento mantém a sensibilidade à influencia do ambiente durante toda a vida; (v) o início e duração de um período crítico são definidos não apenas pela idade, mas pela experiência; (vi) períodos críticos têm tempo de início e duração únicos para cada sistema; (vii) há uma diversidade de mecanismos moleculares nos diferentes sistemas ou até mesmo estágios da mesma via; (viii) circuitos inibitórios exercem um papel especial no sistema nervoso central; (ix) atenção e motivação (excitação) têm poderosa influência nos períodos críticos.

A regulação da função da FMRP, no SNC, está também diretamente relacionada ao seu estado de fosforilação. Quando desfosforilada, a FMRP se associa a polirribossomos ativos, permitindo a tradução de seus RNAs-alvo. Por outro lado, a sua fosforilação leva à inibição da atividade traducional destas mensagens (CEMAN et al., 2003). Nesta via de regulação, a FMRP é alvo da fosfatase 2A (PP2A) (NARAYANAN et al., 2007), enquanto sua fosforilação é feita pela kinase S6K1, integrante da via de sinalização regulada pelo mTOR

(NARAYANAN et al., 2008). A ativação de receptores glutamatérgicos causa desfosforilação e degradação da FMRP na região pós-sináptica, permitindo a tradução dos transcritos alvo da FMRP. Esta maior taxa de tradução induz a internalização dos receptores AMPA e LTD. A redução de receptores AMPA da superfície celular causa uma inabilidade de a espinha responder a estímulos sinápticos, interferindo na sua maturação morfo-funcional e resultando no fenótipo dismórfico observado em pacientes com SXF e animais KO.

Figura 38: Esquema demonstrando a regulação por fosforilação da FMRP na repressão traducional. **(A)** Na espinha dendrítica, a fosforilação da FMRP pela quinase S6K leva a inibição da síntese proteica e mantém os níveis de internalização dos receptores do tipo AMPA. A desfosforilação da FMRP pela fosfatase PP2A permite o aumento dos níveis de síntese proteica. **(B)** Na ausência de FMRP não há repressão traducional levando ao aumento dos níveis de síntese proteica e internalização dos receptores do tipo AMPA, caracterizando o processo de LTD. Fonte: Modificado de de Oostra & Willemsen, 2008

De fato, estudos de plasticidade sináptica revelaram algumas das estratégias utilizadas para alterar a função sináptica em diversas regiões do

cérebro. A plasticidade comportamental requer alterações sinápticas dependentes de atividade na organização de neurônios interconectados. Estas mudanças de circuitos são a base não apenas do aprendizado e formação de memória e outras formas de plasticidade, mas também de algumas patologias como a SXF e outras deficiências intelectuais. Atividade sináptica que induz LTP pode deflagrar respostas pós-sinápticas mediadas por receptores AMPA. O aparecimento de respostas mediadas por receptores AMPA ocorre provavelmente pela inserção destes na membrana pós-sináptica. Seguindo a adição de novos receptores AMPA, a resposta da célula pós-sináptica a sinais glutamatérgicos deve aumentar. De fato, tal aumento é uma possível explicação para o fortalecimento da transmissão sináptica durante a LTP. Inversamente, a depressão ao longo prazo (LTD) da transmissão sináptica é comumente associada com a perda de receptores AMPA na membrana pós-sináptica, provavelmente devido à internalização desses receptores na célula pós-sináptica. Portanto, neurônios podem fortalecer ou reprimir a transmissão sináptica regulando o número de receptores AMPA na membrana pós-sináptica. Tais alterações na eficiência sináptica são importantes na LTP e LTD, assim como na maturação de sinapses glutamatérgicas.

Se as sinapses continuarem a aumentar em potência, como resultado da LTP, elas poderiam atingir eventualmente um máximo de eficiência, tornando difícil a codificação de novas informações. Desta forma, para tornar o reforço sináptico útil, outros processos devem seletivamente enfraquecer grupos específicos de sinapses. A LTD é este processo. LTP e LTD requerem ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA e resultam na entrada de Ca^{+2} na célula pós-sináptica. O maior determinante para o desenvolvimento de LTP ou

LTD parece ser a quantidade de Ca^{+2} na célula pós-sináptica. Um incremento pequeno no Ca^{+2} leva à depressão, enquanto doses maiores desencadeiam a potencialização. LTP é parcialmente devida à ativação de CaMKII, que fosforila proteínas-alvo. LTD, por outro lado, parece resultar da ativação de fosfatases dependentes de Ca^{+2} . Os diferentes efeitos do Ca^{+2} durante a LTP ou LTD podem surgir da ativação seletiva de cinases ou fosfatases pelos altos ou baixos níveis de Ca^{+2} , respectivamente. É possível que haja fosforilação e desfosforilação do mesmo conjunto de proteínas regulatórias, respectivamente na LTP e LTD, a fim de controlar a eficiência da transmissão sináptica. A relação de FMRP na regulação desses mecanismos através de síntese protéica está diretamente relacionada ao aumento de sua expressão logo após o nascimento do animal.

5.2 A FMRP e o córtex cerebral

À IHQ, o soro imune 3460 apresentou um padrão de marcação no córtex cerebral com sinal restrito às camadas corticais I (camada molecular), II (camada granular externa) e III (camada piramidal externa), algumas vezes chegando à região superficial da camada IV (camada granular interna). Na região mais rostral do encéfalo do rato, a primeira região cortical onde identificamos sinal com o soro imune 3460 foi no córtex motor, inicialmente no córtex motor primário e a partir de regiões pouco mais caudais no córtex motor secundário. A presença da FMRP no córtex motor já foi descrita anteriormente e é condizente com sinais apresentados pelos animais KO e pacientes afetados pelas síndromes relacionadas a FMRP, SXF e FXTAS, que mostram a habilidade motora diminuída na ausência da FMRP. Pacientes com a SXF exibem comportamentos estereotipados típicos do autismo, assim como atraso

no desenvolvimento do controle motor fino (LARGO; SCHINZEL, 1985; ROBERTS et al., 2009; ZINGEREVICH et al., 2009). Estes sintomas motores começam a se apresentar na infância (BARANEK et al., 2008). Além disso, pacientes com SXF exibem dificuldade de coordenação motora em idades mais avançadas (KAU; MEYER; KAUFMANN, 2002). Camundongos KO para o *Fmr1* exibem alterações temporais em comportamento oromotor (ROY et al., 2011). No córtex motor, a FMRP foi observada como integrante de grânulos ribonucleoproteicos (RNP) citoplasmáticos, os quais são imprescindíveis para que a FMRP exerça suas atividades de regulação traducional e transporte de RNP (BARBEE et al., 2006; EL FATIMY et al., 2012). A FMRP é uma integrante crucial destes grânulos, sem a qual a sua regulação é perdida (CHRISTIE et al., 2009). Os grânulos contendo FMRP apresentaram padrões de expressão pré e pós-sinápticos, sugerindo que, além das funções pós-sinápticas mais bem estabelecidas, a FMRP deva ter um papel na regulação pré-sináptica (SUVRATHAN et al., 2010; ZHANG et al., 2009). Atuando nestes dois compartimentos, a FMRP deve estar intimamente relacionada com a formação de circuitos que controlam atividades motoras. Além do córtex motor, estes grânulos estão também enriquecidos em outras regiões relacionadas ao controle motor como cerebelo, formação reticular e tálamo (CHRISTIE et al., 2009) (AKINS et al., 2012). A distribuição destes grânulos foi estudada em animais juvenis (P15), com idades próximas às dos que compuseram nosso estudo (P12), período do desenvolvimento em que se encontram no pico da sinaptogênese e plasticidade neuronal (FIALA; FEINBERG, 1998; HARRIS; JENSEN; TSAO, 1992). Após esse período, a expressão da FMRP diminui

rapidamente, tendo expressão muito baixa em animais senis (P60) (CHRISTIE et al., 2009).

Além das áreas de planejamento motor, os grânulos contendo FMRP se encontram enriquecidos em estruturas responsáveis pelo processamento de sinais sensoriais (AKINS et al., 2012). Nossas observações no córtex cerebral mostraram intensa marcação com o soro imune 3460 em regiões do córtex somatossensorial, córtex visual e córtex auditivo, indicando a presença das isoformas FMRP₊₁₂ISO nas regiões de processamento sensorial. A ausência da FMRP leva a alterações sensoriais tanto em humanos quanto em camundongos. Pacientes afetados pela SXF apresentam hipersensibilidade a estímulo sensorial, enquanto animais KO podem ter convulsões quando expostos a estímulo auditivo intenso (BARANEK et al., 2008; CHEN; TOTH, 2001; MILLER et al., 1999). Outros estudos também mostraram expressão alta dos grânulos contendo FMRP em sistemas somatossensoriais (PRICE; VERNE; SCHWARTZ, 2006) e mais especificamente no córtex visual (CHRISTIE et al., 2009). A FMRP apresenta expressão alta em regiões importantes no processamento auditivo ao longo do tronco encefálico, tálamo e formação reticular (AKINS et al., 2012). Nestas regiões, a FMRP também se associa com canais de potássio na região pre-sináptica, importantes na sinalização que codifica estes sinais (BROWN et al., 2010).

Mostramos com o soro imune 3460 marcação em diversas seções do córtex cingulado, com a mesma distribuição que o sinal para o anticorpo 7G1-1. A disfunção nesta região causada pela ausência da expressão da FMRP e suas isoformas FMRP₊₁₂ISO é condizente com os fenótipos sensoriais apresentados pelos pacientes SXF e modelos animais KO e KI. O córtex

cingulado é uma região importante na formação de memória e recebe estímulo de regiões sensoriais, tendo sido implicado na formação de memória olfativa reforçada por correlação emocional (MATSUNAGA et al., 2013) e na coordenação auditivo-motora (PECENKA; ENGEL; KELLER, 2013). Mostramos que as isoformas FMRP₊₁₂ISO se expressam nos animais em P12 em diversas áreas relacionadas ao processamento sensorial, sugerindo uma possível função da alça variável mais longa de KH-2 nestes processos. Paralelamente, mostramos que a FMRP tem um aumento de expressão no início do período pós-natal, fase em que foi demonstrado que a FMRP tem sua expressão aumentada em resposta a grande riqueza de estímulos apresentados e a formação de processos cognitivos (GABEL et al., 2004; IRWIN et al., 2005; TODD; MACK, 2000).

Em animais em P15, a FMRP foi observada no córtex cerebral se estendendo da camada I a camada IV do córtex cerebral, muitas vezes em segmentos esparsos, mas com marcação muito forte no hipocampo. Neste estudo, a ausência da FMRP causou defeitos de maturação e proliferação neuronal e dismorfismo de espinhas dendríticas, especificamente no córtex cerebral somatosensorial primário (TILL et al., 2012). Embora a maturação neuronal ainda tenha ocorrido no córtex somatosensorial, sua capacidade de formar circuitos sinápticos foi perdida, o que foi atribuído à redução da plasticidade neuronal.

Em contraste com nossas observações, Till e colaboradores (TILL et al., 2012) não observaram nenhuma marcação em células da glia. Enquanto a IHQ não permite uma discriminação inequívoca entre células neuronais ou gliais, a

maioria das nossas observações ao microscópio em regiões corticais e hipocampus mostraram células com morfologia indicativa de neurônios, enquanto na região do corpo caloso, observamos marcação que é sugestiva de expressão da FMRP e FMRP₊₁₂ISO nas fibras de oligodendrócitos (dados não mostrados), que deve ser um achado inespecífico. Nas regiões dos ventrículos laterais observamos ainda marcação exclusiva para o anticorpo 7G1-1 no epêndima, epitélio cuboide simples, e plexo coroide, que representa uma continuação deste epitélio, sobre uma lâmina basal, altamente vascularizada que se projeta à luz dos ventrículos (Fig. 12). Essas marcações são remissivas da expressão da FMRP em outros tecidos epiteliais, bem como da possibilidade de marcação de célula epitelial da meninge, como descrito (Fig. 6). Descreveu-se a expressão da FMRP em células da glia (MIENTJES et al., 2006; PACEY; DOERING, 2007) e que transcritos de origem glial podem ser transportados ativamente para neurônios (GIUDITTA et al., 2008), levantando-se a dúvida sobre a origem dos transcritos que traduzem para a FMRP encontrada em neurônios. Em estudo recente investigou-se a questão, demonstrando-se que a FMRP detectada na região pré-sináptica é de fato de origem neuronal (AKINS et al., 2012; TILL et al., 2012) e que o aumento da síntese proteica advindo da ausência da FMRP no modelo KO é mais acentuada em áreas com maior densidade neuronal (QIN et al., 2005).

Nossas observações sobre a presença da FMRP (E18 a E20) e FMRP₊₁₂ISO (E20) na camada mais superficial da placa cortical de forma uniforme, levou-nos a indagar se células do tipo Cajal-Retzius poderiam expressar a FMRP, aspecto não relatado na literatura científica. No entanto, as condições para estudos morfológicos empregadas no presente estudo são

insatisfatórias para esclarecer esta questão. Para tal, a marcação dupla com anticorpo anti-reelina ou a imunomarcação com ouro e observação à microscopia eletrônica de neurônios bipolares ou multipolares na camada I seria necessário. A reelina (RELN) é uma glicoproteína muito importante no SNC, tanto no desenvolvimento, quanto na vida adulta. Diversas doenças neuropsiquiátricas compartilham uma desregulação no gene *RELN* como autismo, mal de Alzheimer (BOTELLA-LÓPEZ et al., 2006), esquizofrenia (GEYER et al., 1999; MCALONAN et al., 2002; TURETSKY et al., 2007). Esta proteína é normalmente expressa durante o desenvolvimento em células de Cajal-Retzius temporárias da camada I do córtex cerebral, além do hipocampo, córtex entorrinal e cerebelo no adulto (ABRAHAM; MEYER, 2003; ALCÁNTARA et al., 1998; CHIN et al., 2007; DOEHNER; KNUESEL, 2010; LACOR et al., 2000). A reelina atua na manutenção da plasticidade sináptica através de receptores NMDA (BEFFERT et al., 2005; GROC et al., 2007; HERZ; CHEN, 2006; QIU; WEEBER, 2007; VENTRUTI et al., 2011). Transcritos do gene *RELN* foram identificados como alvo da regulação pela proteína FMRP (DARNELL et al., 2011). FMRP tem expressão baixa em neurônios de pacientes com diversos transtornos psiquiátricos como autismo (FATEMI; FOLSOM; THURAS, 2011; FATEMI; FOLSOM, 2010, 2011) esquizofrenia e transtorno bipolar (FATEMI et al., 2010). A ausência da repressão traducional da FMRP sobre *RELN* pode ser um dos mecanismos importantes na patologia da SXF e de condições psiquiátricas. Neste caso, a marcação dupla com o anticorpo anti-reelina e anti-FMRP será importante para esclarecer esta questão.

5.3 A FMRP e o cerebelo

O cerebelo é uma importante estrutura nas patologias SXF e, principalmente, FXTAS, visto que pacientes apresentam importantes sintomas motores, além de sinais à ressonância magnética do crânio em FXTAS (BERRY-KRAVIS et al., 2007). Os estudos de localização de transcritos do gene *FMR1* humano identificaram diversas variantes destes RNAs no cerebelo, principalmente células de Purkinje (ABITBOL et al., 1993). Ao nível proteico, os grânulos de RNP contendo FMRP foram observados por todo o cerebelo, com maior expressão na camada molecular superficial e vermis. (AKINS et al., 2012; DEVYS et al., 1993). Estes grânulos foram também observados no cerebelo de animais em P15, estendendo-se até a camada granular externa (CHRISTIE et al., 2009), uma região onde novos neurônios estão se diferenciando e formando sinapses (LANDIS, 1987). Os grânulos com FMRP são observados em projeções de células de Purkinje em idades a partir de P6 até P20. A marcação em todo o cerebelo desaparece de P30 a P60 (CHRISTIE et al., 2009). O soro imune 3460 apresentou sinal positivo para os animais em P12 no cerebelo, nas células de Purkinje e camada granular, além de sugestiva marcação na camada molecular (a mais externa). Além de recorrentes observações de expressão da FMRP nas células de Purkinje (MIENTJES et al., 2006), estas apresentam espinhas dendríticas alongadas e indução de LTD aumentada em estudos eletrofisiológicos e de comportamento nos KO. As alterações motoras, causadas pela ausência da FMRP foram ainda demonstradas no modelo condicional de KO do *Fmr1*, cuja deleção estava restrita às células de Purkinje. Estes animais apresentaram déficit em testes de condicionamento de piscar olhos (KOEKKOEK et al., 2005). A marcação com o anticorpo 7G1-1 em nosso estudo acompanhou padrão semelhante ao

apresentado pelo soro imune 3460, embora com intensidade mais alta na camada granular do que em células de Purkinje. Porém, o forte sinal visto nessas células pelo soro imune 3460 pode ser, em parte, decorrente de clones de anticorpos presentes no soro pré-imune (Fig. 19).

5.4 A FMRP e o hipocampo

A plasticidade sináptica do hipocampo é crucial para mecanismos de aprendizado e memória, potencializando ou reprimindo sinais sinápticos (ARMANO et al., 2000; BEGGS, 2001). Em roedores, o hipocampo se forma por volta do décimo quinto dia embrionário (E15), inicialmente por interneurônios produtores de GABA e, em seguida, pela gênese dos neurônios piramidais glutamatérgicos no hipocampo (SORIANO; COBAS; FAIRÉN, 1986). Estes dois tipos celulares tem origens distintas. Progenitores de neurônios GABAérgicos têm origem na eminência gangliônica medial e migram tangencialmente no curso migratório hipocampal para formar o neuroepitélio denteado (PLEASURE; COLLINS; LOWENSTEIN, 2000). Neurônios glutamatérgicos têm origem no neuroepitélio de Ammon e migram por curtas distâncias radialmente para formar as camadas piramidais do hipocampo (Altman & Bayer, 1990).

No desenvolvimento, a última estrutura hipocampal a ser formada é o giro denteado. Esta é uma região de muito interesse por formar novos neurônios durante a idade adulta. No embrião, progenitores de neurônios granulares expressando o marcador pro-neurogênico mash-1, migram ao giro denteado em desenvolvimento por volta de E18 (PLEASURE; COLLINS; LOWENSTEIN, 2000). Esta corrente migratória coloniza a matriz terciária e a camada granular na embriogênese tardia e principalmente no período pós-natal

precoce. De fato, a maioria dos neurônios no giro denteado de roedores aparece no período pós-natal (ALTMAN; DAS, 1965; BAYER; ALTMAN, 1991) com o período de pico da gênese de células granulares ocorrendo entre cinco e sete dias depois do nascimento do rato (SCHLESSINGER; COWAN; GOTTLIEB, 1975). Neurônios granulares surgem de progenitores que inicialmente residem em uma zona proliferativa ectópica no hilo denteado, que progressivamente retrai e origina a camada subgranular do giro denteado (ALTMAN; DAS, 1965; BAYER; ALTMAN, 1991).

Diversos estudos sugerem que receptores ionotrópicos GABA_A, NMDA e AMPA apresentam uma participação sequencial na excitação neuronal durante a formação sináptica (BEN-ARI et al., 1989; GARASCHUK; HANSE; KONNERTH, 1998). No hipocampo neonatal, assim como em outras estruturas cerebrais imaturas, GABA, o principal transmissor de sinais inibitórios no sistema nervoso central adulto, provê a maior parte dos sinais excitatórios (CHERUBINI; GAIARSA; BEN-ARI, 1991; LEINEKUGEL et al., 1997). A mudança de despolarização para hiperpolarização pela ação de GABA é mediada pela variação de concentração interna de Cl⁻ (OWENS; KRIEGSTEIN, 2002; RIVERA et al., 1999), a qual ocorre no hipocampo no final da primeira semana pós natal do rato (BEN-ARI et al., 1989).

O desenvolvimento da transmissão sináptica glutamatérgica é caracterizado pela participação precoce de receptores NMDA e depois AMPA. Portanto, no hipocampo em P1-P2, estímulos elétricos evocam em células piramidais uma corrente pós-sináptica bloqueada apenas por antagonistas de receptores NMDA (BEN-ARI et al., 1989; DURAN et al., 1995). Devido ao bloqueio de canais NMDA por Mg⁺² de forma dependente de voltagem, essas

sinapses são silenciosas em potenciais de membrana de repouso. Estudos com microscopia eletrônica forneceram evidências diretas de que, após o nascimento, sinapses glutamatérgicas têm uma maioria de receptores NMDA (PETRALIA et al., 1999). O percentual de sinapses silenciosas diminui durante o desenvolvimento com progressiva colocação de receptores AMPA e NMDA para o sítio sináptico (DURAN et al., 1995; HSIA; MALENKA; NICOLL, 1998; PETRALIA et al., 1999), como explicado anteriormente para a maturação sináptica com formação de LTP e LTD.

Figura 39: Esquema demonstrando a maturação das espinhas dendríticas e a formação de sinapses. A formação sináptica inicia-se com o encontro de dois neurônios através de interações heterotípicas entre moléculas de adesão. Com isso, há formação de filopódios e uma reestruturação do citoesqueleto para se estabelecer o contato entre 2 células. As primeiras sinapses são elétricas e se dão provavelmente pelo auxílio de outras células como gliais e formação de junções do tipo fenda. A partir do momento que as células se tornam excitáveis, as sinapses com neurotransmissor são inicialmente GABAérgicas, porém excitatórias, até o nascimento do animal em que há uma inversão com a concentração de cloretos. A partir daí, há a expressão dos

receptores glutamatergicos NMDA e se observa maior remodelamento do citoesqueleto de actina. As protuberâncias da membrana do dendrito do neurônio pós-sináptico já se mostram mais volumosas, com formato de espinhos ou cogumelo. A LTP já esta presente. A maturação sinaptica só aconteceu após a expressão de receptores do tipo AMPA, também inotrópicos, cuja internalização irá culminar com o aparecimento da LTD e eliminação sinaptica.

A função de regulação da tradução de alvos de RNAm pela FMRP está intimamente relacionada a sua capacidade de interagir com grânulos ribonucleoproteicos (RNP) nos quais estes transcritos estão sendo reprimidos. Em animais em P15, apesar de a FMRP isolada ser identificada em todas as regiões do hipocampo, a presença destes grânulos contendo FMRP foi detectada apenas no giro denteado e área CA3 do hipocampo, especificamente na região sináptica (CHRISTIE et al., 2009). A deleção do *Fmr1* especificamente em células destas áreas causou aumento no número destes grânulos, sugerindo que a FMRP é importante na regulação, mas não na localização destes complexos (AKINS et al., 2012). Em animais senis (P60), a expressão da FMRP nessas áreas tornou-se desprezível (CHRISTIE et al., 2009) (AKINS et al., 2012).

Nossas observações em ratos P12 da expressão da FMRP₊₁₂ISO no giro denteado e CA3 do hipocampo são concordantes com os relatos anteriores para a FMRP. Como relatado, há neurogênese no giro denteado no período pós-natal precoce. A expressão das FMRP₊₁₂ISO neste local e período pode se relacionar a alguma etapa importante da diferenciação neuronal, antes do amadurecimento sináptico. Tanto o anticorpo 7G1-1 quanto o soro imune 3460 apresentou sinal no hipocampo, que foi mais intenso no giro denteado e área CA3, podendo ser observado também na fímbria do hipocampo e nas adjacências no córtex parahipocampal com o anticorpo 7G1-1 (Figs. 17 e 21).

Esta distribuição sugere que as isoformas FMRP₊₁₂ISO podem ter um papel nas funções de memória e aprendizado, exercidas também pelas demais isoformas da FMRP no hipocampo. A presença da FMRP e de suas isoformas FMRP₊₁₂ISO na área CA3 do hipocampo é coerente com a observação de que a FMRP está expressa na formação reticular, região que regula sinais de diversas fontes sensoriais, inclusive de dor (Mason, 2001). Como já mostramos, as isoformas da FMRP, que expressam ou não a sequência do éxon 12, estão presentes em áreas do córtex sensorial. Estes e vários outros estudos indicam que a FMRP participa da transmissão sensorial de diversas modalidades de estímulos. Estes estímulos passam em enervação pelo septo lateral, no núcleo septal, ligando as regiões de processamento sensorial à área CA3 do hipocampo. Estas enervações ligam a região CA3 ao córtex piriforme responsável pela discriminação olfativa (STAUBLI; LYNCH, 1987). A região do córtex piriforme tem resposta sináptica mediada por receptores NMDA, que se encontra alterada nos animais *Fmr1* KO (GOCEL; LARSON, 2012). Estes mesmos animais apresentam ainda um déficit no LTP, específico no córtex piriforme (LARSON et al., 2005). Nosso estudo com o soro imune 3460 mostrou um sinal intenso no córtex piriforme e no núcleo endopiriforme em diferentes coordenadas estereotáticas, sempre acompanhado de marcação com o anticorpo 7G1-1 (Figs. 14 e 15). Estas marcações reforçam a hipótese de que as isoformas FMRP₊₁₂ISO podem exercer funções específicas durante o processamento sensorial relacionado a diversos estímulos.

5.5 A FMRP e células-tronco neurais pós-natais

Detectamos com o soro imune 3460 e anticorpo 7G1-1 marcação na região periventricular em P12 de ambos os ventrículos laterais em porção mais

rostral, com distribuição tanto dorsal quanto ventral. A região periventricular é uma das poucas áreas no encéfalo onde ocorre neurogênese durante a fase adulta (PENCKA et al., 2001; TERVONEN et al., 2009). De forma semelhante, encontramos sinal com o soro imune 3460 e 7G1-1 no giro denteado do hipocampo e na camada granular externa do cerebelo (Fig.17), regiões do encéfalo que são neurogênicas durante a fase adulta (LANDIS, 1987). Além dessas, neurogênese foi também documentada no animal adulto no bulbo olfatório (LÖTSCH et al., 2013), embora esta estrutura não tenha sido analisada no presente estudo. A FMRP é importante no processo de diferenciação de células progenitoras neuronais, tanto na linhagem germinativa (YANG et al., 2007) quanto em células progenitoras pós-natais em cérebro de *Drosophila* (CALLAN et al., 2010; LUO et al., 2010) e na região subventricular de camundongos (SCOTTO-LOMASSESE et al., 2011). Células de camundongos neonatos KO para o *Fmr1* parecem acumular-se na zona subventricular em desenvolvimento do neocórtex (TERVONEN et al., 2009). Em modelos celulares com abolição da expressão da FMRP, células-tronco neurais do adulto, provenientes dos ventrículos laterais e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) apresentam um aumento no número de células em diferenciação, a maioria destas com alterações morfológicas características de neurônios dos modelos KO do *Fmr1* (CASTRÉN et al., 2005; SHERIDAN et al., 2011). Por outro lado, em células-tronco neurais do adulto (P28) derivadas de córtex cerebral, a proliferação celular e a neurogênese encontram-se normais (GALVEZ; GREENOUGH, 2005). Esta diferença pode ser atribuída à menor expressão da FMRP no córtex cerebral do adulto (BHATTACHARYYA et al., 2008), sugerindo que a função da FMRP nos progenitores neuronais seja

mais importante no período crítico para a sinaptogênese, no fim da segunda semana de vida. Nossos dados sugerem que as isoformas FMRP₊₁₂ISO podem ter um papel em ambos os processos.

Para averiguar mais especificamente a função das isoformas FMRP₊₁₂ISO nos progenitores neuronais, estabelecemos culturas de neuroesferas que foram diferenciadas em cultivo. Confirmamos que a expressão da FMRP nestas progenitoras é bastante elevada (FIG. 33, B) e mostramos que a expressão das isoformas FMRP₊₁₂ISO é muito baixa nestes progenitores em seu estado indiferenciado. Entretanto, durante o processo de diferenciação neuronal, a expressão destas isoformas aumenta rapidamente, se tornando equiparável ao das isoformas mais abundantes da FMRP (FIG. 33, B). Nossos dados sugerem que as isoformas com a alça variável em configuração mais longa no KH-2 da FMRP tem sua função regulada e exercem uma função específica, ainda desconhecida, durante a diferenciação neuronal.

No embrião, a proliferação de células precursoras e a diferenciação e migração de novos neurônios e células da glia são essenciais para o estabelecimento da arquitetura cortical (COSTA et al., 2009). Durante a embriogênese, a FMRP é altamente expressa em regiões que contêm células progenitoras e neurônios recém-diferenciados (CASTRÉN et al., 2005; SCHRIER et al., 2004). Embora a ausência da FMRP pareça não afetar a proliferação de progenitores, estudos de células-tronco neuronais em cultura sugerem que a ausência desta proteína leva ao aumento da produção de células expressando marcadores neuronais (CASTRÉN et al., 2005).

5.6 A FMRP no envelhecimento cerebral

Não observamos expressão significativa do éxon 12 do *FMR1* humano em córtex cerebral frontal, humano, em envelhecimento. Nas mesmas amostras, a expressão dos íntrons 1, 7 e 15 foi desprezível. Desta forma, concluímos não haver retenção intrônica nessas amostras, bem como não ser relevante a contribuição da configuração longa da alça variável ao domínio KH2 da FMRP em córtex cerebral, frontal, humano, em envelhecimento saudável.

Pacientes com FXTAS e camundongos *knock-in* (KI), cuja curta sequência de trinucleotídeos CGG foi substituída por trato repetitivo CGG do tamanho de pré-mutações na região 5'-UTR do *Fmr1*, apresentam inclusões intranucleares positivas para ubiquitina em neurônios e glia (GRECO et al., 2006; HAGERMAN et al., 2001; SCHLUTER et al., 2012). Estas inclusões contêm os transcritos do gene *FMR1* com expansão de trinucleotídeos CGG e diversas proteínas, incluindo muitas com função de ligação a RNA e relacionadas ao estresse oxidativo (IWAHASHI et al., 2006), levando à proposição de que a superexpressão destes transcritos pode sequestrar proteínas reguladoras de RNA ao núcleo e, consequentemente desencadeando uma resposta ao estresse e o disfunção neuronal. As regiões encefálicas onde estas inclusões são identificadas devem representar aquelas com maior expressão do gene *FMR1*. Estas regiões são concordantes com nossas observações sobre a localização das isoformas FMRP₊₁₂ISO. Em pacientes FXTAS e camundongos modelo KI, as inclusões intranucleares foram observadas no córtex cerebral frontal nas camadas I (camada molecular), II (camada granular externa) e III (camada piramidal externa) e também no córtex entorrinal e córtex motor. No hipocampo, estas inclusões são identificadas no

hilo e giro denteado e na área CA1. No cerebelo, as inclusões estão presentes na camada granular e nas células de Purkinje (WENZEL et al., 2010).

De forma consistente com o modelo de toxicidade pelo RNAm do *FMR1* na fisiopatologia de FXTAS, observou-se uma redução de complexidade dendrítica e viabilidade em neurônios cultivados por 21 DIV, a partir da dissociação de hipocampo de fêmeas de camundongo KI (CHEN et al., 2010). No mesmo modelo animal KI, verificaram-se defeitos de migração e diferenciação neuronal na formação do córtex cerebral. Esses dados indicam que, embora com níveis regulares de FMRP, os elevados níveis de RNAm do *Fmr1* expresso a partir de alelos pré-mutados podem causar um déficit precoce durante a diferenciação neuronal. Uma vez que as FMRP₊₁₂ISO devem ser funcionalmente relevantes ao processo de diferenciação neuronal normal durante a embriogênese, este modelo KI, em que há problemas nesse desenvolvimento, deve ser interessante para análise dessas isoformas. Outro aspecto interessante é que, sendo o *splicing* do pré-RNAm um evento cotranscricional (DE ALMEIDA; CARMO-FONSECA, 2008), expansões de tripletos CGG, presentes na região 5' do transcrito do *FMR1* podem ter um efeito direto sobre a taxa de inclusão do éxon 12 no RNAm do *FMR1*. Se esse efeito for negativo, através da exclusão do éxon 12 do *Fmr1*, em um período em que as FMRP₊₁₂ISO devem ser necessárias para a diferenciação neuronal, a falta da configuração longa da alça variável do domínio KH-2 da FMRP poderá ter um efeito deletério.

5.7 A configuração longa da alça variável do domínio KH-2 da FMRP

Sabe-se que o domínio KH-2 da FMRP se liga a RNAs em motivos com sequências definidas (ASCANO et al., 2012; CORBIN et al., 1997). Além

disso, demonstrou-se que o domínio KH-2 da FMRP liga-se *in vitro* a uma estrutura secundária de RNA, denominada *kissing complex* (KcRNA) (DARNELL; FRASER, 2005). A competição *in vitro* por KcRNA em excesso ou a presença da mutação p.I304N, que desestabiliza o domínio KH-2, faz com que a FMRP perca a capacidade de interagir com polirribossomos (FENG et al., 1997; MAZROUI et al., 2003; SIOMI et al., 1994). Esta mutação também impede que a FMRP forme dímeros (FENG et al., 1997). A alça variável mais longa do KH-2 da FMRP mantém a especificidade de ligação aos KcRNAs; no entanto, esta ligação perde a estabilidade *in vitro* mais rapidamente do que a alça curta (DARNELL et al., 2009). Isto sugere que a presença do éxon 12 pode diminuir a estabilidade de todo domínio KH-2, fazendo com que a inclusão regulada deste éxon represente um efeito supressor nas interações da FMRP, pelo menos as associações a RNA. A fim de verificar se as isoformas FMRP₊₁₂ISO mantêm uma interação com polirribossomos similar às demais isoformas da FMRP *in vivo*, geramos lisados de córtex cerebral de animais em P12, em condições que favorecem a manutenção dos complexos polirribossomais. O perfil cromatográfico mostrou distribuição das FMRP₊₁₂ISO a complexos com massa em cerca de 1000 kDa, que devem ser representativos dos complexos polirribossômicos, embora não tenhamos avaliado o conteúdo de RNAr nessas frações. Essas isoformas distribuíram-se também a frações de massa molecular baixa (160 a 40 kDa), representando agrupamentos pequenos ou proteínas isoladas (Fig. 24). Esta distribuição sugere que *in vivo*, as isoformas que expressam a sequência do éxon 12 do *Fmr1* não perdem a capacidade de se ligar a polirribossomos. No entanto, a presença pronunciada das isoformas FMRP₊₁₂ISO nas frações com peptídeos

entre 160 e 40 kDa não descarta a hipótese de que a alça variável maior produza uma modulação de interação que desloque apenas parte das moléculas de FMRP para estas frações. O peptídeo de 28kDa, reconhecido pelo soro imune 3460, não foi observado nas frações correspondentes aos complexos polirribossomais. Tal fato sugere que esta proteína não possui capacidade de associação a RNA, e não possui relação com as isoformas da FMRP.

Como apresentado, o segmento codificado pelo éxon 12 do *FMR1* tem extensão constante (20 a 21 aminoácidos entre mamíferos). Este módulo e a sugestão de que a alça variável adote uma estrutura desordenada (SJEKLOČA et al., 2009) indicam que a alça possa funcionar como uma plataforma para interações com outras proteínas que a estabilizem e que, dependentemente destas, duas configurações, aberta ou fechada, seriam possíveis, conferindo uma mudança conformacional sobre o dímero FXR. No cenário de um efeito supressor da interação com RNAs, a longa alça poderia dificultar o acesso tanto do próprio KH-2 quanto do domínio vizinho, RGG, aos seus alvos de RNA. Isso pode ser importante, por exemplo, às funções de transporte da FMRP, processo no qual se acredita que o complexo RNP da FMRP não esteja em contato com subunidades de ribossomo (WANG et al., 2008). Nos complexos macromoleculares, a FMRP₊₁₂ISO poderia formar homodímero, homotípico, i.e, com outra molécula FMRP₊₁₂ISO, situação em que o acesso a RNA seria ainda mais difícil; ou homodímero, heterotípico, por exemplo, com uma molécula FMRP₋₁₂ISO. A terceira alternativa seria a formação de heterodímero com FXR1P ou FXR2P. Uma vez demonstrado, no presente estudo, que as FMRP₊₁₂ISO endógenas têm uma expressão significativa *in*

vivo, sugerindo relevância funcional, ensaios *in vitro* com FXR recombinantes serão necessários para se testar as hipóteses discutidas aqui.

6 Referências bibliográficas

- ABERG, K. et al. Human QKI, a potential regulator of mRNA expression of human oligodendrocyte-related genes involved in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 19, p. 7482–7, 9 maio 2006.
- ABITBOL, M. et al. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. **nature genetics**, v. 4, n. 2, p. 147–153, 1993.
- ABRAHAM, H.; MEYER, G. Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 13, n. 6, p. 715–27, jan. 2003.
- ADAMS-CIOABA, M. A. et al. Structural Studies of the Tandem Tudor Domains of Fragile X Mental Retardation Related Proteins FXR1 and FXR2. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e13559, nov. 2010.
- ADINOLFI, S. et al. The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. **Biochemistry**, v. 42, n. 35, p. 10437–10444, 2003.
- ADINOLFI, S.; BAGNI, C.; MUSCO, G. Dissecting FMR1 , the protein responsible for fragile X syndrome , in its structural and functional domains. **Rna**, p. 1248–1258, 1999.
- AGULHON, C. et al. Expression of FMR1, FXR1, and FXR2 genes in human prenatal tissues. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 58, n. 8, p. 867–80, ago. 1999.
- AKINS, M. R. et al. Systematic mapping of fragile X granules in the mouse brain reveals a potential role for presynaptic FMRP in sensorimotor functions. **The Journal of comparative neurology**, v. 520, n. 16, p. 3687–706, 1 nov. 2012.
- ALCÁNTARA, S. et al. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 19, p. 7779–99, 1 out. 1998.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. **Nature**, v. 207, n. 5000, p. 953–6, 28 ago. 1965.
- ANTAR, L. N. et al. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. **J Neurosci**, v. 24, n. 11, p. 2648–2655, 2004.
- ANTAR, L. N. et al. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. **Genes Brain Behav**, v. 4, n. 6, p. 350–359, 2005.
- ARMANO, S. et al. Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 14, p. 5208–16, 15 jul. 2000.

- ASCANO, M. et al. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. 382–386, 12 dez. 2012.
- ASCHRAFI, A. et al. The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 2180–5, 8 fev. 2005.
- ASHLEY, C. et al. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. **Nat Genet**, v. 4, n. 3, p. 244–251, 1993.
- ASHLEY, C. et al. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. **Science**, v. 262, n. 5133, p. 563 – 566, out. 1993.
- BÄCHNER, D. et al. Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and the female gonad. **Human molecular genetics**, v. 2, n. 12, p. 2043–50, dez. 1993.
- BAKKER, C. E. et al. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. **Exp Cell Res**, v. 258, n. 1, p. 162–170, 2000.
- BAKKER, C.; VERHEIJ, C.; WILLEMSSEN, R. Fmr1 knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. **Cell**, 1994.
- BANERJEE, P. et al. Short- and long-term memory are modulated by multiple isoforms of the fragile X mental retardation protein. **J Neurosci**, v. 30, n. 19, p. 6782–6792, 2010.
- BARANEK, G. T. et al. Developmental trajectories and correlates of sensory processing in young boys with fragile X syndrome. **Physical & occupational therapy in pediatrics**, v. 28, n. 1, p. 79–98, jan. 2008.
- BARBEE, S. A. et al. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. **Neuron**, v. 52, n. 6, p. 997–1009, 2006.
- BARDONI, B. et al. Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. **Neurobiol Dis**, v. 4, n. 5, p. 329–336, 1997.
- BAYER, S.; ALTMAN, J. **Neocortical development**. Michigan: Raven Press, 1991. p. 255
- BEFFERT, U. et al. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. **Neuron**, v. 47, n. 4, p. 567–79, 18 ago. 2005.
- BEGGS, J. A statistical theory of long-term potentiation and depression. **Neural computation**, 2001.
- BEN-ARI, Y. et al. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. **The Journal of physiology**, v. 416, n. 11, p. 303–25, 13 set. 1989.
- BERRY-KRAVIS, E. et al. Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. **Annals of neurology**, v. 53, n. 5, p. 616–623, 2003.

- BERRY-KRAVIS, E. et al. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. **Mov Disord**, v. 22, n. 14, p. 2018–30, quiz 2140, 2007.
- BHATTACHARYYA, A. et al. Normal Neurogenesis but Abnormal Gene Expression in Human Fragile X Cortical Progenitor Cells. **Stem cells and development**, v. 17, n. 1, p. 107–17, fev. 2008.
- BLACKWELL, E.; CEMAN, S. A new regulatory function of the region proximal to the RGG box in the Fragile X mental retardation protein. **Journal of cell science**, n. August, 24 ago. 2011.
- BLACKWELL, E.; ZHANG, X.; CEMAN, S. Arginines of the RGG box regulate FMRP association with polyribosomes and mRNA. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 7, p. 1314–1323, 1 abr. 2010.
- BLONDEN, L. et al. Two members of the Fxr gene family, Fmr1 and Fxr1, are differentially expressed in *Xenopus tropicalis*. **The International journal of developmental biology**, v. 49, n. 4, p. 437–41, jan. 2005.
- BOLDUC, F. V et al. Excess protein synthesis in *Drosophila* fragile X mutants impairs long-term memory. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 1143–5, out. 2008.
- BONTEKOE, C. J. M. et al. Knockout mouse model for Fxr2: a model for mental retardation. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 5, p. 487–98, 1 mar. 2002.
- BOTELLA-LÓPEZ, A. et al. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 14, p. 5573–8, 4 abr. 2006.
- BOULLE, K. DE; VERKERK, A.; REYNIERS, E. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. **Nature** ..., 1993.
- BRACKETT, D. M. et al. FMR1 transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58296, jan. 2013.
- BROWN, M. R. et al. Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 819–21, jul. 2010.
- BROWN, V. et al. Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15521–7, 19 jun. 1998.
- BROWN, V. et al. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 477–487, 2001.
- BRYKAILO, M. A; CORBETT, A. H.; FRIDOVICH-KEIL, J. L. Functional overlap between conserved and diverged KH domains in *Saccharomyces cerevisiae* SCP160. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 4, p. 1108–18, jan. 2007.

- BUCKLEY, P. T. et al. Cytoplasmic Intron Sequence-Retaining Transcripts Can Be Dendritically Targeted via ID Element Retrotransposons. **Neuron**, v. 69, n. 5, p. 877–84, 10 mar. 2011.
- CALLAN, M. A. et al. Fragile X protein controls neural stem cell proliferation in the Drosophila brain. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 15, p. 3068–79, 1 ago. 2010.
- CASTRÉN, M. et al. Altered differentiation of neural stem cells in fragile X syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 49, p. 17834–9, dez. 2005.
- CEMAN, S. et al. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. **Human molecular ...**, v. 12, n. 24, p. 3295–305, 15 dez. 2003.
- CHEEVER, A.; CEMAN, S. Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 3, p. 362–6, mar. 2009.
- CHEN, L.; TOTH, M. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. **Neuroscience**, v. 103, n. 4, p. 1043–50, jan. 2001.
- CHEN, T. et al. Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 10, p. 5707–18, out. 1997.
- CHEN, Y. et al. The selective RNA-binding protein quaking I (QKI) is necessary and sufficient for promoting oligodendroglia differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 32, p. 23553–60, 10 ago. 2007.
- CHEN, Y. et al. Murine hippocampal neurons expressing Fmr1 gene premutations show early developmental deficits and late degeneration. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 1, p. 196–208, jan. 2010.
- CHERUBINI, E.; GAIARSA, J. L.; BEN-ARI, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 12, p. 515–9, dez. 1991.
- CHIN, J. et al. Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2727–33, 14 mar. 2007.
- CHRISTIE, S. B. et al. The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. **J Neurosci**, v. 29, n. 5, p. 1514–1524, 2009.
- COFFEE, R. L. et al. In vivo neuronal function of the fragile X mental retardation protein is regulated by phosphorylation. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 4, p. 900–15, 11 nov. 2011.
- COLLINS, R. E.; CHENG, X. Structural domains in RNAi. **FEBS Lett**, v. 579, n. 26, p. 5841–5849, 2005.
- COMERY, T. A. et al. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5401–4, maio 1997.

COMERY, T.; HARRIS, J. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. **Proceedings of the ...**, v. 94, n. May, p. 5401–5404, 1997.

CORBIN, F. et al. The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 9, p. 1465–72, set. 1997.

COSTA, M. R. et al. Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 19 Suppl 1, p. i135–43, jul. 2009.

CRUZ-MARTÍN, A. et al. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. **J Neurosci**, v. 30, n. 23, p. 7793–7803, jun. 2010.

CUNNINGHAM, C. L. et al. Premutation CGG-repeat expansion of the Fmr1 gene impairs mouse neocortical development. **Hum Mol Genet**, 2010.

CURRIE, J. R.; BROWN, W. T. KH domain-containing proteins of yeast: absence of a fragile X gene homologue. **American journal of medical genetics**, v. 84, n. 3, p. 272–6, 28 maio 1999.

DARNELL; FRASER. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. **Genes & ...**, p. 903–918, 2005.

DARNELL, J. C. et al. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 489–499, 2001.

DARNELL, J. C. et al. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 17, p. 3164–77, 1 set. 2009.

DARNELL, J. C. C. J. et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 247–261, 22 jul. 2011.

DAVIDOVIC, L. et al. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 24, p. 3047–3058, 2007.

DE ALMEIDA, S. F.; CARMO-FONSECA, M. The CTD role in cotranscriptional RNA processing and surveillance. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 1971–1976, jun. 2008.

DE DIEGO OTERO, Y. et al. Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. **Molecular and cellular biology and cellular biology**, v. 22, n. 23, p. 8332–8341, 2002.

DE VILLERS-SIDANI, E. et al. Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 180–9, 3 jan. 2007.

DENG, P.-Y.; SOJKA, D.; KLYACHKO, V. A. Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. **The**

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 31, n. 30, p. 10971–82, 27 jul. 2011.

DENMAN, R. B.; DOLZHANSKAYA, N.; SUNG, Y. J. Regulating a translational regulator: mechanisms cells use to control the activity of the fragile X mental retardation protein. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 14, p. 1714–28, jul. 2004.

DENMAN, R. B.; SUNG, Y. J. Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins. **Biochemical and biophysical research**, v. 292, n. 4, p. 1063–1069, 2002.

DESAI, N. S. et al. Early Postnatal Plasticity in Neocortex of Fmr1 Knockout Mice. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 4, p. 1734–1745, 28 jun. 2006.

DEVYS, D. et al. The FMR-1 protein is cytoplasmatic, most abundant in neurons and appears normal in carries of a fragile X premutation. **Nature genetics**, v. 4, n. 4, p. 335–340, 1993.

DOEHNER, J.; KNUESSEL, I. Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging. **Aging and disease**, v. 1, n. 1, p. 12–29, ago. 2010.

DOLZHANSKAYA, N.; MERZ, G.; ALETTA, J. Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. **Journal of cell science**, 2006.

DOLZHANSKAYA, N.; MERZ, G.; DENMAN, R. B. Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10385–10393, 2006.

DUBÉ, M.; HUOT, M. E.; KHANDJIAN, E. W. Muscle specific fragile X related protein 1 isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast. **BMC genetics**, v. 1, p. 4, jan. 2000.

DURAN, R. et al. Domoic acid induces neurotoxicity and ip3 mobilization in cultured cells of embryonic chick retina. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 28, n. 1, p. 100–7, jan. 1995.

EBERHART, D. E. et al. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 8, p. 1083–1091, 1996.

EDBAUER, D. et al. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. **Neuron**, v. 65, n. 3, p. 373–84, 11 fev. 2010.

EICHLER, E. E. et al. Fine structure of the human FMR1 gene. **Hum Mol Genet**, v. 2, n. 8, p. 1147–1153, 1993.

EL FATIMY, R. et al. Fragile X mental retardation protein interacts with the RNA-binding protein Caprin1 in neuronal RiboNucleoProtein complexes [corrected]. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39338, jan. 2012.

FAGIOLINI, M.; HENSCH, T. K. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 183–6, 9 mar. 2000.

FATEMI, S. H. et al. Phosphodiesterase signaling system is disrupted in the cerebella of subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. **Schizophrenia research**, v. 119, n. 1-3, p. 266–7, jun. 2010.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. The Role of Fragile X Mental Retardation Protein in Major Mental Disorders. **Neuropharmacology**, n. November, p. 1–6, nov. 2010.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. Dysregulation of fragile x mental retardation protein and metabotropic glutamate receptor 5 in superior frontal cortex of individuals with autism: a postmortem brain study. **Molecular autism**, v. 2, p. 6, jan. 2011.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D.; THURAS, P. D. Deficits in GABA(B) receptor system in schizophrenia and mood disorders: a postmortem study. **Schizophrenia research**, v. 128, n. 1-3, p. 37–43, maio 2011.

FENG, Y. et al. Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. **American journal of human genetics**, v. 56, n. 1, p. 106–13, jan. 1995.

FENG, Y. et al. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. **J Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 1539–1547, 1997.

FENG, Y. et al. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. **Molecular cell**, v. 1, n. 1, p. 109–18, dez. 1997.

FERRARI, F. et al. The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. **Mol Cell Neurosci**, v. 34, n. 3, p. 343–354, 2007.

FIALA, J.; FEINBERG, M. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. **The Journal of ...**, 1998.

FORNEROD, M. et al. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1051–60, 19 set. 1997.

FRIDELL, R. A. et al. A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. **Embo J**, v. 15, n. 19, p. 5408–5414, 1996.

FU, Y. H. et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1047–1058, 1991.

GABEL, L. A et al. Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 47, p. 10579–83, 24 nov. 2004.

GALVEZ, R.; GREENOUGH, W. T. Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation

syndrome. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 135, n. 2, p. 155–60, 1 jun. 2005.

GARASCHUK, O.; HANSE, E.; KONNERTH, A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. **The Journal of physiology**, v. 507 (Pt 1, p. 219–36, 15 fev. 1998.

GARCIA-AROCENA, D.; HAGERMAN, P. J. Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. R1, p. R83–9, 2010.

GAREAU, C. et al. Characterization of fragile X mental retardation protein recruitment and dynamics in Drosophila stress granules. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55342, jan. 2013.

GAREAU, C. et al. Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in Drosophila. **Biology open**, v. 2, n. 1, p. 68–81, 15 jan. 2013.

GATTO, C. L.; BROADIE, K. Temporal requirements of the fragile x mental retardation protein in modulating circadian clock circuit synaptic architecture. **Frontiers in neural circuits**, v. 3, p. 8, jan. 2009.

GEYER, M. A. et al. Effects of LU-111995 in three models of disrupted prepulse inhibition in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 2, p. 716–24, ago. 1999.

GIUDITTA, A. et al. Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 515–55, abr. 2008.

GOCEL, J.; LARSON, J. Synaptic NMDA receptor-mediated currents in anterior piriform cortex are reduced in the adult fragile X mouse. **Neuroscience**, v. 221, p. 170–81, 27 set. 2012.

GONÇALVES, M. R. R. et al. Atypical clinical course of FXTAS: rapidly progressive dementia as the major symptom. **Neurology**, v. 68, n. 21, p. 1864–6, 22 maio 2007.

GRECO, C. M. et al. Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **Brain**, v. 129, n. Pt 1, p. 243–255, 2006.

GREENOUGH, W. T. et al. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7101–7106, 2001.

GRIGSBY, J. et al. Impairment in the cognitive functioning of men with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **Journal of the neurological sciences**, v. 248, n. 1-2, p. 227–33, 25 out. 2006.

GROC, L. et al. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 38, p. 10165–75, 19 set. 2007.

GROSS, C.; BASSELL, G. J. Excess protein synthesis in FXS patient lymphoblastoid cells can be rescued with a p110 β -selective inhibitor. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 18, p. 336–45, jan. 2012.

HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J. The fragile-X premutation: a maturing perspective. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 5, p. 805–16, maio 2004.

HAGERMAN, R. J. et al. Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 111–21, jan. 1984.

HAGERMAN, R. J. et al. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. **Neurology**, v. 57, n. 57, p. 127–130, 2001.

HARRIS, K. M.; JENSEN, F. E.; TSAO, B. 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**, v. 12, n. 7, p. 2685–2705, 1992.

HENSCH, T. K. et al. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5393, p. 1504–8, 20 nov. 1998.

HENSCH, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 877–88, nov. 2005.

HERGERSBERG, M. et al. Tissue-specific expression of a FMR1/beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. **Human molecular genetics**, v. 4, n. 3, p. 359–66, mar. 1995.

HERZ, J.; CHEN, Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 11, p. 850–9, nov. 2006.

HESSL, D. et al. Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 139B, n. 1, p. 115–121, 2005.

HINDS, H. L. et al. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. **Nat Genet**, v. 3, n. 1, p. 36–43, 1993.

HOEFFER, C. A et al. Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with Fragile X syndrome. **Genes, brain, and behavior**, 23 jan. 2012.

HOELLINGER, T. et al. Biological oscillations for learning walking coordination: dynamic recurrent neural network functionally models physiological central pattern generator. **Frontiers in computational neuroscience**, v. 7, p. 70, jan. 2013.

HSIA, A. Y.; MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Development of excitatory circuitry in the hippocampus. **Journal of neurophysiology**, v. 79, n. 4, p. 2013–24, abr. 1998.

HUANG, T. et al. Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons. **American journal of medical genetics**, v. 64, n. 2, p. 252–5, 9 ago. 1996.

HUBER, K. M. et al. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7746–7750, 2002.

HUNTER, J. E. et al. Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity. **Genetic epidemiology**, v. 32, n. 6, p. 553–9, set. 2008.

IACOANGELI, A. et al. Reply to Bagni: On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. E29, 3 jun. 2008.

IRWIN, S. A. et al. Evidence for altered Fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 73, n. 1, p. 87–93, jan. 2000.

IRWIN, S. A. et al. Fragile X mental retardation protein levels increase following complex environment exposure in rat brain regions undergoing active synaptogenesis. **Neurobiology of learning and memory**, v. 83, n. 3, p. 180–7, maio 2005.

IWAHASHI, C. K. et al. Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. **Brain**, v. 129, n. Pt 1, p. 256–271, 2006.

JACQUEMONT, S. et al. Fragile X Premutation Tremor / Ataxia Syndrome : Molecular , Clinical , and Neuroimaging Correlates. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 4, p. 869–878, abr. 2003.

JACQUEMONT, S. et al. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. **Jama**, v. 291, n. 4, p. 460–9, jan. 2004.

JACQUEMONT, S.; FARZIN, F.; HALL, D. Aging in individuals with the FMR1 mutation. **Journal**, 2004.

JIN, P. et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 113–7, fev. 2004.

JONTES, J. D.; SMITH, S. J. Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. **Neuron**, v. 27, n. 1, p. 11–14, 2000.

JORDAN, M. A; THROWER, D.; WILSON, L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. **Journal of cell science**, v. 102 (Pt 3, p. 401–16, jul. 1992.

KAU, A. S. M.; MEYER, W. A.; KAUFMANN, W. E. Early development in males with Fragile X syndrome: a review of the literature. **Microscopy research and technique**, v. 57, n. 3, p. 174–8, 1 maio 2002.

KHANAM, T. et al. Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. **RNA biology**, v. 3, n. 4, p. 170–7, out. 2006.

KHANAM, T. et al. Can ID repetitive elements serve as cis-acting dendritic targeting elements? An in vivo study. **PloS one**, v. 2, n. 9, p. e961, jan. 2007.

KHANDJIAN, E. W. et al. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 5, p. 783–789, 1995.

KHANDJIAN, E. W. et al. Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13357–62, 7 set. 2004.

KHANDJIAN, E. W. E. W. et al. The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. **Nature genetics**, v. 12, n. 1, p. 91–93, 1996.

KIM, M.; BELLINI, M.; CEMAN, S. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 1, p. 214–28, jan. 2009.

KIM, S. H. et al. Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2413–8, 1 mar. 2006.

KIRKPATRICK, L. L.; MCILWAIN, K. A.; NELSON, D. L. Alternative splicing in the murine and human FXR1 genes. **Genomics**, v. 59, n. 2, p. 193–202, 15 jul. 1999.

KIRKPATRICK, L. L.; MCILWAIN, K. A.; NELSON, D. L. Comparative genomic sequence analysis of the FXR gene family: FMR1, FXR1, and FXR2. **Genomics**, v. 78, n. 3, p. 169–177, 2001.

KOEKKOEK, S. K. et al. Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. **Neuron**, v. 47, n. 3, p. 339–352, 2005.

KREMER, E. J. et al. Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X. **Am J Hum Genet**, v. 49, n. 3, p. 656–661, 1991.

LACOR, P. N. et al. Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3556–61, 28 mar. 2000.

LACOUX, C. et al. BC1-FMRP interaction is modulated by 2'-O-methylation: RNA-binding activity of the tudor domain and translational regulation at synapses. **Nucleic acids research**, p. 1–11, 11 jan. 2012.

LAGGERBAUER, B. et al. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 4, p. 329–338, 2001.

LANDIS, D. Initial junctions between developing parallel fibers and Purkinje cells are different from mature synaptic junctions. **Journal of Comparative Neurology**, 1987.

LARGO, R. H.; SCHINZEL, A. Developmental and behavioural disturbances in 13 boys with fragile X syndrome. **European journal of pediatrics**, v. 143, n. 4, p. 269–75, mar. 1985.

LAROCQUE, D. et al. Nuclear retention of MBP mRNAs in the quaking viable mice. **Neuron**, v. 36, n. 5, p. 815–29, 5 dez. 2002.

LARSON, J. et al. 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**, v. 25, n. 41, p. 9460–9469, 2005.

LAVAL, S. H. et al. Mapping of FMR1, the gene implicated in fragile X-linked mental retardation, on the mouse X chromosome. **Genomics**, v. 12, n. 4, p. 818–21, abr. 1992.

LAZAROV, O. et al. Impaired survival of neural progenitor cells in dentate gyrus of adult mice lacking FMRP. **Hippocampus**, v. 000, p. 1–5, 30 nov. 2011.

LEEHEY, M. A. et al. Progression of tremor and ataxia in male carriers of the FMR1 premutation. **Movement disorders**, v. 22, n. 2, p. 203–206, jan. 2007.

LEINEKUGEL, X. et al. Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. **Neuron**, v. 18, n. 2, p. 243–55, fev. 1997.

LING, S. C. et al. Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 50, p. 17428–17433, 2004.

LIU, Z. et al. Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5544, p. 1098–102, 2 nov. 2001.

LOESCH, D. Z.; HAY, D. A. Clinical features and reproductive patterns in fragile X female heterozygotes. **Journal of medical genetics**, v. 25, n. 6, p. 407–14, jun. 1988.

LÖTSCH, J. et al. Functional genomics suggest neurogenesis in the adult human olfactory bulb. **Brain structure & function**, 9 ago. 2013.

LU, C. et al. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 23, p. 5039–47, 1 dez. 2012.

LUBS, H. A marker X chromosome. **American journal of human genetics**, v. 21, n. 3, p. 231, 1969.

LUBS, H. A. et al. Restudy of the original marker X family. **American journal of medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 133–44, jan. 1984.

LUO, Y. et al. Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. **PLoS genetics**, v. 6, n. 4, p. e1000898, abr. 2010.

MAGUIRE, M. L. et al. Solution structure and backbone dynamics of the KH-QUA2 region of the Xenopus STAR/GSG quaking protein. **Journal of molecular biology**, v. 348, n. 2, p. 265–79, 29 abr. 2005.

MARÍN, A. B. S. **Capacidade proliferativa in vitro de precursores neuro-gliais, telencefálicos e expressão dos genes 1 e 2 do Complexo da Esclerose Tuberosa (TSC1 e TSC2)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

- MARINO, D. DI; ACHSEL, T. Molecular dynamics simulations show how the FMRP Ile304Asn mutation destabilizes the KH2 domain structure and affects its function. ... **and Dynamics**, 2013.
- MATSUNAGA, M. et al. Brain-immune interaction accompanying odor-evoked autobiographic memory. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72523, jan. 2013.
- MAURER-STROH, S. et al. The Tudor domain “Royal Family”: Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 2, p. 69–74, 2003.
- MAZROUI, R. et al. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. **Human molecular**, v. 11, n. 24, p. 3007–3017, 15 nov. 2002.
- MAZROUI, R. et al. Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 23, p. 3087–96, 1 dez. 2003.
- MCALONAN, G. M. et al. Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger’s syndrome. **Brain : a journal of neurology**, v. 125, n. Pt 7, p. 1594–606, jul. 2002.
- MERYASH, D. L. et al. An anthropometric study of males with the fragile-X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 159–74, jan. 1984.
- MIENTJES, E. J. et al. Fxr1 knockout mice show a striated muscle phenotype: implications for Fxr1p function in vivo. **Human molecular genetics**, v. 13, n. 13, p. 1291–302, 1 jul. 2004.
- MIENTJES, E. J. et al. The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. **Neurobiology of disease**, v. 21, n. 3, p. 549–55, mar. 2006.
- MILLER, L. J. et al. Electrodermal responses to sensory stimuli in individuals with fragile X syndrome: a preliminary report. **American journal of medical genetics**, v. 83, n. 4, p. 268–79, 2 abr. 1999.
- MIYASHIRO, K. Y. et al. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. **Neuron**, v. 37, n. 3, p. 417–31, 6 fev. 2003.
- MONTAGNON, M. et al. Transition from normal to premutated alleles in fragile X syndrome results from a multistep process. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 2, n. 2, p. 125–31, jan. 1994.
- MUDDASHETTY, R. S. et al. Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. **Molecular cell**, v. 42, n. 5, p. 673–88, 10 jun. 2011.
- MUSLIMOV, I. A. et al. RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 4722–33, 15 jun. 1997.
- NAPOLI, I. et al. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 1042–54, 19 set. 2008.

NARAYANAN, U. et al. FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 52, p. 14349–57, 26 dez. 2007.

NARAYANAN, U. et al. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18478–82, jul. 2008.

NIMCHINSKY, E. A.; OBERLANDER, A. M.; SVOBODA, K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. **J Neurosci**, v. 21, n. 14, p. 5139–5146, 2001.

NOSYREVA, E. D.; HUBER, K. M. Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. **Journal of neurophysiology**, v. 95, n. 5, p. 3291–5, maio 2006.

OBERLE, I. et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1097–1102, 24 maio 1991.

OHASHI, S. et al. 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**, v. 277, n. 40, p. 37804–37810, 2002.

OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715–27, set. 2002.

PACEY, L. K.; DOERING, L. C. Developmental expression of FMRP in the astrocyte lineage: implications for fragile X syndrome. **Glia**, v. 1609, n. December 2006, p. 1601–1609, 2007.

PAN, F. et al. Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 41, p. 17768–17773, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. sixth edition. **Academic Press, San Diego**, 2007.

PECENKA, N.; ENGEL, A.; KELLER, P. E. Neural correlates of auditory temporal predictions during sensorimotor synchronization. **Frontiers in human neuroscience**, v. 7, n. August, p. 380, jan. 2013.

PEDROTTI, S. et al. The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. **The EMBO journal**, v. 29, n. 7, p. 1235–47, 7 abr. 2010.

PENCEA, V. et al. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. **Experimental neurology**, v. 172, n. 1, p. 1–16, nov. 2001.

PETRALIA, R. S. et al. Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 31–6, jan. 1999.

PFEIFFER, B. E. et al. Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. **Neuron**, v. 66, n. 2, p. 191–7, 29 abr. 2010.

PFEIFFER, B. E.; HUBER, K. M. Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 27, p. 7147–50, 5 jul. 2006.

PHAN, A. T. et al. Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 7, p. 796–804, 5 jan. 2011.

PLEASURE, S. J.; COLLINS, A. E.; LOWENSTEIN, D. H. Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 16, p. 6095–105, 15 ago. 2000.

POLYAK, K. et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes & Development**, v. 8, n. 1, p. 9–22, 1 jan. 1994.

PRICE, D. D.; VERNE, G. N.; SCHWARTZ, J. M. Plasticity in brain processing and modulation of pain. **Progress in brain research**, v. 157, p. 333–352, jan. 2006.

QIN, M. et al. Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an in vivo study in the FMR1 null mouse. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 20, p. 5087–95, 18 maio 2005.

QIU, S.; WEEBER, E. J. Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. **Journal of neurophysiology**, v. 97, n. 3, p. 2312–21, mar. 2007.

RAMOS, A. et al. The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 21–31, jan. 2006.

RIVERA, C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 251–5, 21 jan. 1999.

ROBERTS, J. E. et al. Autistic behavior in boys with fragile X syndrome: social approach and HPA-axis dysfunction. **Journal of neurodevelopmental disorders**, v. 1, n. 4, p. 283–91, dez. 2009.

ROY, S. et al. Comprehensive motor testing in Fmr1-KO mice exposes temporal defects in oromotor coordination. **Behavioral neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 962–9, dez. 2011.

SADAKA, Y. et al. Changes in mouse barrel synapses consequent to sensory deprivation from birth. **The Journal of comparative neurology**, v. 457, n. 1, p. 75–86, 24 fev. 2003.

- SAFFARY, R.; XIE, Z. FMRP regulates the transition from radial glial cells to intermediate progenitor cells during neocortical development. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 1427–1439, 2011.
- SAVARY, E.; HUGNOT, J.; CHASSIGNEUX, Y. Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis. ... **Cells**, 2007.
- SCHAEFFER, C. et al. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. **The EMBO**, v. 20, n. 17, p. 4803–4813, 3 set. 2001.
- SCHLESSINGER, A. R.; COWAN, W. M.; GOTTLIEB, D. I. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 159, n. 2, p. 149–75, 15 jan. 1975.
- SCHLUTER, E. W. et al. Distribution and frequency of intranuclear inclusions in female CGG KI mice modeling the fragile X premutation. **Brain research**, p. 1–14, 11 jul. 2012.
- SCHRIER, M. et al. Transport kinetics of FMRP containing the I304N mutation of severe fragile X syndrome in neurites of living rat PC12 cells. **Experimental neurology**, v. 189, n. 2, p. 343–353, out. 2004.
- SCHÜTT, J. et al. Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. **J Biol Chem**, v. 284, n. 38, p. 25479–25487, 18 set. 2009.
- SCOTTO-LOMASSESE, S. et al. Fragile X Mental Retardation Protein Regulates New Neuron Differentiation in the Adult Olfactory Bulb. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 2205, fev. 2011.
- SÉVIN, M. et al. Penetrance of marked cognitive impairment in older male carriers of the FMR1 gene premutation. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 12, p. 818–24, dez. 2009.
- SHERIDAN, S. D. et al. Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile x syndrome. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26203, jan. 2011.
- SHTANG, S.; PERRY, M. D.; PERCY, M. E. Search for a *Caenorhabditis elegans* FMR1 homologue: identification of a new putative RNA-binding protein (PRP-1) that hybridizes to the mouse FMR1 double K homology domain. **American journal of medical genetics**, v. 84, n. 3, p. 283–5, 28 maio 1999.
- SIOMI, H. et al. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. **Cell**, v. 74, n. 2, p. 291–298, jul. 1993.
- SIOMI, H. et al. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. **Cell**, v. 77, n. 1, p. 33–9, 8 abr. 1994.
- SIOMI, M. C. et al. FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. **The EMBO journal**, v. 14, n. 11, p. 2401–8, 1 jun. 1995.

SIOMI, M. C. et al. 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**, v. 16, n. 7, p. 3825–3832, 1996.

SITTLER, A. et al. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 1, p. 95–102, 1996.

SJEKLOČA, L. et al. A study of the ultrastructure of fragile-X-related proteins. **The Biochemical journal**, v. 419, n. 2, p. 347–57, 15 abr. 2009.

SORIANO, E.; COBAS, A.; FAIRÉN, A. Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. **Brain research**, v. 395, n. 1, p. 88–92, nov. 1986.

STALEY, J. P. Hanging on to the branch. **Nature structural biology**, v. 9, n. 1, p. 5–7, jan. 2002.

STAUBLI, U.; LYNCH, G. Stable hippocampal long-term potentiation elicited by “theta” pattern stimulation. **Brain research**, v. 435, n. 1-2, p. 227–34, 1 dez. 1987.

STRUCKHOFF, A. P.; DEL VALLE, L. Neurospheres and glial cell cultures: immunocytochemistry for cell phenotyping. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1078, p. 119–32, jan. 2013.

STUDENT. The probable error of a mean. **Biometrika**, 1908.

SUTTON, M. A.; SCHUMAN, E. M. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. **Journal of neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 116–31, jul. 2005.

SUVRATHAN, A. et al. Characterization and reversal of synaptic defects in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p. 11591–6, 22 jun. 2010.

TAMANINI, F. et al. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 8, p. 1315–22, ago. 1997.

TAMANINI, F. et al. Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 5, p. 863–869, 1999.

TAMANINI, F.; UNEN, L. VAN; BAKKER, C. Oligomerization properties of fragile-X mental-retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. **Biochem. J**, v. 523, p. 517–523, 1999.

TASSONE, F. et al. CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 144B, n. 4, p. 566–9, jun. 2007.

TERVONEN, T. A et al. Aberrant differentiation of glutamatergic cells in neocortex of mouse model for fragile X syndrome. **Neurobiology of disease**, v. 33, n. 2, p. 250–9, fev. 2009.

TILL, S. M. et al. Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. **Human molecular genetics**, p. 1–48, 27 fev. 2012.

TODD, P. K.; MACK, K. J. Sensory stimulation increases cortical expression of the fragile X mental retardation protein in vivo. **Brain research. Molecular brain research**, v. 80, n. 1, p. 17–25, 14 ago. 2000.

TODD, P. K.; MALTER, J. S.; MACK, K. J. Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. **Brain research. Molecular brain research**, v. 110, n. 2, p. 267–78, 20 fev. 2003.

TUCKER, B.; RICHARDS, R.; LARDELLI, M. Expression of three zebrafish orthologs of human FMR1-related genes and their phylogenetic relationships. **Development genes and evolution**, v. 214, n. 11, p. 567–74, nov. 2004.

TURETSKY, B. I. et al. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 1, p. 69–94, jan. 2007.

TURNER, G. et al. Prevalence of fragile X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 64, n. 1, p. 196–7, 12 jul. 1996.

ULLMAN, K. S.; POWERS, M. A.; FORBES, D. J. Nuclear export receptors: from importin to exportin. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 967–70, 19 set. 1997.

VALACCA, C. et al. Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. **J Cell Biol**, v. 191, n. 1, p. 87–99, 2010.

VALENTINE, G. et al. Fragile X (fmr1) mRNA expression is differentially regulated in two adult models of activity-dependent gene expression. **Brain research**, v. 22, n. 75, p. 337–341, 2000.

VALVERDE, R. et al. Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. **Structure**, v. 15, n. 9, p. 1090–1098, 2007.

VELLOSO, F. **Expressão de isoformas da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP) e sua regulação**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

VENTRUTI, A. et al. Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain. **Neuroscience**, v. 189, p. 32–42, 25 ago. 2011.

VERHEIJ, C. et al. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. **Group**, v. 363, n. 6431, p. 722–724, 1993.

VERHEIJ, C. et al. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 5, p. 895–901, 1995.

- VERKERK, A. J. et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 905–914, maio 1991.
- VERKERK, A. J. et al. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. **Hum Mol Genet**, v. 2, n. 8, p. 1348, 1993.
- WAN, L. et al. Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 22, p. 8536–47, nov. 2000.
- WANG, E. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470–476, 2008.
- WANG, H. et al. Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. January, p. 105–114, 2008.
- WEILER, I. J. et al. Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 50, p. 17504–9, 14 dez. 2004.
- WEILER, I. J. J. et al. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5395, maio 1997.
- WENZEL, H. J. et al. Ubiquitin-positive intranuclear inclusions in neuronal and glial cells in a mouse model of the fragile X premutation. **Brain research**, v. 1318, p. 155–66, 8 mar. 2010.
- WILLEMSSEN, R. et al. Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 225, n. 1, p. 27–33, 5 ago. 1996.
- XIE, W. et al. Tissue and developmental regulation of fragile X mental retardation 1 exon 12 and 15 isoforms. **Neurobiology of disease**, v. 35, n. 1, p. 52–62, jul. 2009.
- YAN, X.; DENMAN, R. B. Conformational-dependent and independent RNA binding to the fragile x mental retardation protein. **Journal of nucleic acids**, v. 2011, p. 246127, jan. 2011.
- YANG, L. et al. Fragile X mental retardation protein modulates the fate of germline stem cells in Drosophila. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 15, p. 1814–20, 1 ago. 2007.
- YANG, Y. et al. The bantam microRNA is associated with drosophila fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. **PLoS genetics**, v. 5, n. 4, p. e1000444, abr. 2009.
- YU, S. et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1179–1181, 1991.

ZALFA, F. et al. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. **Cell**, v. 112, n. 3, p. 317–327, 2003.

ZALFA, F. et al. Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33403–10, 30 set. 2005.

ZANG, J. B. et al. A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. **PLoS genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000758, dez. 2009.

ZHANG, J. et al. Altered hippocampal synaptic plasticity in the FMR1 gene family knockout mouse models. **Journal of**, v. 101, n. 5, p. 2572–2580, maio 2009.

ZHANG, Y. et al. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. **Embo J**, v. 14, n. 21, p. 5358–5366, 1995.

ZINGEREVICH, C. et al. Motor abilities of children diagnosed with fragile X syndrome with and without autism. **Journal of intellectual disability research : JIDR**, v. 53, n. 1, p. 11–8, jan. 2009.

Manuscript in preparation

***Fmr1* exon 12 expression into mature Fmrp isoforms is up-regulated in the cerebral cortex after birth**

Fernando J Velloso^{1*}, Juliana C Correa^{1*}, Marcelo Valpeteris¹,
Camila Ribeiro¹, Laís G. Garcia¹, Telma T Schwindt², Henning
Ulrich³, Luiz R G Britto⁴, Silvana Chiavegatto⁵, Angela M Vianna-
Morgante¹ and Luciana A Haddad¹

(1) Department of Genetics and Evolutionary Biology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; (2) Department of Cell Biology and Development, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (3) Department of Biochemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo; (4) Department of Physiology and Biophysics, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; and (5) Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

(*) These authors contributed equally to this work.

Running title: *Fmr1* exon 12 expression into endogenous Fmrp isoforms

Corresponding author:

Luciana A. Haddad, M.D., Ph.D.
Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva
Rua do Matão, 277 # 327
05508-090 São Paulo SP BRAZIL
E-mail: haddadL@usp.br
Ph. 55-11-3091-0971 FAX 55-11-3091-7553

Abstract

Fragile mental retardation protein (FMRP), the product of *Fragile Mental Retardation 1* (*FMR1*) gene, is an RNA-binding protein with significant expression in the brain. FMRP second K-homology domain (KH-2) has been implicated in ribosome and RNA binding. The length of its variable loop may be extended by the alternative, in-frame inclusion of exon 12 in *FMR1* transcripts. However, it is unknown if that extension is relevant at the protein level for FMRP isoforms *in vivo*. An antibody was developed that detects the segment encoded by *Fmr1* exon 12 in mature FMRP isoforms (FMRP₊₁₂ISO). Low expression has been observed in embryonic days 19 and 20 of the rat cerebral cortex, cerebellum and hippocampus. The expression of those isoforms is significant in the rat cerebral cortex and cerebellum, as well as in the hippocampus in the first six postnatal weeks. In P12 encephalon, FMRP₊₁₂ISO distribute to cerebral cortical neurons, of motor, somatosensorial, auditory, cingulate and visual areas, to hippocampal CA3 area and dentate gyrus, as well to cerebellar Purkinje cells and granular layer.. Similarly to FMRP₊₁₂ISO highest expression in neuron observed *in vivo*, we show that their expression is up-regulated *in vitro* during neuronal differentiation of embryonic telencephalus-derived neurospheres. Our data *in vitro* suggest that molecular events in the neuronal differentiation may be related to the up-regulation of the inclusion of exon 12 in *Fmr1* transcripts, significantly increasing its expression into FMRP₊₁₂ISO. Those events appear specific to the cerebral cortex and cerebellum in a narrow window of synaptogenesis.

Key words: FMR1 gene – KH domain – Variable loop - FMRP

Introduction

Fragile Mental Retardation Protein (FMRP) is expressed by the *Fragile Mental Retardation 1* (*FMR1*) gene in the central nervous system (CNS), notably in the hippocampus, brain cortex and cerebellum (Abitbol et al., 1993; Devys et al., 1993; Khandjian et al., 1995). Lack of FMRP expression is associated with fragile X syndrome, the major cause of inherited intellectual disability among men. Sequence analyses indicated putative domains in FMRP with potential RNA binding ability. Those include two central K-homology (KH) domains and a C-terminal RGG (arginine, glycine, glycine) box. In addition, two N-terminal agenet/Tudor-motifs have been suggested to bind RNA (Supplementary Fig. 1; Ashley et al., 1993; Gibson et al., 1993; Adinolfi et al., 2003). In fact, FMRP binds *in vivo* to polysomes and *in vitro* to mRNA and microRNA, constituting ribonucleoprotein particles (RNPs, Ashley et al., 1993; Corbin et al., 1994; Mazroui et al., 1994; Khandjian et al., 1995; Siomi et al., 1996; Feng et al., 1997; Jin et al., 2004). In cell-free systems, purified FMRP is able to repress mRNA translation including of the *FMR1* transcript itself (Ashley et al., 1993), and to activate other mRNA species (Bechara et al., 2009). Accumulating data implicate FMRP in roles in synapsis development, elimination, and plasticity (Comery et al., 1997; Nimchinsky et al., 2001; Huber et al., 2002; Weiler et al., 2004; Edbauer et al., 2010).

A point mutation (p.I304N) in FMRP second KH domain (KH-2) has been associated with a severe phenotype of fragile X syndrome (De Boulle et al., 1993) and impaired FMRP association to polyribosomes (Feng et al. 1997; Darnell et al., 2005; Zang et al., 2009). A knock-in mouse harboring the p.I304N mutation displays many features seen in the knockout *Fmr1* mouse and in fragile X patients. In that mouse model, the mutant FMRP levels are significantly reduced and its ability to specifically bind to some RNA species and to polyribosomes is abolished (Zang et al., 2009). Therefore, the functional importance of FMRP KH-2 domain has been demonstrated.

KH domains have been described as RNA-interacting or protein dimerisation interfaces (Chen et al., 1997; Liu et al., 2001; Valverde et al., 2008). A minimal KH motif sufficient for RNA binding is composed of a beta-sheet, followed by two alpha-helices and a second beta-sheet. A constant four-residue loop links the two alpha-helices. In eukaryotes, a variable loop joins the minimal motif to a third beta-sheet and another alpha-helix, encompassing the canonical KH domain (Valverde et al., 2008), as seen in each KH domain of FMRP. Differently from most KH domains, FMRP KH-2 domain has a long variable loop, encoded by *Fmr1* exon 11. As *Fmr1* exon 12 is alternatively spliced (Ashley et al., 1993; Eichler et al., 1993; Verheij et al., 1993; Verkerk et al., 1993), its inclusion in *Fmr1* transcripts leads to an in-frame extension of the variable loop of FMRP KH-2 domain. Interestingly, the segment encoded by *Fmr1* exons 11 and 12 is absent in *Fmr1* invertebrate orthologs and in the vertebrate paralogous genes, *Fragile X-related 1* (*FXR1*) and *2* (*FXR2*) genes, potentially implicating FMRP in differential, specialized roles, as yet unknown (Wan et al., 2000; Tucker et al., 2004; Blonden et al., 2005).

In spite of the recognized role of KH domains in RNA binding, few targets have been ascertained to FMRP KH-2 domain. The majority of FMRP RNA targets has been demonstrated to interact with its RGG box (Brown et al., 2001; Darnell et al., 2001; Schaeffer et al., 2001). However, synthetic RNAs displaying a specific secondary structure known as kissing complex have been described to associate with FMRP KH-2 domain (Darnell et al., 2005; Zang et al., 2009). Darnell et al. (2009) have further demonstrated that the variable loop, in either the short or long forms, is dispensable for FMRP binding to kissing complex-containing RNAs. On the other hand, increased affinity has been observed between recombinant FMRP isoforms and homopurine-ribopolymers upon expression of *FMR1* transcripts displaying exon 12 (Denman and Sung, 2002 e Xiang 2009). Those analyses have been useful in discriminating RNA-binding abilities between FMRP isoforms with or without exon-12 expression.

Nevertheless, it remains unclear if the expression of FMRP isoforms with the segment encoded by *FMR1* exon 12 (FMRP₊₁₂ISO) is relevant *in vivo*.

We performed semi-quantitative analyses of *Fmr1* exon-12 expression on embryonic day 19 (E19) and second postnatal day (P2), a period when total FMRP have been reported to increase in response to sensory stimuli (Todd and Mack, 2000; Gabel et al., 2004; Irwin et al., 2005), and FMRP needed for appropriate synaptogenesis (Nimchinsky et al., 2001). Brain structures with major *Fmr1* expression – cerebral cortex, hippocampus and cerebellum - have been selected, and revealed a differential inclusion rate of exon 12 into *Fmr1* transcripts. We further evaluated if that variation was reflected at the protein level by developing an antibody that detects exon 12-encoded segment in mature FMRP isoforms. Our *in vivo* and *in vitro* analyses of endogenous FMRP₊₁₂ISO reveal that *Fmr1* exon 12 expression is regulated in a period of intense synaptogenesis. Early postnatal cerebral cortex is depicted as a major source of those isoforms.

Material and Methods

Animals

Wistar rats were obtained from the animal facility of the University of São Paulo Medical School (São Paulo, Brazil). For real-time RT-PCR, male rats were used on embryonic day 19 (E19) and postnatal day 2 (P2). For cell culturing (E14), brain immunofluorescence (P12) and Western blotting (E19, P2, P4, P6, P10, P13, P25 and P42), both female and male rats were employed. A protocol for research in animals was approved by the Institute of Biosciences Ethics Review Board at the University of Sao Paulo, where experiments took place. Research was conducted in accordance with international standards for animal care and experimentation. Animals were sacrificed in a closed chamber under carbon dioxide saturation.

Antibodies and cell lines

Proteins levels were detected with antibodies against γ -tubulin (Sigma, St Louis MO), synapsin I (Millipore, Temecula CA), postsynaptic density 95 (PSD-95) (Millipore, Temecula CA), Flag mAbM2 (Sigma, St Louis MO) and FMRP (mAb1C3 [Millipore, Temecula CA] and mAb7G1-1 [Brown *et al.*, 2001]). HEK 293 (human embryonic kidney) cell line was used in transfection experiments.

Patients

Blood serum from a fragile X patient, with full mutation and no expression of FMR1 gene, was used as a negative control for antibody detection of FMRP. Hypotonic lysis was achieved with blood lysis buffer (17mM Tris-HCl, 140mM NH₄Cl; pH7.65) and, after centrifugation, the pellet was submitted to protein lysis, as described.

Real-time RT-PCR

Hippocampus, cerebral cortex and cerebellum samples were readily isolated from each animal upon sacrifice, frozen on liquid nitrogen and kept at -80C. Adult tissue was used for protocol standardization. Frozen brain samples were quickly immersed in LiCl and urea solution, and homogenized manually with the use of a syringe. Total RNA and genomic DNA were isolated by centrifugation, extracted with phenol and quantified by electrophoresis in ethidium bromide-stained agarose gel. Total RNA samples were treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad CA) for 30 min at 37C to prevent residual DNA contamination. DNase-treated total RNA (2 μ g) was reversely transcribed using oligo(dT), random oligomers and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad CA). Male subjects were selected by PCR amplification using primers specific for the *Tspy* gene in the Y chromosome.

Quantitative analysis of transcripts was carried out in a Rotor-Gene 3000 device (Corbett Research, Australia) using SYBR green. Optimal conditions for cDNA and primer concentration as well as amplification efficiency were obtained through five-point twofold dilution curve analysis using RG-3000 (Corbett Research) software for each transcript and for different brain regions. As a result, each PCR reaction contained 12.5ng of reversely transcribed RNA, 200 nM of each specific primer, SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad CA) and RNase-free water to a 20- μ l final volume. cDNA samples of groups were assayed in the same run, in triplicate, using 0.1ml microtubes. Samples without cDNA template (no template control) were included as negative controls in all experiments. Amplification parameters were 95.8C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95.8C for 15 seconds and 60.8C for 60 seconds, with fluorescence acquisition at the end of each step. A melting step (dissociation curve) was performed following each run to further confirm product specificity and absence of primer dimers. Real-time data were analyzed using RG-3000 (Corbett Research, Australia) software and an Excel spreadsheet. The relative amount of transcripts of interest in different brain regions for each age group was calculated according to Vandesompele et al. (2002). Briefly, the arithmetic mean of each transcript replicated cycling threshold (Ct) value was transformed to a quantity, taking into account its amplification efficiency. Real time PCR efficiencies for each reaction varied from 97% to 103%, and the correlation coefficient was not lower than 0.96. Raw quantities were subsequently normalized by dividing them by the geometric mean of the stable reference *Ppia* gene, for cerebral cortex and cerebellum. Genes tested for normalization of hippocampal samples were: beta-actin (*Bact*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), beta-2 microglobulin (*B2m*), polymerase II polypeptide A (*Polr2a*), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt*).

The mean quantity representing relative expression values were plotted using GraphPad InStat version 3.05 (GraphPad Software, San Diego CA) and those with

parametric distribution were compared using two-tailed Student's *t* test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Overexpression of recombinant *Fmr1*

Fmr1 coding sequence encompassing exons 11 through 17 was cloned in pcDNA3 vector in frame with the upstream flag tag coding sequence, a kind gift of V. Ramesh (Massachusetts General Hospital, Boston MA). *Fmr1* recombinant clones with or without *Fmr1* exon 12 were used to transfect HEK-293 cells with lipofectamine plus reagent (Invitrogen, Carlsbad CA). After 48 hours, transfected cells were harvested, lysed and submitted to Western blotting.

Antibody production

The twelve-residue long, most hydrophilic segment of the 21-residue peptide encoded by *Fmr1* exon 12 was chosen for synthesis (GGPQKPEPKAWQ, Invitrogen, Carlsbad CA). The peptide was conjugated to KLH and injected in two rabbits (3460 and 3462) for antibody production (Invitrogen, Carlsbad CA). Sera collected before (preimmune serum) and eight, ten and twelve (final bleeding, immune serum) weeks after antigen injection were tested on ELISA (Invitrogen, Carlsbad CA) and blots. 3460 immune serum was affinity-purified with a SulfoLink Immobilization kit for peptides (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL).

Western and dot blotting

Lysates of harvested cultured cells, total brain tissue, hippocampus, frontal cerebral cortex or cerebellum from rat at indicated embryonic and postnatal ages or human leukocyte pellets were used for Western blotting. Tissue or cell pellets, collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS), were lysed in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% triton-X-100, protease inhibitors [Complete Ultra tablets, EDTA free, Roche [Mannheim, Germany]], and phosphatase inhibitors (1

mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate)] for 30 min., at 4C, and then centrifuged at 16,000 X g, for 30 min., at 4C. Protein content from cell lysates was estimated according to the method of Bradford (1976). Forty micrograms of lysate protein (80 µg for leukocyte protein) were submitted to 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter (45 µm, BioRad, Hercules CA). The same peptide that was injected in the rabbits (6.25 - 400 ng in two-fold dilutions) was dot-blotted on a nitrocellulose membrane. Western and dot blotting was performed in TBS-T [136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 27 mM Tris, pH7.4 and 0.05% tween-20]. Blocking solution consisted of 1% alkali-soluble casein (Novagen, San Diego CA) in TBS-T. Antibodies were diluted in 1% BSA in TBS-T and were incubated for one hour each (mAb1C3 and affinity-purified 3460 [p3460] were incubated for six hour each). Horseradish peroxidase-conjugated antibodies were from GE (Piscataway, NJ). Primary antibody dilutions were as follows: 3460 and 3462 preimmune and immune sera at 1:250 (1:1.000 for dot blot); p3460 at 1:400 (1:100 for dot blot); mAb1C3 at 1:250; mAb anti-flag M2 at 1:2.000; anti-γ-tubulin at 1:40.000; anti-synapsin I and anti-PSD95 at 1:1.000 each. After incubating the membrane with ECL Prime (GE, Piscataway NJ) for five minutes, it was exposed to Amersham Hyperfilm ECL (GE, Piscataway, NJ).

Rat encephalon immunofluorescence

P12 male rats were submitted to anesthesia and perfused with paraformaldehyde at 4%. and postfixed in paraformaldehyde at 4% for 4 hours. Brains were stored in sucrose solution at 10C, and 12-µm slices were taken in a cryostat. Slices were submitted to free-floating immunofluorescence protocol. Samples were incubated with primary antibodies in the presence of 5% goat serum, at room temperature, overnight, in orbital agitation. Secondary goat antibodies either directed to mouse and conjugated with TRITC or directed to

rabbit and conjugated with FICT were incubated for two hours in orbital agitation in a 100-fold dilution. Slices were mounted in slides and images were observed and captured at LSM410 confocal microscope (Zeiss, Germany).

Primary neurosphere cultures

Primary neuronal cultures were performed from E20 rat cerebral cortex as described (Haddad et al., 2002). For primary neurosphere culturing, rat embryos at the fourteenth day of gestation (E14) had the telencephalic vesicle isolated. After trypsin digestion at 37C for 10 min., the enzyme was inactivated by fetal bovine serum (FBS), and the tissue submitted to mechanical dissociation. Complete medium [DMEM:F12 (7:3), 1X B27 supplement (Life Technologies, Carlsbad CA)], 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF, R&D, Minneapolis MN), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF, R&D, Minneapolis MN), 5 µg/mL heparin (Sigma, St Louis MO), 2mM glutamine, and antibiotics (Life Technologies, Carlsbad CA)] was added to the tissue, which was filtered (40 µm) and seeded at 2×10^6 cells, in a final volume of 20 mL complete medium, in a poly-2-hydroxyethyl methacrylate-coated (Sigma, St Louis MO) T-75 flask. All cultures were kept at 37C and 5% CO₂. Seven days after seeding, neurospheres were passaged. Suspension neurospheres were either submitted to neuronal differentiation or fixed in 4% paraformaldehyde, cut in a cryostat (12-µm sections) and proceeded to immunofluorescence. Passage-2 neurospheres were plated onto poly-D-lysine-coated coverslips and cultured under differentiating conditions in Neurobasal medium (Life Technologies, Carlsbad CA), supplemented with 1X B27 (Life Technologies, Carlsbad CA), 2.5 µg/mL heparin, 1 mM N-acetylcysteine (Sigma, St Louis MO), 0.2% glucose, 1X insulin-transferrin-selenium compound, 2 mM glutamine and antibiotics (Life Technologies, Carlsbad CA). Every 48 hs, for 12 days, half of the medium was replaced by complete medium, supplemented with 20% conditioned, filtered medium from the same culture. After fixation in 4%

paraformaldehyde for 20 min. at 37C, cells were submitted to indirect immunofluorescence.

Indirect immunofluorescence

After fixation, sectioned suspension neurospheres adhered onto poly-L-lysine-coated slides or differentiated neurosphere cells on coverslips were permeabilized in 0.3% triton-X-100 for 20 min., incubated for 20 min. in 0.1M glycine, blocked in 5% globulin-free bovine serum albumin (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) in phosphate-buffered saline, for one hour, incubated with primary antibody overnight at room temperature, and then with Alexa488-conjugated anti-rabbit or Alexa-568-conjugated anti-mouse secondary antibody in a 400-fold dilution for 90 min. Coverslips were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame CA).. Images were observed and captured at LSM410 confocal microscope (Zeiss, Germany).

Results

FMRP KH-2 domain has the longest variable loop among other human KH domains (Suppl. Material). Among FMRP orthologues, KH-2 variable loop is observed mostly invariably in mammals, and encoded by *Fmr1* exons 11 and 12 (Suppl. Fig. 1A and B). The expression pattern of *Fmr1* exon 12 has not been clearly defined in the central nervous system (CNS) areas where FMRP is mostly abundant.

Exon-12 inclusion in *Fmr1* transcripts

To start studying the functional relevance of *Fmr1* exon 12, we conducted real-time RT-PCR of transcripts from male rat cerebral cortex, hippocampus and cerebellum, on E19 and P2. These are the major encephalic areas of *FMR1* expression, which has been demonstrated to increase between late embryonic and early postnatal developmental periods (Todd and Mack, 2000; Gabel et al., 2004; Irwin et al., 2005; Nimchinsky et al., 2001). The *Cyclophilin A* (*Ppia*; Entrez Gene: 5478)

gene was selected among others for normalization of cerebral cortex and cerebellum data as its transcript levels presented no statistically significant variation within and between different developmental stages (data not shown). In the hippocampus, however, all genes tested presented extensive internal expression variation on E19 or P2. Therefore, hippocampus data is presented without normalization by a housekeeping gene. We also analyzed *Fmr1* hippocampus expression in animals born from different females, which did not differ from those born from the same female. Therefore, the data presented was not affected by different genomic background (data not shown).

The real-time RT-PCR experiments for the whole amount of *Fmr1* transcripts were carried out with a primer pair specific to exons 10 and 11, which should identify every *Fmr1* transcript. Another primer pair, composed of a sense primer annealing in the constant exon 11 and an antisense primer specific to the variable target, exon 12, detects only *Fmr1* transcripts expressing this exon. This experimental approach allowed for individual comparisons within global *Fmr1* expression data or the expression of those transcripts that included exon 12.

The expression pattern of the sum of all *Fmr1* transcripts, generated with the primers hybridizing in the constant region of the gene, is presented in Fig. 1A. The *Fmr1* cerebral cortex or cerebellum expression did not differ between E19 and P2 (N = 8, Student's *t* test, 47.06 vs. 55.91, $p = 0.354$ for the cerebral cortex; and 46.95 vs. 63.24, $p = 0.16$ for the cerebellum). In the same period, *Fmr1* expression had a four-fold, significant increase in the hippocampus (N = 8, Student's *t* test, 33.7 vs. 134.35, $p = 0.0035$).

In our approach, the exon 12-containing RT-PCR product was expected to be amplified from *Fmr1* transcripts that could also carry other alternative exons. Therefore, the results reflect only the presence of exon 12 in the *Fmr1* mRNA (Fig. 1B). The overall expression of exon 12 was relatively low on E19 in the two brain areas and the

cerebellum. In both periods, E19 and P2, the cerebellum presented the lowest levels of exon 12 expression. In the cerebral cortex and cerebellum, there was a significant increase in exon-12 expression between E19 and P2 (N = 8, Student's *t* test, 6.49 vs. 25.83, $p = 0.0009$ for the cerebral cortex; and 5.31 vs. 13.01, $p = 0.006$ for the cerebellum).. In the hippocampus, we observed a trend to increase in exon 12 expression from E19 to P2 (N = 8, Student's *t* test, 7.84 vs. 19.88, $p = 0.0504$).

To evaluate if the results obtained for exon 12 by RT-PCR reflected an actual increase in this exon expression or was an effect of the general raise in *Fmr1* mRNA levels, we estimated the relative inclusion rate of exon 12 for the three encephalic areas in the two developmental points. These data were generated as a mean of ratios between *Fmr1* exon-12 expression and *Fmr1* overall expression for each animal from the group. This estimation roughly defined the rate of exon 12 inclusion among *Fmr1* transcripts. In the hippocampus, on E19, the exon 12 sequence was present in 22% of *Fmr1* transcripts, an inclusion rate that decreased nearly by half (13%) after five days (P2). Although we observed an increase in exon 12 expression between E19 and P2 in the hippocampus, the relative increase in *Fmr1* expression was higher, reducing the inclusion rate of exon 12 at this age and tissue. An inverse pattern could be observed in the cerebellum, where the inclusion rate raised from 4% to 20% after birth in spite of the reduction of total *Fmr1* transcript levels. In frontal cerebral cortex, there was a four-to-five-fold increase of exon 12 inclusion in the perinatal period (12% on E19 vs. 52% on P2), showing that exon 12-expressing *Fmr1* transcripts were prevailing in P2 cerebral cortex. While in general exon-12 inclusion rates in *Fmr1* transcripts varied within a narrow range between 4% and 22%, our results disclosed the frontal cerebral cortex on P2 as a developmental window where *Fmr1* exon 12 splicing is more likely to be a regulated event and FMRP₊₁₂ISO biologically relevant (Fig. 1C).

Exon 12-containing *Fmr1* transcripts are translated *in vivo* into mature FMRP isoforms

The effects of exon 12 expression into mature FMRP isoforms were investigated with polyclonal antibodies directed to a peptide encoded by *Fmr1* exon 12. Sera from two rabbits (3460 and 3462) were used twelve weeks after peptide injection (immune serum) when ELISA data revealed titers higher than 1:204,800 as compared to less than 1:50 in the preimmune serum (Invitrogen, Carlsbad CA). Both immune sera could detect a fusion protein expressing *Fmr1* partial coding sequence (Fig. 2A) and the peptide (Fig. 2B), whereas only 3460 immune serum recognized endogenous bands in the range of the expected molecular mass of 60 to 80 kDa on Western blots of lysates from a cell line (Fig. 2C) or rat cerebral cortex (Fig. 2D). Unspecific bands migrated as 28, 40 and 55 kDa (Fig. 2C). These bands were also present in leukocytes from a fragile X syndrome patient, contrary to the 60- to 80-kDa bands that were absent in that sample, confirming the latter as FMRP (Fig. 2D). The monoclonal antibody 1C3, which recognizes a constant segment of FMRP encoded by *Fmr1* exon 10 was also used to detect FMRP from the cell line (Fig. 2D), brain cortex (Fig. 2D) and leukocytes (Fig. 2D), indicating that the 60-80 kDa bands should be FMRP.

Although recognizing the peptide and bands migrating in SDS-PAGE with the expected molecular mass, differently from the preimmune serum, the lack of specificity of the 3460 immune serum led us to affinity-purify it. The purified fraction was named p3460 and recognized the peptide (Fig. 2B), as well as bands in the 60-80 kDa range besides a 28 kDa-band on blots (Fig. 2D). The 3462 immune serum did not recognize endogenous FMRP but did detect the 28 kDa-protein (Fig. 2C). We believe that the latter protein, which we termed p28k, is a cross reaction, and not related to FMRP by alternative splicing or proteolysis. These data show that the antibody generated (p3460) is able to detect the expression of *Fmr1* exon 12 into mature FMRP isoforms on blots of rat brain cortex lysates.

FMRP₊₁₂ISO are developmentally regulated in the CNS

Based on the semi-quantitative analyses by real-time RT-PCR, we prompted to investigate FMRP₊₁₂ISO expression during the postnatal development of the three central nervous system (CNS) areas previously evaluated by real-time RT-PCR – hippocampus, cerebellum and frontal cerebral cortex. These studies analyzed the expression of FMRP₊₁₂ISO and the ensemble of FMRP isoforms (FMRP₊₁₂ISO plus FMRP₋₁₂ISO) by using p3460 and 1C3 antibodies, respectively. FMRP overall expression increased in the hippocampus and cerebellum, between embryonic day 19 (E19) and postnatal day 42 (P42). In the hippocampus, increased levels of FMRP₊₁₂ISO were observed between P4 and P10. In the cerebellum FMRP₊₁₂ISO presented steady, low levels. In frontal cerebral cortex, no increase has been observed for either FMRP₊₁₂ISO or the full amount of FMRP after P2. However, postnatal levels were slightly higher than at E19 (Fig. 3). Our Western blotting analyses demonstrate that FMRP₊₁₂ISO expression is regulated during development of the frontal cortex, hippocampus and cerebellum in the developmental period analyzed. The Western blotting data correlates with our RT-PCR results as we show that expression of exon 12 increases after birth in the cerebral cortex and cerebellum, whereas in the hippocampus FMRP₊₁₂ISO correspond to a minor fraction of FMRP isoforms at that time frame.

The highest expression levels of FMRP₊₁₂ISO in the frontal cortex were observed at a period (P2-P28) when maturation of a wide range of sensorial circuits is taking place. Therefore, we examined the expression of synapsin as markers of synapsis formation and maturation. In addition, the postsynaptic density 95 protein (PSD95) was used to try to correlate with the maturation levels of dendritic spine-containing neurons. We observed that the expression levels of FMRP₊₁₂ISO in the hippocampus were inversely related with those of the synapsis maturation markers analyzed (Fig. 4), indicating that FMRP₊₁₂ISO may be functionally relevant during synapsis development albeit before its final maturation.

FMRP₊₁₂ISO expression increases during neuronal differentiation *in vitro*

As both 3460 immune serum and the p3460 antibody identify the 28-kDa band, all staining experiments needed to be performed by double-labeling or parallel labeling with either 1C3 or 7G1-1 antibodies. We employed the latter for those analyses that revealed co-labeling of neurons from P12 cerebral cortex (Fig. 4). Although there were neurons labeled only by the 7G1-1 antibody indicating lack of expression of *Fmr1* exon 12, and cells where no FMRP was detected by the monoclonal antibody due to the cross reaction, costaining corroborated that the 3460 antibody recognizes FMRP.

The neuronal distribution of FMRP₊₁₂ISO is corroborated *in vitro* in primary neuronal cultures from the rat cerebral cortex by the co-staining with the neuronal marker β -III tubulin (Supplementary Fig. 2). In order to verify if neuronal differentiation increases the expression of FMRP₊₁₂ISO, we employed primary cultures of suspension neurospheres obtained from E14 rat telencephalic vesicle. Suspension neurospheres had high cytoplasmic expression of the total amount of FMRP isoforms, as observed by the 7G1-1 antibody, but very low levels of FMRP₊₁₂ISO (Fig. 4). Twenty-four hours after plating the neurospheres under adherent conditions, similar amounts of total FMRP and FMRP₊₁₂ISO were observed (Fig. 4). The expression levels of exon 12 into mature FMRP isoforms was further observed twelve days after plating, when cells with a neuronal phenotype exhibited an intense double staining by the 7G1-1 and 3460 antibodies (Fig. 4). The staining pattern obtained by 3460 preimmune serum is shown in a side panel (Fig. 4). In conclusion, our data indicate that in the cerebral cortex FMRP₊₁₂ISO are up-regulated during synaptogenesis, and that neuronal differentiation *in vitro* recapitulates this expression switch.

Immunohistochemistry

To be included

RNAi analyses

To be included

Conflict of Interest Statement

None declared.

Acknowledgements

The authors thank Waldir Caldeira (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brazil) for careful confocal microscope analyses. AMVM and LAH acknowledge financial support from São Paulo Research Foundation, FAPESP (CEPID 1998/14254-2) through the facilities of the Human Genome Research Center (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brazil). Research has been funded by FAPESP grants 2008/53857-8 for LAH and 1998/14254-2 for AMVM.

References

- Ashley CT *et al.* (1993). Human and murine FMR-I: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet* 4 (3): 244-51.
- Black DL (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291-336.
- Bureau I, Shepherd GM, Svoboda K. (2008) Circuit and plasticity defects in the developing somatosensory cortex of FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*. May 14;28(20):5178-88.
- Bureau I. (2009) The development of cortical columns: role of Fragile X mental retardation protein. *J Physiol*. 587(Pt 9):1897-901.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Castets M, Schaeffer C, Bechara E, Schenck A, Khandjian EW, Luche S, Moine H, Rabilloud T, Mandel JL, Bardoni B. (2005) FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 2005 Mar 15;14(6):835-44.
- Chen T, Damaj BB, Herrera C, Lasko P, Richard S. (1997) Self-Association of the Single-KH-Domain Family Members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: Role of the KH Domain. *Mol Cell Biol*, 17:5707–5718
- Darnell JC *et al.* (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH-2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev* 19 (8): 903-18.

- Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell R. (2009) Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum Mol Genet* 18: 17 3164–3177.
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 3(1):31-35.
- Denman, R.B. and Y.J. Sung, *Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **292**(4): p. 1063-9.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P. and Mandel, J. L. 1993. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genet.*, 4, 335-340.
- Didiot MC, Tian Z, Schaeffer C, Subramanian M, Mandel JL, Moine H. (2008) The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *Nucl Acids Res* 36(15):4902-12
- Dolzhanskaya N *et al.* (2006a). Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* 45 (34): 10385-93.
- Dolzhanskaya N *et al.* (2006b). Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J Cell Sci* 119 (9): 1933-46.
- Eichler EE *et al.* (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 2 (8): 1147-53.
- Galvez R, Gopal AR, Greenough WT. (2003) Somatosensory cortical barrel dendritic abnormalities in a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Brain Res.* 971(1):83-9.
- Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 98(13):7101-6.
- Haddad LA *et al* (2002). The TSCI tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem* 277 (46): 44180-6.
- Harlow EG, Till SM, Russell TA, Wijetunge LS, Kind P, Contractor A. (2010) Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of FMR1 knockout mice. *Neuron.* 65(3):385-98.
- Irwin SA, Christmon CA, Grossman AW, Galvez R, Kim SH, DeGrush BJ, Weiler IJ, Greenough WT. 2005 Fragile X mental retardation protein levels increase following complex environment exposure in rat brain regions undergoing active synaptogenesis. *Neurobiol Learn Mem.* May;83(3):180-7.
- Irwin SA, Swain RA, Christmon CA, Chakravarti A, Weiler IJ, Greenough WT. (2000) Evidence for altered Fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. *Neurobiol Learn Mem.* Jul;74(1):87-93.
- Khandjian, E. W., Fortin, A., Thibodeau, A., Tremblay, S., Côté, F., Devys, D., Mandel, J. L. and Rousseau, F. 1995. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 783-789.
- Konur S, Yuste R. (2004) Developmental regulation of spine and filopodial motility in primary visual cortex: reduced effects of activity and sensory deprivation. *Neurobiol.* 59(2):236-46.
- [Liu Z](#), [Luyten I](#), [Bottomley MJ](#), [Messias AC](#), [Houngninou-Molango S](#), [Sprangers R](#), [Zanier K](#), [Krämer A](#), [Sattler M](#). (2001) Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. [Science](#). 2001 Nov 2;294(5544):1098-102.

- Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. (2001) Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci.* 21(14):5139-46.
- Reeve SP, Bassetto L, Genova GK, Kleyner Y, Leyssen M, Jackson FR, Hassan BA. (2005) The *Drosophila* fragile X mental retardation protein controls actin dynamics by directly regulating profilin in the brain. *Curr Biol.* 15(12):1156-63.
- Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron.* 2003 38(6):887-98.
- Siomi, H., et al., *The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein.* *Cell*, 1993. **74**(2): p. 291-8.
- Sittler A *et al.* (1996). Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr 1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* 5 (1): 95-102.
- Todd PK, Malter JS, Mack KJ. (2003) Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 110(2):267-78.
- Valverde R, Edwards L, Regan L (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS Journal* 275:2712–2726.
- Verheij C *et al.* (1993). Characterization and localization of the FMR-I gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 363 (6431): 722-4.
- Verkerk *et al.* (1993). Alternative splicing in the fragile X gene FMRI. *Hum Mol Genet* 2(4): 399-404.
- Yun SW, Platholi J, Flaherty MS, Fu W, Kottmann AH, Toth M. (2006) Fmrp is required for the establishment of the startle response during the critical period of auditory development. *Brain Res.* 2006 Sep 19;1110(1):159-65.

Figure Legends

Figure 1: The frontal cerebral cortex significantly expresses *Fmr1* exon 12 soon after birth. Relative transcript amounts were estimated for *Fmr1* transcripts **(A)** and those transcripts that include *Fmr1* exon 12 **(B)** for rat hippocampus, frontal cerebral cortex and cerebellum on embryonic day 19 (E19) and second postnatal day (P2). The relative inclusion rate of exon 12 was defined as a ratio between exon 12-including transcripts and total *Fmr1* messages **(C)**. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Figure 2: Western blotting analyses with a novel antibody that recognizes *Fmr1* exon 12-encoded segment in FMRP. Two rabbits (3460 and 3462) were immunized against a 12-residue peptide encoded by rat *Fmr1* exon 12 (Invitrogen, Carlsbad CA). **(A)** Lysates of HEK-293 cells overexpressing the coding region of rat *Fmr1* exons 11 through 17, including exon 12, were submitted to Western blotting. Immune serum (I) of rabbits 3460 and 3462 and anti-flag M2 antibody recognize a 35-kDa-band corresponding to the expected molecular mass of the fusion protein, in addition to bands of lower molecular weight, which may be attributable to degradation or cross-reaction (asterisk and arrow, 28 kDa). Preimmune (PI) sera from the same rabbits did not recognize any of the above-mentioned bands. **(B)** Affinity-purified 3460 immune serum (p3460) and 3460 and 3462 immune sera detect the peptide encoded by *Fmr1* exon 12. Preimmune sera do not. **(C)** Western blotting of untransfected HEK-293 reveals endogenous human FMRP specific bands. 3460 immune serum identifies human FMRP isoform as a 75kDa band and recognizes the 28kDa-band. 3462 immune serum does not recognize endogenous FMRP but does detect the 28-kDa protein. **(D)** Western blotting analyses with anti-FMRP antibodies 1C3 (Millipore, Temecula CA), 7G1-1 (Iowa HDB, Iowa City IA) and p3640 in leukocytes from a fragile X syndrome patient and in normal rat cerebral cortex (P8). Arrowheads indicate specific 60-80 kDa

FMRP bands recognized by all three antibodies. p3460 also recognizes the 28-kDa band. Asterisks indicate unspecific bands.

Figure 3: Developmental blot presenting protein bands identified by antibodies directed to γ -tubulin, synapsin, PSD-95 and FMRP (1C3 and p3460). Data are shown for (A) cerebral cortex, (B) hippocampus and (C) cerebellum, at embryonic day 19 (E19) and postnatal days (P) P2, P4, P6, P10, P13, P25 and P42. Molecular mass is indicated according to electrophoretic mobility on SDS-PAGE.

Figure 4: (A-D) Immunofluorescence of 7-DIV suspension neurospheres cultured from dissociated E14 rat telencephalic vesicles. (E-K) Indirect immunofluorescence of neurosphere cells submitted to dish adherence and neuronal differentiation protocol for 1 DIV (E-G) or 12 DIV (H-K). Labeling is shown for 3460 preimmune serum (A, H), 3460 immune serum (B E I), and anti-FMRP 7G1-1 antibody (C, F, J). Overlapping images D, G, and K are respectively from B and C, E and F, and I and J. Scale bars: 25 μ m.

Figure 5: Immunohistochemistry (P12) to be included

Figure 6: RNAi (to be included)

Figures - Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Supplementary Material

The second KH domain (KH-2) of FMRP is encoded by *Fmr1* invariable exons 9, 10, 11 and 13. This domain adopts the $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ fold, and its variable loop is encoded by *Fmr1* exons 11 and 12. The in-frame inclusion of exon 12 in *Fmr1* transcripts extends FMRP KH-2 domain variable loop from 44 to 65 residues in the rat (Suppl. Fig. 1A). To obtain a better view of this segment among animals, we retrieved FMRP sequences from 51 vertebrate species that had the orthologous *Fmr1* gene available at Ensembl database (June 2012, <http://www.ensembl.org>). FMRP sequences from *in silico* translation were aligned (Clustalw2, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). The extended variable loop was observed in the FMRP KH-2 domain from all mammalian orthologues that had no sequence ambiguities. In these 31 mammalian species, FMRP KH-2 variable loop was encoded by *Fmr1* exons 11 and 12. In 30 species, *Fmr1* exon 12 encoded 21 aminoacids. In addition, exon 12-encoded sequence has been observed in the orthologue from one non-mammalian species, the lizard *Anolis carolinensis*. We cannot address if this constitutes a sequencing artifact. Overall, FMRP KH-2 variable loop exhibited some aminoacid variation, which was apparently lesser in regions encoded by exon 12 boundaries. The segment encoded by the boundary between exons 11 and 12 displays 13 fully conserved residues in a stretch of 15. Seven of the last ten aminoacids encoded by *Fmr1* exon 12 are entirely conserved among mammals (Suppl. Fig. 1B). Analyses of the expressed sequence tags (EST) available at the EST database (dbEST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) indicated that exon 12 expression undergoes alternative splicing in at least seven species (*Ornithorhynchus anatinus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Macaca fascicularis* and *Homo sapiens*).

A search at EMBL database (<http://smart.embl-heidelberg.de>) retrieved 96 human KH domain-containing protein sequences. Eighty-eight out of 96 human KH-

domain sequences had three to 15 residues within the variable loop. One KH domain in each of the following four STAR (signal transduction and activation of RNA) proteins had 24 to 28 residues: the splicing factor 1 (SF-1), quaking 1 (QKI), Src substrate-associated during mitosis protein (Sam-68) and Sam-68-like mammalian protein 2 (SLM-2). Four other protein sequences had variable loops with more than 28 residues (FMRP KH-2 domain, one KH domain in the high-density lipoprotein-binding protein vigilin, poly(rC)-binding protein 4 and tudor and KH domain-containing protein). FMRP KH-2 domain variable loop, even in its shortest form without the segment encoded by *Fmr1* exon 12, was the longest among the 96 KH domains analyzed.

Figure Legends

Figure 1: (A) Fragile Mental Retardation Protein (FMRP) displays four regions predicted to bind RNA: two N-terminal Agenet/TUDOR motifs, two K-homology domains (KH1 and KH-2) and one RGG box (Siomi *et al.*, 1993; Adinolfi *et al.*, 2003). Each KH domain in FMRP has the canonical $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ -fold. FMRP KH-2 domain variable loop may be extended (dotted line) by the expression of *Fmr1* exon 12. (B) Alignment of 11 representative mammalian FMRP KH-2 domain sequences. *FMR1* invariable exons 9, 10, and 13 code for FMRP KH-2 domain sequence that adopts the $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ fold (shown in primary structure and secondary prediction only), where α and β stand respectively for α -helix and β -sheet; GXXG for the constant loop. The variable loop and the encoding exons are indicated. Asterisks denote 100% identity.

Figure 2: FMRP₊₁₂ISO are identified in neuronal cells. Primary cultures of E20 rat cerebral cortex were fixed and submitted to immunofluorescence with antibodies identifying the neuronal marker β III-tubulin or FMRP (1C3), doubly labeled with 3460 immune serum.

Figures

Figure 1

A

B

Figure 2