

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MEIRE SILVA BATISTELA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES DO GENE *RAPH1* COM O
FENÓTIPO CHE2 C5+

CURITIBA
2009

MEIRE SILVA BATISTELA



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES DO GENE *RAPH1* COM O FENÓTIPO CHE2 C5+

Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial da disciplina de Estágio II em Genética, para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador: Prof.º Dr. Ricardo L.R. de Souza.

Colaborador externo: Prof.ª Dra. Liya Regina Mikami.

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, pelo apoio e suporte nesses quatro anos de dedicação.

Agradeço também aos *verdadeiros* amigos, que me acompanharam nos momentos de alegria e dificuldades, inclusive aqueles que infelizmente, se encontravam a muitos km de distância, mas que sempre me deixaram uma palavra de carinho nos momentos necessários.

Ao meu namorado Rafael, pelo amor e compreensão.

Ao Professor Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza por ter me acolhido em seu laboratório e me orientado sempre com muita atenção e paciência.

Agradeço também aos demais professores do Laboratório de Polimorfismo e Ligação, Professora Dr. Eleidi Alice Chautard Freire Maia e Professora Dr. Lupe Furtado Alle, assim como aos colegas de laboratório pela excelente convivência e cooperatividade.

E em especial à ajuda da Professora Dr. Liya Regina Mikami desde o início do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	IV
RESUMO	V
INTRODUÇÃO	1
1.1 COLINESTERASES.....	1
1.2 BUTIRILCOLINESTERASE.....	2
1.3 BANDA C ₅	5
1.4 GENE <i>RAPH1</i>	7
1.5 LAMELIPODINA HUMANA.....	8
1.6 PCR EM TEMPO REAL.....	10
OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 AMOSTRA.....	14
3.2 METODOLOGIA.....	14
3.2.1 PCR.....	14
3.2.2 Análise do DNA Amplificado.....	15
3.2.2.1 SSCA.....	15
3.2.2.2 <i>Eletroforese em gel de Poliacrilamida</i>	15
3.2.2.3 <i>Revelação do gel</i>	16
3.2.3 PCR TEMPO REAL	17
3.2.4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	18
RESULTADOS	19
4.1 SNP 1 (rs2246118).....	19
4.2 SNP 2 (rs12989194).....	19
DICUSSÃO	26
5.1 METODOLOGIA.....	26
5.1 SNP 1 (rs2246118).....	26
5.2 SNP 2 (rs12989194).....	27
5.3 LOCALIZAÇÃO DOS SNPs.....	27
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1. Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i>	3
Figura 1.2. Estrutura do gene <i>RAPH1</i>	8
Figura 1.3. Estruturas das proteínas da família MRL.....	9
Figura 1.4. Fases da PCR em escala logarítmica.....	10
Figura 1.5. Sonda ligada à fita de DNA.....	11
Figura 1.6. Liberação dos fluoróforos pela DNA Polimerase.....	11
Figura 4.1. Curva de emissão de fluorescência em homozigotos para o alelo C.....	20
Figura 4.2. Curva de emissão de fluorescência em heterozigotos.....	21
Figura 4.3. Curva de emissão de fluorescência em homozigotos para o alelo T.....	22
Figura 4.4. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, com os genótipos encontrados para o SNP 2 (rs12989194).....	24
Figura 5.1 Esquema do cromossomo 2 mostrando seus SNPs em desequilíbrio de ligação com o gene <i>RAPH1</i>	28
Tabela 4.1 Condições padrão testadas para as eletroforeses do SNP 1 (rs2246118).....	19
Tabela 4.2. Freqüências alélicas e genotípicas para os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, referentes ao SNP 1 (rs2246118).....	23
Tabela 4.3. Freqüências alélicas e genotípicas para os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, referentes ao SNP 2 (rs12989194).....	25

RESUMO

A butirilcolinesterase humana (BChE) é sintetizada no fígado, e pode ser encontrada em diversos tecidos do corpo. Apesar de sua função fisiológica não ter sido completamente esclarecida, esta enzima já foi relacionada com diversas funções como a condução nervosa lenta, à proteção da acetilcolinesterase, IMC, Síndrome Metabólica, Doença de Alzheimer, metabolismo da cocaína, entre outras. A BChE pode ser encontrada sob diversas formas no plasma, uma delas é representada pela banda C₅, que é formada pelo tetrâmero da BChE associado a uma proteína desconhecida codificada pelo loco *CHE2*. Estudos recentes apontam a lamelipodina humana (Lpd) como sendo a provável proteína associada à BChE, na formação da banda C₅, presente somente em indivíduos *CHE2* C5+. O presente estudo verificou a existência de relação entre a variabilidade do loco *CHE2* e mutações no gene *RAPH1*, responsável por codificar a proteína lamelipodina. Foram genotipados dois SNPs em desequilíbrio de ligação alto com o gene *RAPH1* e determinadas suas frequências alélicas e genotípicas, a fim de verificar a existência de associação entre os alelos dos SNPs e os fenótipos *CHE2* C5+ e *CHE2* C5-. As técnicas utilizadas para a genotipagem das amostras foram PCR em Tempo Real e PCR-SSCA. As frequências alélicas e genotípicas obtidas foram analisadas estatisticamente. Para o SNP 1 (rs2246118) as frequências alélicas não diferiram significativamente nos dois grupos enquanto que as frequências genotípicas se apresentaram bastante diferentes. O valor de *Odds Ratio* foi significativo somente para o genótipo T/T quando comparado com os genótipos C/T+C/C e não para o C/C quando comparado com C/T+T/T, quanto à presença destes genótipos nos dois grupos. Para o SNP 2 (rs12989194), tanto as frequências alélicas quanto as genotípicas não foram diferentes, assim como os valores de *Odds Ratio* não foram significativos para os dois genótipos (1/1 e 2/2). O fato de existir uma diferença nas frequências genotípicas, e um número maior de indivíduos homocigotos para o alelo T no grupo *CHE2* C5+, indica uma provável associação do SNP 1 (rs2246118) com esse fenótipo, sugerindo que o gene *RAPH1* e a proteína lamelipodina podem estar realmente relacionadas à formação da banda C₅, em indivíduos *CHE2* C5+.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1- COLINESTERASES

As colinesterases acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) são enzimas responsáveis por hidrolisar preferencialmente ésteres de colina. Podem ser diferenciadas em duas subclasses enzimáticas de acordo com a especificidade ao substrato; seu comportamento perante o excesso deste e sua susceptibilidade à inibidores (ÇOKUĞRAŞ, 2003).

Estas enzimas estão presentes tanto em tecidos colinérgicos e não colinérgicos assim como também no plasma e em fluidos corporais (RYHNÄNEN *et al.*, 1983; MASSOULIE *et al.*, 1992). A AChE hidrolisa a acetilcolina muito mais rápido do que qualquer outro éster de colina e é menos eficiente com o substrato butirilcolina, o qual é preferencialmente hidrolisado pela BChE (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989). No entanto, apesar de sua eficiência a AChE é inibida por altas concentrações de acetilcolina enquanto que a BChE tem sua atividade aumentada nessas condições (ALLES; HAWES, 1940) indicando uma possível contribuição fisiológica na hidrólise deste neurotransmissor sob determinadas circunstâncias, como por exemplo durante a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário (LAYER *et al.*, 1992 *apud* MIKAMI, 2005).

Tem sido sugerido por vários autores que as colinesterases apresentam relação com os processos de tumorigênese e proliferação celular (LAYER E SPORNS, 1987; LAPIDOT-LIFSON *et al.*, 1989; PATINKIN *et al.*, 1990; ZAKUT *et al.*, 1990; SOREQ *et al.*, 1991). Layer *et al.* (1992) reforçaram essa hipótese ao observarem correlação entre a expressão da butirilcolinesterase e altas taxas proliferativas em neuroblastos do tubo neural e células de retina.

Ambas as enzimas são inibidas com concentrações de 10^{-5} M de fisostigmina (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989) propriedade que distingue as colinesterases das demais esterases enquanto que o bambuterol é capaz de diferenciar as colinesterases entre si por ser um inibidor específico da BChE.

Existe uma distribuição específica de cada enzima nos diferentes tecidos. A AChE é conhecida por ser abundante no cérebro, placa motora dos músculos esqueléticos e membrana dos eritrócitos (DAVE *et al.*, 2000), enquanto que a BChE pode ser encontrada no plasma, na pele, pâncreas, substância branca do cérebro, coração, músculo liso e adipócitos (WESCOE *et al.*, 1947).

Embora a AChE e a BChE tenham uma grande similaridade na seqüência de seus aminoácidos (cerca de 53%) e em suas formas moleculares, essas duas enzimas são produtos de genes diferentes. Em humanos, o gene *ACHE* está situado no braço longo do cromossomo 7 (7q22) e o gene *BCHE*, no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2). Comparações entre as duas colinesterases indicam que suas seqüências codificantes encontram-se altamente conservadas em vertebrados, mostrando que esses genes podem ter surgido por duplicação de um gene ancestral comum (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989). Estas duas colinesterases também já foram descritas na maioria dos organismos do Reino Animal além dos vertebrados (SILVER, 1974).

1.2 - BUTIRILCOLINESTERASE

A butirilcolinesterase humana (EC 3.1.1.8) também conhecida por colinesterase do soro, pseudocolinesterase, e colinesterase não específica é produzida principalmente no fígado (WESCOE *et al.*, 1947). Pode ser encontrada no plasma e em diversos tecidos do corpo.

As principais formas moleculares da BChE que podem ser encontradas no plasma são designadas em ordem decrescente de mobilidade eletroforética: C₁, C₂, C₃, C₄ e C₅ (HARRIS *et al.*, 1962; 1963), e representam, respectivamente, monômero, monômero ligado à albumina, dímero, tetrâmero e o tetrâmero ligado à uma substância ainda desconhecida de aproximadamente 60 kDa. Massoulié e Bon (1982) propuseram uma outra nomenclatura que representa as formas globulares (G) e assimétricas (A) da enzima e o número de subunidades. As formas globulares podem ser solúveis ou ligadas à membrana celular por uma proteína transmembrânica, denominada PRIMA “proline-rich membrane anchor” (PERRIER *et al.*, 2002). A nomenclatura das formas globulares é representada por G1, G2, G3 e G4, respectivamente monômero, dímero, trímero de mobilidade intermediária entre G2 e G4 e o tetrâmero. O complexo formado pelo monômero da BChE mais albumina é representado por G1-ALB. As formas assimétricas

(alongadas), representadas pela letra A, são formadas por um a três tetrâmeros (A4, A8, A12) covalentemente associados a uma cauda de colágeno (Col-Q) que os ancora na matriz extra-celular da junção neuro-muscular (KREJCI *et al.*, 1997).

O monômero da BChE possui aproximadamente 574 aminoácidos e 9 cadeias de carboidratos ligadas a resíduos de asparagina, seu peso molecular é cerca de 90 kDa. Pontes dissulfeto são responsáveis pela ligação de dois monômeros para a formação de um dímero estável (LOCKRIDGE *et al.*, 1987a, 1987b, *apud* NUNES, 2007) e dois dímeros se ligam através de ligações não covalentes para a formação do tetrâmero (LOCKRIDGE; LA DU, 1982 *apud* BOBERG, 2008).

O gene *BCHE* (Figura 1.1) é de caráter polimórfico e está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2), constituído por 64.559 pb do início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação, distribuídos em quatro exons, formados por 2.444 pares de bases (GenBank, NC 000003). Mais de sessenta e cinco variantes para este loco já foram descritas, sendo muitas delas consideradas raras e outras com freqüência populacional \geq 1% (MIKAMI, 2005).

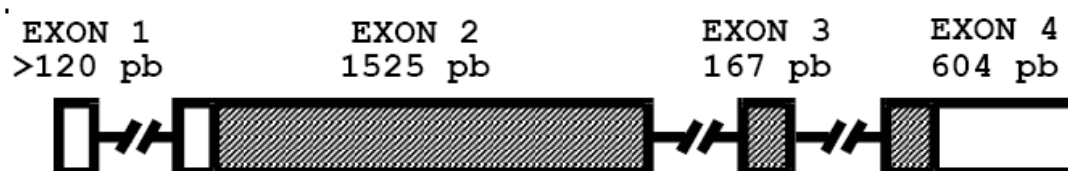


Figura 1.1 - Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região hachurada corresponde à proteína madura.

Os primeiros alelos identificados no loco *BCHE* foram os da variante usual (*BCHE**U), que é o mais comum, presente em mais de 95% dos indivíduos (WHITTAKER, 1986); da variante atípica (*BCHE**A) e da variante resistente ao fluoreto (*BCHE**F). Também já foram descritas as variantes K (*BCHE**K) e J (*BCHE**J), entre outras, que assim como as variantes atípica e resistente ao fluoreto, apresentam redução na atividade da BChE.

Embora seja conhecido o papel da BChE na hidrólise de diversos ésteres de colina, como a butirilcolina, além de ésteres alifáticos, tais como o ácido acetilsalicílico (AAS) (HARRIS, 1980) a função fisiológica e o substrato natural da BChE ainda não estão totalmente esclarecidos. A BChE também é conhecida por exercer um importante papel farmacológico na hidrólise do relaxante muscular succinilcolina, o qual é utilizado durante a anestesia (KALOW; GUNN, 1959). Em alguns casos podem ocorrer paralisia muscular e apnéia respiratória prolongada, pois os pacientes portadores de algumas variantes não usuais da BChE são incapazes de hidrolisar a succinilcolina em doses fisiológicas presente na anestesia.

Alguns estudos relacionam a BChE à condução nervosa lenta, à regulação de níveis de colina e acetilcolina no plasma, à proteção da acetilcolinesterase, à remoção de ésteres de colina produzidos no metabolismo, e à assimilação de alimentos (KUTTY, 1980; WHITTAKER, 1980, 1986). Além de já ter sido associada à lípidos, lipoproteínas, peso, índice de massa corporal (IMC) e obesidade (KÁLMÁN *et al.*, 2004; KUTTY; PAYNE, 1994; STUEBER-ODEBRECHT *et al.*, 1985; SOUZA *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2003, respectivamente).

A BChE também tem sido associada com a Síndrome Metabólica (RANDELL *et al.*, 2005), caracterizada por uma série de sintomas, entre eles: obesidade visceral, hipertensão, dislipidemia patogênica e intolerância a glucose, que por tempo prolongado pode causar Diabetes Mellitus do tipo 2. Lepiński *et al.* (2005) encontraram uma frequência do alelo K da BChE de 22,0% em pacientes com Síndrome Metabólica quando comparada com indivíduos sem a síndrome (11,2%), e também que a variante K em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 pode predispor a um aumento no risco desenvolvimento da Síndrome Metabólica.

Gomes (2007) verificou que existe uma associação entre a variante atípica da BChE (*BChE**A) e a susceptibilidade ao Mal de Hansen, relacionada não ao desenvolvimento da doença mas sim ao risco de contraí-la.

A BChE também já foi associada a Doença de Alzheimer (WRIGHT *et al.*, 1993) que é caracterizada por uma intensa diminuição da transmissão colinérgica, devido a deficiência do neurotransmissor acetilcolina, ocasionando uma progressiva degeneração em áreas do cérebro principalmente associadas à memória, intelecto e consciência. A

atividade da BChE encontra-se aumentada nessas condições e estudos mostram que uma inibição específica na BChE eleva de forma acentuada os níveis de acetilcolina, ocasionando melhora no quadro patológico (CASADEMONT *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2000).

Broomfield *et al.* (1991) relataram que existe uma proteção do sistema nervoso colinérgico pela BChE em macacos Rhesus quando expostos à toxicidade de organofosforados (OPs), na estequiometria de 1:1. A enzima purificada de eqüinos foi administrada antes da aplicação de doses de OPs e nenhum dos macacos apresentaram sinais de intoxicação, evidenciando a eficácia da BChE em prevenir danos causados pelo veneno. Pesquisas posteriores utilizando BChE humana também obtiveram resultados similares (RAVEH *et al.*; 1997). Devido à estreita relação de parentesco existente entre macacos e seres humanos é possível extrapolar os resultados encontrados e considerar este tipo de tratamento indicado em pessoas que são normalmente mais expostas a esses OPs, entre elas os agricultores.

Outro aspecto importante da BChE é o seu envolvimento no metabolismo da cocaína (INABA *et al.*, 1978). A BChE hidrolisa a droga geralmente em dois produtos: ácido benzóico e ecgonina metil éster os quais possuem pequena atividade biológica (MISRA *et al.*, 1975; MADDEN; POWERS, 1990). Recentemente tem-se considerado o uso da BChE no tratamento de intoxicações severas pela droga em seres humanos, que muitas vezes levam à morte (GORELICK, 1997). No entanto a BChE que ocorre normalmente no plasma possui eficiência catalítica relativamente baixa em hidrolisar a cocaína, sendo necessária uma quantidade elevada da enzima.

Brimijoin *et al.* (2008) desenvolveram a proteína Albu-Coch pela fusão de uma variedade recombinante da BChE ao C terminal da albumina sérica humana. Esta fusão resultou em uma proteína que superou a baixa eficiência da BChE nativa além de ser extremamente estável, possuir baixa toxicidade e maior tempo de meia vida no plasma tornando-a indicada para fins terapêuticos.

1.3 – BANDA C₅

Uma associação entre a BChE e uma proteína desconhecida codificada pelo loco *CHE2* (cromossomo 2, q33-q35) foi proposta por Scott e Powers (1974) como a provável

formação da banda C₅, sendo CHE2 C₅⁺ e CHE2 C₅⁻ responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C₅. A frequência do fenótipo CHE2 C₅⁺ na população do sul do Brasil é de cerca de 10% (CHAUTARD FREIRE- MAIA *et al.*, 1991 *apud* NUNES, 2007).

Masson (1991) demonstrou que altas concentrações do sal NaCl (1,5 a 4M) são capazes de dissociar o complexo C₅ em C₄ indicando que esta associação não é covalente. No mesmo trabalho foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida e demonstrado que a proteína desconhecida possui 60kDa, estes cálculos foram feitos simplesmente pela diferença entre os 400 kDa do complexo C₅ e 340kDa do tetrâmero C₄.

Sugimori (1986) demonstrou que os indivíduos CHE2 C₅⁺ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos CHE2 C₅⁻ pois, de acordo com Harris (1980) indivíduos com fenótipo CHE2 C₅⁺ apresentam atividade média da BChE cerca de 30% superior à de indivíduos CHE2 C₅⁻. Também foi proposto um padrão de herança autossômico dominante para a presença da banda C₅ (HARRIS *et al.*, 1962) apesar de já terem sido relatados casais CHE2 C₅⁻ com filhos CHE2 C₅⁺ (GUERREIRO *et al.*; 1989).

Alcântara *et al.* (2001) verificaram que o fenótipo CHE2 C₅⁺ intenso apresenta IMC médio (23,2) significativamente menor ($p < 0,001$) quando comparado com os fenótipos CHE2 C₅⁺ fraco (25,2) e CHE2 C₅⁻ (25,4). Posteriormente no trabalho de Furtado (2005) foi verificado que o fenótipo CHE2 C₅⁺ é menos freqüente em obesos que em amostra da população de Curitiba, sugerindo que esse fenótipo tem efeito protetor em relação à obesidade.

Masson (1991) e vários outros autores, procuraram identificar a proteína ligada ao tetrâmero da BChE, a qual origina a formação da banda C₅, no entanto os resultados obtidos não permitiram sua identificação, mas foram importantes para que fossem descartadas várias hipóteses. Foi demonstrado que a banda C₅ não é um híbrido de AChE/BChE, tão pouco um agregado de C₂ (MASSON *et al.*, 1991). A possibilidade de que C₅ poderia ser uma imunoglobulina foi considerada por Gallango e Arends (1969), porém anticorpos contra cadeias κ e λ de imunoglobulina não detectaram tal fragmento em isolado de C₅.

O mapeamento do gene da fibronectina como pertencente ao cromossomo 2 (KOCH *et al.*, 1982), próximo à região designada para CHE2 (EIBERG *et al.*, 1989),

levantou a possibilidade de C₅ ser formada pela associação de C₄ com fragmento de fibronectina. Essa hipótese foi rejeitada, pois C₅ não foi reconhecida por anticorpos policlonais para fibronectina humana.

Li *et al.* (2008) verificaram a existência de vários peptídeos ricos em prolina em tetrâmeros da BChE humana e de cavalos. Estes peptídeos estão presentes tanto na BChE sérica como também na BChE da junção neuromuscular e do sistema nervoso central. Os peptídeos ricos em prolina além de dirigirem a formação do complexo C₄ fazem parte do complexo final e permanecem intrínsecos ao tetrâmero, organizando suas 4 subunidades.

Também foi proposto no mesmo trabalho que a variedade de peptídeos ricos em prolina obtidos após desnaturação de C₄, são todos derivados de uma mesma proteína: a lamelipodina humana (*RAPH 1* gi: 82581557, utilizando banco de dados BLAST). Estes peptídeos são originados de um único peptídeo progenitor que é progressivamente proteolizado tanto na terminação N quanto na C, conforme circula na corrente sanguínea ligado à BChE. O resultado de diferenças na proteólise origina o peptídeo intrínseco à BChE e a todas as suas variantes observadas.

Tanto o gene para a lamelipodina humana (*RAPH1* - Ras association and pleckstrin homology domains 1) quanto o da proteína desconhecida codificada pelo loco *CHE2* presente no complexo C₅ em indivíduos CHE2 C5+, estão localizados na mesma região do cromossomo 2 (q33); (NCBI GENE; LOCKRIDGE *et al.*, 1990, respectivamente) sugerindo que a proteína presente no complexo C₅ poderia ser uma forma truncada da lamelipodina. A protease responsável por clivar a lamelipodina nas terminações N e C do complexo C₄ provavelmente não se liga de modo eficiente à lamelipodina mutada, e desta forma a lamelipodina presente no complexo C₅ ficaria com um tamanho maior em relação à lamelipodina encontrada no complexo C₄.

1.4 – GENE *RAPH1*

O gene *RAPH1*, responsável por codificar a proteína lamelipodina humana, foi descrito pela primeira vez por Nagase *et al.* (2000) os quais determinaram sua localização no cromossomo 2. Posteriormente sua localização foi refinada e determinada como sendo na região q33 (EPPERT *et al.*, 2004).

Também no trabalho de Eppert *et al.* (2004) foi verificado que o gene *RAPH1* consiste em 15 exons com 2 exons adicionais (exons 16 e 17) caso existam *splicings* alternativos na região C-terminal, totalizando 17 exons (Figura 1.2). Existem também duas regiões de *splicing* alternativo (exons 5 e 6) localizados no meio do gene. O transcrito do exon 15 possui uma região que pode se ligar tanto com o transcrito do exon 16, quanto com o do 17.



Figura 1.2 – Estrutura do gene *RAPH1*. A região hachurada não é traduzida. Os exons 5 e 6 são para *splicing* alternativo. O exon 15 contém uma região crítica de *splicing* que quando utilizada pode se ligar ao exon 16 ou 17. Adaptado de Eppert *et al.*, (2004).

1.5 – LAMELIPODINA HUMANA

A lamelipodina humana (Lpd) juntamente com as proteínas RIAM e MIG-10 (encontrada em *C. elegans*) são parte da família de proteínas MRL. Todas possuem os domínios PH (*pleckstrin homology*) e RA (*Ras-association*) além de um polipeptídeo rico em prolina na região C-terminal, com tamanho diferente para cada uma delas (Figura 1.3). Estes domínios são sítios de ligação que estão associados à membrana celular, à sinalização, além de possuírem seqüências de ligação às proteínas Ena/VASP. As proteínas MRL funcionam como adaptadores de sinais para modular a actina do citoesqueleto através das proteínas Ena/VASP (LAFUENTE *et al.*; 2004; KRAUSE *et al.*, 2004), intimamente relacionadas com a protrusão lamelipodial e a motilidade celular.

Krause *et al.* (2004) verificaram que tanto as proteínas Ena/VASP quanto a Lpd estão localizadas nas pontas dos lamelipódios e filopódios e também que o domínio PH da Lpd é responsável por se ligar especificamente a PI(3,4)P₂, um potente sinalizador celular relacionado à quimiotaxia.

Em experimentos do mesmo trabalho observou-se um aumento da velocidade de protrusão lamelipodial quando a Lpd encontrava-se superexpressa. Em contra partida a ausência total da expressão da Lpd dificultou a formação do lamelipódio, além de diminuir a velocidade de lamelipódios residuais e a quantidade de filamentos de actina-F presentes na célula.

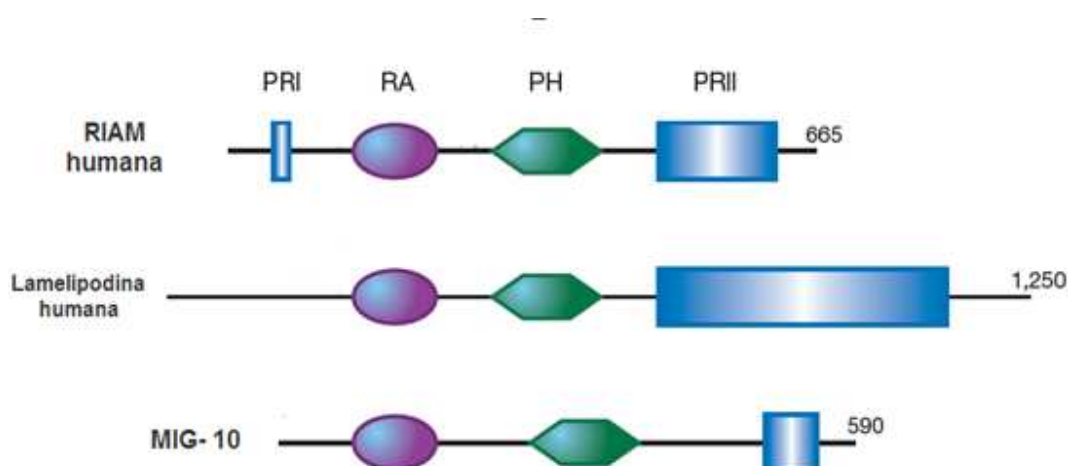


Figura 1.3 - Estruturas das proteínas da família MRL. PRI e PRII – domínios ricos em prolina; RA – domínio *Ras – association*; PH – *Pleckstrin homology*. Adaptado de Legg e Machesky (2004).

Resultados obtidos por Lyulcheva *et al.* (2008) sugerem que um ortólogo da lamelipodina humana encontrado em *Drosophilas* (pico), é extremamente importante para a proliferação celular e o crescimento dos tecidos e do organismo de forma geral, mostrando que outras proteínas, além das colinesterases, podem ter papel na proliferação celular e possivelmente na tumorigênese. Redução nos níveis da proteína pico ocasionam redução nas taxas de divisão celular, retardo no crescimento e letalidade, enquanto que sua superexpressão resulta em um crescimento acentuado dos tecidos.

Já foram descritos mais de 500 SNPs para o gene *RAPH1* (NCBI SNP DATABASE) responsável por codificar a lamelipodina, e a técnica PCR em Tempo Real vem sendo bastante utilizada para a genotipagem destes e de diversos outros SNPs.

1.6 - PCR EM TEMPO REAL

A técnica PCR em Tempo Real é baseada no método clássico de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase), que foi desenvolvido por Kary Mullis na década de 80, permitindo aos pesquisadores amplificar regiões específicas de DNA em mais de 1 um bilhão de cópias. (MULLIS;FALOONA, 1987; MULLIS, 1990; SAIKI *et al.*, 1985 *apud* VALASEK; REPA, 2005).

Desde a invenção da técnica PCR em Tempo Real nos anos 90 (HIGUCHI *et al.*, 1992, 1993), esta tem sido amplamente utilizada com diversas finalidades, entre elas: diagnóstico de doença e carga viral (HIV, Vírus da hepatite B, C e outros); eficácia da terapêutica de determinadas drogas; detecção de patógenos; quantificação gênica; genotipagem entre outras (INFORMATIVO BIESP, 2006).

A grande vantagem da PCR em Tempo Real quando comparada com a PCR convencional é a possibilidade da detecção dos resultados na primeira fase da reação de amplificação (fase exponencial), considerada mais precisa. Na PCR convencional existe a necessidade da utilização de géis de poliacrilamida ou agarose, que normalmente consomem muito tempo e nem sempre garantem um resultado preciso, além de os resultados só poderem ser observados na última fase da reação (Fase Platô) (Figura 1.4).

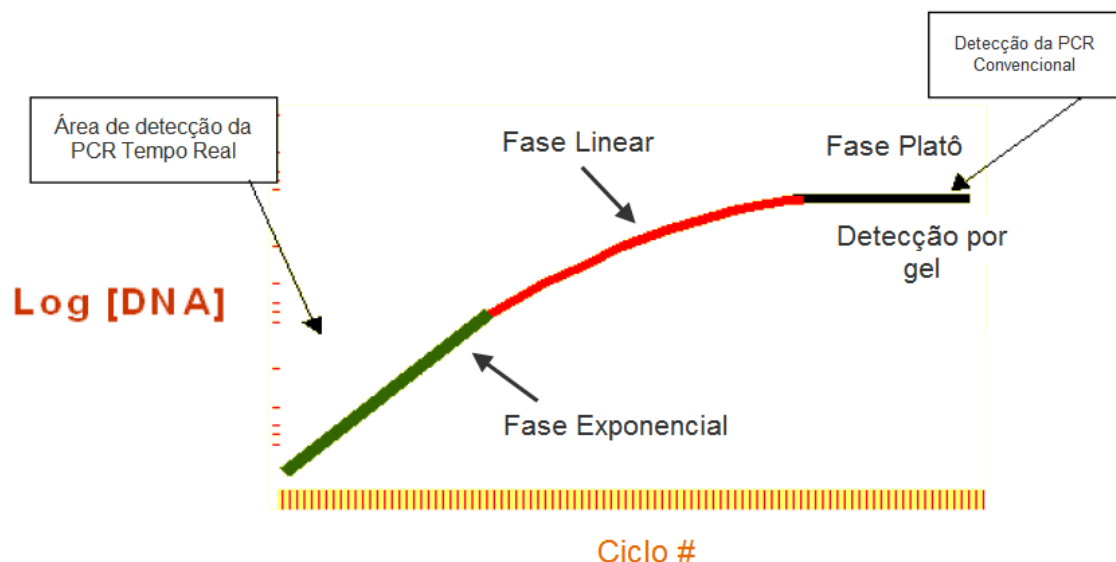


Figura 1.4: Fases da PCR em escala logarítmica. Adaptado do tutorial da Applied Biosystems (Real-Time PCR Vs. Traditional PCR).

Com essa técnica é possível fazer a genotipagem de SNPs, que normalmente é feita com a enzima AmpliTaq Gold® DNA Polimerase com atividade exo-nuclease 5', esta atividade e o sistema FRET (*Fluorescent Resonant Energy Transfer*) permitem a detecção da reação de PCR em Tempo Real por emissão de fluorescência. Também são utilizadas sondas TaqMan® Probes que são pequenos oligonucleotídeos específicos para cada SNP a ser analisado contendo os fluoróforos Reporter (extremidade 5') e Quencher (extremidade 3'), acrescidos de uma solução PCR Master Mix contendo todos os reagentes necessários para a reação de amplificação. As sondas se hibridizam especificamente em uma região entre os dois iniciadores.

Durante a reação de amplificação a DNA Polimerase é responsável por clivar as sondas contendo os fluoróforos que estavam previamente ligadas às fitas de DNA (Figura 1.5). Ao ser liberado (Figura 1.6), o fluoróforo de maior energia, Reporter, consegue emitir sua fluorescência antes suprimida pelo fluoróforo de menor energia, chamado Quencher. Os fluoróforos Reporters normalmente utilizados na reação de amplificação são: VIC® responsável por ligar no Alelo 1 e FAM™ responsável pela ligação ao Alelo 2.

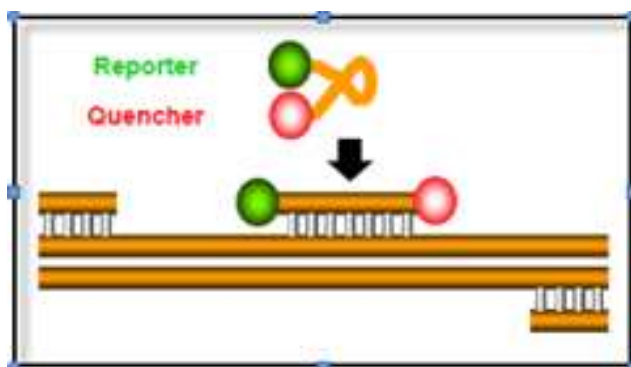


Figura 1.5 – Sonda ligada a fita de DNA.

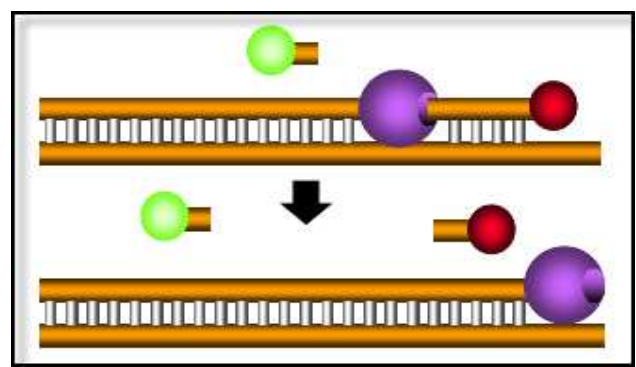


Figura 1.6 – Liberação dos fluoróforos pela Polimerase

Se somente uma das fluorescências for liberada, VIC® ou FAM™ é possível dizer que a amostra é homocigota para aquele alelo. Se as duas forem detectadas, a amostra é considerada heterocigota possuindo os dois alelos marcados pelas sondas.

A partir da técnica PCR em Tempo Real juntamente com a técnica de PCR-SSCA deseja-se verificar através da análise de SNPs, se mutações no gene *RAPH1*, responsável por codificar a lamelipodina humana, são responsáveis pela variação encontrada no loco *CHE2*, em indivíduos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

2.0 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

- Verificar a existência de relação entre a variabilidade do loco *CHE2* e mutações no gene *RAPH1*, que codifica a proteína lamelipodina.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar dois SNPs do gene *RAPH1* em indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-.
- Verificar a frequência alélica e genotípica desses SNPs nos 2 grupos.
- Verificar a existência de associação entre os alelos dos SNPs e os fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1– AMOSTRA

As amostras referem-se a doadores de sangue de Curitiba, e encontram-se estocadas no Laboratório de Polimorfismos, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná. O DNA já foi previamente extraído e genotipado para o loco *CHE2*. Foram utilizadas 63 amostras de fenótipo *CHE2* C5+ e 66 amostras de fenótipo *CHE2* C5-

3.2 – METODOLOGIA

As mutações foram genotipadas utilizando as técnicas PCR–SSCA e PCR em Tempo Real. Concentração dos géis, tempo de corrida e outros aspectos referentes às metodologias, foram padronizados no decorrer dos experimentos separadamente para os dois SNPs sendo eles: SNP 1 rs2246118 (intron 6), e SNP 2 rs12989194 (a montante do gene). Esses SNPs foram escolhidos através do programa Haploview, utilizando os dados do projeto HapMap, sendo que os critérios utilizados foram frequências semelhantes dos dois alelos e desequilíbrio de ligação alto (*tag* SNPs) com o gene *RAPH1*.

3.2.1 – PCR

As amplificações foram realizadas com 10µl de volume total de reação, contendo 9µl de PCR supermix (Invitrogen- 22mM Tris-HCl pH 8,4; 55mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 200µM dATP; 200µM dTTP; 200µM dCTP; 200µM dGTP; 22 U/mL Taq DNA polimerase), 1µl de DNA e 10pmoles de cada iniciador. As PCRs foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient ou Techgene Ftgene2D e os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores utilizados: RAPH15 GGTTTCACCAAGTTGCACAG e RAPH13 CTAGGCTTTTGATTACTCTG gerando um fragmento de DNA com 158pb para o SNP 1 (rs2246118); RAPH25 CAAGGGAGGCTATGTGCCAT e RAPH23 ATGCTCTTCCTCCCAACTTC gerando um fragmento de DNA com 200pb para o SNP 2 (rs12989194).

Os termocicladores utilizaram os seguintes programas: Para o termociclador Eppendorf Mastercycler gradient : 1) 95°C por 30 segundos; 2) 95°C por 30 segundos; 3) 48°C por 30 segundos; 4) 72°C por 30 segundos; 5) repetir por 35 ciclos do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 minutos; 7) 20°C por 10 minutos.

Para o termociclador Techgene Ftgene2D: 1) 80°C por 30 segundos; 2) 94°C por 30 segundos; 3) 48°C por 30 segundos; 4) 72°C por 30 segundos; 5) repetir por 35 ciclos do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 minutos.

3.2.2 – ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO

3.2.2.1 - SSCA

A técnica de SSCA (análise de conformação de fita simples) consiste na amplificação do DNA e posterior desnaturação por calor. As fitas simples resultantes são colocadas em gel de poliacrilamida, adquirem conformação tridimensional, e assim podem correr em posições diferentes no gel. Uma simples mutação de ponto pode alterar essa conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento.

Após a amplificação das amostras, 5 µL de cada amostra foram misturados a 6 µL de solução tamponante (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 µL de EDTA 0,4 M, 16,7 µL de NaOH 3 M e 108,3 µL de água bidestilada) e, depois, mantidos a 94°C por 5 minutos para desnaturação das fitas do DNA.

3.2.2.2 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Após a desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

O gel, para um volume final de 30 mL, era preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 49:1 (49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL) acrescida de 250 µL de persulfato de amônio 10% e 30 µL de TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina). A solução para preparo do gel era o tampão Tris 33mM pH 3,68, caracterizando uma eletroforese descontínua por ter sido usado Tampão TBE 1x na cuba.

A separação parcial das bandas nos géis para o SNP 1 (rs2246118) foram obtidas através das seguintes condições: eletroforese em gel de poliacrilamida solução estoque de 49:1, concentração do gel 11%, descontínua, duração da corrida de 23h, 100V.

Em relação ao SNP 2 (rs12989194) as eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida utilizando solução estoque 49:1, concentração do gel 8%, descontínua, com duração da corrida de 23h, 120V.

3.2.2.3 – REVELAÇÃO DO GEL

A revelação dos géis foi realizada com base na metodologia descrita por Budowle e cols., 1991 (*apud* MIKAMI, 2005), durante a qual se mantém o gel sob agitação.

Após ter sido realizada a eletroforese, o gel foi depositado em um recipiente de vidro e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1%) durante 3 min. Decorrido este tempo foi lavado duas vezes com água destilada e imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) por 30s sob aquecimento no forno de microondas (potência média/forte). Feito isto o gel foi lavado novamente duas vezes com água destilada e foi imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96% e 92 µL de formaldeído) até que o líquido escurecesse. Depois da retirada do líquido escurecido, acrescentou-se o restante da solução reveladora. O gel foi novamente aquecido por 30 segundos no forno microondas e depois mantido imerso até que as bandas de DNA aparecessem.

Quando a revelação estava terminada, o gel foi lavado duas vezes com água destilada e mantido em solução de ácido acético (10%) por 5 min. Lavou-se, então, por duas vezes com água destilada e acrescentou-se solução aquosa de glicerol (5%), na qual o gel foi mantido por, pelo menos, 10 min. Antes da secagem, o gel era embebido em solução de metanol (30%) e glicerol (1%) e colocado sobre duas folhas de papel transparente para que pudesse ser arquivado no computador através do scanner. Após este procedimento o gel foi depositado sob um papel celofane (previamente embebido na mesma solução de metanol e glicerol) que deveria estar esticado sobre uma superfície lisa para que não se formassem bolhas de ar que prejudicassem a secagem. Então se

cobriu o gel com uma folha de papel filtro e este foi levado a uma prensa forrada com papel filtro, permanecendo por aproximadamente sete dias.

3.2.3 – PCR EM TEMPO REAL

A técnica PCR em Tempo Real foi utilizada para a genotipagem das amostras CHE2 C5+ e CHE2 C5- para o SNP 1 (rs2246118).

As sondas fluorescentes são complementares à região do SNP: AAATATCTAAGAAAAATAAAAACCTT[C/T]TTGGTTGGGCGTGTTGGCTCATTTC, sendo o fluoróforo Reporter VIC® responsável por marcar o alelo contendo a base C e o FAM™ responsável por detectar o alelo contendo a base T.

O kit de genotipagem contendo as sondas TaqMan® Probes juntamente com os iniciadores específicos foram diluídos em uma proporção de 1:1 em tampão TE 1x (50 µl Tris-HCl 2M, 20µl EDTA 0,5M e 9.93mL H₂O milli-Q, pH 7,2-7,4). Este kit deve ser sempre mantido enrolado em papel alumínio para que não seja exposto excessivamente à luz.

Foi preparada uma solução MIX contendo por amostra: 0,3µl do kit diluído, acrescidos de 3,2µl de H₂O milli-Q e 5µl da solução TaqMan® Genotyping Master Mix (o qual contém a enzima AmpliTaq Gold ® DNA Polimerase UP, dNTP's e demais reagentes necessários para a reação de amplificação). Desta solução MIX foram retirados 8,5µl e adicionados em cada poço da placa de PCR (em um total de 96 poços) com 1,5µl de DNA, totalizando 10µl de volume final por amostra. Também foram adicionados à placa dois controles negativos contendo 1,5 de H₂O milli-Q ao invés de amostras de DNA. Durante a manipulação do kit de genotipagem assim como os demais reagentes e materiais, foram utilizadas luvas sem talco.

Depois de aplicadas todas as amostras, a placa foi vedada com filme adesivo transparente com auxílio de uma espátula de plástico, para que não existisse contato direto entre as luvas e o filme.

A reação de amplificação foi realizada no aparelho Mastercycler® ep realplex com o seguinte ciclo de amplificação:

1) 50°C por 2 minutos; 2) 95°C por 10 minutos; 3) 95°C por 15 segundos; 4) 60°C por 1 minuto; 5) repetir por 45 ciclos do passo 3 ao 4.

Após término da reação de amplificação (aproximadamente 1 hora e 40 minutos depois), os resultados ficaram gravados no próprio computador acoplado ao aparelho Mastercycler® ep realplex, para posteriores análises. Os genótipos foram identificados através da análise individual das curvas de VIC® e FAM™.

3.2.4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise das frequências alélicas e genotípicas foi utilizado o programa Clump e obtidos valores χ^2 pelo método Monte Carlo, com 10000 simulações.

Também foram gerados valores de *Odds Ratio* para estimar se um dos genótipos estava mais freqüente no grupo estudo (CHE2 C5+) ou no grupo controle (CHE2 C5-). O valor de *Odds Ratio* é calculado através da fórmula $OR = (AxD)/(BxC)$ (WOOLF, 1955) obtida de uma tabela de contingência 2x2 que calcula a relação entre duas proporções: eventos sobre não eventos no grupo de estudo, dividido por eventos sobre não eventos no grupo controle.

Quando o intervalo de confiança (95%) obtido continha o valor 1, significava que não havia diferença significativa quanto a presença ou ausência do genótipo nos dois grupos.

4.0 – RESULTADOS

4.1– SNP 1 (rs2246118)

A princípio optou-se por utilizar a técnica PCR-SSCA para a genotipagem das amostras. Cinco condições padrão (Tabela 4.1) foram testadas a fim de estabelecer as condições ideais para a diferenciação dos padrões de bandas dos genótipos. Os fatores modificados foram: solução estoque de poliacrilamida, concentração de acrilamida dos géis, tampão, duração da pré-corrída, voltagem e tempo de corrida.

Tabela 4.1 - Condições padrão testadas para as eletroforeses utilizadas na genotipagem do SNP 1 (rs2246118), pela técnica PCR - SCCA.

Condições padrão	Solução estoque de poliacrilamida	Concentração		Pré-corrída		Voltagem (V)
		acrilamida (%)	eletroforese	(duração)	Tempo de corrida	
1	29:1	8	contínua	1h	1h 30 min	360
2	29:1	10	contínua	1h	3h 30 min	320
3	29:1	10	descontínua	1h	3h 30 min	320
4	49:1	11	descontínua	35 min	5h 30 min	400
5	49:1	11	descontínua	_____	23h	100

A condição 5 foi a que mais se aproximou da ideal por apresentar certa separação das bandas no gel, no entanto os resultados obtidos para a genotipagem não foram conclusivos. Dessa forma os resultados para esse SNP foram obtidos somente através da técnica PCR em Tempo Real.

Foram observados para o grupo CHE2 C5+: 22 indivíduos homozigotos para o alelo C (C/C), 23 heterozigotos (C/T) e 14 indivíduos homozigotos para o alelo T (T/T). Já para o grupo CHE2 C5- foram encontrados: 15 indivíduos C/C, 47 indivíduos C/T e 4 indivíduos T/T. As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 mostram as curvas de emissão de fluorescência observadas para genótipos encontrados em indivíduos homozigotos para o alelo C, heterozigotos, e homozigotos para o alelo T, respectivamente.

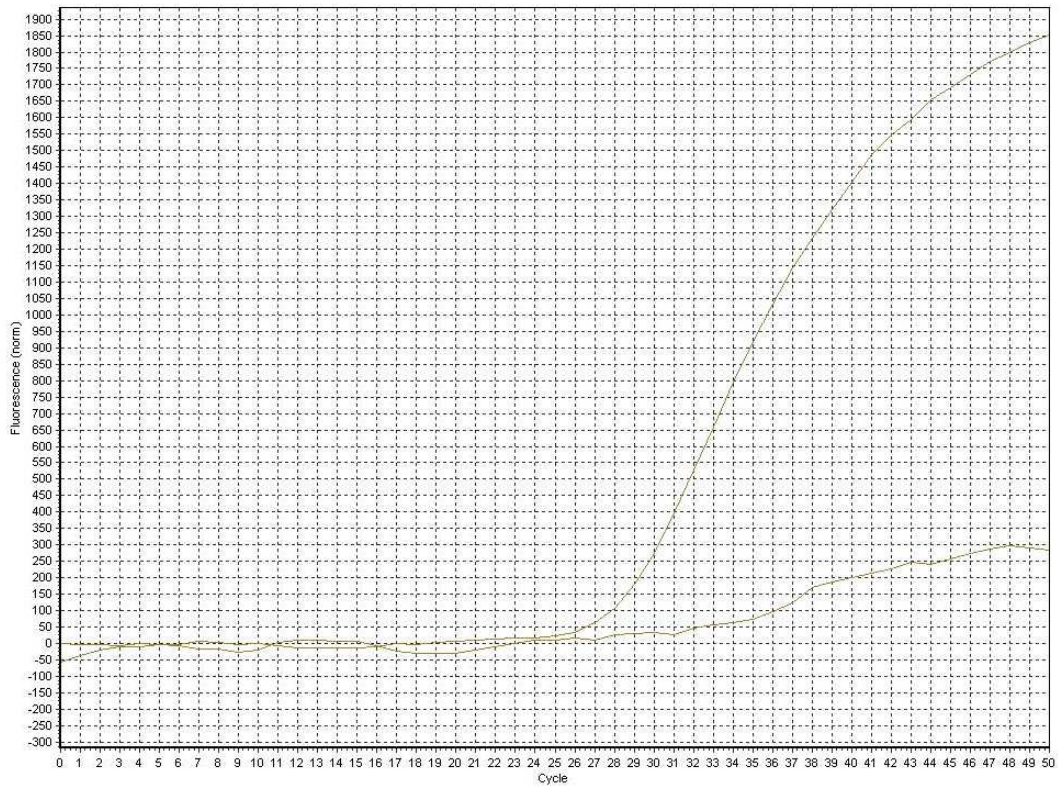


Figura 4.1 – Curva de emissão de fluorescência observada em homocigotos para o alelo C, marcada pelo fluoróforo Reporter VIC®.

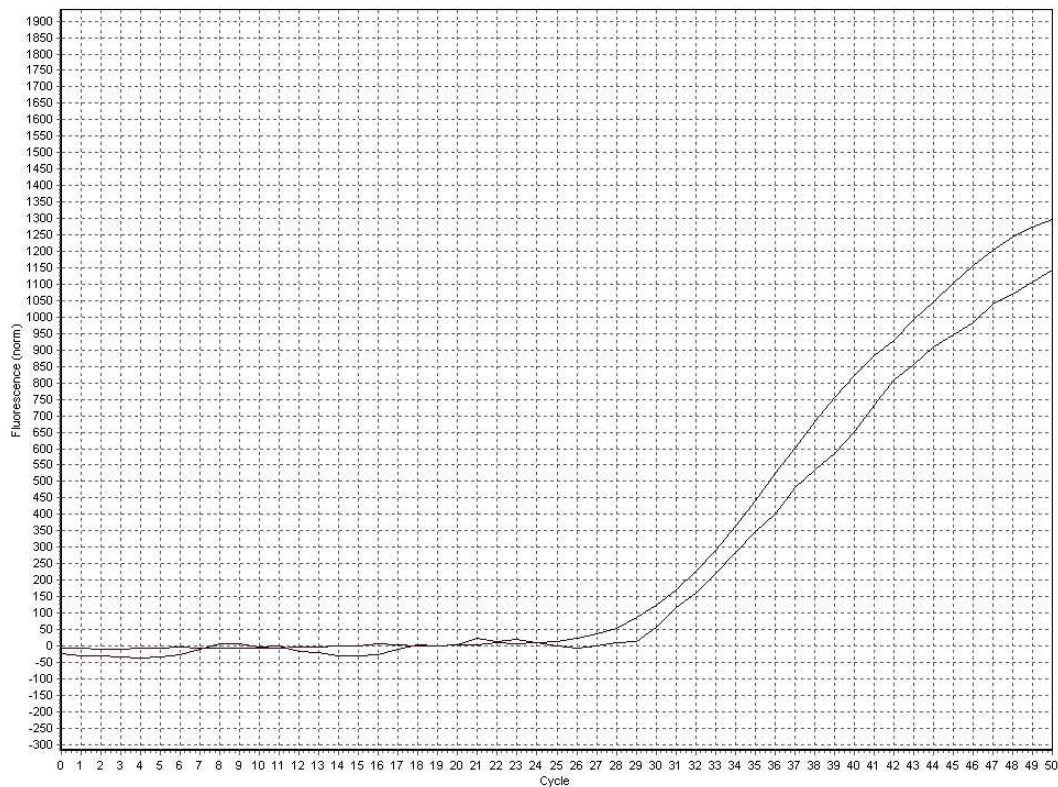


Figura 4.2 - Curvas de emissão de fluorescência observadas em heterozigotos, marcada pelos fluoróforos Reporter VIC® e FAM™.

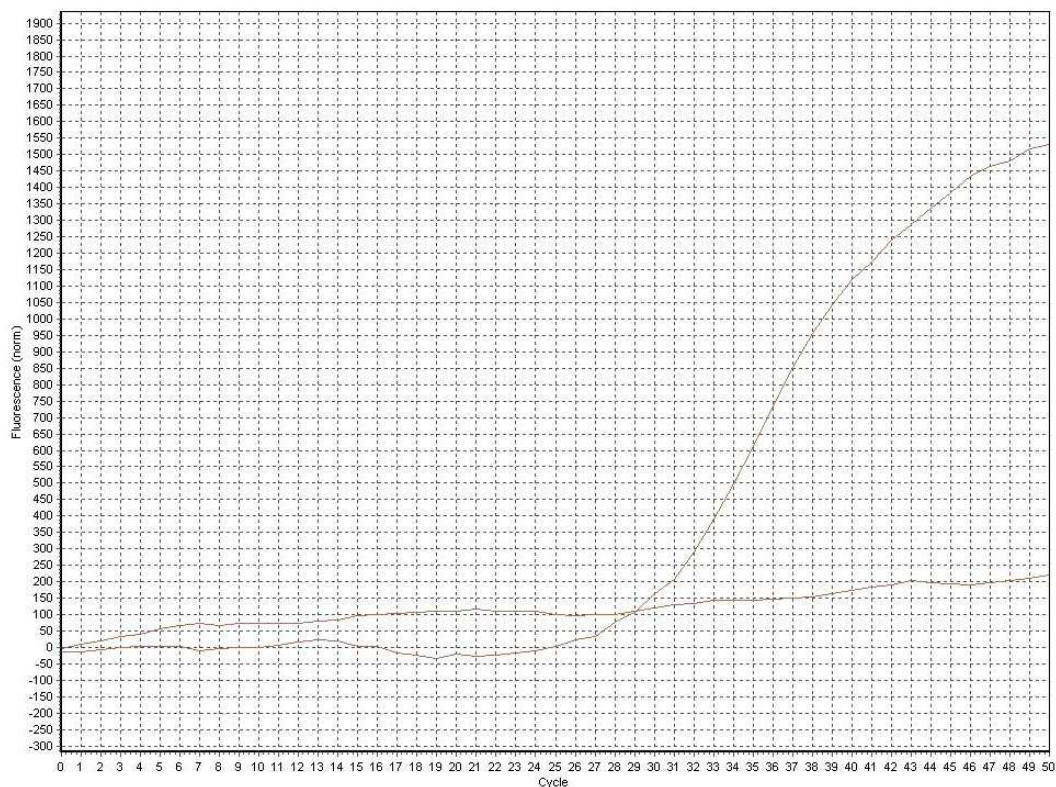


Figura 4.3 - Curva de emissão de fluorescência observada em homocigotos para o alelo T, marcada pelo fluoróforo Reporter FAM™.

As frequências alélicas observadas para o grupo CHE2 C5+ foram: 0,5678 para o alelo C e 0,4322 para o alelo T. Já para o grupo CHE2 C5- as frequências alélicas foram: 0,5833 para o alelo C e 0,4167 para o alelo T. Também foram calculadas as frequências genotípicas para ambos os grupos, sendo elas: 1) CHE2 C5+: 0,3729 para indivíduos C/C; 0,3898 para os indivíduos com genótipo C/T e 0,2373 para os indivíduos T/T; 2) CHE2 C5-: 0,2273 para os indivíduos C/C; 0,7121 para os indivíduos C/T e 0,0606 para os indivíduos T/T. Os valores das frequências alélicas e genotípicas para ambos os grupos estão resumidos na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Frequências alélicas e genotípicas para os grupos CHE2C5+ e CHE2C5-, referentes ao SNP 1 (rs2246118).

Grupo	Frequências alélicas		Frequências Genotípicas (%)			N
	C	T	C/C	C/T	T/T	
CHE2*C5+	0,5677	0,4322	37,28	38,98	23,72	59*
CHE2*C5-	0,5833	0,4166	22,72	71,21	6,06	66

*4 amostras não foram genotipadas para o fenótipo CHE2 C5+ (das 63 iniciais).

Também foram realizados cálculos de χ^2 para verificar se as amostras de ambos os grupos se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para o grupo CHE2 C5+ o valor não foi significativo ($P > 0,10$). Já o grupo CHE2 C5- apresentou um valor bastante significativo ($P < 0,01$), evidenciando que o grupo CHE2 C5+ se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o grupo CHE2 C5- não.

As frequências alélicas não foram diferentes nos dois grupos ($P > 0,70$), porém as frequências genotípicas foram significativamente diferentes ($P < 0,01$). Através de testes *Odds Ratio* foi comparado o genótipo C/C com os genótipos C/T + T/T nos dois grupos e o resultado não foi significativo (2,02, IC: 0,93 a 4,41), já com relação ao genótipo T/T e os genótipos C/T + C/C, o valor se apresentou bastante significativo (4,82, IC: 1,49 a 15,63).

4.2 – SNP 2 (rs12989194)

Após análise dos géis de poliacrilamida utilizados para a genotipagem das amostras, foram encontrados para o grupo CHE2 C5+: 31 indivíduos homocigotos para o Alelo 1; 21 indivíduos heterocigotos e 3 indivíduos homocigotos para o Alelo 2. Com relação ao grupo controle CHE2 C5- foram observados 33 indivíduos homocigotos para o Alelo 1; 27 heterocigotos e 3 indivíduos para o Alelo 2. A figura 4.4 mostra um gel de poliacrilamida submetido à eletroforese e os genótipos encontrados.

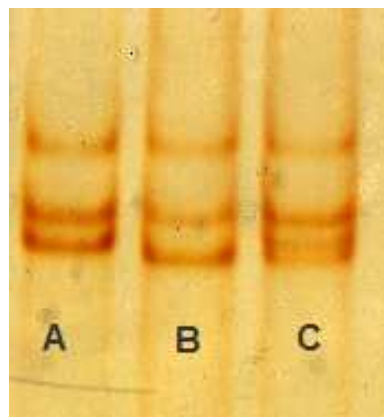


Figura 4.4: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, com os genótipos encontrados para o SNP 2 (rs12989194). A – Homozigoto para o alelo 1; B – Homozigoto para o alelo 2; C – Heterozigoto.

As freqüências alélicas e genotípicas também foram calculadas. Para o grupo CHE2 C5+ observou-se uma freqüência alélica de 0,7545 para o Alelo 1 e de 0,2455 para o Alelo 2. Para o grupo CHE2 C5- as freqüências foram 0,7380 e 0,2619 para os Alelos 1 e 2 respectivamente. Já as freqüências genotípicas foram: 1) CHE2 C5+: 0,5636 para o genótipo 1/1, 0,3818 para os indivíduos 1/2 e 0,0545 para o genótipo 2/2; 2) CHE2 C5-: 0,5238 para o genótipo 1/1, 0,4286 para o 1/2 e 0,0476 para o genótipo 2/2. Na Tabela 4.3 estão representados estes valores.

Tabela 4.3. Frequências alélicas e genotípicas para os grupos CHE2C5+ e CHE2C5-, referentes ao SNP 2 (rs12989194).

Grupo	Frequências alélicas		Frequências Genotípicas (%)			N
	Alelo 1	Alelo 2	1/1	1/2	2/2	
CHE2*C5+	0,7545	0,2454	56,36	38,18	5,45	55*
CHE2*C5-	0,738	0,2619	52,38	42,85	4,76	63**

*8 amostras não foram genotipadas para o fenótipo CHE2 C5+ (das 63 iniciais)

**3 amostras não foram genotipadas para o fenótipo CHE2 C5- (das 66 iniciais)

O cálculo do χ^2 foi realizado para verificar se as amostras se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor não foi significativo para nenhum dos grupos ($P > 0,80$ para CHE2 C5+ e $P > 0,30$ para CHE2 C5-), indicando que as amostras estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os grupos.

A diferença entre as frequências alélicas e genotípicas também não foram significativas nos dois grupos sendo: $P > 0,70$ e $P > 0,50$ para as frequências alélicas e genotípicas, respectivamente. Através de testes de *Odds Ratio* foram comparados para este SNP: a) o genótipo 1/1 com os genótipos 1/2 + 2/2, assim como b) o genótipo 2/2 com os genótipos 1/2 + 1/1. Nos dois grupos o resultado não foi significativo, a) 1,17, IC: 0,57 a 2,43 e b) 1,15, IC: 0,22 a 5,97.

5.0 – DISCUSSÃO

5.1– METODOLOGIA

A técnica de PCR-SSCA precisa ser padronizada para cada fragmento analisado. Para o SNP 2 (rs12989194) foi possível chegar aos padrões ideais, porém para o SNP 1 (rs2246118) foram feitos vários testes (tabela 4.1), mas os resultados não permitiram a identificação precisa dos genótipos. Dessa forma, para esse SNP optamos pelo método de genotipagem por Taqman (PCR em Tempo Real). Com esse método foi possível fazer a genotipagem de forma mais rápida quando comparada com a técnica PCR-SSCA, no entanto, foram necessárias análises individuais das curvas geradas pelo programa de análise (figuras 4.1, 4.2 e 4.3), não sendo possível utilizar os resultados fornecidos diretamente pelo programa.

5.2 - SNP 1 (rs2246118)

Apesar de as frequências alélicas não serem diferentes para os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, estes dois grupos diferem grandemente em suas frequências genotípicas. O genótipo T/T é muito mais freqüente em indivíduos CHE2 C5+ (23,72%) do que no grupo CHE2 C5- (6,06%). O valor de *Odds Ratio* corroborou esta hipótese por apresentar um valor bastante significativo quanto à presença do genótipo T/T no grupo CHE2 C5+. Diferentemente do genótipo C/C que não apresentou diferença significativa quanto à sua presença no grupo estudo, apesar de suas frequências genotípicas terem sido diferentes nos dois grupos, CHE2 C5+ (37,28%) e CHE2 C5- (22,72%).

Por existir um número muito maior de indivíduos homocigotos para o alelo T no grupo CHE2 C5+ e sabendo que o SNP 1 se encontra em desequilíbrio de ligação alto com o gene *RAPH1*, podemos inferir que o gene também possui relação com o fenótipo CHE2 C5+. Dessa forma, a proteína lamelipodina codificada pelo gene *RAPH1*, poderia estar de fato associada à banda C₅ como sugerido por Li *et al.* (2008), além de fazer parte do tetrâmero da BChE.

O fato de o grupo CHE C5- não se encontrar em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o grupo CHE2 C5+ sim, mas com uma baixa probabilidade ($P > 0,10$), poderia ser mais um indício de que esse SNP está interferindo de alguma maneira nas frequências genotípicas

dos dois grupos. Ou então que existem outros fatores desconhecidos governando a expressão dos fenótipos, podendo ser até mesmo a existência de outros alelos.

5.3 - SNP 2 (rs12989194)

Não houve diferença nas frequências alélicas e genotípicas encontradas nos grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5- para o SNP 2 (rs12989194), indicando que esta mutação não está associada à variabilidade encontrada no loco *CHE2*.

Devido às frequências alélicas encontradas nos dois grupos estarem em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, estas podem ser comparadas às frequências alélicas de outras populações.

De acordo com o projeto HapMap, as frequências dos alelos para este SNP em Europeus é 0,392 para o alelo C e 0,608 para o alelo T. Por não terem sido realizados experimentos de seqüenciamento não é possível afirmar ao certo quais os nucleotídeos são correspondentes aos chamados Alelo 1 e Alelo 2 neste estudo. No entanto, por se tratarem de indivíduos caucasóides em ambas as populações podemos inferir que o Alelo 1 mais freqüente tanto no grupo CHE2 C5+ quanto no CHE2 C5- seria o Alelo T, mais freqüente também na população européia, e o Alelo 2 menos freqüente, o alelo C.

Para a população Asiática o alelo T se apresentou bem mais freqüente (0,833), quando comparado com o alelo C (0,167). Diferentemente dos Africanos que possuem o alelo C mais freqüente do que o alelo T (0,583 e 0,417, respectivamente), o mesmo ocorre para os Americanos com ascendência Africana (alelo C: 0,523 e alelo T: 0,477). (NCBI SNP DATABASE, 2009) evidenciando que as frequências alélicas da maioria dos marcadores genéticos são muito variáveis entre as diferentes populações e etnias (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

5.4 – LOCALIZAÇÃO DOS SNPs

O SNP 1 (rs2246118) está localizado dentro do gene *RAPH1* enquanto que o SNP 2 (rs12989194) se encontra a montante. O SNP 1 (rs2246118) faz parte de um grande bloco de ligação (bloco CEU) que envolve praticamente todo o gene *RAPH1* e se estende até o próximo gene (Figura 5.1). O fato de este SNP ter apresentado diferença nas

freqüências genóticas nos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, indica que a mutação exata responsável por essa variação fenotípica está localizada numa região próxima, também dentro do bloco de ligação, deixando fortes indícios para a procura desta mutação em trabalhos posteriores.

Por outro lado o SNP 2 (rs12989194) se encontra em uma região fora do bloco de ligação do gene *RAPH1* (Figura 5.1), corroborando os resultados obtidos que não foram significativos quanto à diferença nas frequências alélicas e genóticas em ambos os grupos. Isto evidencia que diferentemente do SNP 1, o SNP 2 não tem relação com a variabilidade encontrada no loco *CHE2*.

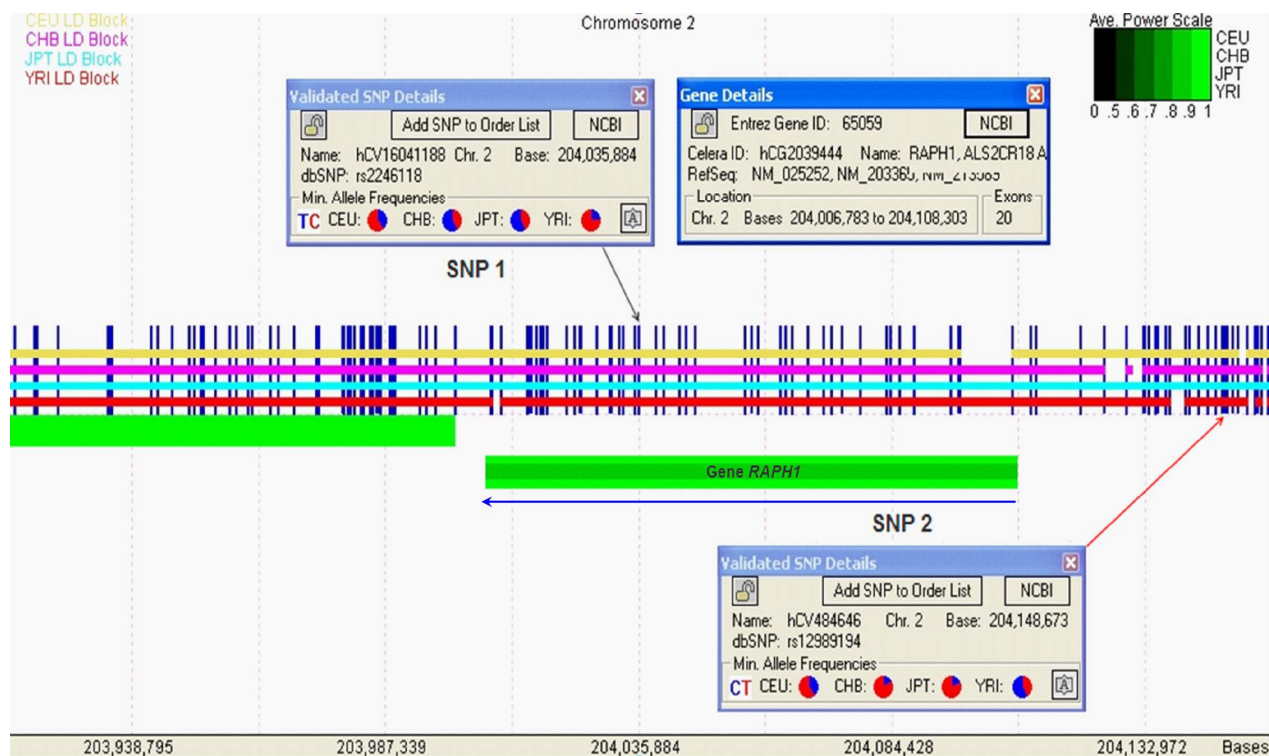


Figura 5.1 Esquema do cromossomo 2 mostrando seus SNPs em desequilíbrio de ligação com o gene *RAPH1*. A seta preta mostra a posição do SNP 1 (rs2246118), a vermelha do SNP 2 (rs12989194) ao longo do cromossomo e a azul, o sentido do gene. As caixas correspondentes aos SNPs mostram suas frequências alélicas encontradas nas diversas populações. As linhas coloridas sobre os SNPs evidenciam os blocos de ligação, sendo a cor amarela designada para o bloco Caucasoíde (CEU), a lilás e a azul representam os Asiáticos (CHB+JPT) e a vermelha os Africanos (YRI). Esquema gerado pelo programa SNPBrowser™.

6.0 – CONCLUSÕES

- 6.1** Não existe diferença entre as frequências alélicas nos grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5- para o SNP 1 (rs2246118), no entanto as frequências genóticas diferem significativamente nos dois grupos, indicando uma possível associação deste SNP com a variabilidade encontrada no loco *CHE2*.
- 6.2** A frequência maior de indivíduos homocigotos para o alelo T (genótipo T/T) encontrada no grupo CHE2 C5+ também sugere a associação do SNP 1 (rs2246118) com o fenótipo CHE 2 C5+.
- 6.3** A existência de uma provável associação do SNP 1 (rs2246118) com o grupo CHE2 C5+ indica que o gene *RAPH1* pode estar realmente envolvido na formação da banda C₅, e que a proteína lamelipodina, codificada por ele, estaria associada ao tetrâmero da BChE para a formação do complexo C₅.
- 6.4** Não existem diferenças significativas entre as frequências alélicas e genóticas nos grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5- para o SNP 2 (rs12989194), sugerindo que não existe associação deste SNP com os fenótipos.

7.0 – REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.**, v. **73**, p. 587-595, 2001.

ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPPLY, H. L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.27, p. 1557-1564, 2003.

ALLES, G. A.; HAWES, R. C. Cholinesterases in the blood of man. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 133, p. 375-390, 1940.

ANDRADE, F. A. **Variantes dos sítios -116 e 1615 do gene BCHE Butirilcolinesterase Humana e índice de massa corporal.** 90 f. Tese (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

AUGUSTINSSON, K.B.; BARR, M. Age variation in plasma arylesterase activity in children. **Clin.Chim.Acta**, p.568-573, 1963.

APPLIED BYOSSYSTEMS. **Real-Time PCR Vs. Traditional PCR.** Tutorial

BOBERG, D.R. **Formas moleculares da butirilcolinesterase e obesidade.** 136 f. Tese (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BRIMIJOIN, S; GAO, Y; ANKER, J. J, GLIDDON, L.A, LAFLEUR, D; SHAH, R; ZHAO, Q; SINGH, M; CARROLL, M.E. A cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase selectively blocks cocaine toxicity and reinstatement of drug seeking in rats. **Neuropsychopharmacology** **33** p. 2715–2725, 2008.

BROOMFIELD, C. A; MAXWELL, D. M.; SOLANA, R. P; CASTRO C. A; FINGER A. V; LENZ, D. E. Protection by butyrylcholinesterase against Organophosphorus poisoning in nonhuman primates. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 259 n.2, p.633-638, 1991.

CAVALLI-SFORZA, LL; MANOZZI, P; PIAZZA, A. The history and geography of human genes. Princeton, New Jersey: Princeton University Press; 1994.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem, J**, v. 260, p. 625-634, 1989.

DAVE K.R., SYAL A.R., KATYARE S.S. Tissue cholinesterases, a comparative study of their kinetic properties. **Z. Naturforsch.** 55c, p. 100-108, 2000.

EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. **Clin. Genet.**, v. 35, p. 313-321, 1989.

EPPERT, K.; WUNDER, J. S; ANELIUNAS, V.; TSUI, L.; SCHERER, S. W.; ANDRULIS, I. L. Altered expression and deletion of RMO1 in osteosarcoma. **Int. J. Cancer** v. 114, p. 738–746, 2005.

FURTADO, L. **Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade.** 174 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GALLANGO, M.L. e ARENDS, T. Phenotypical variants of pseudocholinesterase in myeloma patients. **Human. Genet.**, v. 7, p. 104-108, 1969.

GOMES, H.J.P. **Investigação da relação entre a variante atípica da butirilcolinesterase e a susceptibilidade à hanseníase.** 44 f. Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GORELICK, D. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. **Drug Alcohol Depend** 48 p. 159–165. 1997.

GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B.; AGUIAR, G.F.S. Serum cholinesterase polymorphism (CHE1 and CHE2 loci) among several Indian groups from Amazon region of Brazil and segregation of the C5 variant in families. **Gene Geogr.** 3 p.11-20, 1989.

HAPMAP PROJECT, 2009. Disponível em:

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics.** Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A e ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-98, 1962.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; GLEN-BOTT, A.M. e THORNTON, J.A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-87, 1963a.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; HOPKINSON, D.A. e WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. **Ann. Hum. Genet.**, v. 26, p. 359-82, 1963b.

HIGUCHI, R; DOLLINGER, G; WALSH, P.S; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology** **10** p. 413–417, 1992.

HIGUCHI, R; FOCKLER, C; DOLLINGER, G; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** **11** p. 1026–1030, 1993.

INABA T, STEWART D, KALOW W. Metabolism of cocaine in man. **Clin Pharmacol Ther** **23** p. 547–552. 1978.

INFORMATIVO BIESP, 2006. Disponível em: <http://www.biesp.com.br/pcr.htm>. Acesso em: 20/10/2009.

KÁLMÁN, J.; JUHÁSZ, A.; RAKONCZAY, Z.; ÁBRAHÁM, G.; ZANAA, M.; BODAD K.; FARKASE, T.; PENKEF, B. e JANKA, Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.**, v. 75, p. 1195–1204, 2004.

KALOW, W.; GUNN, D.R. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. **Ann. Hum. Genet.**, London, v. 23, p. 239-250, 1959.

KRAUSE, M., LESLIE, J.D., and STEWART, M. et al. Lamellipodin, an ena/vasp ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. **Dev Cell.** **7**, p. 571-583, 2004.

KREJCI, E., THOMINE S., BOSCHETTI, N., LEGAY, C., SKETELJ, J. e MASSOULIÉ, J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. **J. Biol. Chem.**, v. **272**, p. 22840-22847, 1997.

KOCH, G.A.; SCHOEN, R.C.; KLEBE, R.J. e SHOWS, T.B. Assignment of a fibronectin gene to human chromosome 2 using monoclonal antibodies. **Exp. Cell. Res.**, v. 141, p. 293-302, 1982.

KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 13, p. 239-243, 1980.

KUTTY, K. M. e PAYNE, R. H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 8, p.247-250, 1994.

LAFUENTE, E.M; van PUIJENBROEK, A.A.F.L; KRAUSE, M.; CARMAN, C.V. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-Induced Adhesion. **Dev Cell**, v. 7, p. 585-595, 2004.

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C.A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Co-amplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4715-4717, 1989.

LAYER, P.G. e SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 284-288, 1987.

LAYER, P.G.; WEIKERT, T.; WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 268, p. 409-418, 1992.

LEGG, J. A.; MACHESKY, L. M. MRL proteins: Leading Ena/VASP to Ras GTPases. **Nature Cell Biology**, v. 6 . p.1015-1017, 2004.

LEPIENSKI, L.M; ALCANTARA, V.M; SOUZA, R.L.R; R´ EA, R.R; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Variant K of butyrylcholinesterase and types1 and 2 of diabetes mellitus. **ExtendedAbstracts/Chemico-Biological Interactions**, p. 353-434, 2005.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12012-12018, 1982.

LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 549-557, 1987a.

LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S.; LA DU, B.N. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 12945-12952, 1987b.

LOCKRIDGE, O. ; ARPAGAUS, M., KOTT, M., VATSIS, K. P., BARTELS, C. F., LA DU, B. N., **Biochemistry** 29, 124-131, 1990.

LI, H.; SCHOPFER, L. M.; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Lamellipodin praline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. **Biochemical Journal, London**, v. 411, p. 425-432, 2008.

LYULCHEVA, E.; TAYLOR, E.; MICHAEL, M.; VEHLLOW, A.; TAN, S.; FLETCHER, A.; KRAUSE, M.; BENNETT, D. Drosophila pico and its mammalian ortholog Lamellipodin activate serum response factor and promote cell proliferation. **Developmental Cell**, v. 15, p. 680-690, 2008.

MADDEN, J.; POWERS, R. Effects of cocaine and cocaine metabolites on cerebral arteries in vitro. **Life Sci** **47**, p. 1109–1114, 1990.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology. Massoulié J. et al. eds. Washington DC: **American Chemical Society**, p. 42-45, 1991.

MASSOULIÉ, J. e BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Review of Neurosciences**, v. **5**, p. 57-106, 1982.

MASSOULIE, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCIE, E.; VALETTE F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Neurobiology** **41**, p.31-91, 1992.

MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com atividade da butirilcolinesterase**. 180 f. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MISRA, A.L; NAYAK, P.K; BLOCH R; MULE, S.J. Estimation and disposition of [3H]benzoylecgonine and pharmacological activity of some cocaine metabolites. **J Pharm Pharmacol** **27**, p. 784 -786, 1975.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci Am** **262** p. 56–61, 1990.

MULLIS, K.B; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol** **155** p. 335–350, 1987.

NAGASE, T.; KIKUNO, R.; HATTORI, A.; KONDO, A.; OKUMURA, K.; OHARA, O. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIX. The complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. **Dna Research** **7**, p. 347-355, 2000.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) acesso ao

banco de dados do GENBANK. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&cmd=search&term=bche>. Acessado em 16/09/2009.

NCBI SNP DATABASE. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Acessado em: 25/11/2009.

NUNES, K. **Haplotipos do gene *BCHE* da Butirilcolinesterase**. 152 f. Tese (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PATINKIN, D.; SEIDMAN, S.; ECKSTEIN, F.; BENSELER, F.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Manipulations of cholinesterase gene expression modulates murine megakaryocytopoiesis in vitro. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 6046-6050, 1990.

PERRIER, A. L., MASSOULIÉ J. e KREJCI E. PRIMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v. 33, p. 275-285, 2002.

RANDELL, E.W; MATHEWS, M.S; ZHANGB, H; SERAJ, J.S; SUNB, G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry** 38. p. 799–805, 2005.

RAVEH, L; GRAUER, E; GRUNWALD, J; COHEN, E; ASHANI Y. The stoichiometry of protection against Soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. **Toxicology and applied pharmacology** 145, p. 43–53, 1997.

RYHÄNEM, R.J.J. Pseudocholinesterase activity in some human body fluids. **Gen. Pharmacol.** 14, p. 459-460, 1983.

SAIKI, R.K, SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B; HORN, G.T; ERLICH, H.A; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230 p. 1350–1354, 1985.

SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 26, p. 189-94, 1974.

SILVER, A. The Biology of Cholinesterases. **Frontiers of Biology** 36, Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1974.

SOREQ, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y. e ZAKUT H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, v. 3, p. 511-516, 1991.

SOUZA, R. L. R.; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K. V.; FURTADO, L. e CHAUTARDFREIRE-MAIA, E. A. Possible influence of *BCHE* locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Ant.**, v. 326, p. 329-334, 2005.

STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L. e CARRENHO, J.M.X. Studies on the CHE1 locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Southern Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 8, p. 535-543, 1985.

SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.**, v. 33, p. 321-27, 1986.

VALASEK, M.A; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Adv Physiol Educ** 29 p. 151–159, 2005.

ZAKUT, H.; ERLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SELDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R e SOREQ, H. Acetylcholinesterase and 175 butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 900-908, 1990.

WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F.; LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 149, p. 549-551, 1947.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, London, v. 35, p. 174-197, 1980.

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. New York: Karger, p. 1-126, 1986.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, vol 19, p. 251-253, 1955.

WRIGHT, C.I; GEULA, C.; MESULAM, M. Neurological cholinesterases in normal brain and in Alzheimer's disease: Relationship to plaques, tangles and pattern selective vulnerability. **Ann. Neurol.** 34, p. 373-384, 1993.

ÇOKUGRAS, A. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turk J Biochem**, v. 28, p. 54-61, 2003.