

Suppressors of a *lin-12* Hypomorph Define Genes That Interact With Both *lin-12* and *glp-1* in *Caenorhabditis elegans*

ABSTRACT

The *lin-12* gene of *Caenorhabditis elegans* is thought to encode a receptor which mediates cell-cell interactions required to specify certain cell fates. Reversion of the egg-laying defective phenotype caused by a hypomorphic *lin-12* allele identified rare extragenic suppressor mutations in five genes, *sel-1*, *sel-9*, *sel-10*, *sel-11* and *sel(ar40)* (*sel* = suppressor and/or enhancer of *lin-12*). Mutations in each of these *sel* genes suppress defects associated with reduced *lin-12* activity, and enhance at least one defect associated with elevated *lin-12* activity. None of the *sel* mutations cause any obvious phenotype in a wild-type background. Gene dosage experiments suggest that *sel-1* and *sel(ar40)* mutations are

lin-12 é um gene que pertence à família dos genes *Notch*, na altura já conhecidos em *Drosophila*, *Xenopus*, *Mus* (incluindo um oncogene), *Rattus* e *Homo*. Nos casos estudados devidamente, sabia-se que são proteínas de membrana envolvidas em interações à superfície das células cuja ação origina bifurcações das linhagens do desenvolvimento.

A deteção de parceiros de interação com estas proteínas implica, a nível genético, uma de duas estratégias: isolamento de mutantes com o mesmo fenótipo que só possa ser recuperado por complementação, ou de mutantes que suprimem o fenótipo. A primeira abordagem tinha falhado até aí, recorreram à segunda.

http://www.wormbook.org/chapters/www_lin12Notch/lin12notch.html

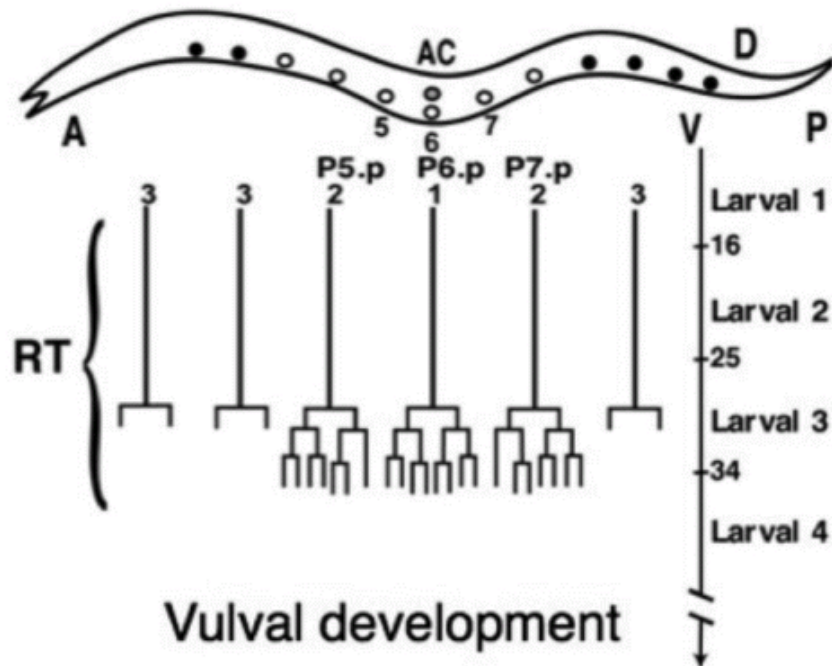
Summary of relevant phenotypes of *lin-12* mutants

Genotype	No. of ACs ^a	VPC fates						Vulval phenotype	Egg-laying phenotype	% proximal germline mitosis
		P3.p	P4.p	P5.p	P6.p	P7.p	P8.p			
<i>lin-12(d)</i> strong	0	2°	2°	2°	2°	2°	2°	Muv	0 AC-Egl	0
<i>lin-12(d)</i> weak	0	3°	3°	3°	3°	3°	3°	Vul	0 AC-Egl	0
<i>lin-12(+)</i>	1	3°	3°	2°	1°	2°	3°	WT	WT	0
<i>lin-12(n676n930)</i>	1 or 2			variable ^b				Variable ^b	Egl	35
<i>lin-12(0)</i>	2	3°	3°	1°	1°	1°	3°	Evi	Sterile	100

Muv, Multivulva; Vul, Vulvaless; Evi, abnormally everted vulva.

^a ACs derived from Z1.ppp and/or Z4.aaa. Additional ACs derived from other cells are sometimes found in *lin-12(0)* and *lin-12(h)* mutants (GREENWALD, STERNBERG and HORVITZ 1983; SEYDOUX, SCHEDL and GREENWALD 1990; SUNDARAM and GREENWALD 1993).

^b See Table 5 and SUNDARAM and GREENWALD (1993) for a detailed description of VPC fates and other vulval defects in *lin-12(n676n930)* mutants.



Lista de alelos

lin-12(0) amórficos; *lin-12(d)* hipomórficos dominantes, sem célula-âncora (AC) necessária à indução da volva; *lin-12(n676n930)* hipomórfico recessivo com elevada penetrância a 25 °C

Mutagénese por EMS: screening de mutantes que revertam o fenótipo mutante de *lin-12* (incapacidade de postura dos ovos). Isolaram indivíduos F₂ que punham ovos. De 500000 equivalentes haplóides, isolaram 14 mutantes em 5 *loci* que receberam o nome coletivo *sel*. As mutações foram analisadas geneticamente para determinar dominâncias, mapeamento, e interações entre *loci*.

sel mutations suppress the maternal-effect lethality caused by *glp-1(e2142)*

Relevant genotype	Average brood size \pm standard deviation	
	25°	20°
<i>glp-1(e2142)</i> ¹	0 (33)	12 \pm 6 (5)
<i>glp-1(e2142)</i> ²	ND	4 \pm 4 (25)
<i>sel(ar40); glp-1(e2142)</i> ³	151 \pm 18 (10)	324 (1)
<i>sel(ar40)/+; glp-1(e2142)</i> ⁴	38 \pm 22 (12)	251 \pm 5 (2)
<i>glp-1(e2142); sel-1(e1948)</i> ⁵	17 \pm 11 (17)	219 \pm 22 (6)
<i>glp-1(e2142); sel-1(e1948)/+⁶</i>	0.2 \pm 1 (25)	2 \pm 2 (10)
<i>glp-1(e2142); sel-9(ar26)</i> ⁵	119 \pm 29 (13)	191 \pm 23 (5)
<i>glp-1(e2142); sel-9(ar26)/+⁶</i>	1 \pm 1 (12)	119 \pm 16 (5)
<i>glp-1(e2142); sel(arX)</i> <i>sel-10(ar41)</i> ⁵	5 \pm 7 (10)	29 \pm 16 (7)
<i>glp-1(e2142); sel(arX)</i> <i>sel-10(ar41)/+⁶</i>	ND	15 \pm 4 (12)
<i>glp-1(e2142); sel-10(ar41)</i> ⁷	0 (25)	23 \pm 12 (10)
<i>glp-1(e2142); sel-11(ar39)</i> ⁵	46 \pm 20 (10)	142 \pm 9 (5)
<i>glp-1(e2142); sel-11(ar39)/+⁶</i>	3 \pm 4 (18)	50 \pm 30 (12)

The number of animals scored is given in parentheses. 25° and 20° experiments were done by slightly different methods (see MATERIALS AND METHODS).

¹ *unc-36 glp-1(e2142); rol-3*.

² *unc-36 glp-1(e2142)/+ glp-1(e2142); rol-3 +/+ him-5*.

³ *sel(ar40); unc-36 glp-1(e2142)*.

⁴ *sel(ar40)/+; unc-36 glp-1(e2142)/+ glp-1(e2142); him-5/+*.

⁵ *unc-36 glp-1(e2142); rol-3 sel*.

⁶ *unc-36 glp-1(e2142)/+ glp-1(e2142); rol-3 sel +/+ + him-5*.

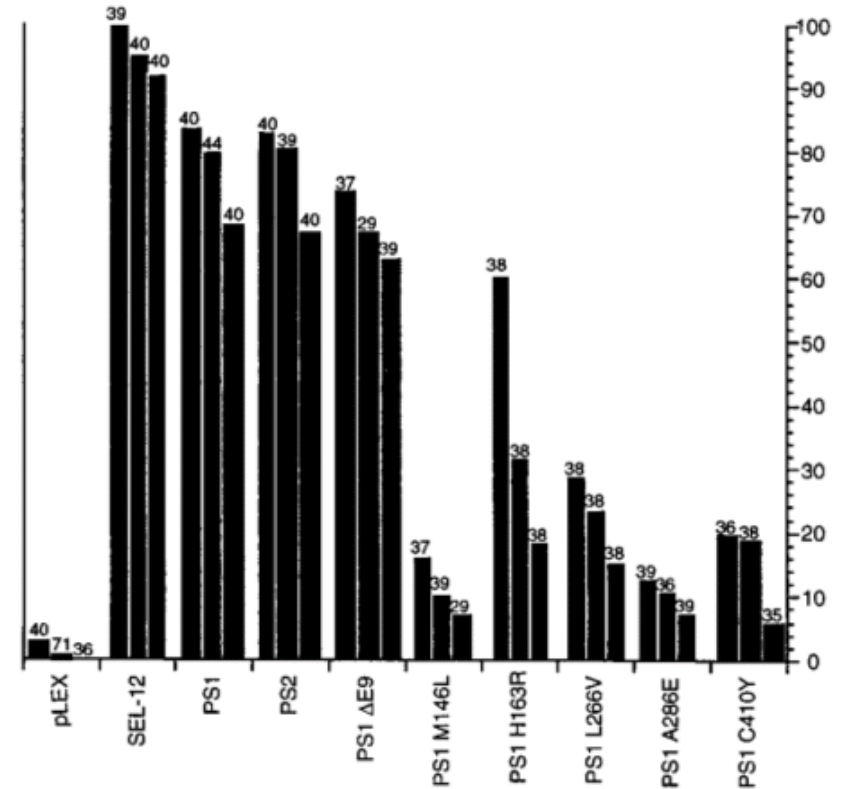
⁷ *unc-36 glp-1(e2142); lon-3 sel-10(ar41)*.

Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*

(Alzheimer disease/*sel-12*/genetics/transgenic nematode/expression)

O produto do gene *sel-12* tem sequência de aminoácidos 50% idêntica às proteínas humanas PS1 e PS2 (Presenilin 1 e 2), e foi identificado como revertente dum fenótipo de expressão constitutiva de *lin-12*.

Injetaram plasmídeos pLEX, com o promotor de *lin-12*, contendo os cDNAs de PS1 ou PS2 na linhagem germinal de hermafroditas de *C. elegans*.



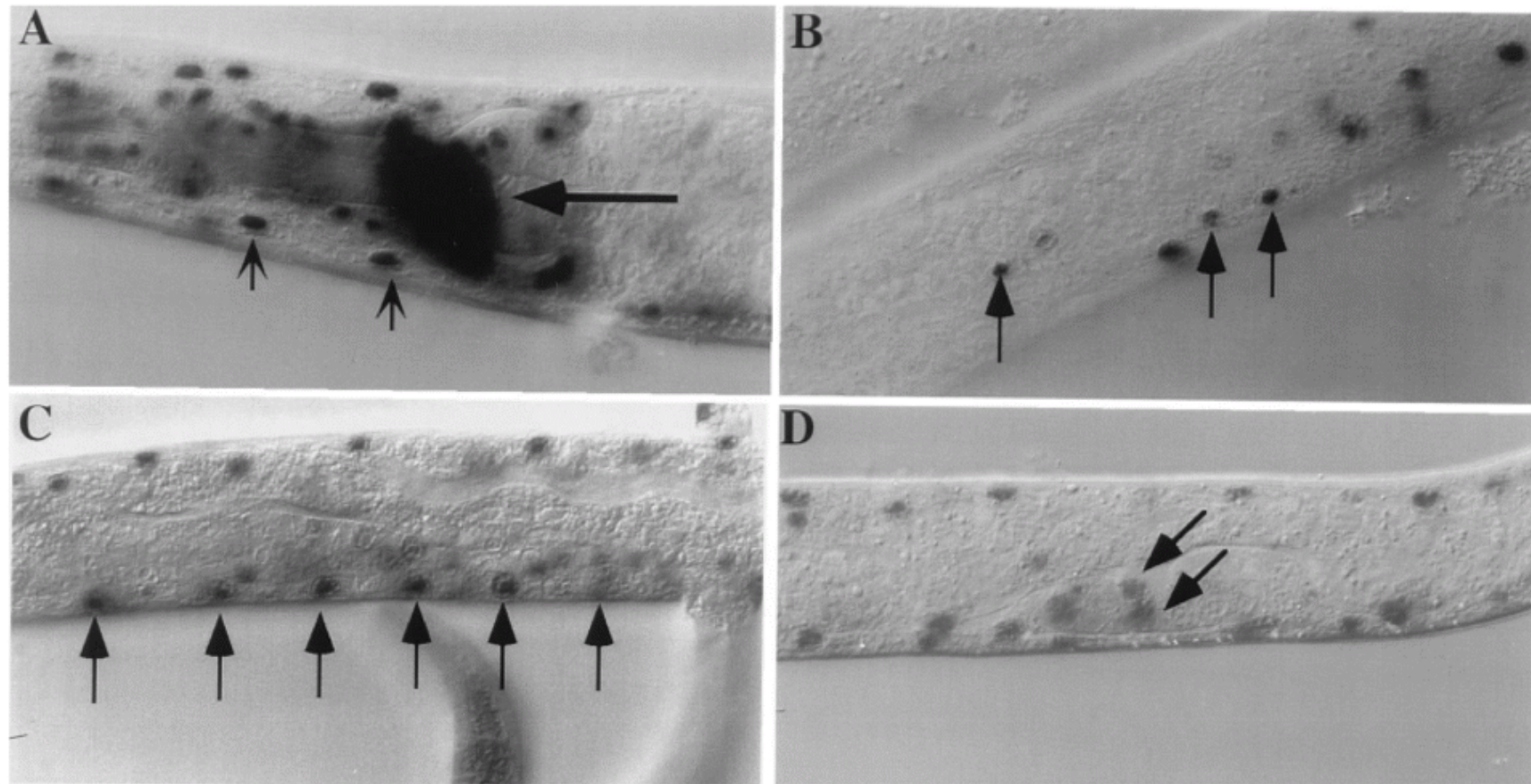


FIG. 3. Transgenic hermaphrodites expressing a *sel-12::lacZ* transgene. Expression is seen in neural and nonneural cells. (A) Adult. Large arrow indicates nerve ring; smaller arrows indicate muscle nuclei. (B) Adult. Arrows indicate ventral cord nuclei. (C) L3 larva. Arrows indicate nuclei of the vulval precursor cells P3.p–P8.p. (D). L2 larva. Arrows indicate the nuclei of the somatic gonadal cells Z1.ppp and Z4.aaa. *sel-12* activity has been shown to influence the fates of P3.p–P8.p and Z1.ppp and Z4.aaa in sensitized genetic backgrounds (11). Compromised neural function associated with reduced activity has not yet been seen in the nerve ring or ventral cord, possibly because an appropriate sensitized genetic background has not been examined. Complete genotype: *smg-1(r861) unc-54(r293); arIs17* [pRF4, pIB1Z17].

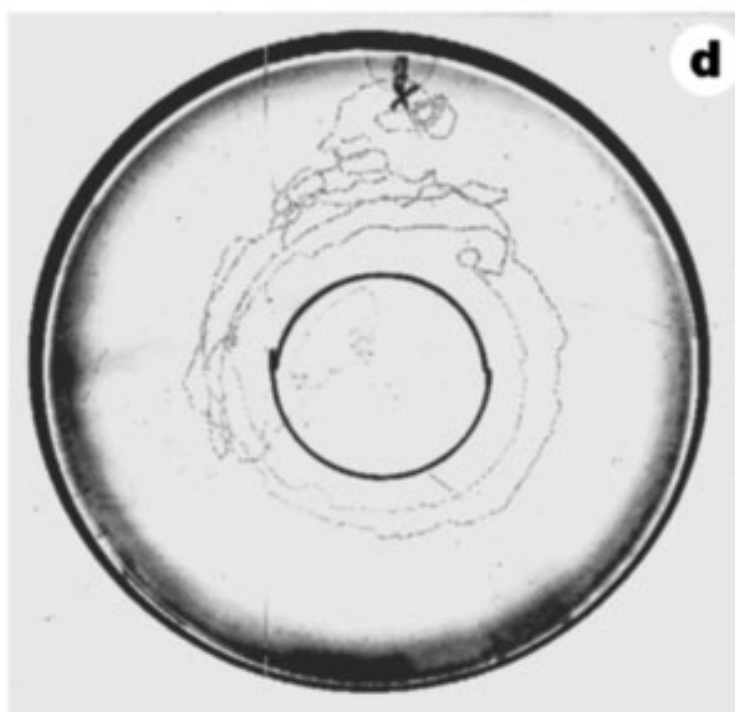
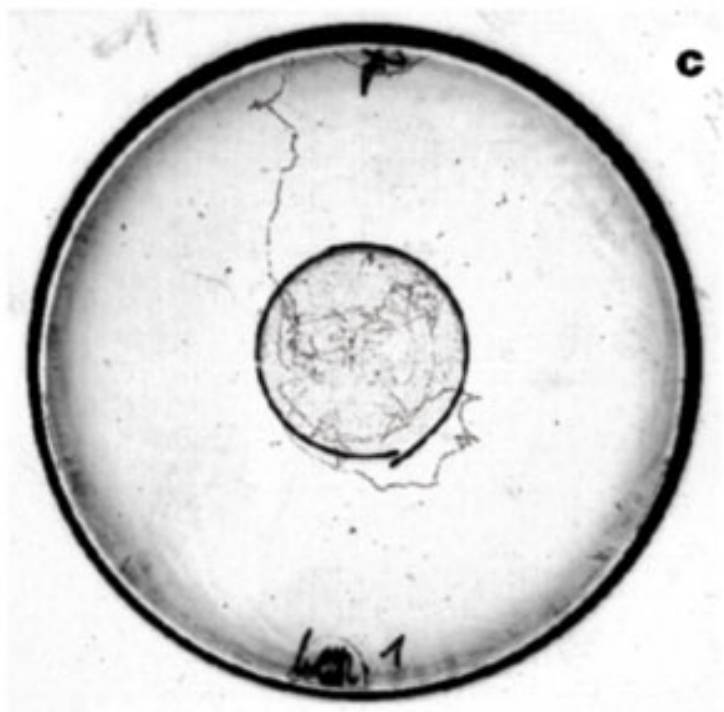
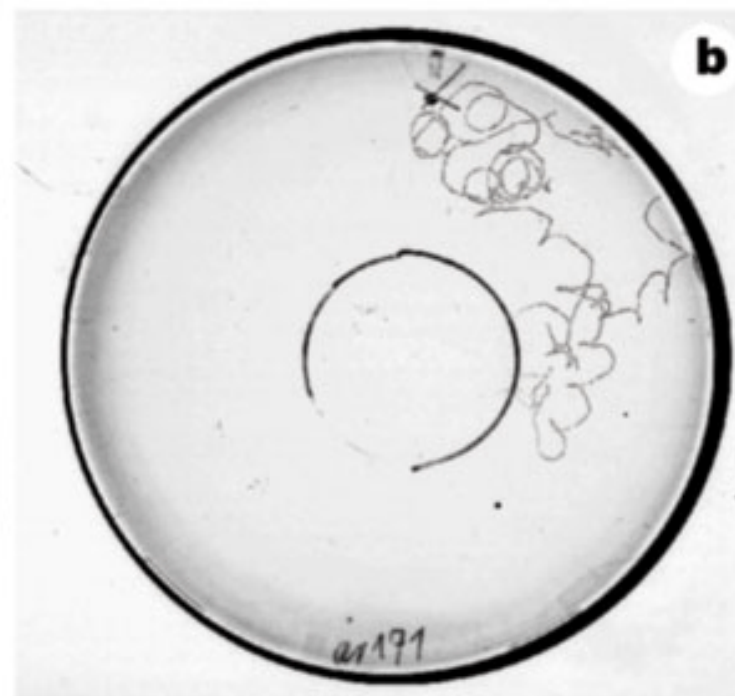
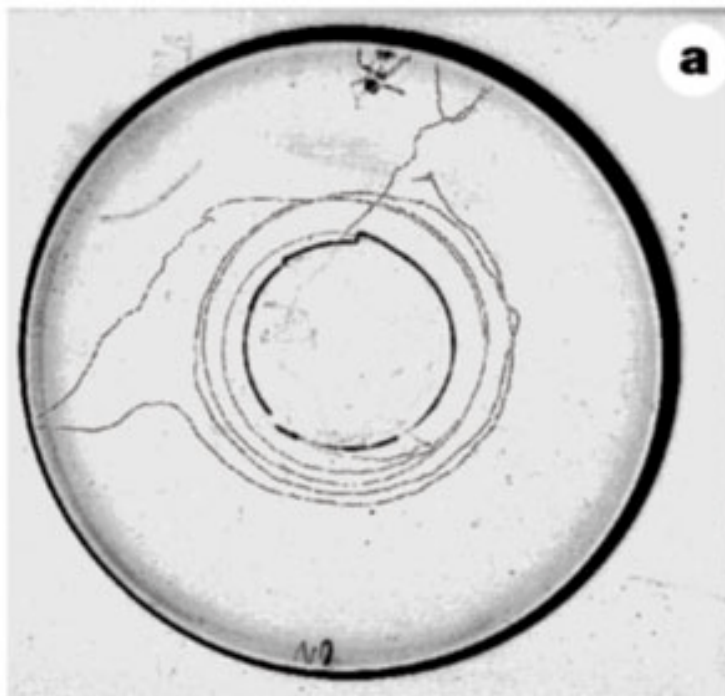


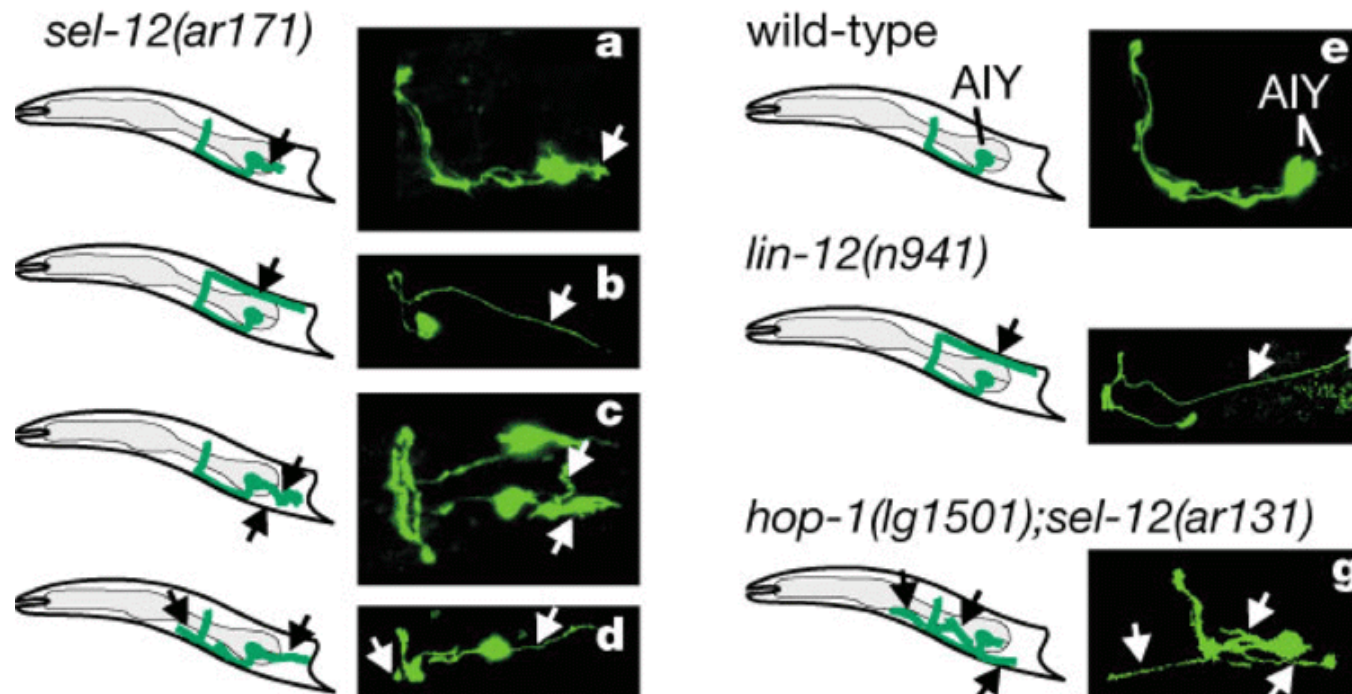
Table 1 Rescue of the *sel-12* thermotaxis defect

Genotype	Transgene	Fraction showing isothermal tracks
Wild type*		41/46
<i>sel-12(ar131)</i>		1/42
<i>sel-12(ar171)</i>		3/38
<i>hop-1(lg1501)</i>		0/44
<i>lin-12(n941)</i>		0/15
<i>hop-1(lg1501);sel-12(ar131)</i>		0/31
<i>hop-1(lg1501);sel-12(ar171)</i>		0/33
<i>sel-12(ar171);bys101</i>	<i>sel-12::sel-12</i>	38/49
<i>sel-12(ar171);bys100</i>	<i>sel-12::sel-12</i>	19/41
Wild type†		49/55
<i>sel-12(ar131)†</i>		3/40
<i>sel-12(ar171)†</i>		2/39
<i>sel-12(ar131); byEx103†</i>	<i>ttx-3::sel-12</i>	18/42
<i>sel-12(ar131); byEx115†</i>	<i>ttx-3::sel-12</i>	21/41
<i>sel-12(ar131); byEx115†</i>	<i>ttx-3::sel-12</i>	35/67
<i>sel-12(ar171); byEx115†</i>	<i>ttx-3::sel-12</i>	18/41

* Strain carries a *daf-6(e1377)* mutation that did not affect thermotaxis behaviour.

† Animals expressing *ttx-3::GFP*.

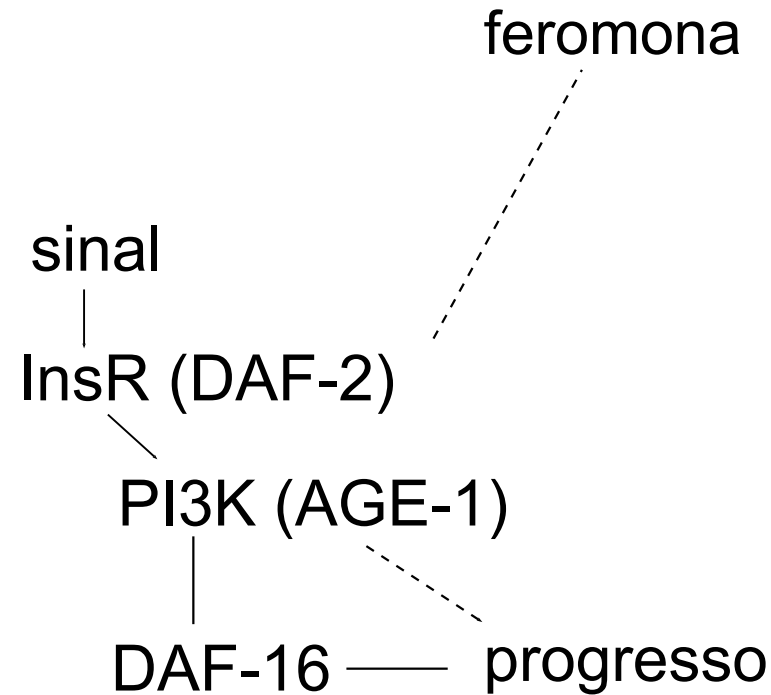
bys100 and *bys101* are independent chromosomally integrated arrays expressing *sel-12* cDNA from the *sel-12* promoter.



The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*

Scott Ogg, Suzanne Paradis, Shoshanna Gottlieb,
Garth I. Patterson, Linda Lee, Heidi A. Tissenbaum
& Gary Ruvkun

Wild-type animals enter the developmentally arrested dauer stage in response to high levels of a secreted pheromone³, accumulating large amounts of fat in their intestines and hypodermis. Mutants in DAF-2 (a homologue of the mammalian insulin receptor) and AGE-1 (a homologue of the catalytic subunit of mammalian phosphatidylinositol 3-OH kinase) arrest development at the dauer stage³. Moreover, animals bearing weak or temperature-sensitive mutations in *daf-2* and *age-1* can develop reproductively, but nevertheless show increased energy storage and longevity^{1,2,4,5}. Here we show that null mutations in *daf-16* suppress the effects of mutations in *daf-2* or *age-1*; lack of *daf-16* bypasses the need for this insulin receptor-like signalling pathway. The principal role of DAF-2/AGE-1 signalling is thus to antagonize DAF-16. *daf-16* is widely expressed and encodes three



% dauer a 25 °C sem/com feromona

WT	0/35,8%
<i>daf-2(e1370)</i>	95,2/– %
<i>daf-16(mgDf50)</i>	0/23,9% (incompletos)
<i>daf-16;daf-2</i>	0/– %

Alelos de *DAF-16* isolados
após mutagénese por raios γ

Homologia com membros da
família Fork Head (fatores de
transcrição)

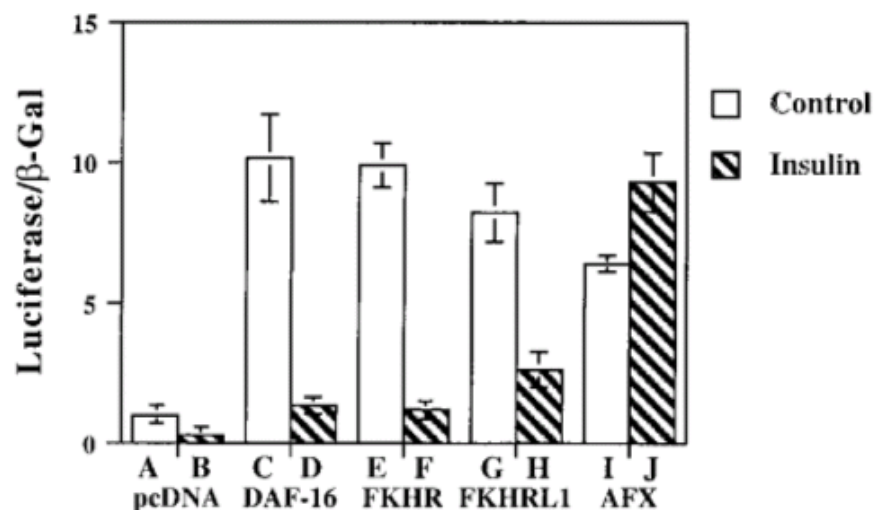
DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells

Nargis Nasrin*, Scott Ogg†, Catherine M. Cahill*, William Biggs†, Simin Nui*, Justin Dore*, Dominica Calvo⁵, Yang Shi*, Gary Ruvkun†, and Maria C. Alexander-Bridges*†

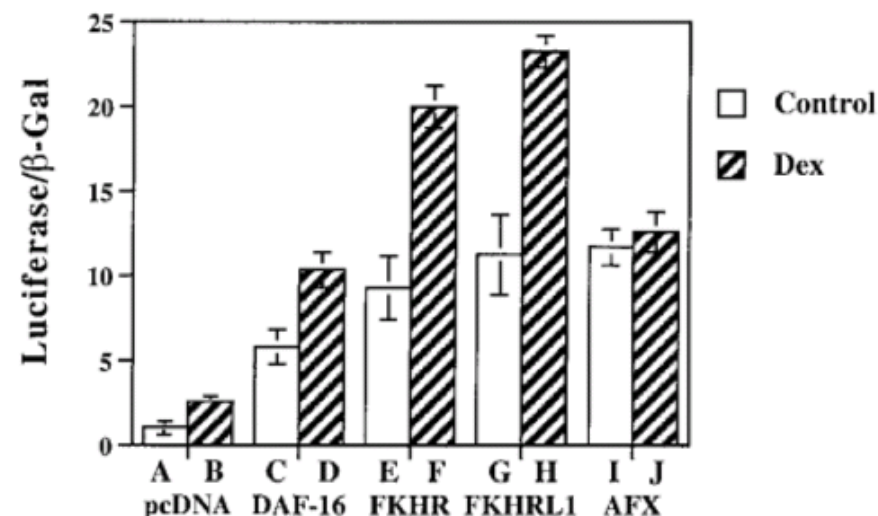
Células HepG2 (derivadas de hepatoma) como modelo metabólico do hepatócito, respondem a moduladores do metabolismo como a insulina e glucocorticoides.

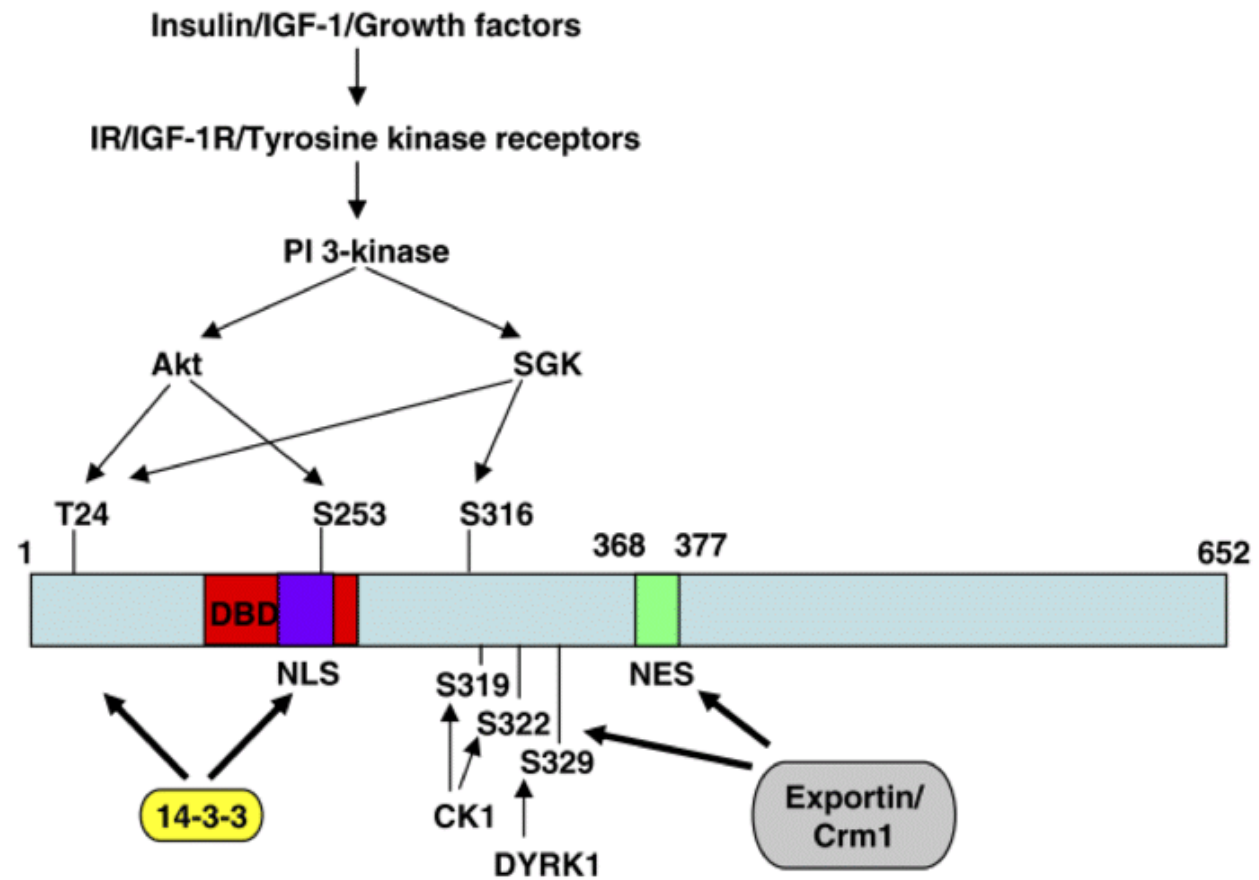
Co-transfecção de plasmídeos reporter contendo promotores com o IRE (elemento de resposta à insulina) e de expressão de DAF-16 e membros da família Fork Head

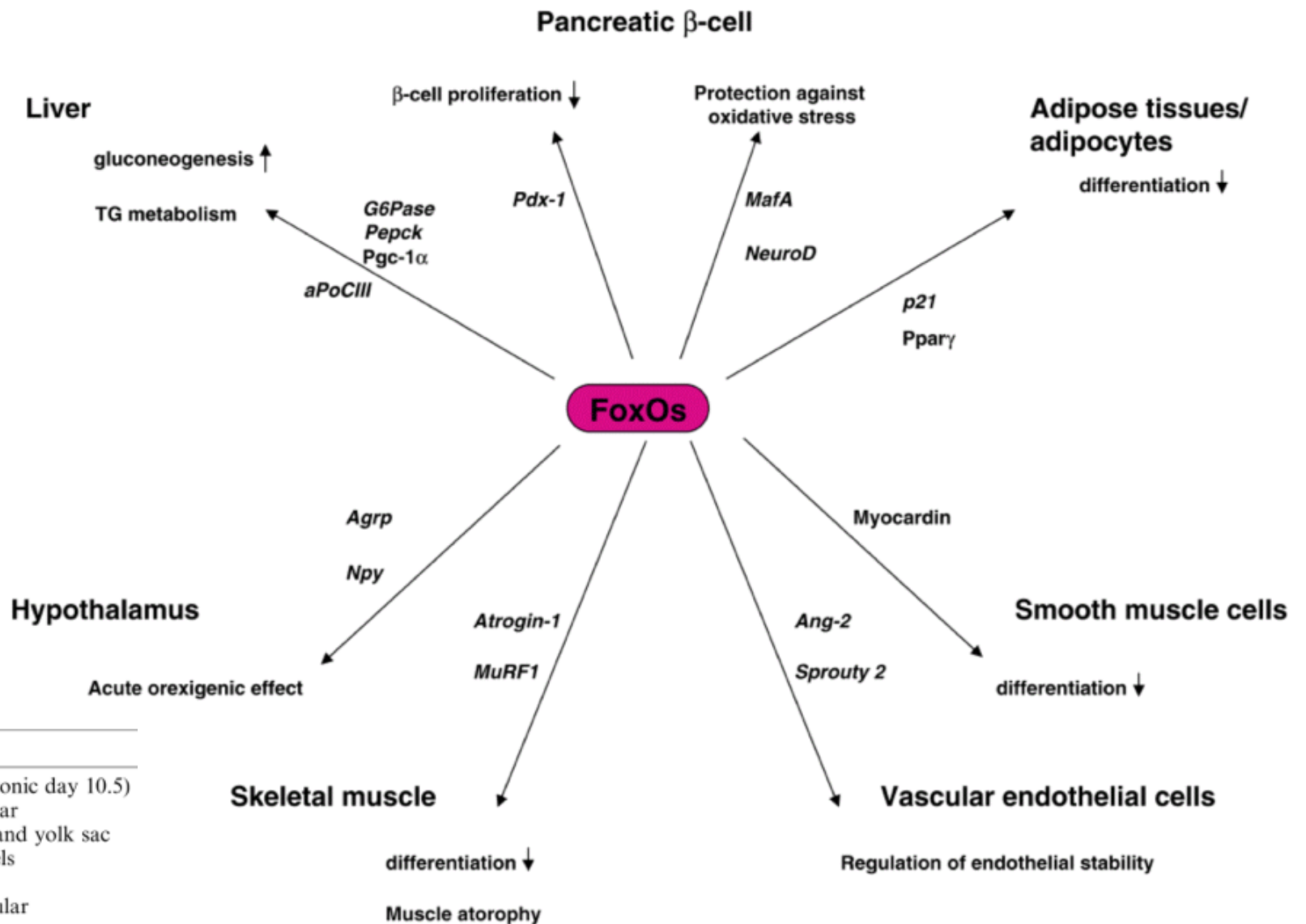
A. Effect of Insulin on DAF-16 and Homologues



B. Effect of Dex on DAF-16 and Homologues







Phenotypes of FoxOs knockout mice

Knockout mice	Phenotypes
<i>FoxO1</i> ^{-/-}	Embryonic lethal (embryonic day 10.5) Defects of normal vascular development in embryo and yolk sac Lack of aortic arch vessels
<i>FoxO3a</i> ^{-/-}	Viable Abnormal ovarian follicular development Hematological abnormalities Pituitary adenoma/female, ovarian stromal tumor
<i>FoxO4</i> ^{-/-}	Viable Impaired neointima formation Lung adenoma/adenocarcinoma Pituitary adenoma/female
<i>Mx-Cre</i> ⁺ , <i>FoxO1/3/4</i> ^{L/L}	Lymphoblastic thymic lymphoma Hemangioma

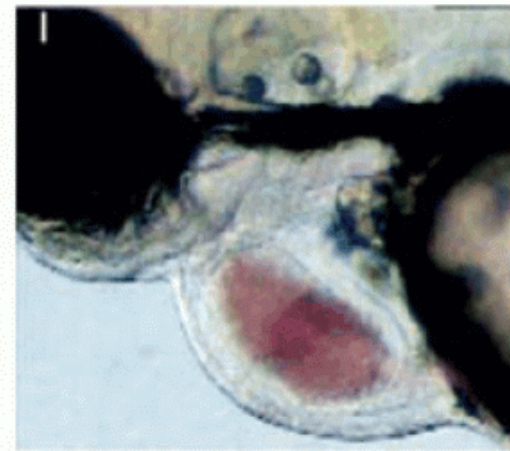
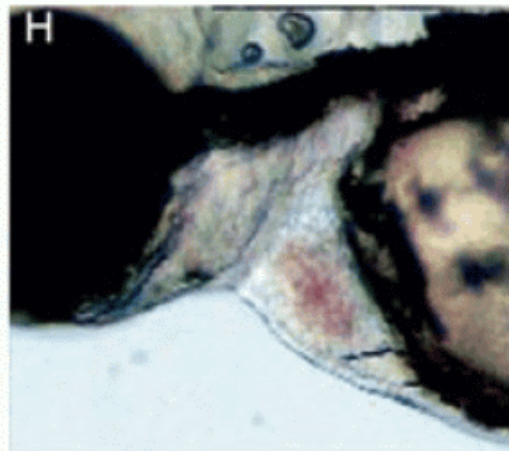
Early Myocardial Function Affects Endocardial Cushion Development in Zebrafish

Thomas Bartman^{1,2,3,4}, Emily C. Walsh^{1,5}, Kuo-Kuang Wen⁶, Melissa McKane⁶, Jihui Ren⁶, Jonathan Alexander^{1,7},
Peter A. Rubenstein⁶, Didier Y. R. Stainier^{1*}

BMP-4 no limite A-V ————— anel do endocárdio ————— "almofada" do endocárdio
42 hpf 48 hpf 72–96 hpf

Mutante $cfk^{-/-}$ deficiente na formação do anel do endocárdio, não estabelecendo circulação (como devia às 36 hpf, logo que o tubo cardíaco se encurva) e exibindo dilatação cardíaca

WT



$cfk^{-/-}$

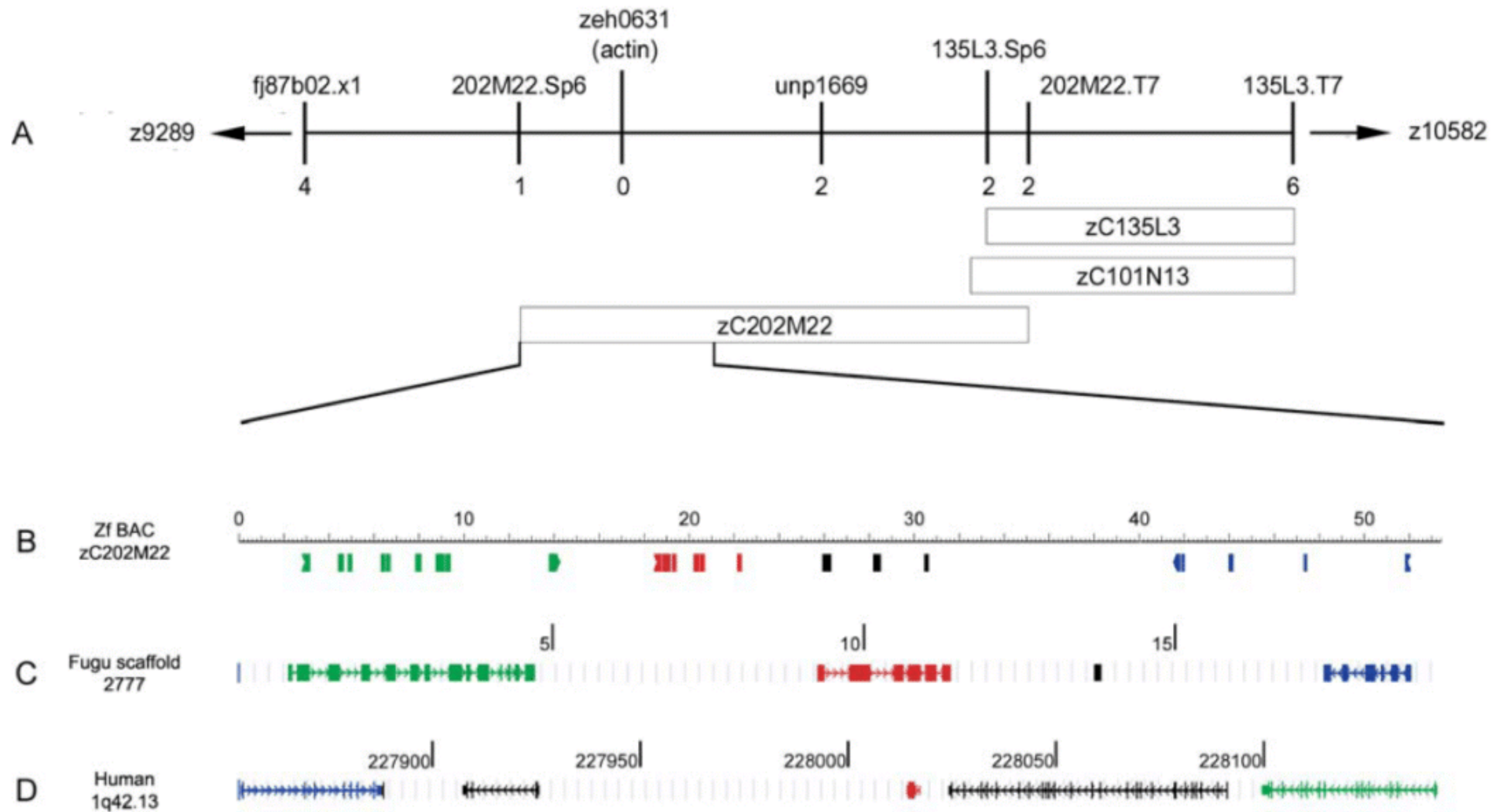
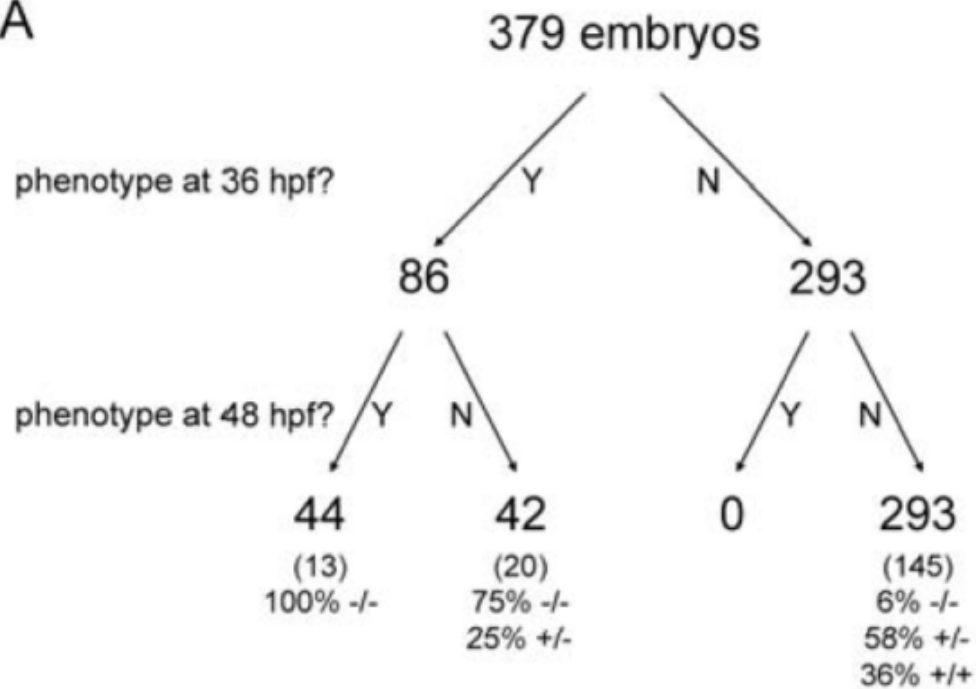


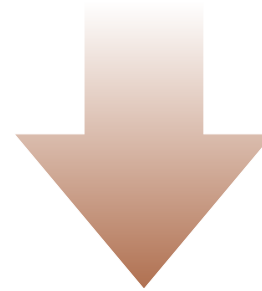
Figure 2. Positional Cloning of *cfk*

cfk codifica uma actina sarcomérica, e a mutação *cfk*^{s11} substitui uma arg conservada em todas as actinas, necessária à polimerização em filamentos. Replicaram esta mutação em levedura e o efeito detetado foi o de redução do crescimento em meio hiperosmótico

A

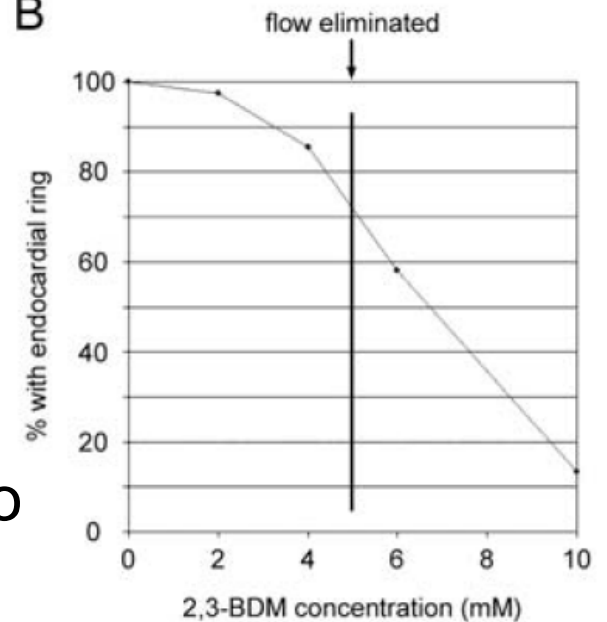


Penetrância do alelo cfk^{s11} em $-/-$:
 81% (36 hpf) e 47 % (48 hpf); em +/- 6%
 e 0% respetivamente
 Formação da “almofada” do
 endocárdio dissociada do fluxo
 sanguíneo?



Tentaram uma fenocópia pelo tratamento com 2,3-butanedione monoxime (inibidor da contração das miofibrilhas): a formação do anel do endocárdio diminuiu, mas também dissociada do fluxo sanguíneo (58% ainda formam o anel de miocárdio com 6 mM)

B



Hipótese: a actina de cfk participa apenas neste processo morfogénético, e o seu homólogo humano poderia ser o alvo de mutações que implicam malformações cardíacas sem afetarem o funcionamento do miocárdio

Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development

Dimitris Beis^{1,*§}, Thomas Bartman^{1,†}, Suk-Won Jin¹, Ian C. Scott¹, Leonard A. D'Amico¹, Elke A. Ober^{1,‡}, Heather Verkade¹, Julie Frantsve¹, Holly A. Field¹, Ann Wehman², Herwig Baier², Alexandra Tallafuss³, Laure Bally-Cuif³, Jau-Nian Chen⁴, Didier Y. R. Stainier^{1,§} and Benno Jungblut^{1,§}

Aplicaram doses mutagénicas de etil-nitrosureia (ENU) a mais de 2000 famílias F₂, de que resultaram:

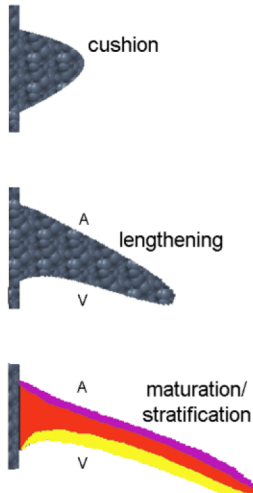
Table 1. Summary of the mutants identified in our forward genetic screen

Phenotypic groups	Alleles	Loci (CG)	Heart defects	Previously identified loci
Cellular organization defects	4	4	Cell morphology defects	<i>oko meduzy (ome)</i>
Left-right asymmetry, random heart jogging	2	2	Random heart and endodermal organ positioning at 36 hpf	
Large heart	2	2	AV mis-specification	<i>santa (san)</i> , <i>valentine (vtn)</i>
Blood regurgitation at the AV canal	12	10	Outflow tract stenosis, lack of cuboidal AV endocardium	
Ventricular defects cause sinoatrial regurgitation	17	13	Noncontracting ventricle, collapsed ventricle, ventricle fails at 80 hpf	
Sinoatrial regurgitation without obvious ventricular defects	6	6	Excessive ECM between endocardial/myocardial cells, lack of ECs	
Heart fins and jaw defects	5	5	Lack of ECs	<i>hands off (han)</i> , <i>logelei (log)</i>
Day 4 heart defects	7	6	AV cushion and atrial endocardium defects	
Total (in eight groups)	55	48		5

The mutants exhibit atrioventricular (AV) or sinoatrial blood regurgitation at 48 or 96 hpf. Groups are ordered according to the time of appearance of the regurgitation phenotype, from earlier to later. Allele numbers of each one and mapping positions for a subset of the mutants is in Table S1 in the supplementary material. CG, complementation group.

Uma das conclusões que tiraram, é que o desenvolvimento da almofada do endocárdio se faz pela transição epitélio-mesênquima de células do endocárdio situadas no limite entre o ventrículo e a aurícula (isto é, na região definida pelo anel do endocárdio), possivelmente dependente de contrações do miocárdio

Table 1 Zebrafish cardiac mutants with related human disease

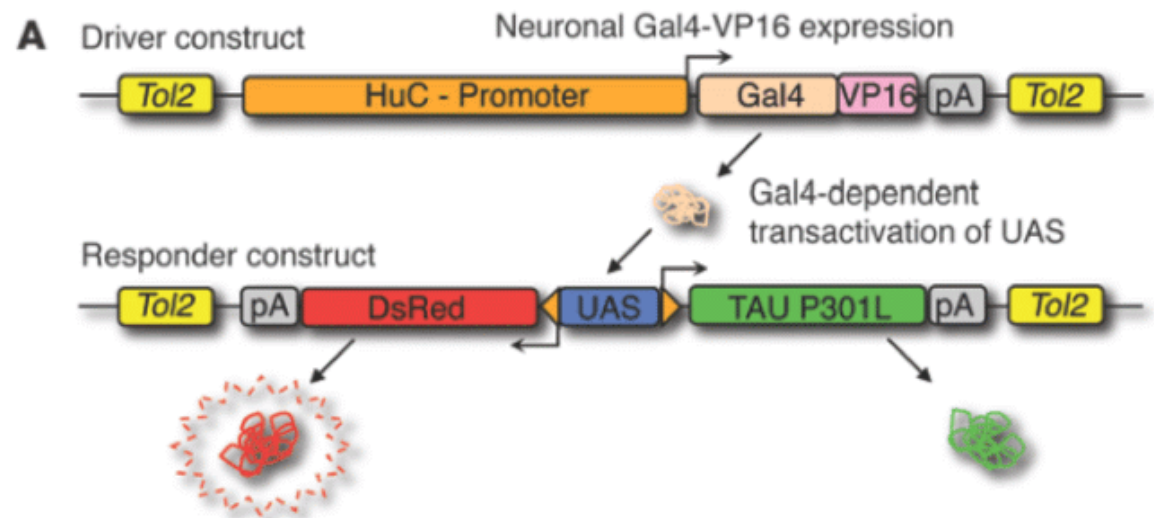
Zebrafish gene name	Zebrafish loss-of-function phenotype	Human gene name	Related human heart disease				
<i>one-eyed-pinhead/egf-cfc</i>	Reduced mesendoderm differentiation, visceral laterality defects and cardia bifida	<i>CRYPTIC</i>	Dextrocardia, transposition of the great arteries, double-outlet-right-ventricle, AVS defect				
<i>lost-a-fin/alk8</i>	Unlooped heart with reduced atrium	<i>ALK2</i>	AVS defect, mitral valve malformation				
<i>jeekyll/ugdh</i>	AV valves fail to form	<i>UGDH</i>	AVS defect				
<i>apc</i>	Unlooped heart with hyperplastic endocardial cushions	<i>APC</i>	AVS defect				
<i>silent-heart/tnnt2</i>	Poorly contractile ventricle and atrium	<i>TNNT2</i>	DCM and HCM				
<i>pickwick/ttn</i>	Poorly contractile ventricle and atrium	<i>TTN</i>	DCM				
<i>lost-contact/main-squeeze/ilk</i>	Reduced contractility and aberrant cardiomyocyte shape, dilated and reptured blood vessels	<i>ILK</i>	DCM				
<i>laminin alpha 4</i>	Genetic interaction with lost-contact/ilk	<i>LAMA4</i>	DCM		mouse	chick	zebrafish
<i>nexilin/nexn</i>	Disturbed sarcomere integrity and dilated heart	<i>NEXN</i>	DCM		E9.5	E3	6 dpf
<i>chap</i>	Disturbed sarcomere integrity and dilated heart	<i>CHAP</i>	Unknown		E14.5	E7	16 dpf
					E17.5-postnatal	E10-E14	~28 dpf - adult (variable)

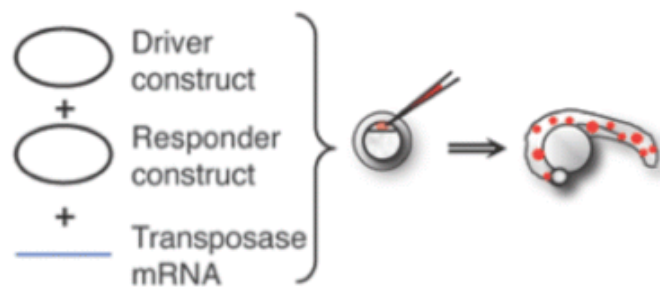
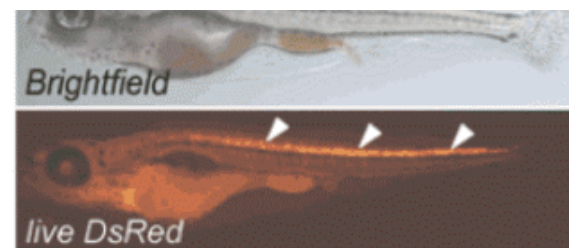
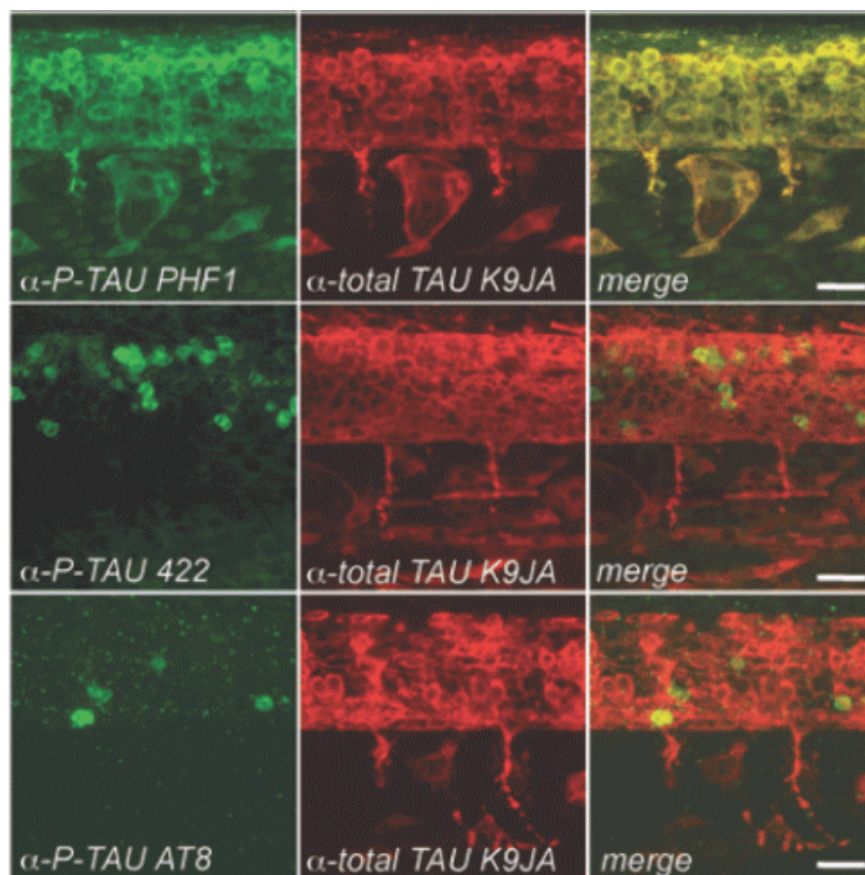
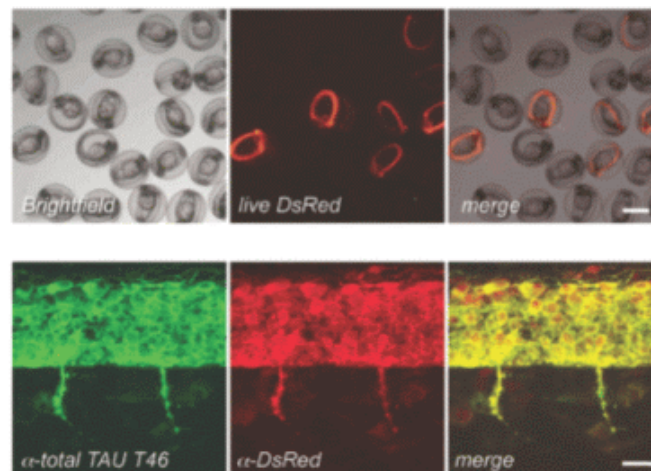
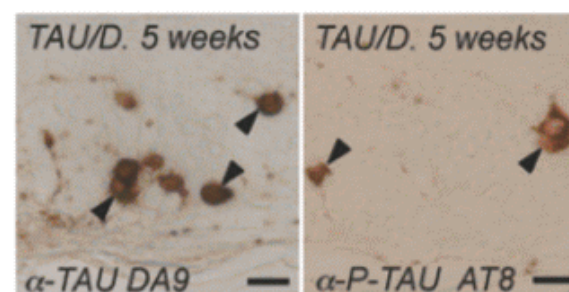
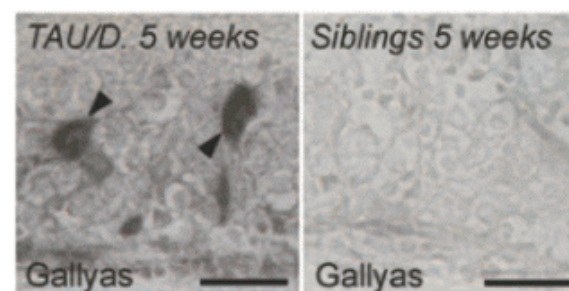
A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation

Dominik Paquet,^{1,2} Ratan Bhat,³ Astrid Sydow,⁴ Eva-Maria Mandelkow,⁴
Stefan Berg,³ Sven Hellberg,³ Johanna Fäلتing,³ Martin Distel,⁵
Reinhard W. Köster,⁵ Bettina Schmid,^{1,2} and Christian Haass^{1,2}

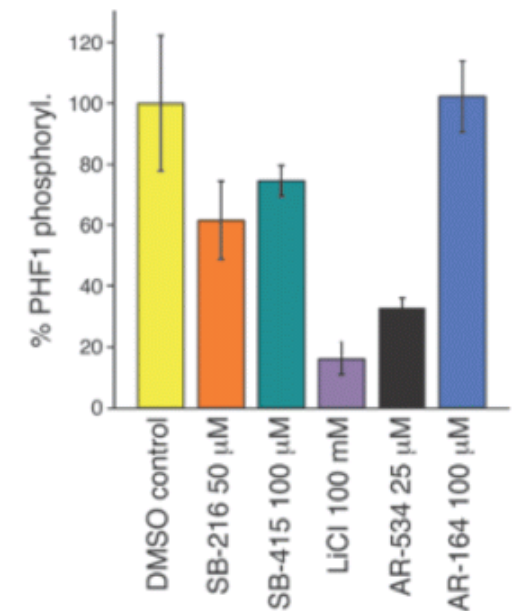
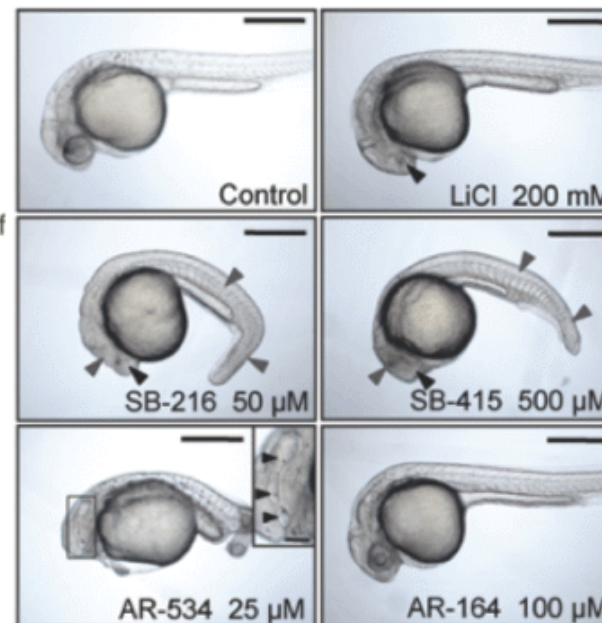
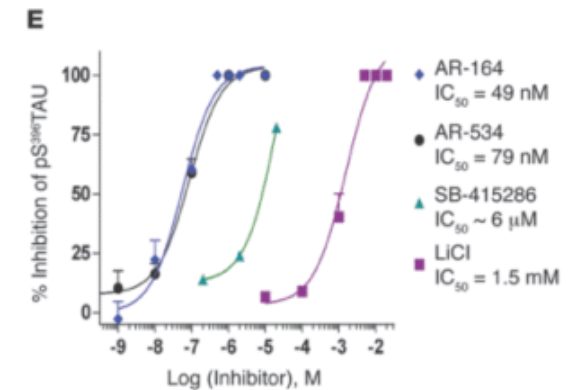
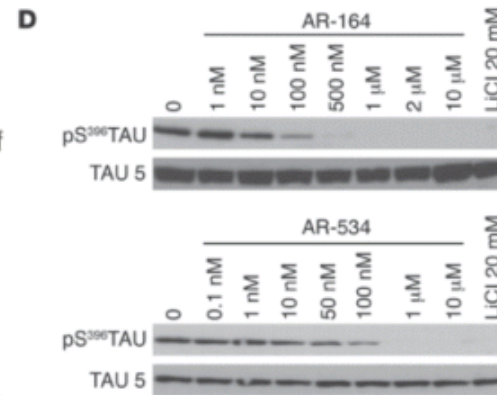
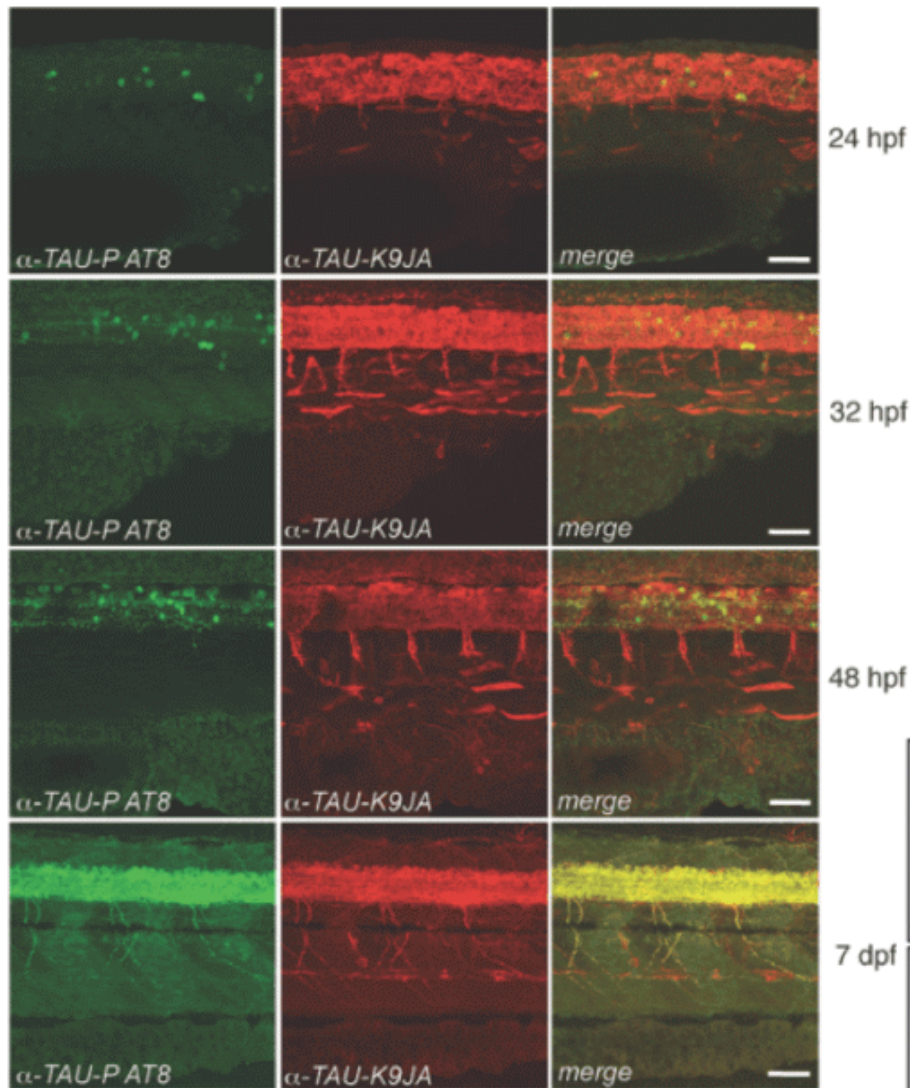
Our aging society is confronted with a dramatic increase of patients suffering from tauopathies, which include Alzheimer disease and certain frontotemporal dementias. These disorders are characterized by typical neuropathological lesions including hyperphosphorylation and subsequent aggregation of TAU protein and neuronal cell death. Currently, no mechanism-based cures are available. We generated fluorescently labeled TAU transgenic zebrafish, which rapidly recapitulated key pathological features of tauopathies, including phosphorylation and conformational changes of human TAU protein, tangle formation, neuronal and behavioral disturbances, and cell death. Due to their optical transparency and small size, zebrafish larvae are well suited for both in vivo imaging and drug development. TAU-induced neuronal cell death was imaged by time-lapse microscopy in vivo. Furthermore, we used this zebrafish model to identify compounds targeting the TAU kinase glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). We identified a newly developed

tauopatias: hiperfosforilação da TAU destaca-a dos microtúbulos, de que resulta agregação, que é patogénica para os neurónios. GSK3 β é apenas uma das quinases suspeitas. O teste de inibidores em murganhos não tem trazido resultados. Resolveram testar dois inibidores, que demonstraram bons resultados em culturas celulares, num modelo de peixe-zebra que expressa mutantes TAU associados a demência frontotemporal em neurónios.



B**C****E****F**

A acumulação de TAU patogénico correlaciona com morte de neurónios, alterações da morfologia dos neurónios e ausência de reação de escape (ver filme)



a permeabilidade ao AR-164 num teste que reproduz a barreira hematoencefálica é 3x menor que ao AR-534

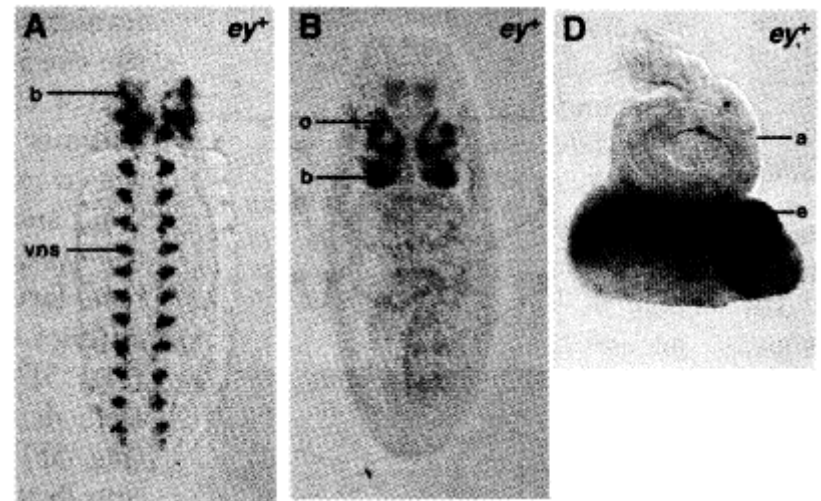
Induction of Ectopic Eyes by Targeted Expression of the *eyeless* Gene in *Drosophila*

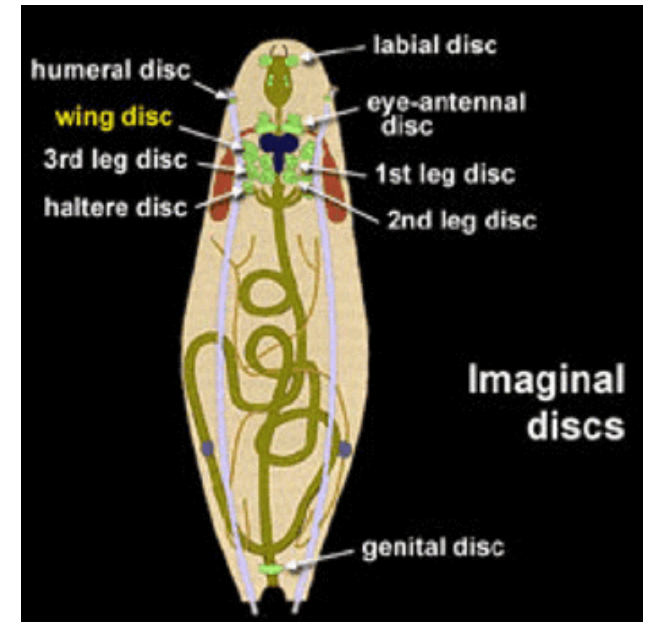
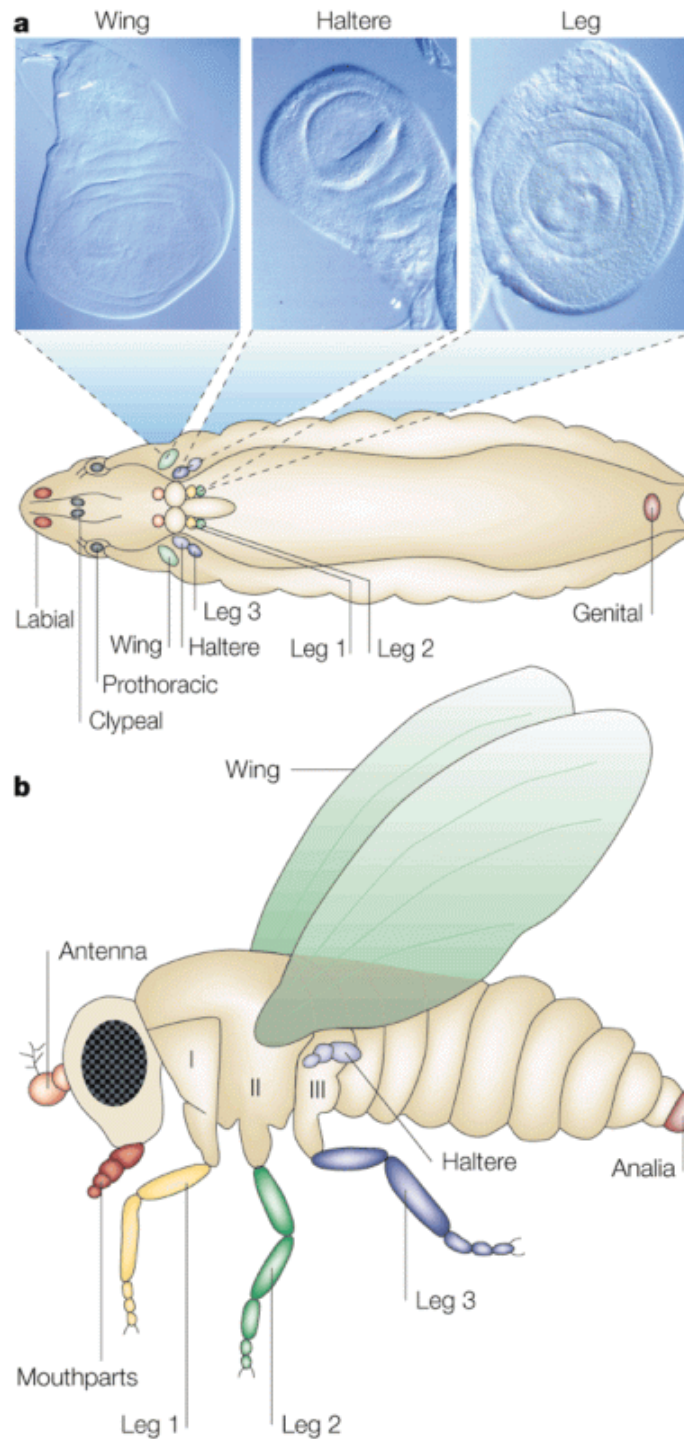
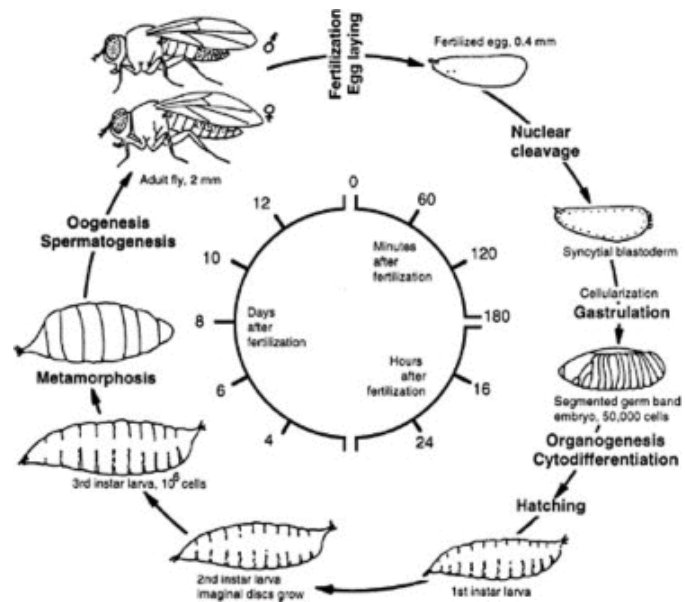
Georg Halder,* Patrick Callaerts,* Walter J. Gehring†

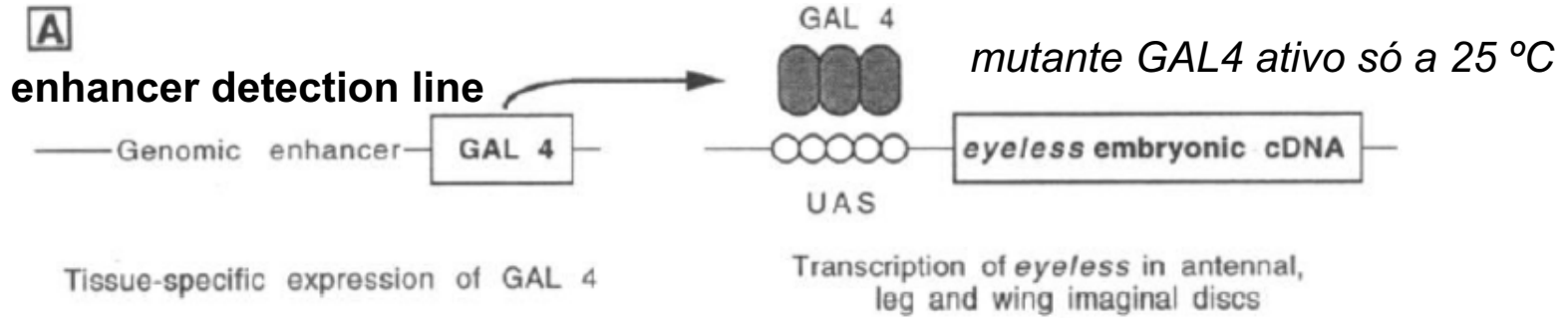
The *Drosophila* gene *eyeless* (*ey*) encodes a transcription factor with both a paired domain and a homeodomain. It is homologous to the mouse *Small eye* (*Pax-6*) gene and to the *Aniridia* gene in humans. These genes share extensive sequence identity, the position of three intron splice sites is conserved, and these genes are expressed similarly in the developing nervous system and in the eye during morphogenesis. Loss-of-function mu-

Semelhança de expressão em várias fases do desenvolvimento e em várias estruturas: no murganho, *Sey* (*PAX-6*) começa por expressar-se no encéfalo, seguido do tubo neural até ao extremo posterior. Aos 8,5 dpc, aparece no sulco ótico, seguido do cálice ótico e da retina neural, assim como na ectoderme adjacente (cristalino, córnea). Mais tarde (1-2 dias) também aparece nos primórdios nasais.

Expressão de *ey* em 3 fases do desenvolvimento em *Drosophila*

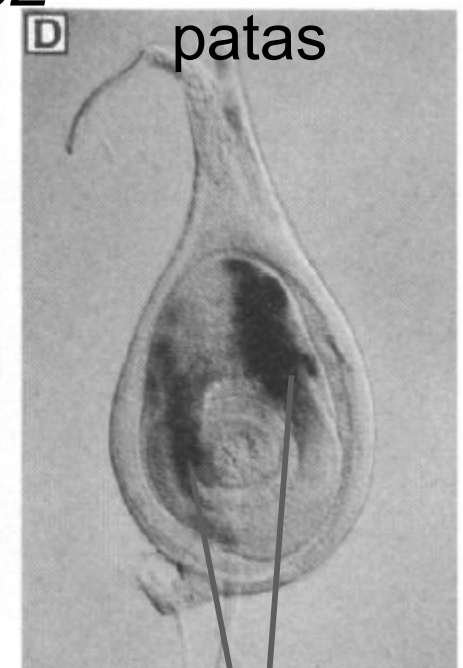
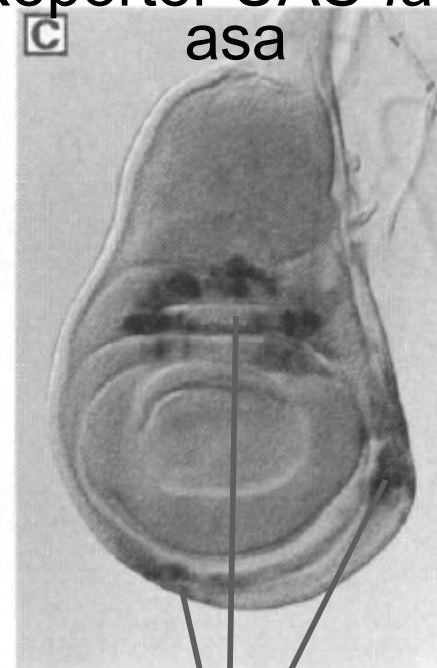
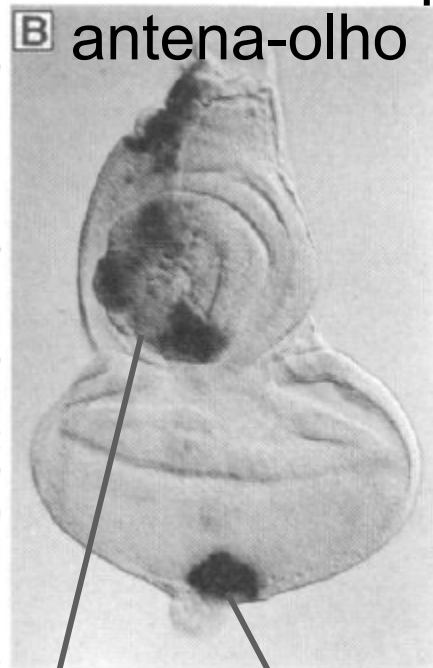






GAL4-crosses were established at 25°C on standard medium. The GAL4 lines were crossed to a number of UAS-*ey* lines and most of these crosses led to embryonic or early larval lethality. This outcome is probably the result of the ectopic expression of *ey* in various tissues during embryogenesis because the GAL4 lines start to express GAL4 during embryonic stages. In crosses with the MS941, p339, and E132 lines, transheterozygote adults were recovered. For MS941, almost no lethality was observed, whereas for p339 and E132, a substantial number of dead embryos or larvae were noted. For line E132, virtually only females were obtained because most males died during the early phases of development. This result may be explained by the dependence of the lethality on the level of transactivation of *ey* by GAL4. In the E132 line, the enhancer detector construct is inserted into the X chromosome and therefore, is dosage-compensated in males. As a consequence, the transheterozygous males produce twice as much GAL4 activity as the females, and die during larval stages, whereas the females survive. Thus, all cuticles shown are derived from females.

Reporter UAS-*lacZ*



cutícula da cabeça

nervo ótico

três regiões da asa

tíbia e fémur

Cabeça



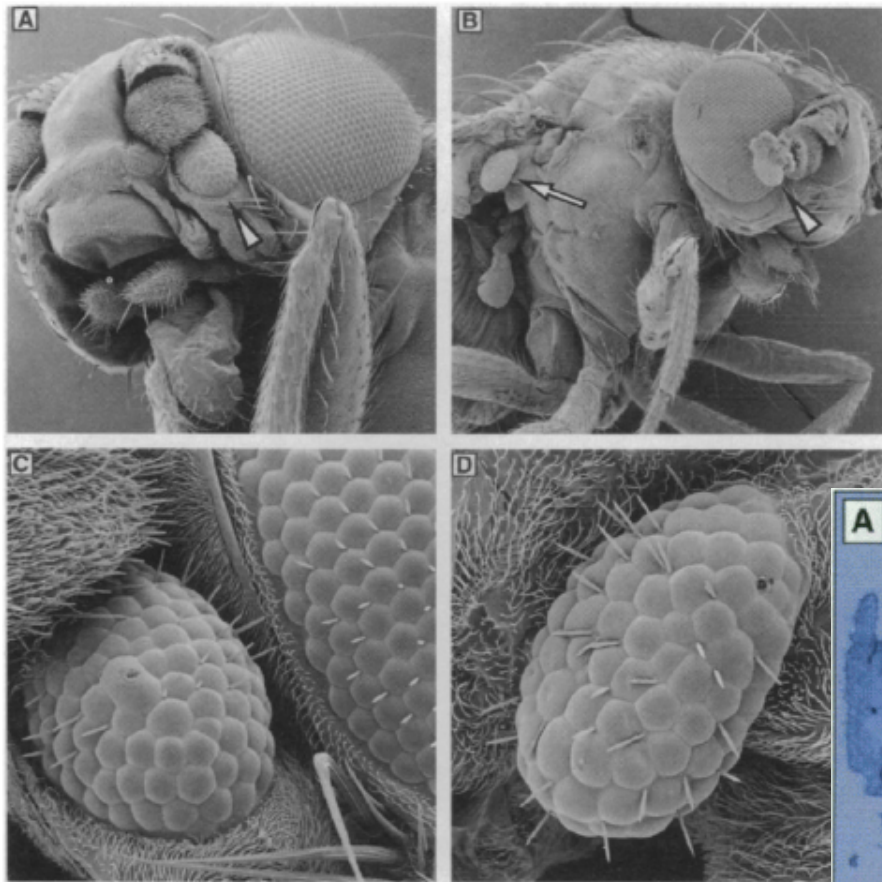
Asa



Antena

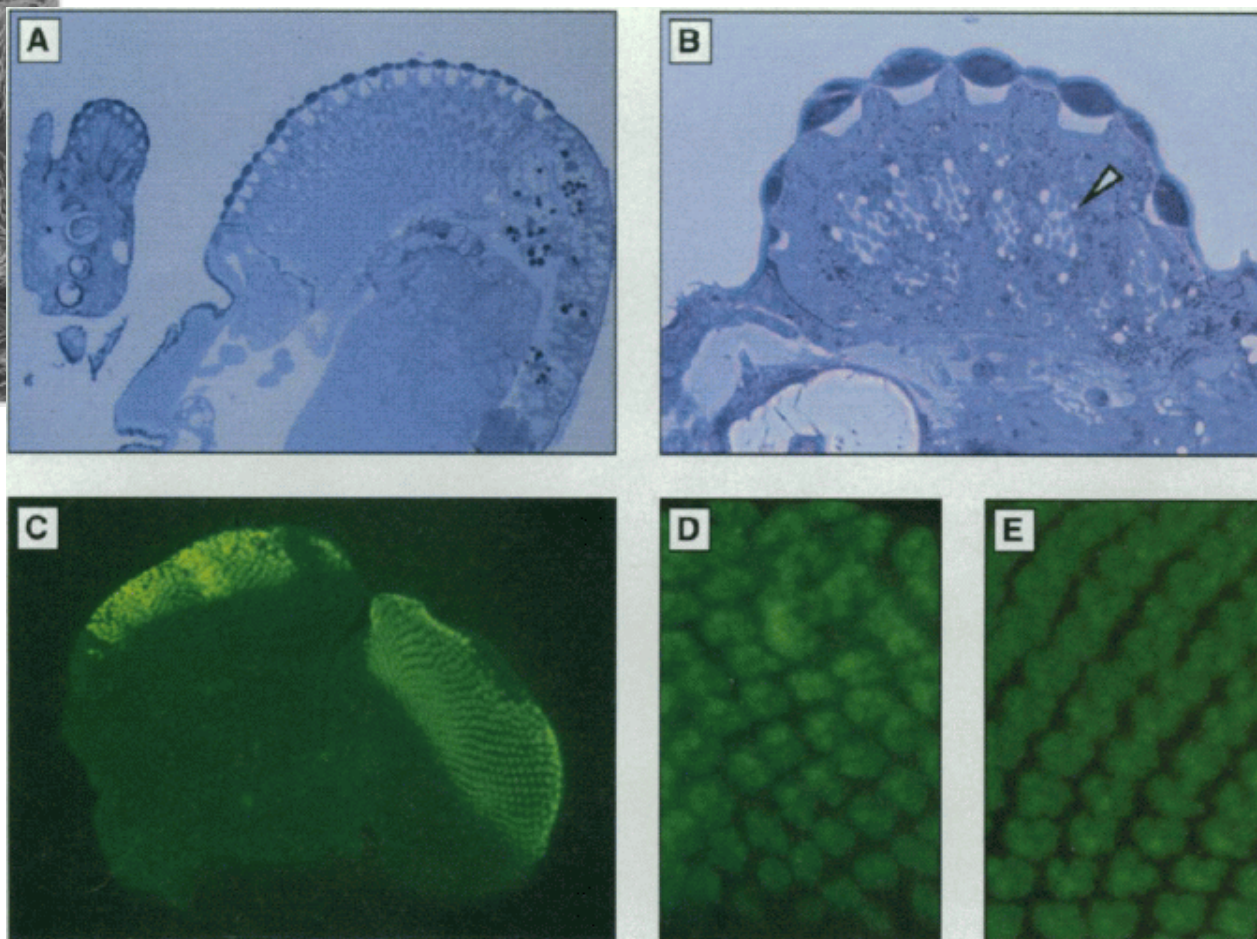


Tíbia



Estruturas normais* morfologicamente e também anatomicamente

*(exceto no número de facetas)

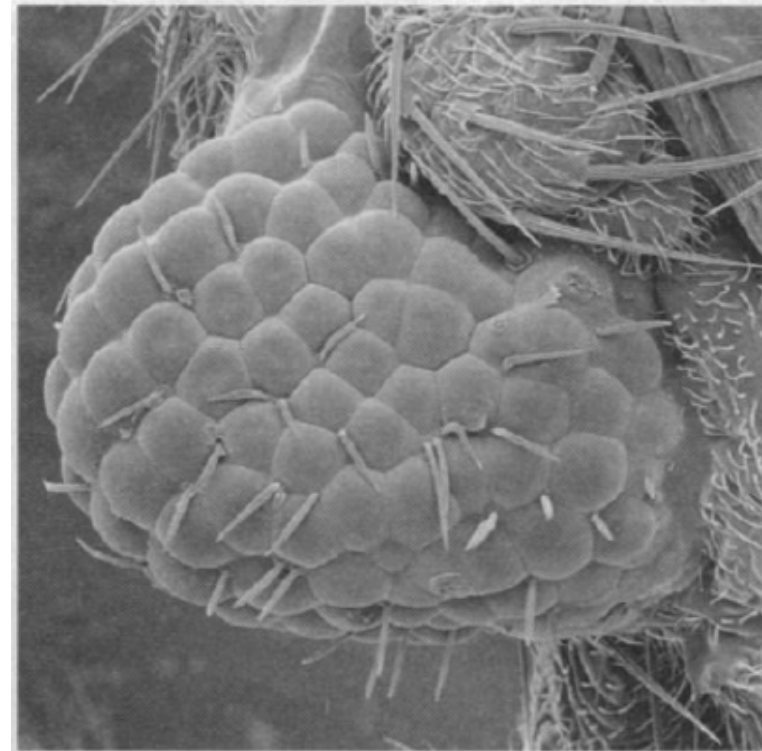


Se *ey* é o “master regulator” para a morfogénese do olho facetado, e 15% do número de “enhancer detection lines” têm expressão no disco imaginal do olho numa fase a jusante da de *ey*, estimaram que cerca de 2500 genes dependem de *ey*. Esta interação é na sua maioria indireta (através doutros genes), mas como a expressão de *ey* é prolongada, pode ser necessária para outras fases do desenvolvimento.

Hipótese

O homólogo *Sey* (PAX-6 em murganho) pode produzir também olhos ectópicos em *Drosophila*

The full-length mouse Pax-6 cDNA (a gift of C. Walther and P. Gruss) was cloned as a Not I–Xho I fragment in the GAL-UAS vector [pUAST (11)]. Flies were transformed as described in (15). To ectopically induce the mouse Pax-6 gene, the UAS–Pax-6 transformant lines were crossed to the E132 GAL4 expressing line as for the *Drosophila* gene (14). The figure shows an ectopic eye on a second leg of a male.



Aspetos comparativos

- Em vertebrados, *PAX6* também se expressa na neuroectoderme, e mais tarde na ectoderme sobre os placódios óticos e nasais, posteriormente ficando restrito à vesícula ótica, cristalino e córnea em desenvolvimento.
- Os mutantes sem *PAX6* funcional não deixam de definir as regiões (*Anlage*) onde se formariam as estruturas óticas, mas não há especificação da identidade do desenvolvimento (fenótipo *small eye*).
- Em *Drosophila*, a duplicação do homólogo de *PAX6* (*ey – toy*) traduz-se numa especialização temporal, sendo *toy* o gene mais precoce (v. a seguir).

Eyeless initiates the expression of both *sine oculis* and *eyes absent* during *Drosophila* compound eye development

Georg Haldert[†], Patrick Callaerts[‡], Susanne Flister, Uwe Walldorf[§], Urs Kloter and Walter J. Gehring*

Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstr. 70, CH-4056 Basel, Switzerland

[†]Current address: Howard Hughes Medical Institute, Laboratory of Molecular Biology, University of Wisconsin, 1525 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA

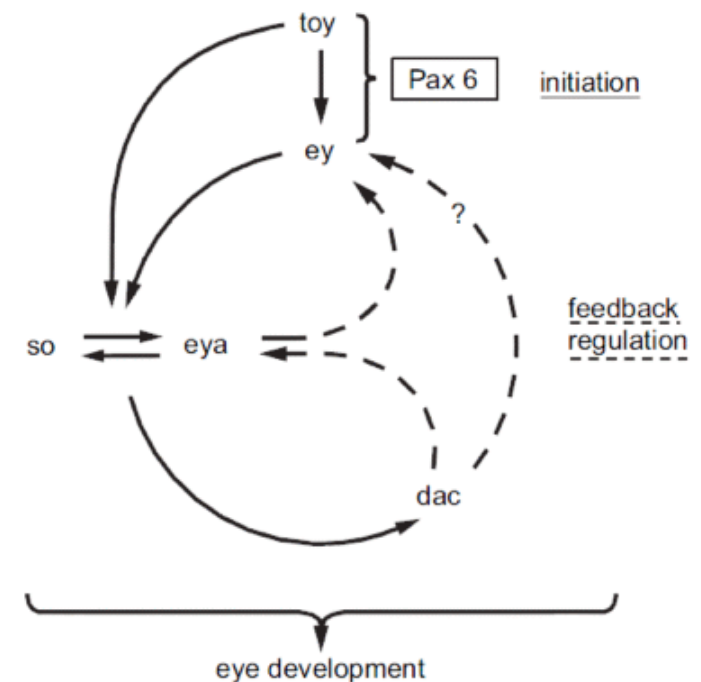
[‡]Current address: University of Houston, Dept of Biology, Houston, TX 77204-5513, USA

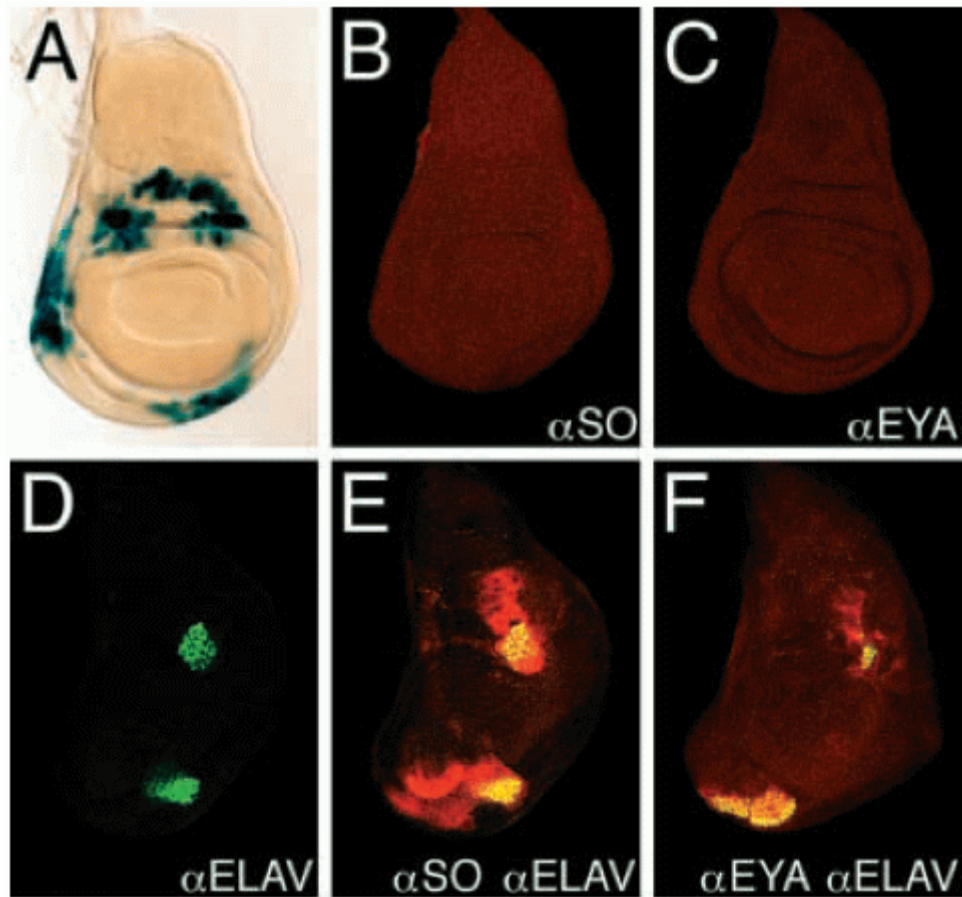
[§]Current address: Institut für Allgemeine Genetik (240), University of Hohenheim, Garbenstr. 30, D-70599 Stuttgart, Germany

Here we identify *sine oculis* and *eyes absent* as two mediators of the eye-inducing activity of *eyeless*. We show that *eyeless* induces and requires the expression of both genes independently during extra eye development.

. . .

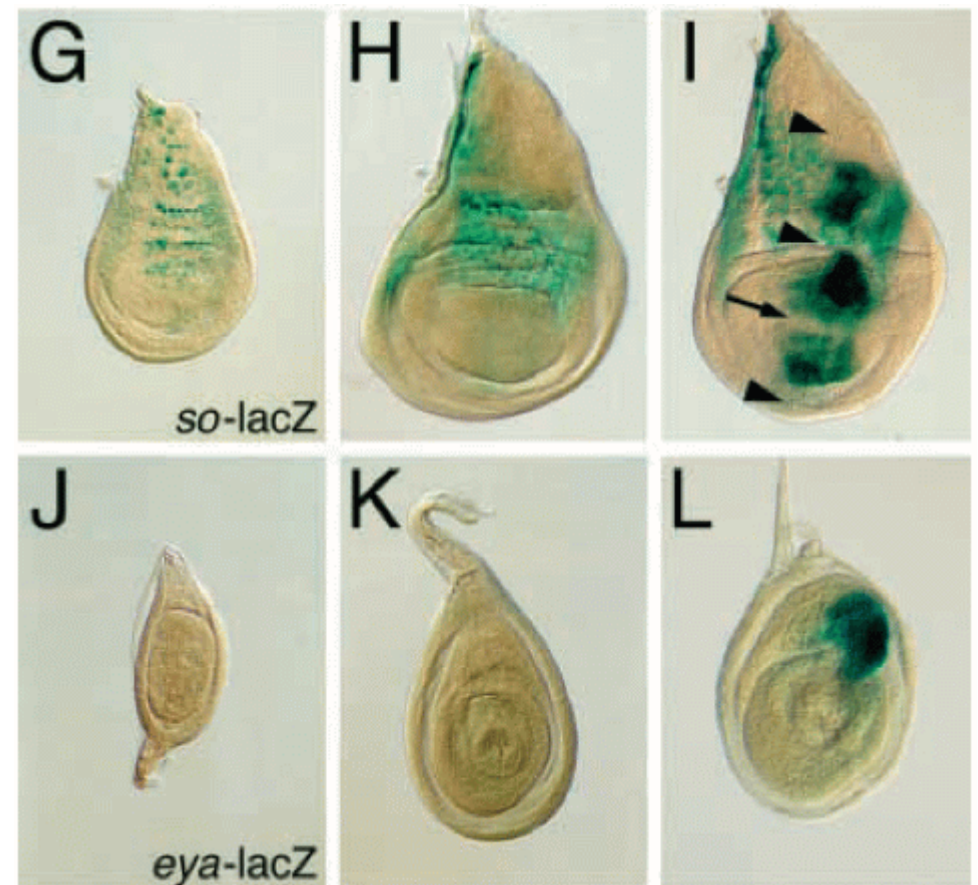
eyeless induces the initial expression of both *sine oculis* and *eyes absent* in the eye disc. *sine oculis* and *eyes absent* then appear to participate in a positive feedback loop that regulates the expression of all three genes. In contrast to the regulatory interactions that occur in the developing eye disc, we also show that in the embryonic head, *sine oculis* acts in parallel to *eyeless* and *twin of eyeless*, a second Pax-6 gene from *Drosophila*. Recent studies in vertebrate systems indicate that the epistatic relationships among the corresponding vertebrate homologs are very similar to those observed in *Drosophila*.



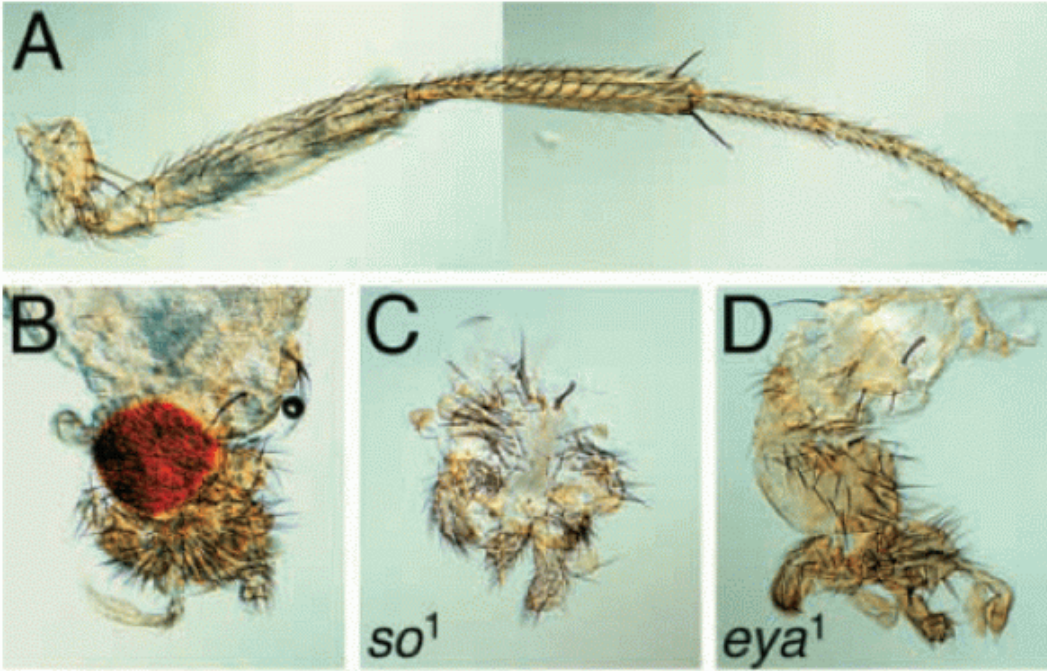


Expressão ectópica de *so* e *eya* em discos imaginais de asa. B e C são wt; A, D, E e F são duma mesma estirpe com expressão ectópica de *ey* (ELAV é marcador da formação de fotorecetoires)

wg é antagonista de *dpp*, donde se deduz que este último é fundamental para desenca-



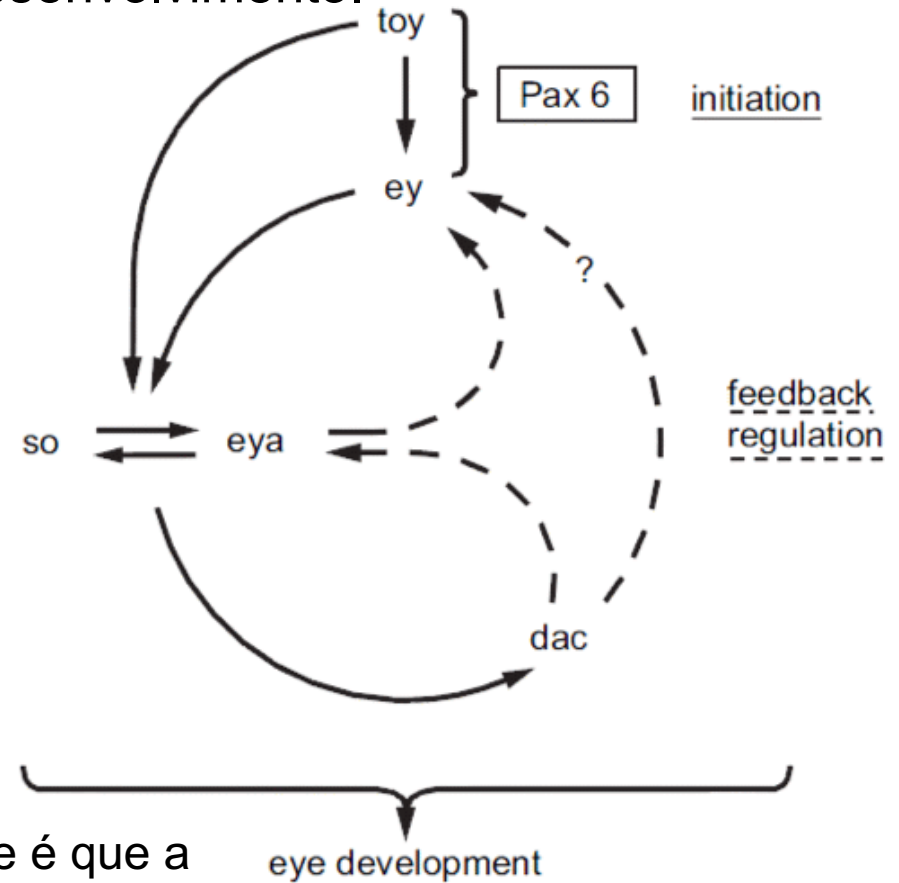
Reporters *lacZ* (com enhancers de *so* ou *eya*) induzidos por choque térmico em resposta ao driver *ey* (*hsp90::ey*) em discos imaginais de asa (I) ou pata (L). G/J são controlos antes do choque térmico, e H/K controlos sem driver. A expressão de *ey* em I, apesar de ubíqua, é antagonizada localmente (expressão de *wg*, setas em I)



Expressão ectópica de *ey* (driver *dpp-GAL4*) nos discos das patas produz malformações mas também olhos ectópicos, desde que as moscas tenham *so* e *eya* ativos (B)

Vertebrados

No murganho existem três genes *Eya*, e pelo menos *Eya1* depende de *Sey* (*PAX6*). Um dos homólogos de *so* é *Six3* e também se expressa no olho em desenvolvimento.



Não sabem explicar porque é que a tentativa de induzir olhos ectópicos em *Xenopus* usando *PAX6* de murganho apenas produziu efeitos parciais (cristalino).

Mus musculus

Versatilidade como modelo experimental

- Rapid **validation of cancer genes** in chimeras derived from established genetically engineered mouse models
- High-Resolution Analysis of **Parent-of-Origin Allelic Expression** in the Mouse Brain
- Estradiol-17 β regulates mouse **uterine epithelial cell proliferation** through insulin-like growth factor 1 signaling
- Genetic and Pathologic Aspects of **Retinoic Acid-Induced Limb Malformations** in the Mouse
- Practical Applications of the Bioinformatics Toolbox for **Narrowing Quantitative Trait Loci**
- Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays **aging** in mice
- SRT1720 improves survival and healthspan of **obese** mice
- Dissection of the **Genetics of Arthritis Severity**
- The genetic basis of **emotional behaviour** in mice
- Mouse models of **autism**

Increased Gene Dosage of *Ube3a* Results in Autism Traits and Decreased Glutamate Synaptic Transmission in Mice

Stephen E. P. Smith,¹ Yu-Dong Zhou,¹ Guangping Zhang,¹ Zhe Jin,¹
David C. Stoppel,^{1,2} Matthew P. Anderson^{1,2*}

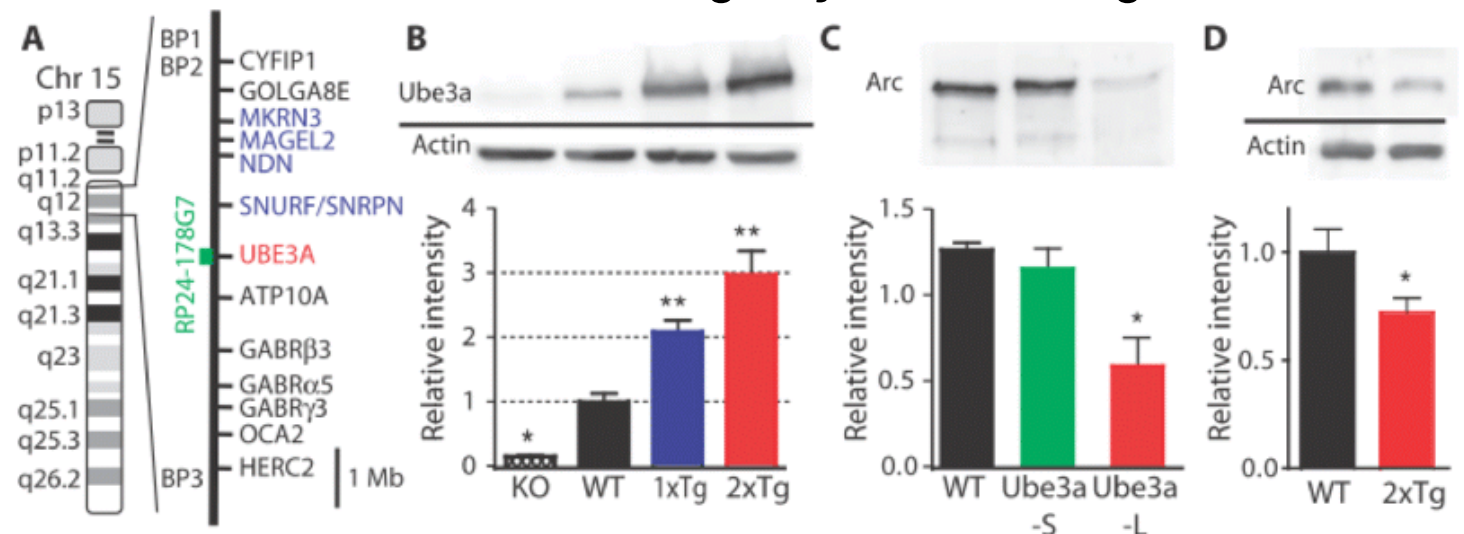
test this, we tripled the dosage of one of these genes, the ubiquitin protein ligase *Ube3a*, which is expressed solely from the maternal allele in mature neurons, and reconstituted the three core autism traits in mice: defective social interaction, impaired communication, and increased repetitive stereotypic behavior. The penetrance of these autism traits depended on *Ube3a* gene copy number. In animals with increased *Ube3a* gene dosage,

O padrão de expressão deste *locus* é compatível com a evidência de que os aumentos de dose genética com autismo são exclusivamente os transmitidos por via materna.

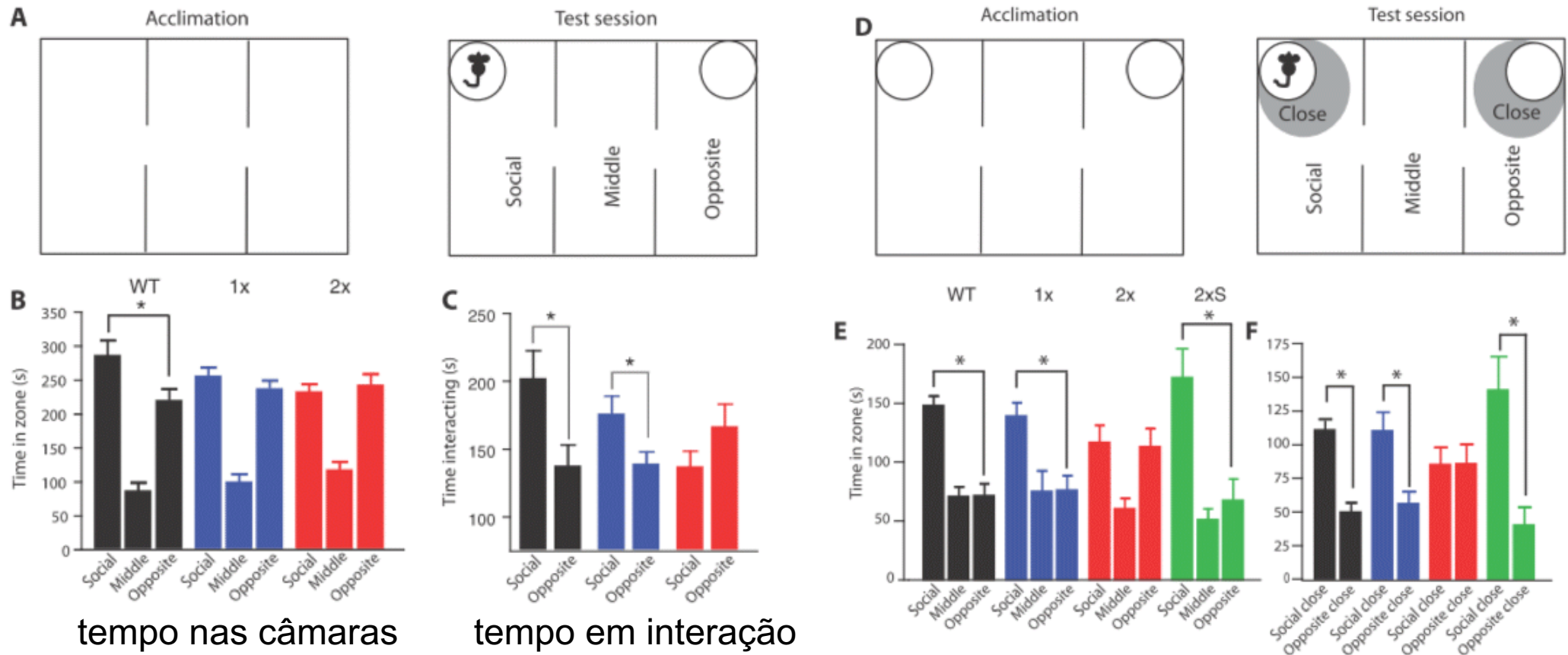
A região homóloga em murganho (cromossoma 7) tem o mesmo padrão de *imprinting* (por exemplo, há um modelo da síndrome de Angelman).

O *imprinting* desta região implica a importância da regulação da dose genética ativa.

A atividade de ubiquitina ligase tem por substratos, entre outros, as proteínas neuronais Arc e Euphelin5.

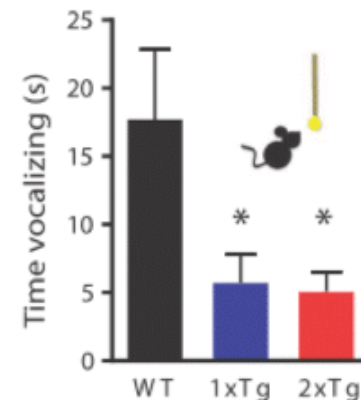
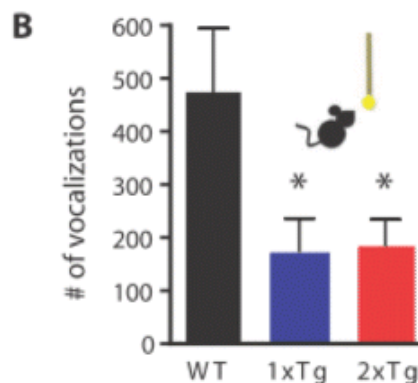
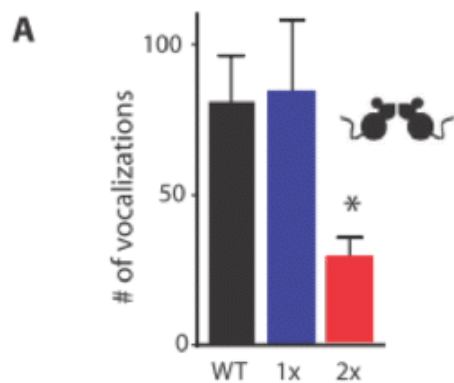


Validação do modelo



com objetos inanimados há uma igual preferência,
enquanto a diferença na interação com
murganhos-sonda não é diferente entre duas
linhas transgênicas independentes

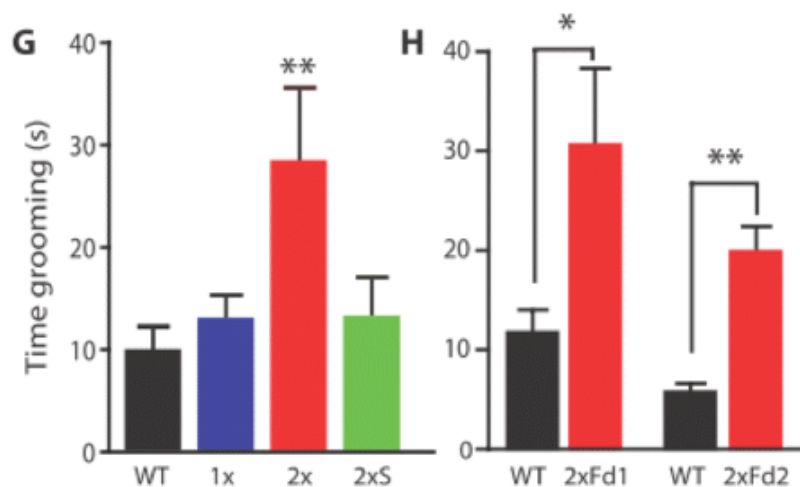
Excluíram deficiências motoras



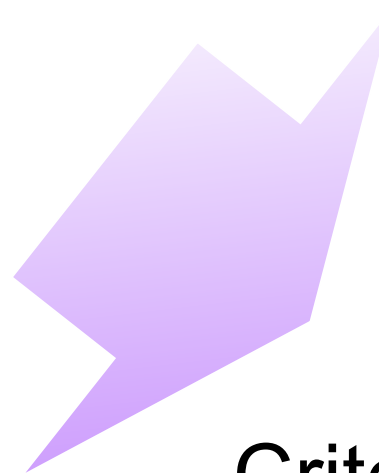
Diferenças apenas quantitativas: mesmo tipo de vocalizações, mesma reação a estímulo adverso (separação da mãe); olfato normal

Vocalizações: na presença doutro

na presença de urina de fêmea



Comportamento repetitivo



Critérios de autismo ✓

Estabelecido o modelo, determinaram que:

- Aumento da dosagem de Ube3a inibe a transmissão sinática glutamatérgica:
 - ▶ ... reduz a libertação pré-sinática de glutamato, assim como a sua concentração sinática, e
 - ▶ ... reduz a excitabilidade pós-sinática (conversão do estímulo sinático em potenciais de ação)
- Fundamento metabólico pode não ser o de degradar proteínas como Arc:
 - ▶ Recetor de hormona esteroide (localização nuclear)?
 - ▶ Estabilização ou tráfego de proteínas alterado (ubiquitinação)?

Fenótipos novos

- Autismo só recebe tratamento para componentes de comorbilidade, como a epilepsia e a ansiedade. Grande interesse em usar modelos como este para:
 - ▶ testar potenciais fármacos através das medidas quantitativas de comportamento social e comunicação aqui desenvolvidos
 - ▶ analisar funcionamento neuronal em busca de potenciais alvos de terapêutica

Falta ainda analisar coocorrências, descritas para os indivíduos com idic15:

- ❖ epilepsia, incluindo SUDEP
- ❖ deficits de aprendizagem e de memória

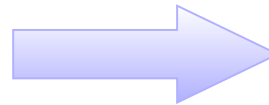
Concluem não haver relação com síndrome de Angelman

Heterogeneidade do espectro de autismo implica que este modelo é *apenas para um tipo* de autismo (subtipos, terapêuticas)

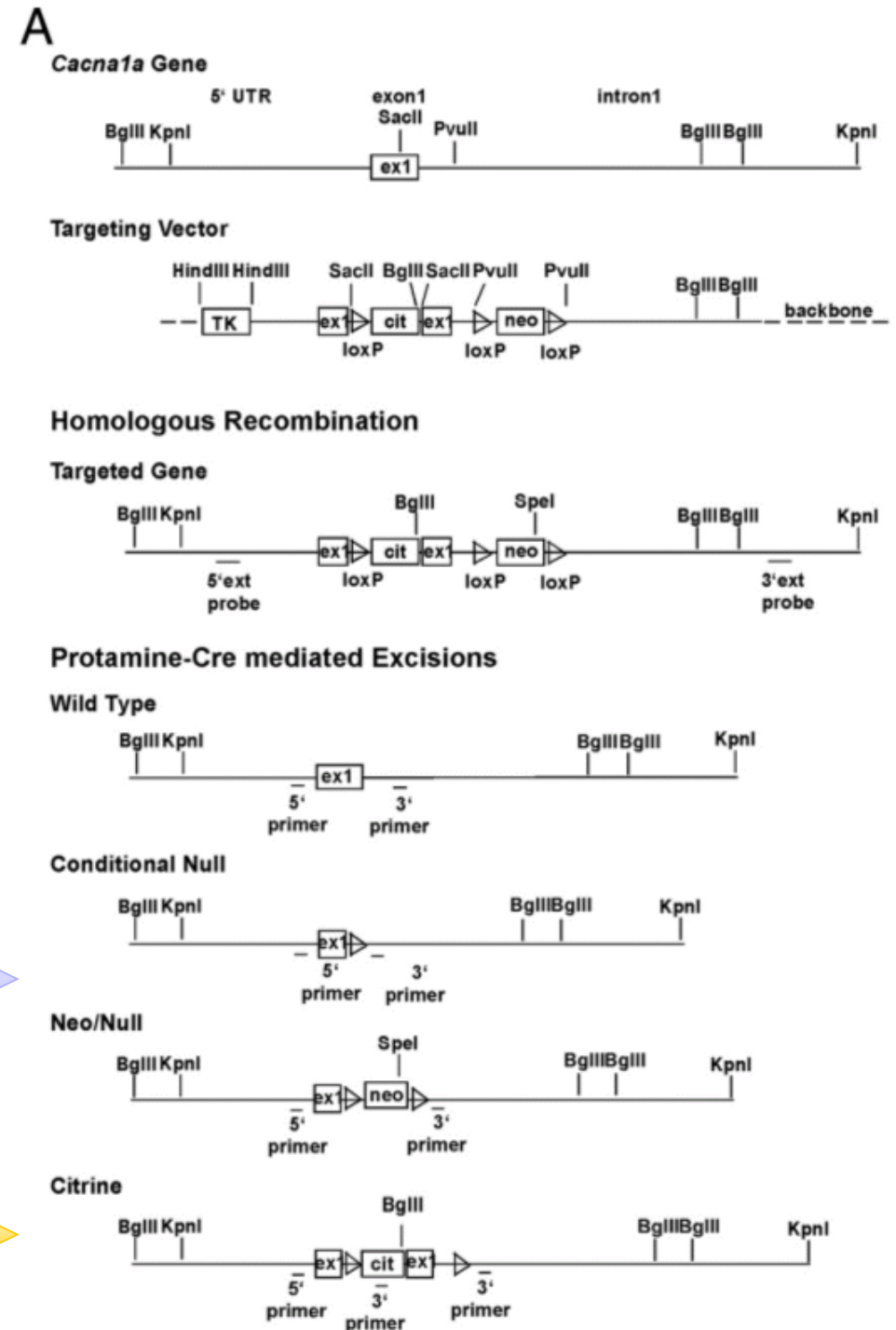
Delayed Postnatal Loss of P/Q-Type Calcium Channels Recapitulates the Absence Epilepsy, Dyskinesia, and Ataxia Phenotypes of Genomic *Cacna1A* Mutations

Melanie D. Mark,¹ Takashi Maejima,¹ Denise Kuckelsberg,¹ Jong W. Yoo,³ Robert A. Hyde,² Viral Shah,² Davina Gutierrez,² Rosa L. Moreno,⁴ Wolfgang Kruse,¹ Jeffrey L. Noebels,³ and Stefan Herlitze^{1,2}

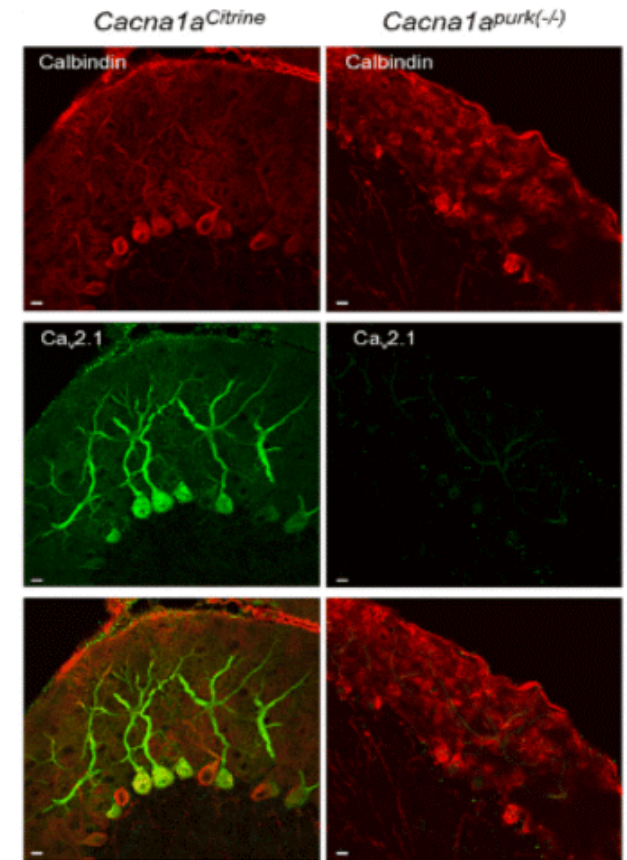
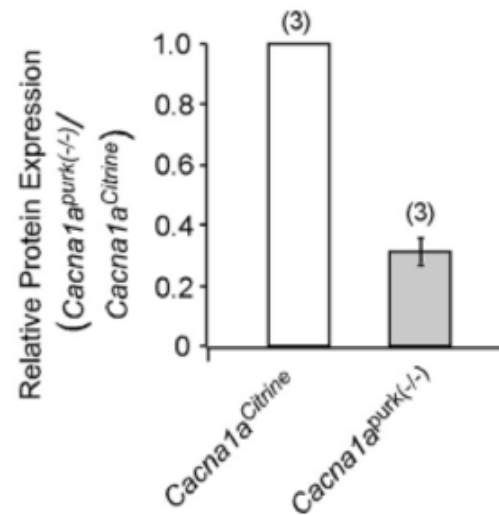
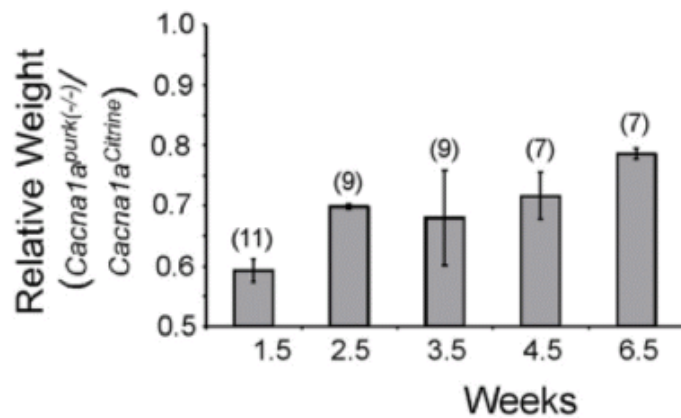
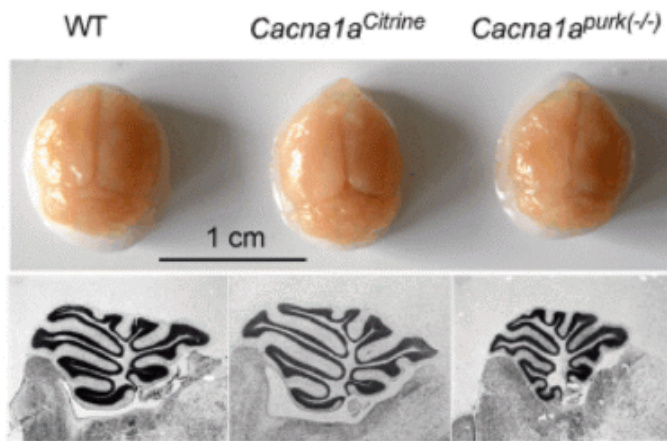
Atáxicos letais
(filme 1)



Controlo positivo
(filme 2)



Cruzando os Citrine (floxed) com a linha PCP2-Cre (recombinase controlada pelo promotor PCP2/L7), produziram descendentes que perderam parte do exão 1 do gene *CACNA1A* apenas nas células de Purkinje, às 2 semanas pós-natal: linha *purk* (filmes 3 e 4)



Todas as funções motoras testadas demonstraram graves insuficiências

Table 2. Frequency and duration of spontaneous and induced dyskinesias

Treatment	Mouse line	<i>n</i>	Seizure (%)	Seizure time (min)
Cage change	<i>Cacna1a</i> ^{Citrine}	27	0	
	<i>Cacna1a</i> ^{purk(-/-)}	14	28.6 ± 6	46.5 ± 5.3
Cage transport	<i>Cacna1a</i> ^{Citrine}	27	0	
	<i>Cacna1a</i> ^{purk(-/-)}	14	21.4 ± 4.5	38.3 ± 5.1
Short restraint	<i>Cacna1a</i> ^{Citrine}	27	0	
	<i>Cacna1a</i> ^{purk(-/-)}	14	57.1 ± 6.9	37.0 ± 4.6
Saline	<i>Cacna1a</i> ^{Citrine}	22	0	
	<i>Cacna1a</i> ^{purk(-/-)}	14	57 ± 8.4	49.0 ± 8.9
Caffeine	<i>Cacna1a</i> ^{Citrine}	11	0	
	<i>Cacna1a</i> ^{purk(-/-)}	13	69.2 ± 5.8	33.2 ± 5.4
Ethanol	<i>Cacna1a</i> ^{Citrine}	11	0	
	<i>Cacna1a</i> ^{purk(-/-)}	13	100	55.5 ± 4.2

Behavioral studies were performed according to the study by Fureman et al. (2002). Data represent the percentage of mice that had a dyskinetic episode per mouse group and the average duration of the dyskinesia per group. Data represent mean ± SEM.

Outro fenótipo importante, mas inesperado por dever relacionar-se com outra região do encéfalo, são as crises de ausência epiléticas.

Destacam o facto de ser uma alteração que ocorre no período pós-natal, e que isso permite terapêutica profilática ou pelo menos uma intervenção precoce.

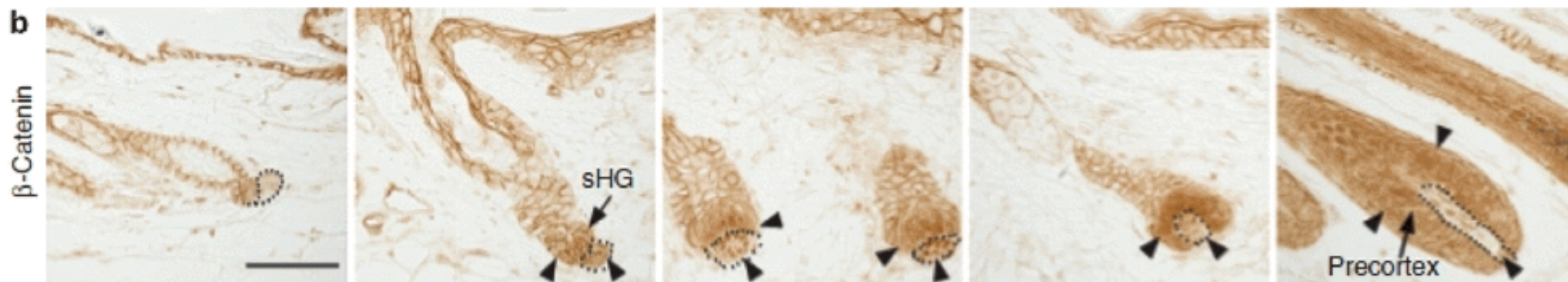
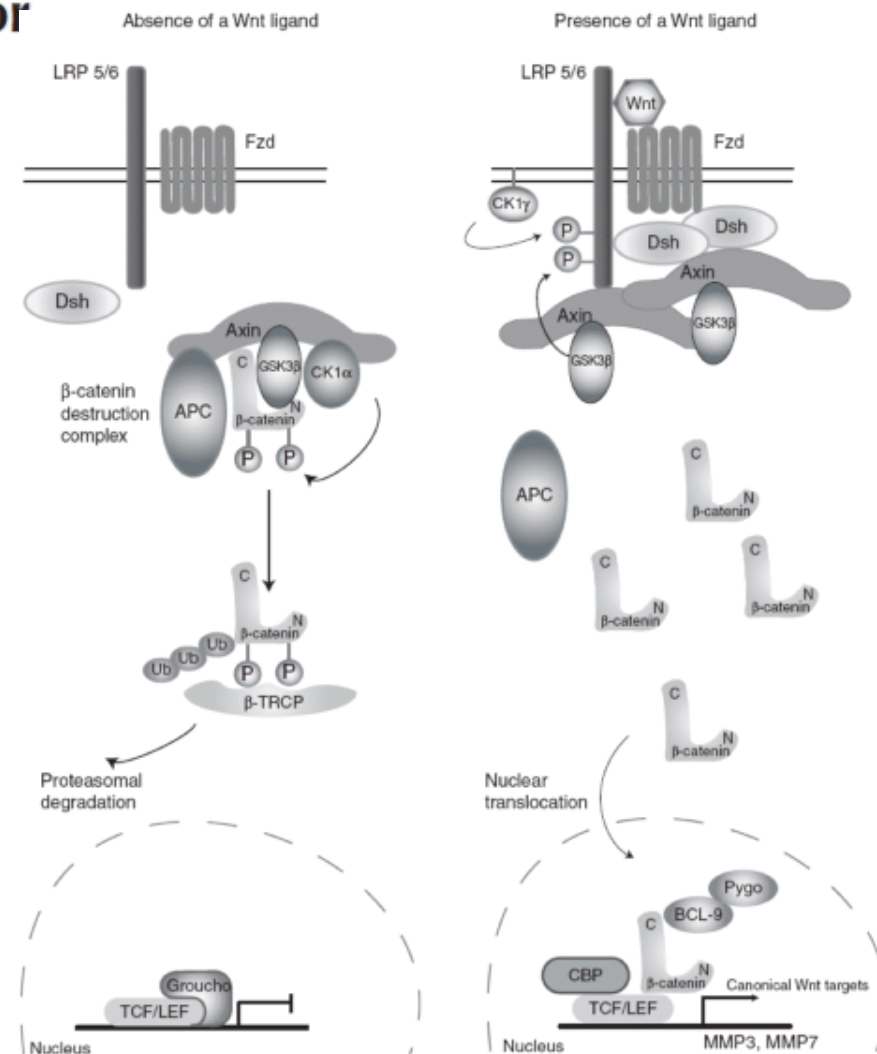
Epithelial Wnt Ligand Secretion Is Required for Adult Hair Follicle Growth and Regeneration

Peggy S. Myung^{1,2}, Makoto Takeo³, Mayumi Ito³ and Radhika P. Atit^{1,2}

Hair follicle growth in adult mammals occurs through cycles of growth (anagen), regression (catagen), and rest (telogen). The ability to continuously cycle through these phases is dependent on hair follicle stem cells (HFSCs), which reside in a specialized niche of the telogen hair follicle that consists of the bulge and secondary hair germ (sHG)

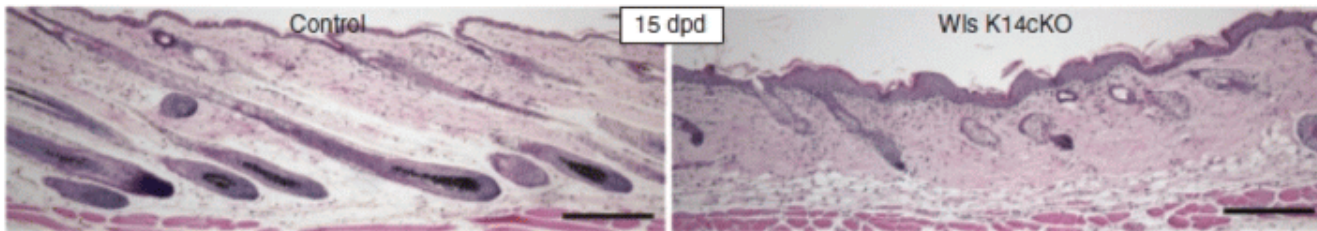
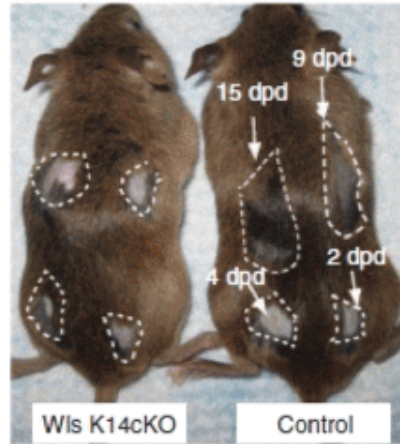
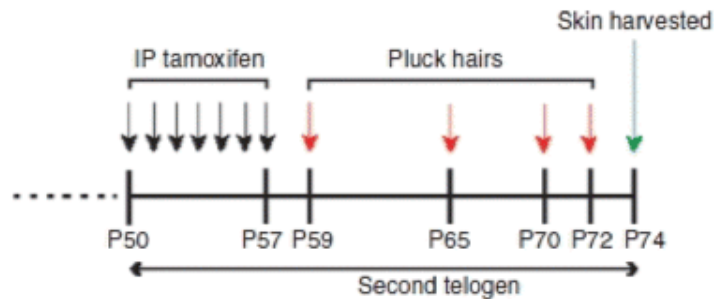
Despite evidence demonstrating the importance of Wnt/ β -catenin signaling in adult hair follicle biology, some questions remain unresolved. First, the requirement for Wnt signaling during anagen onset has not been tested independently of β -catenin's function in adherens junctions or independently of T-cell transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor that have Wnt-dependent and Wnt-independent functions

a Wnt signaling mediator upstream of β -catenin has not been formally examined during anagen induction in the adult hair cycle. In addition, it is unclear how Wnt signaling is initiated during anagen onset. Several Wnt ligands are upregulated in the sHG and less prominently in the DP during anagen. Partly owing to functional redundancy between these Wnt ligands, no study has dissected the specific requirement for Wnt ligands secreted by the hair follicle epithelium to activate Wnt signaling in both the follicular epithelium and DP during anagen onset.



Abordagem experimental

Sistema Cre indutível com tamoxifeno (Cre^T)



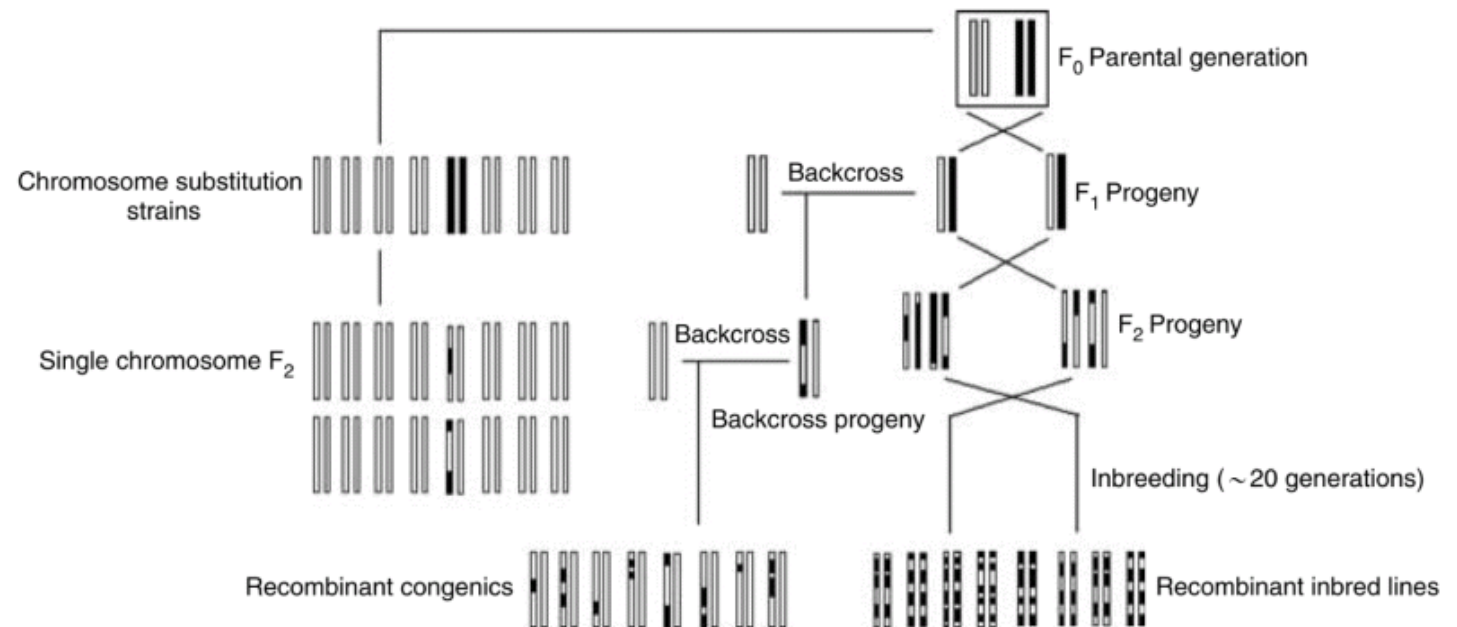
this study sheds light on the potential non-cell-autonomous and cell-autonomous interactions that promote hair growth and holds implications for future strategies to treat hair disorders such as alopecia or hirsutism.

- K.O. de *Wls* (*Wntless*) em epitélios (*K14-CreER; Wls^{fl/fl}*) por injeção intraperitoneal de tamoxifeno resulta na ausência de recuperação após depilação experimental. A maior parte fica-se pelas fases precoces de anagénese, não atingindo uma segunda telogénese. As figuras à esquerda referem-se à indução durante a segunda telogénese.
- Modelo “limpo”, pois as células basais que respondem ao sinal Wnt ($K15^+ CD34^+$) estão intactas.
- A neogénese de folículos na reparação de lesões (reepitelização) requer *Wls*.

QTL = Quantitative Trait Locus

Classicamente um *locus* de variação contínua (estatura, peso, longevidade, etc.), mas é de muita relevância (nomeadamente clínica) a variação contínua subjacente às predisposições para patologias: o efeito acumulado de diversos QTL determina um certo grau de predisposição, e o polimorfismo nas populações explicaria as diferenças entre indivíduos, inclusive entre famílias.

A detecção de QTL é tradicionalmente feita por cruzamentos a partir de linhas consanguíneas e suas variantes, que permitem mapear as regiões do genoma associadas aos fenótipos.



Só com organismos-modelo! E os intervalos de mapa são muito grandes, geralmente abarcando centenas de genes. A validação experimental para tantos genes é incomportável

Genome-Wide Association Mapping of Quantitative Traits in Outbred Mice

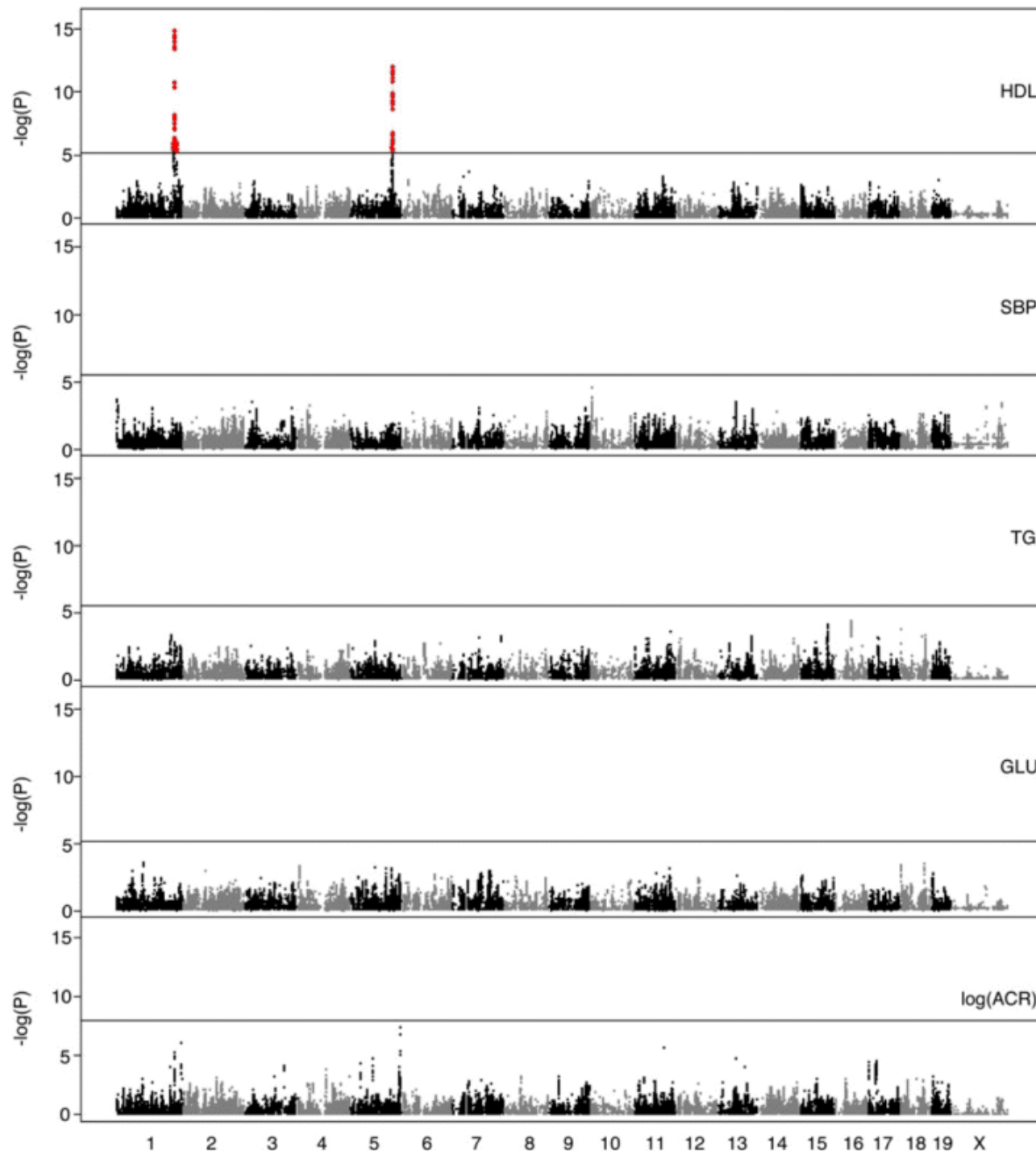
Weidong Zhang,^{*,1} Ron Korstanje,^{*,1} Jill Thaisz,[†] Frank Staedtler,[‡] Nicole Harttman,[‡] Lingfei Xu,[†] Minjie Feng,[†] Liane Yanas,[†] Hyuna Yang,^{*} William Valdar,[§] Gary A. Churchill,^{*} and Keith DiPetrillo^{†,2}

^{*}The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine 04609, [†]Novartis Institutes for BioMedical Research and Novartis

GWAS (Genome-Wide Association Studies/scans) baseiam-se em arrays de genotipagem de SNPs, e desde 2007 que têm permitido descobrir alguns QTLs humanos para predisposições patológicas (exemplo clássico: diabetes tipo II, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293876>).

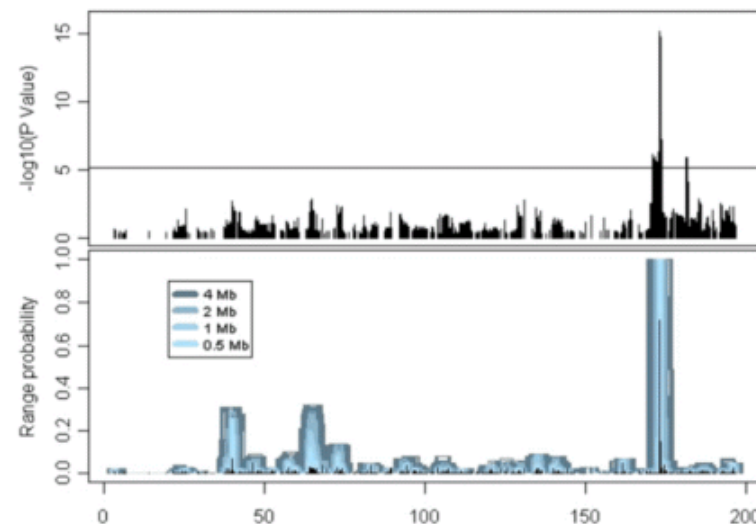
We carried out genome-wide association mapping by using 288 mice from a commercially available outbred stock; NMRI mice were genotyped with a high-density single-nucleotide polymorphism array to map loci influencing high-density lipoprotein cholesterol, systolic blood pressure, triglyceride levels, glucose, and urinary albumin-to-creatinine ratios. We found significant associations ($P < 10^{-5}$) with high-density lipoprotein cholesterol and identified *Apoa2* and *Scarb1*, both of which have been previously reported, as candidate genes for these associations. Additional suggestive associations ($P < 10^{-3}$) identified in this study were also concordant with published quantitative trait loci, suggesting that we are sampling from a limited pool of genetic diversity that has already been well characterized. These findings dampen our enthusiasm for

- Dois motivos para a decepção:
 - Poucos animais (menos poder estatístico)
 - Variabilidade limitada



HDL: colesterol de alta densidade (correlacionado com colesterol total)
 SBP: tensão sistólica (correlacionado com diastólica e média)
 TG: triglicéridos
 GLU: Glucose
 ACR: razão entre albumina e creatinina

Apenas duas regiões com associação significativa, e só para HDL



Cromossoma 1: teste adicional só confirma um dos picos

■ Table 2 Top five peaks for the five traits and comparison with previously mapped QTL

Trait	Chr	Position (bp)	P-Value	QTL (Candidate Gene)	Reference
HDL	1	173,155,512	8.0×10^{-16}	(Apoa2)	Wang et al. 2004
	5	125,530,593	6.0×10^{-12}	(Scarb1)	Su et al. 2010
	1	181,672,702	8.4×10^{-7}		
	7	52,328,410	2.4×10^{-4}		
SBP	11	86,772,383	5.4×10^{-4}	B6 x C3H	Su et al. 2009
	10	7,151,309	2.1×10^{-9}	SBH x SBN (rat)	Yagil and Yagil 1998
	1	5,305,996	2.0×10^{-4}		
	13	57,444,015	3.7×10^{-4}		
TG	3	23,806,561	2.4×10^{-4}	LH x LN (rat)	Sassard et al. 1997
	X	149,326,707	3.9×10^{-4}		
	16	50,610,771	2.3×10^{-5}	D1 x D2	Stylianou et al. 2008
	15	84,041,657	7.8×10^{-5}	MRL/lpr x BALB/c	Gu et al. 1999
GLU	18	4,740,277	1.8×10^{-4}	—	
	11	107,124,592	3.1×10^{-4}	B6 x D2	Colinayo et al. 2003
	1	164,192,866	3.9×10^{-4}	B6 x RR	Suto et al. 2004
				NZO x NON	Su et al. 2009
log(ACR)	1	83,642,895	2.6×10^{-4}	B6 x 129	Kido et al. 2000
	18	73,383,043	3.9×10^{-4}	B6 x CAST	Smith 2002
	18	4,707,155	4.4×10^{-4}		
	4	8,691,086	5.5×10^{-4}	B6 x D2	Togawa et al. 2006
log(ACR)	5	73,493,320	7.3×10^{-4}		Chung et al. 1997
	5	147,841,950	4.6×10^{-8}	MWF x LEW (rat)	Schulz et al. 2002
	1	194,419,611	9.3×10^{-7}	B6 x NZM	Morel et al. 1994
	11	88,323,710	2.6×10^{-6}	SS x SHR (rat)	Poyan Mehr et al. 2003
log(ACR)	1	174,219,650	6.7×10^{-6}	B6 x NZM	Morel et al. 1994
	5	68,016,195	1.9×10^{-5}	B6 x D2	Sheehan et al. 2007

QTL, quantitative trait loci; HDL, high-density lipoprotein; SBP, systolic blood pressure; GLU, glucose, TG, triglyceride; log(ACR), log-transformed albumin-to-creatinine ratio.

Quase todos já conhecidos...

■ Não deixa de ser bom!

- ▶ Valor confirmatório
- ▶ Numa só experiência, sem cruzamentos e/ou seleção fenotípica

Na região do cromossoma 11 a 87 Mb já conhecida, o respetivo intervalo permitiu reduzi-la a uma interseção contendo 177 genes, dos quais 100 são idênticos por descendência (IBD) entre estas duas estirpes, ficando 77. Destes, o *Hnf1b* é um forte candidato porque a sua deleção em hepatócitos e ducto biliar aumenta o teor de colesterol do plasma ➡ validação experimental.

Comparative Anatomy of Marmoset and Mouse Cortex from Genomic Expression

Hiromi Mashiko,¹ Aya C. Yoshida,¹ Satomi S. Kikuchi,¹ Kimie Niimi,² Eiki Takahashi,² Jun Aruga,³ Hideyuki Okano,^{4,5} and Tomomi Shimogori¹

O saguim está muito mais próximo filogeneticamente do que o murganho, e pode servir de ponte entre este último e a espécie humana, especialmente no que concerne ao desenvolvimento e funcionamento do cérebro

Desvantagens do género *Macaca* incluem o tamanho, a reduzida fertilidade, e o desenvolvimento lento

Callithrix tem sido usado em estudos de cognição superior, e de interação social, e pode ser modificado transgenicamente

Comparação entre estados de desenvolvimento (maturação das lâminas corticais, níveis de expressão da serotonina, do seu recetor e do seu transportador).

Método: hibridação *in situ*. Estudos anteriores com microarrays não revelavam diferenças significativas, mas o detalhe anatómico não foi estudado. Saguim neonatal (P0) é equiparado a P14-P20 no murganho, com base no desenvolvimento cortical e metabolismo da serotonina

Nr4a2 K.O. semelhante a esquizofrenia e depressão em murganho;
Tbr1 envolvido na regulação do desenvolvimento do córtex neonatal

Ênfase em determinar a expressão genética que é semelhante à do murganho, e a que é divergente

Loci envolvidos no desenvolvimento do encéfalo

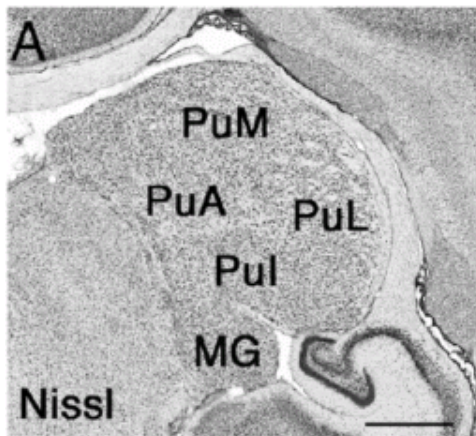
Gene	Encoding protein product
<i>Btbd3</i>	BTB (POZ) domain containing 3
<i>Cdh6</i>	Cadherin 6
<i>Cdh8</i>	Cadherin 8
<i>Cplx3</i>	Complexin3
<i>CTGF</i>	Connective tissue growth factor
<i>EphA4</i>	Eph receptor A4
<i>EphA5</i>	Eph receptor A5
<i>EphA6</i>	Eph receptor A6
<i>EphA7</i>	Eph receptor A7
<i>EFNA5</i>	Ephrin A5
<i>ER81</i>	Ets variant gene 1
<i>Foxp2</i>	Forkhead box P2
<i>GFRalpha1</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
<i>Kitl</i>	Kit ligand
<i>Lhx9</i>	LIM homeobox protein 9
<i>NR1D1</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
<i>NR4A2</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
<i>Ntng2</i>	Netrin G2
<i>Reln</i>	Reelin
<i>RORalpha</i>	RAR-related orphan receptor alpha
<i>Satb2</i>	Special AT-rich sequence binding protein 2
<i>Sema6A</i>	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain (semaphorin) 6A
<i>Tbr1</i>	T-box brain gene 1
<i>Tcf7l2</i>	Transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG box
<i>Zic1</i>	Zinc finger protein of the cerebellum 1
<i>Zic4</i>	Zinc finger protein of the cerebellum 4

Estruturas visuais

As estruturas cerebrais associadas à sensação visual são muito mais diferenciadas nos primatas do que os seus análogos no murganho

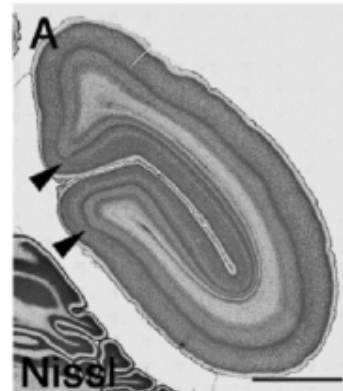
- Núcleo pulvinado (no tálamo)
 - Contestam que seja inexistente no murganho
- Núcleo geniculado dorsolateral
- Córtex visual primário e secundário (V1 e V2)
- Área temporal média (MT) do córtex visual (V5)*
- Hipocampo
- Córtex pré-frontal*

*incluíram estudo de embriões aos 90 dias

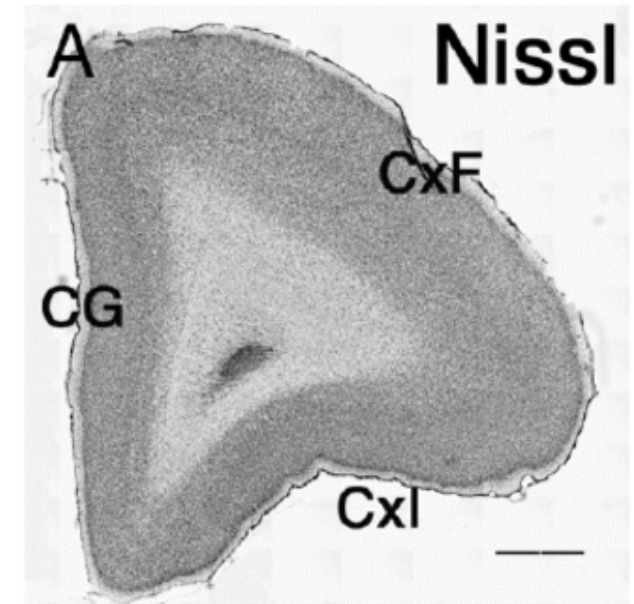
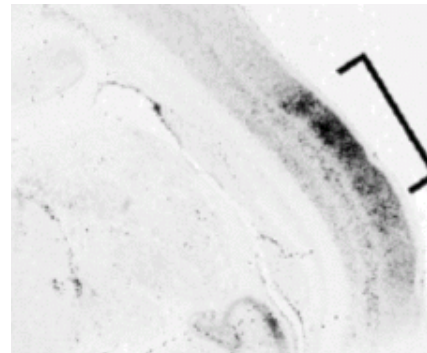


pulvinado

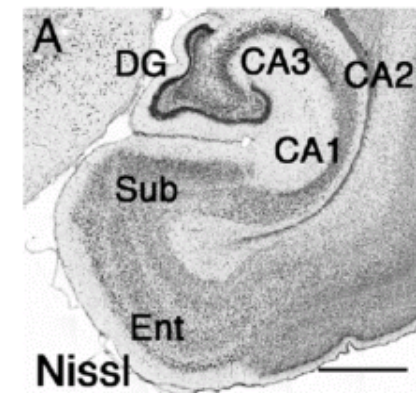
geniculado



córtex visual

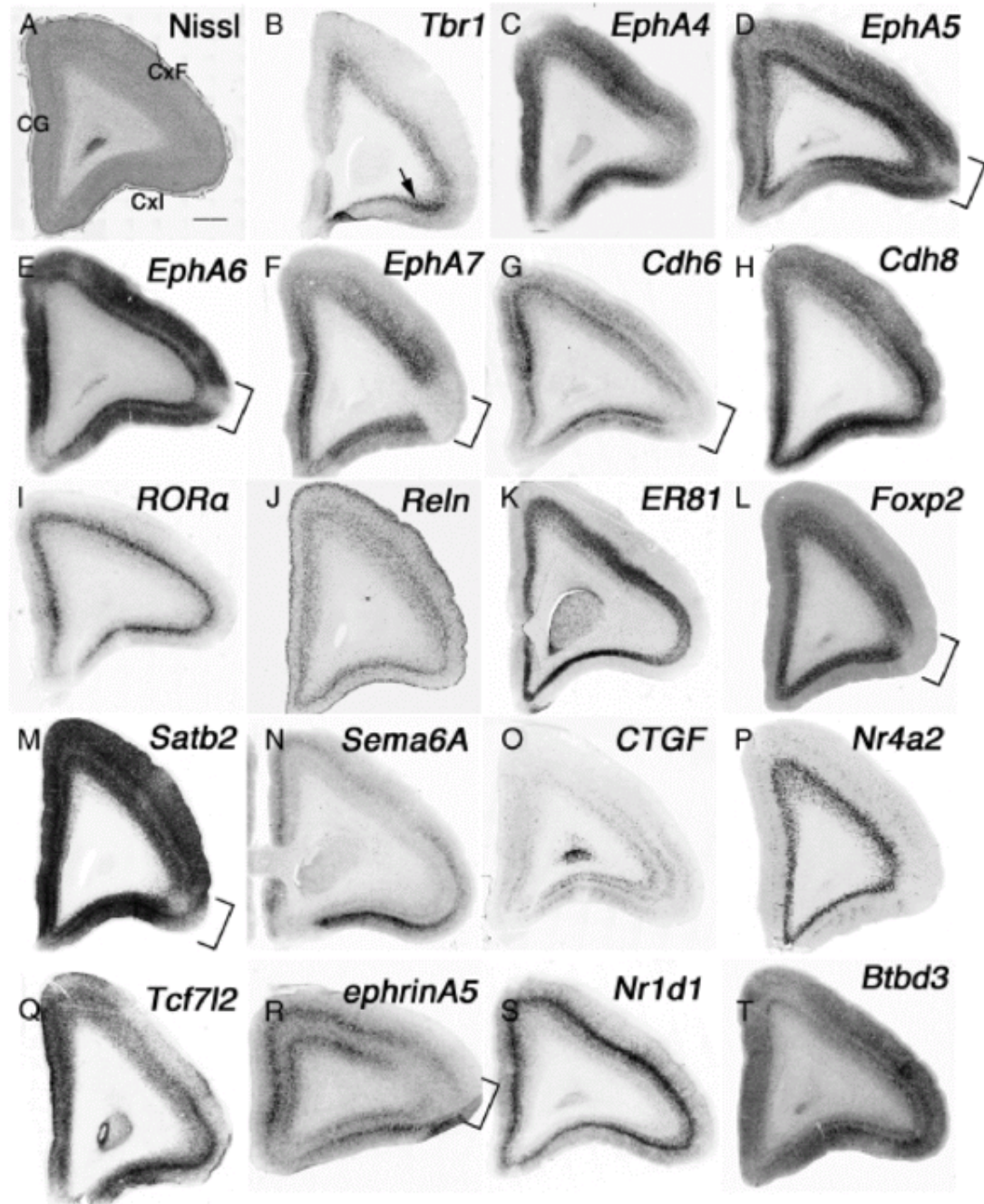


córtex pré-frontal

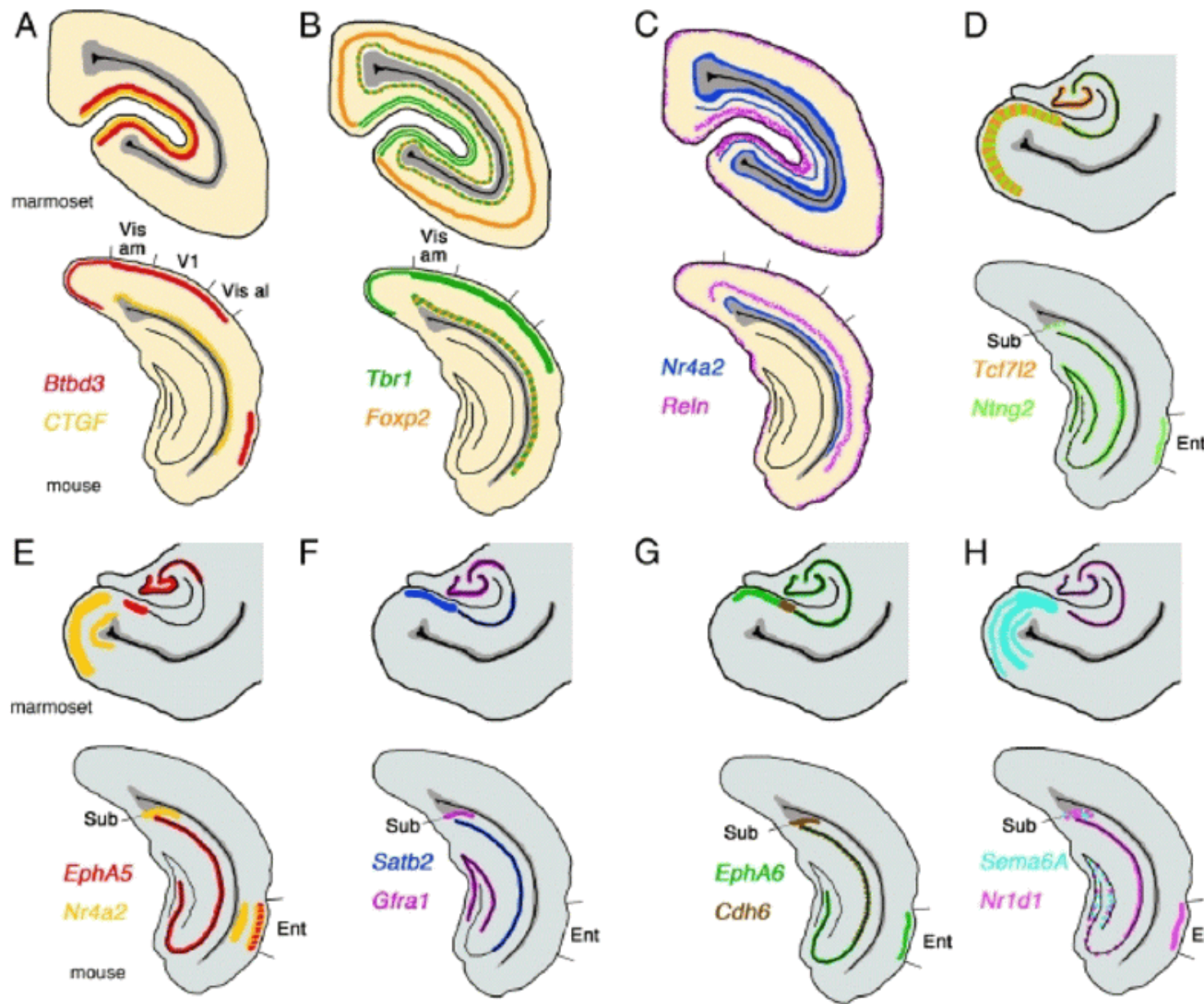


hipocampo

Exemplo de expressão característica de primatas



Diferenças entre murganho e saguim



No murganho: Vis, córtex visual; am/al, anteromedial/anterolateral; Ent; córtex entorrinal; Sub, subículo

Da discussão: ... usámos a análise de hibridação *in situ* no cérebro de saguim para identificar semelhanças e diferenças no padrão de expressão de genes que se mostrou anteriormente estarem associados ao desenvolvimento do cérebro de murganho ... estes genes mostram padrões de expressão regional globalmente semelhantes em ambas as espécies. No entanto, quando examinados em pormenor, os padrões de expressão destes genes são bastante diferentes, especialmente em áreas que têm ligações ao córtex pré-frontal e estão presumivelmente envolvidas em funções cognitivas superiores. ... Vias entre o hipocampo e o córtex pré-frontal estão fortemente envolvidas em atenção seletiva, tomada de decisões, comportamentos por objetivos — influenciáveis pela experiência, donde a plasticidade do desenvolvimento do cérebro.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DEVELOPMENTALLY REGULATED EXPRESSIONS OF *GADD45A*, *GADD45B*, AND *GADD45G* IN THE MOUSE AND MARMOSET CEREBRAL CORTEX

E. MATSUNAGA,* S. NAMBU, M. OKA AND A. IRIKI

Laboratory for Symbolic Cognitive Development, RIKEN Brain Science Institute, Hirosawa 2-1, Wako 351-0198, Japan

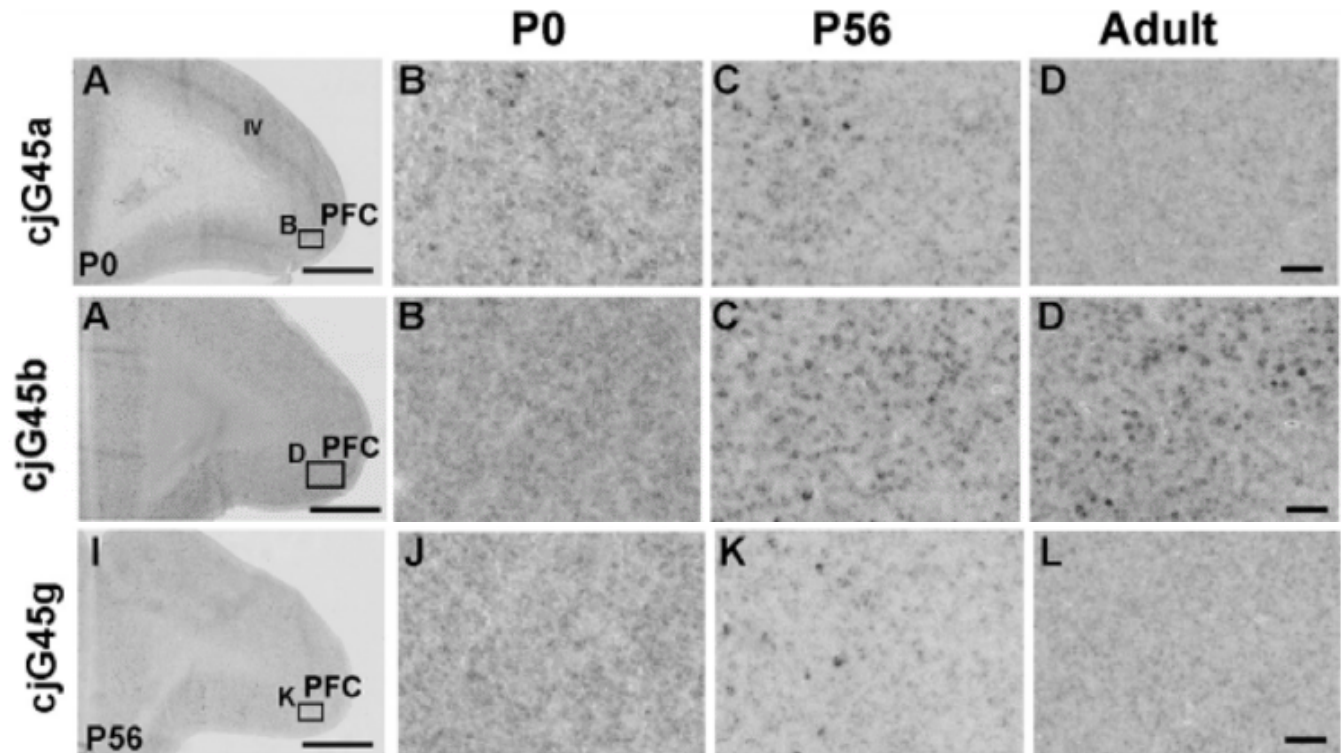
Three growth arrest and DNA damage-inducible small nuclear proteins, Gadd45 alpha, beta, and gamma, have been identified as regulators of methylation status. To understand the involvement of epigenetic factors in primate cortical evolution, we started by analyzing expression of these demethylation genes in the developing common marmoset (*Callithrix jacchus*) and mouse (*Mus musculus*) brain.

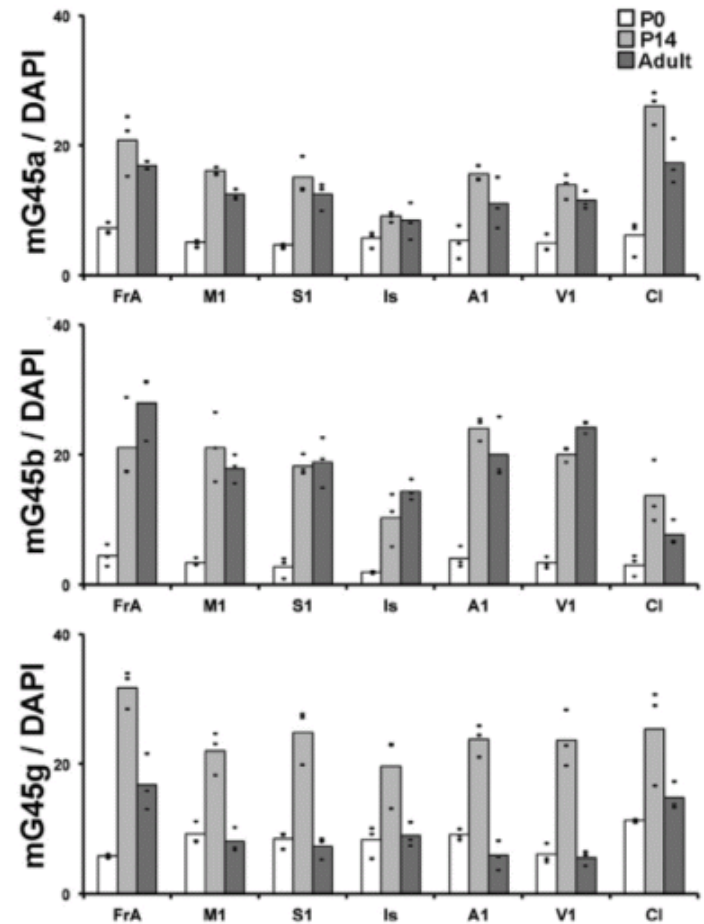
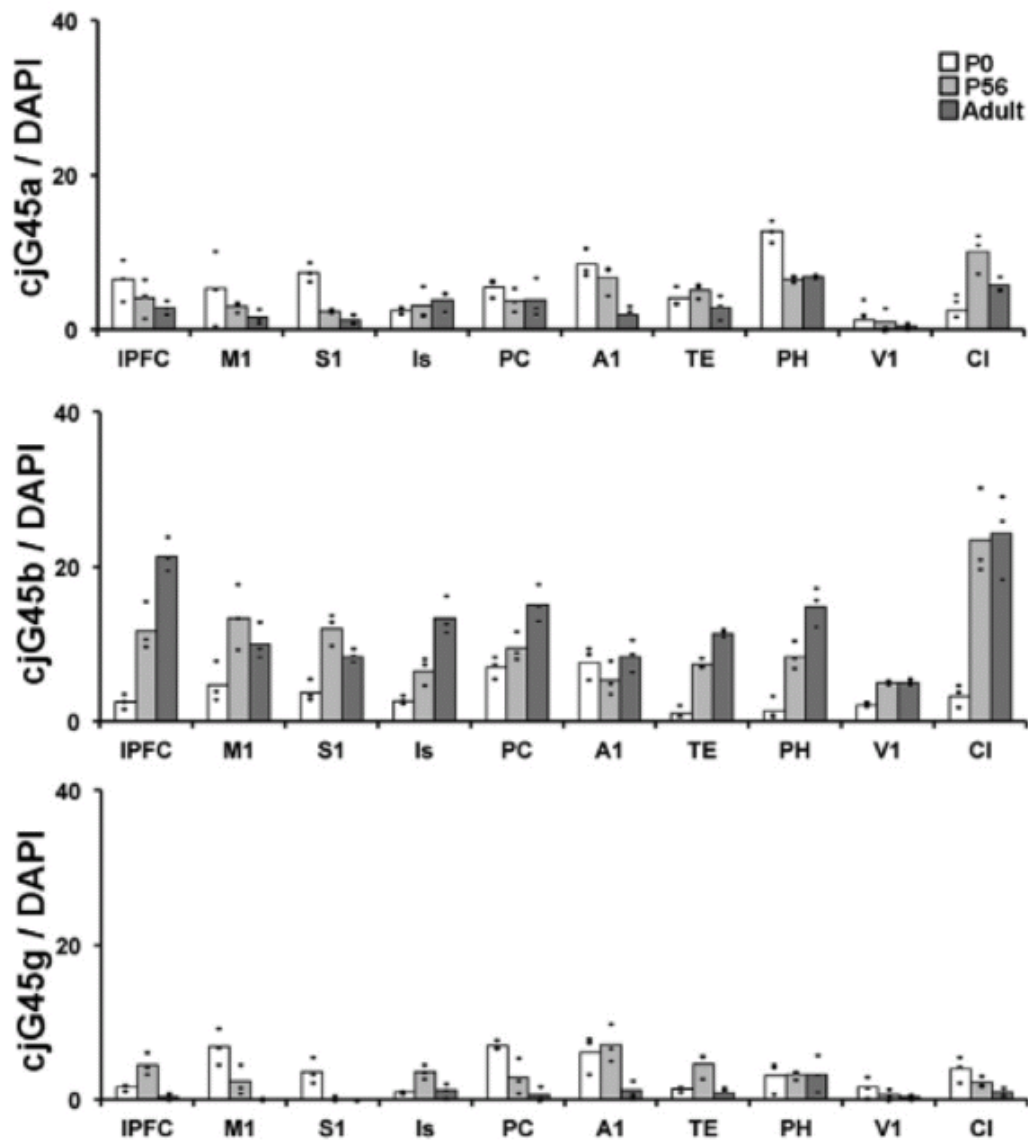
A sigla Gadd refere-se a *Growth arrest and DNA damage-inducible* e tem a ver com as respostas das células a bloqueios de crescimento relacionados com lesões no DNA. No caso das Gadd45 trata-se dum tipo de proteínas nucleares que atuam por desmetilação de regiões-alvo. Pode haver conexão com a sinalização mediada por MAPK (via de fatores de crescimento).

- A desmetilação do DNA é um dos mecanismos envolvidos nos processos de aprendizagem.
- Mutantes de *Gadd45a* têm exencefalia, e com RNAi há defeitos no crescimento dos neuritos no córtex embrionário;
- Mutantes de *Gadd45b* são deficientes na neurogênese e desenvolvimento dendrítico dependente da atividade, e apresentam alterações da memória de longo prazo e potenciação de longo prazo nos neurónios do hipocampo;
- *Gadd45b* desmetila o DNA do fator neurotrófico e do FGF-I em resultado da atividade neural, e é um dos genes que foi associado à psicose em humanos;
- *Gadd45g* controla a diferenciação neuronal em *Medaka* e *Xenopus*, mas poderá ser redundante em murganho (KO sem defeitos evidentes); RNAi bloqueia diferenciação neural, e sinergiza com os efeitos de RNAi de *Gadd45a*

Hibridação *in situ*: sondas RNA marcadas com DIG e reveladas por fosfatase alcalina acoplada a um anticorpo secundário anti-DIG. Contagem de células positivas automatizada.

Sense and antisense probes were synthesized using SP6 or T7 RNA polymerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with digoxigenin (DIG)-labeling mix (Roche Diagnostics).





em *Mus musculus* não é!

...será assim em *Homo sapiens*?

