

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**INFLUÊNCIA DOS GENES CANDIDATOS MC1R, ASIP, TYRP1 E KIT NA  
PIGMENTAÇÃO EM OVINOS CRIoulos E PREDIÇÃO DO EFEITO DOS  
POLIMORFISMOS NÃO SINÔNIMOS NO GENE MC1R HUMANO**

Diego Hepp

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular de  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências (Genética e Biologia  
Molecular)

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira

Porto Alegre

Março de 2015

Este trabalho foi realizado no laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta tesa à minha esposa Valéria,  
companheira de todos os momentos, com  
muita dedicação, compreensão e amor.

## **Agradecimentos**

Este trabalho contou com a participação e o apoio de muitas pessoas para as quais sou grato.

Agradeço ao professor Thales Renato O. de Freitas pela orientação durante a realização deste trabalho, tendo tornado possível a concretização dos objetivos pretendidos.

Agradeço ao professor Gilson R. P. Moreira pelo empenho e comprometimento que dedicou a este trabalho, indo muito além da orientação, participando de etapas importantes para o projeto e incentivando a continuidade da pesquisa. Sua atuação foi essencial. Muito obrigado.

Aos professores do Departamento de Genética da UFRGS em especial, mas não somente, Francisco Mauro Salzano, Nelson Machado, Loreta Freitas, Aldo de Araújo, Claiton Bau, Maria Cátira Bortolini, Lavínia Schüler-Faccini, Tatiana Roman, Fernanda Bered, Maria Helena Zanettini, Márcia Margis e Sídia Maria Callegari-Jacques, agradeço pelos diversos ensinamentos nestes anos como aluno do PPGBM, colaborando com novas possibilidades e caminhos a seguir.

Aos colegas de laboratório agradeço por todos os momentos de amizade, pelo auxílio na bancada, pelas conversas, pelas dicas e pelo apoio. Um grande abraço Darlise Lopes, Fabrício Bertuol, Josmael Corso, Gisele Oliveira, Sandra Büllau, Mayara Medeiros, Tatiane Noviski, Rodrigo Fornel, Lívia Müller, Paula Roratto, Jorge Bernardo-Silva, Graziela Iob, Ana Carolina Del Berto, Samara Arsego, Dalila Welter, Bruna Szynwelski, Patrícia Langone, Caroline Espinosa, Leonardo Leipnitz, Fernando Quintela, Tatiane Trigo, Carla Lopes, Claiton Martins-Ferreira, Renan Maestri, Daniel Galiano, Bruno Busnelo, Carolina Sartor, Guilherme Nunes, Willian Peçanha e a todos os demais colegas que fizeram parte desta caminhada. Meus agradecimentos ao colega Rafael Rauber pelo auxílio na realização dos experimentos de PCR-Real Time. Aprendi muito com todos vocês.

Agradeço à Gislene Lopes Gonçalves por todo o apoio nas diferentes etapas do projeto, por me apresentar ao departamento e por ser uma incrível colega e pessoa.

Um abraço especial aos funcionários do Departamento de Genética, Elmo Cardoso, Luciano Silva, Clenio Machado, Lúcia Oliveira e aos demais.

Também quero agradecer a todos os professores, colegas e alunos do IFRS Câmpus Porto Alegre por estarem sempre me apoiando e incentivando durante a realização deste trabalho. Obrigado Ângelo Horn, Alessandra Bruno, Juliana Nonohay, Karin Tallini, Márcia Bündchen, Paulo Artur Xavier, Francine Cassandra, Priscila Vianna, Bianca Pfaffenseller, Rodrigo Dalmolin e Vilma Horst. Aos meus orientados Renata Quevedo, Bruna Dias, Rudá Moraes, Jordânia dos Santos, Felipe Baseggio, Keli Bandeira, Ana Salvador e Stephanie Almeida obrigado pela confiança e pelo aprendizado.

Este trabalho foi realizado graças ao esforço dos criadores de Ovino Crioulos que, durante anos vem batalhando para a conservação da raça Crioula no nosso estado e no Brasil. Agradeço à Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos (ABCOC), por meio de seus associados, pela oportunidade de estudar estes animais magníficos e este valioso recurso genético e espero ter retribuído à altura a confiança e o apoio.

À minha família, pai Elmar, mãe Gladis e irmãos, Jônatas, Rodrigo e Iuri por sempre apoiarem a realização dos meus sonhos.

E agradeço, muito especialmente, à Valéria, por todo o companheirismo, pelo incentivo constante, e por todo amor que tens por mim.

## Sumário

Lista de Abreviaturas .....	9
Lista de Tabelas.....	12
Lista de figuras.....	14
Resumo.....	16
Abstract .....	18
Capítulo I - Introdução .....	20
A regulação da pigmentação .....	21
Abordagem de genes candidatos para o estudo da coloração dos animais.....	26
O gene Receptor de Melanocortina 1 (MC1R) .....	29
O gene da Proteína sinalizadora agouti (ASIP).....	32
O gene da Proteína relacionada à tirosinase 1 (TYRP1).....	37
O gene receptor tirosina quinase KIT .....	40
Ovinos Crioulos .....	43
A predição do efeito de polimorfismos através de abordagem computacional.....	45
O gene MC1R em humanos .....	47
Objetivos .....	50
Gerais .....	50
Específicos .....	50
Capítulo II - The wool color in the Brazilian Creole breed is influenced by epistatic interaction of the <i>MC1R</i> and <i>ASIP</i> genes. ....	51
Abstract .....	52
Introduction.....	52
Material and Methods .....	56
Animals and samples.....	56
Wool color analysis.....	56

DNA extraction and sequencing of <i>MC1R</i> , <i>ASIP</i> , <i>TYRP1</i> and <i>KIT</i> gene.....	57
<i>ASIP</i> RNA expression quantification .....	58
Results .....	59
Animals and wool color .....	59
<i>MC1R</i> genotyping .....	59
<i>ASIP</i> polymorphisms.....	60
<i>MC1R</i> and <i>ASIP</i> genotype and color.....	60
Color segregation in Crosses.....	60
Polymorphisms in <i>TYRP1</i> gene.....	61
Polymorphisms in <i>KIT</i> gene.....	61
Real Time PCR .....	61
Discussion .....	62
Bibliography.....	65
Tables and figure.....	72
Supplemental material.....	80
Capítulo III – Prediction of the Damage-associated Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in the Human <i>MC1R</i> Gene .....	87
Abstract .....	88
Introduction .....	88
Material and methods .....	91
Data .....	91
Functional analysis Prediction .....	91
Statistical analysis .....	96
Results .....	97
Prediction Programs .....	97
Analysis of consensus prediction tools .....	100
Discussion .....	100
Determination of the most damaging nsSNPs.....	100

Analysis of Red Hair Color (RHC) and Pathogenic MC1R variants .....	102
Conclusion.....	103
Acknowledgements .....	104
References .....	105
Figures.....	115
Tables .....	118
Supporting Information.....	122
Discussão geral.....	135
Referências bibliográficas .....	137



## Lista de Abreviaturas

ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1*;  
ABCOC: Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos;  
ABL1: c-abl oncogene 1;  
A<sup>D</sup>: alelo duplicado do gene ASIP;  
AHCY: hidrolase da s-adenosil-homocisteína;  
AMPc: adenosina monofostato cíclico;  
A<sup>N</sup>: alelo não duplicado do gene ASIP;  
ANOVA: *Analysis of Variance*;  
ARCO: Associação Brasileira de Criadores de Ovinos;  
ASIP: proteína sinalizadora agouti;  
ATP7A: *Copper-transporting ATPase 1*;  
A<sup>y</sup> alelo letal amarelo do gene ASIP em camundongos;  
BCL2: *B-cell leukemia 2*;  
bHLH-Zip: fator de transcrição zíper de leucina e hélice-alça-hélice básico;  
BRCA1: *breast cancer 1, early onset*;  
CAM: calmodulina;  
CAMK: proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina;  
CBP: proteína ligante ao CREB;  
cDNA: DNA complementar;  
CENP-E: *Centromere-associated protein-E gene*;  
CNV: variação no número de cópias (*copy number variation*);  
CREB: proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc;  
Cs<sub>29</sub>: alelo do gene KIT bovino contendo translocação para o cromossomo 29;  
Cs<sub>6</sub> e: alelo do gene KIT bovino contendo translocação para o cromossomo 6 ;  
Ct: *cycle threshold*;  
Cys-rich: região do sítio ativo rica em cisteína;  
DCT: dopacromo tautomerase;  
DDG: *protein stability free-energy change* ( $\Delta\Delta G$ );  
del: deleção;  
DG: diacilglicerol;  
DHI: 5,6-diidroxiindol;  
DHICA: ácido 5,6-diidroxiindol-2-carboxílico;  
DNA: ácido desoxirribonucléico;  
dNTPs: desoxirribonucleotídeos;  
DST: *dystonin*;  
DQ: dopaquinona;  
DVL: *dishevelled*;  
E<sup>+</sup>: alelo selvagem do locus extensão;  
E<sup>D</sup>: alelo dominante do locus extensão;  
E<sup>D1</sup>: alelo preto dominante 1 do locus extensão em suínos;  
E<sup>D2</sup>: alelo preto dominante 2 do locus extensão em suínos;  
EDN1: endotelina 1;  
EDN2: endotelina 2;  
EDN3: endotelina 3;  
EDNRB: receptor de endotelina B;  
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;  
E<sup>P</sup>: alelo de manchas pretas do locus extensão em suínos;

FERV1: retrovírus felino 1;  
FIS: *functional impact score*;  
FZD: *Frizzled*;  
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;  
GO: *Gene Ontology*;  
GSK3 $\beta$ : glicogênio sintase quinase 3;  
GWAS: análise de associação global do genoma (*genome-wide association studies*);  
h $^{\circ}$ : hue;  
IP3: inositol trifosfato;  
ITCH: *itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase*;  
K1: sítio de fosforilação 1;  
K2: sítio de fosforilação 2;  
Kb: kilobase;  
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes;  
KI: sítio de ativação por kinase;  
KIT: homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4;  
L-DOPA: L-3,4-diidroxifenilalanina;  
*LEF1: lymphoid-enhancing factor 1*;  
LTR: *long terminal repeat*;  
MAPK: (*mitogen-activated protein kinase*);  
MATP: *membrane-associated transporter protein*;  
MC1R: receptor de melanocortina 1;  
Me: sítio de ligação à metal;  
MITF fator de transcrição associado à microftalmia;  
MLPH: *melanophilin*;  
MSA: alinhamento de sequências múltiplas (*multiple sequence alignment*);  
MyH7: *beta myosin heavy chain*;  
MYO5A: *myosin VA*;  
MYO7A: *myosin VIIA*;  
nsSNP: polimorfismo de um único nucleotídeo não-sinônimo;  
OA1: *ocular albinism 1*;  
OAT: *ornithine aminotransferase*;  
OCA2: *oculocutaneous albinism 2*;  
OMIM: *On-line Mendelian Inheritance in Man*;  
PAH: *phenylalanine hydroxylase*;  
*PAX3: paired box 3*;  
PCR: reação em cadeia da polimerase;  
PKA: proteína kinase A;  
PKC: proteína quinase C;  
PLC: fosfolipase C;  
PMEL17: *premelanosome protein*;  
P-protein: *oculocutaneous albinism 2 gene*;  
PSIC: *Position-Specific Independent Count score*;  
PTS: *6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase*;  
QTL: análise de característica quantitativa;  
RAB27A: *member RAS oncogene family 27A*;  
RAF: proteína RAF quinase;  
Raly: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*;  
RAS: proteína RAS;  
Real Time PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real;

RF: *random forest*;  
RHC: fenótipo rúivo (*red hair color*);  
RNA: ácido ribonucléico;  
RPS19: proteína ribossômica 19;  
RPS20: proteína ribossômica 20;  
SCF: fator de célula tronco;  
SD: desvio padrão (*Standard deviation*);  
SLC24A5 - *solute carrier family 24 member 5*;  
SLC36A1: *solute carrier family 36 member 1*;  
SLC45A2: *solute carrier family 45 member 2*;  
SLC7A11: *solute carrier family 7 member 11*;  
SNP: polimorfismo de um único nucleotídeo;  
SOD1: superóxido dismutase 1;  
SOD2: superóxido dismutase 2;  
SOX10: *sex determining region Y box 10*;  
SP: peptídeo sinalizador;  
subPSEC: *substitution position-specific evolutionary conservation score*;  
SVM: *support vector machine*;  
t: região transmembrânica;  
TCF: *T-cell factor 1*;  
TM: região transmembrânica;  
TYR: tirosinase;  
TYRP1: protein relacionada à tirosinase 1;  
UV: ultravioleta;  
W: locus branco dominante;  
WNT – *Wingless*;

## Lista de Tabelas

### Capítulo I

Tabela 1: Identificação do alelo dominante do gene *MC1R* em diferentes raças ovinas. .... 31

Tabela 2: Relação entre a duplicação do gene *ASIP* e a coloração da lã em diferentes raças ovinas. .... 36

### Capítulo II

Table 1: Haplotype diversity in *MC1R* gene in the Creole sheep; The six nucleotide variants founded in the 328 sheep and the haplotype frequencies in total population are showed. The sites c.218T>A and c.361G>A are non-synonymous, resulting in the amino acid substitutions p.M73K and p.D121N, respectively. The haplotype H3 represents  $E^D$  allele. Nucleotide site numbers according to Genbank accession NM\_001282528. .... 77

Table 2: *MC1R* genotype proportion in white and colored Creole sheep.  $E^+$  = recessive allele;  $E^D$  = dominant allele; ..... 78

Table 3: Genotype frequency (%) of the polymorphism in *ASIP* gene in Creole sheep presenting the haplotype of the deletions of 5 and 9 base pairs in exon 2 and of the SNPs in exon 4. Results are showed separately in the duplication carriers of the *ASIP* gene ( $A^D$ ), in the individual homozygous to the normal allele ( $A^N A^N$ ) and in the total population.  $D_5$ : deletion of AGGAA;  $D_9$ : deletion of AGCCGCCTC; N: exon 2 without deletions..... 79

Table S1: Description of primers used in this study for *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* and *KIT* genes... 81

Table S2: Polymorphism in *TYRP1* gene in Creole sheep. Genotype and allele frequencies of the SNPs in the analyzed samples (n) are presented. SNP: nucleotide numbers in *TYRP1* gene according to ovine GenBank accession EU760771. .... 83

Table S3: Polymorphism in *KIT* gene in Creole sheep. Genotype and allele frequencies of the SNPs in the analyzed samples (n) are presented. SNP: Nucleotide numbers according to ovine chromosome 6 GenBank accession NC\_019463. .... 84

### Capítulo III

Table 1: Prediction tools used in the analysis. .... 118

Table 2: Matrix of Pearson correlation between the eleven prediction tools and the DAR prediction..... 119

Table 3: Matrix of Chi-square analysis of association between the prediction tools results and with DAR classification. .... 120

Table 4: Prediction scores from SIFT, PROVEAN, Polyphen-2, PANTHER, SNPs3D, Mutation Assessor and MutPred tools of the nsSNPs selected as the most damaging in *MC1R* gene. .... 121

Table S1: Prediction results of the nsSNPs in *MC1R* human gene. Results of the eleven individual tools and of the two consensus tools PON-P and PredictSNP 1.0. The nsSNPs in bold were selected as the most damaging by the all tools. .... 122

Table S2: Information available about the MC1R nsSNPs..... 131

## Lista de figuras

### Capítulo I

Figura 1: Síntese de melanina. Reações envolvidas na formação dos dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina nos melanossomas. Fonte: Ito, 2003..... 22

Figura 2: Melanogênese. Genes envolvidos na rota metabólica da melanogênese conforme o banco de dados da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). A interação entre os elementos apresentados resulta no controle da síntese de melanina. Legenda: Fonte: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko04916+K04199](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04916+K04199)..... 24

Figura 3: TYRP1 ovino. Organização do gene e estrutura da proteína. Exons em azul: região codificante; SP: peptídeo sinalizador; Cys-rich: região do sítio ativo rica em cisteína; Me: sítio de ligação à metal; t: região transmembrânica. Adaptado de Slominski *et al.* 2004..... 37

Figura 4: KIT ovino. Organização do gene e estrutura protéica do receptor tirosina quinase. Exons em verde escuro: região codificante; Ig: domínio imunoglobulina; TM: região transmembrânica; K1 e K2: sítios de fosforilação; KI: sítio de ativação por quinase. Adaptado de Larizza e Beghini, 2000. .... 40

### Capítulo II

Figure 1: Examples of Creole sheep presenting white (A to C) and colored (D to F) phenotype. .... 72

Figure 2: Wool color variation in Creole sheep. Mean values of color parameters  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $h^\circ$  in CIELAB color space, separating White and Colored groups in total population (A) and in the expression quantification experiment (B). Bars indicate standard deviation. .... 73

Figure 3: Genotype frequencies of *MC1R* and *ASIP* gene in the Creole sheep. Genotype combinations of the *MC1R* and *ASIP* gene are show separately in the White and Colored groups in the total population (A) and in the expression quantification experiment (B).  $E^+$  = *MC1R* recessive allele;  $E^D$  = *MC1R* dominant allele;  $A^D$ : *ASIP* duplicated allele;  $A^N$ : *ASIP* non-duplicated allele. .... 74

Figure 4: Pedigree schemes for color segregation in family crosses of Creole sheep. Genotype for *MC1R* and *ASIP* gene are show in six mating groups. Empty and black symbols represent white and colored wool, respectively. Sex is not specified for the offspring.  $E^+$  = *MC1R* recessive allele;  $E^D$  = *MC1R* dominant allele;  $A^D$ : *ASIP* duplicated allele;  $A^N$ : *ASIP* non-duplicated allele. .... 75

Figure 5: Relative quantification of *ASIP* gene expression in Creole sheep skin. Mean Threshold Cycle (Ct) values from Real Time PCR of *ASIP* and *GAPDH* mRNA according to *ASIP* genotype (A) and according to *MC1R* and *ASIP* combined genotype in white and colored groups (B).  $E^+$  = *MC1R* recessive allele;  $E^D$  = *MC1R* dominant allele;  $A^D$ : *ASIP* duplicated allele;  $A^N$ : *ASIP* non-duplicated allele. Bars indicate standard deviation. .... 76

Figure S1: Variation in Creole sheep wool color. CIELAB system  $L^*$  and  $h^\circ$  color parameters scales in total population (A) and in the expression quantification experiment (B). .... 85

Figure S2: Polymorphisms in *TYRPI* gene in Creole sheep. Gene and protein structure of *TYRPI* based in Slominski *et al.* (2004). The coding exons are showed in blue boxes. Untranslated regions of exons are showed in white boxes. Nucleotide numbers according to GenBank accession EU760771. N: amino terminus; C: carboxy terminus; SP: Signal Peptide; Cys-Rich: Cysteine rich segments; Me: metal-binding domain; t: Transmembrane domain; #: SNPs previously identified by Gratten *et al.* (2007). ..... 86

### Capítulo III

Figure 1: Prediction results of the 92 nsSNPs in the *MC1R* gene analyzed by the 11 tools. The different categorical classifications of the 11 tools are showed. .... 115

Figure 2: Distribution of the count of damage results of the 11 tools in the nsSNPs in *MC1R* gene. .... 116

Figure 3: Two-dimensional structure of the *MC1R* protein according to the reference sequence of the *MC1R* gene (NP\_002377). One letter amino acid code is used. The 92 nsSNPs analyzed are colored in relation to the count of damage results in the 11 tools (legend). The RHC associated mutations are indicated by the arrows. TM: transmembrane domains. .... 117

## Resumo

A coloração dos animais é uma característica que apresenta uma grande diversidade de fenótipos nas diferentes espécies. Diferentes abordagens podem ser utilizadas para o entendimento da diversidade na coloração existente nas espécies animais. Através da análise de genes candidatos as mutações responsáveis pela variação na coloração têm sido descritas em diferentes espécies, demonstrando o envolvimento de mecanismos moleculares variados na sua regulação. Este trabalho tem por objetivo a utilização de duas abordagens genéticas para o estudo da variação na coloração, a análise de genes candidatos e a predição computacional do efeito de polimorfismos não sinônimos. Em ovinos a coloração da lã é uma característica com importância na produção e para a identificação das raças. Polimorfismos em diferentes genes foram associados com a coloração da lã, entretanto, estes não foram estudados em muitas raças que apresentam variação fenotípica. A ovelha crioula é uma raça local existente no sul do Brasil que apresenta uma ampla diversidade de cores na lã, incluindo branco, preto e diversos tons intermediários. O gene receptor de melanocortina 1 (*MC1R*) foi previamente associado com a coloração na raça crioula, entretanto, outros genes também devem estar envolvidos na regulação da coloração na raça. Este trabalho avaliou a influência dos genes *MC1R*, *ASIP* (proteína sinalizadora *agouti*), *TYRP1* (proteína relacionada à tirosinase 1) e *KIT* (homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4) na coloração da lã na raça ovina crioula. Amostras de 410 animais de diferentes cores foram analisadas, sendo a variação na coloração da lã determinada por colorimetria. O padrão de herança dos fenótipos foi avaliado através de cruzamentos dirigidos entre indivíduos de diferentes cores. Os polimorfismos nos genes foram avaliados através da realização do sequenciamento e da análise de fragmentos e a quantificação da expressão do gene *ASIP* foi realizada por PCR em Tempo Real. Foi observada a associação significativa entre polimorfismos nos genes *MC1R* e *ASIP* e a cor da lã na raça crioula. O alelo dominante do gene *MC1R*, provocado pelas mutações p.M73K e p.D121N, foi encontrado apenas em indivíduos pigmentados. Este alelo resulta na ativação constitutiva do receptor, e conseqüentemente na produção constante de eumelanina, sendo epistático sobre o gene *ASIP*. Nos animais homocigotos para o alelo selvagem do *MC1R* a manifestação do fenótipo branco ocorreu somente nos portadores de um alelo contendo a duplicação do gene *ASIP*. Os portadores da duplicação do *ASIP* apresentaram níveis elevados de expressão do gene enquanto os



homozigotos para a cópia simples do *ASIP* não expressaram o gene e apresentaram fenótipos pigmentados. Os resultados obtidos permitiram identificar a influência da interação epistática dos genes *MC1R* e *ASIP* na coloração da lã nos ovinos crioulos. O estudo de genes candidatos envolvidos na rota da pigmentação mostrou-se uma abordagem adequada para a análise da variação na coloração nestes animais. Espera-se que o conhecimento adquirido neste trabalho auxilie na criação e na preservação da raça através da manutenção da diversidade fenotípica existente.

A avaliação computacional dos polimorfismos não sinônimos vem sendo utilizada recentemente a fim de determinar os SNPs que potencialmente afetam o funcionamento dos genes e identificar os mecanismos responsáveis por doenças complexas e pela variação nos fenótipos. A predição do efeito de polimorfismos nos genes utilizando ferramentas computacionais apresenta-se como uma abordagem alternativa para o estudo da genética da coloração. O gene *MC1R* humano apresenta uma grande quantidade de polimorfismos alguns dos quais foram associados com a variação na pigmentação e com suscetibilidade a tumores de pele. Entretanto, muitas das variações existentes no gene não foram avaliadas quanto às suas consequências funcionais e o seu papel na variação da pigmentação. Foi realizada a predição computacional dos polimorfismos não sinônimos no gene *MC1R* humano com o objetivo de identificar os nsSNPs mais provavelmente danosos, e estabelecer aqueles com potencial efeito na função do *MC1R*. Foram utilizadas 11 ferramentas de predição individuais (SIFT, MutPred, Polyphen-2, PROVEAN, I-Mutant 3.0, PANTHER, SNPs3D, Mutation Assessor, PhD-SNP, SNPs&GO e SNAP) e dois programas consenso (PON-P e PredictSNP 1.0) para a análise de 92 nsSNPs localizados no gene.

Os programas utilizados baseiam-se em métodos evolutivos, estruturais e computacionais, resultando na identificação dos 14 nsSNPs mais danosos (L48P, R67W, H70Y, P72L, S83P, R151H, S172I, L206P, T242I, G255R, P256S, C273Y, C289R e R306H). Apesar das diferenças nos resultados de cada programa a combinação dos diferentes métodos permitiu diferenciar os polimorfismos neutros dos danosos, mostrando concordância com os programas consenso. A predição computacional demonstrou ser uma abordagem eficiente para a identificação dos alelos danosos no gene *MC1R* e para a priorização de mutações para posteriores estudos funcionais e populacionais.

## Abstract

Animal color is a characteristic that presents a large diversity of phenotypes. Different approaches can be used to understand the color diversity existing among and within species. Through analysis of candidate genes the mutations responsible for the color variation have been described in different species, showing the involvement of various molecular mechanisms of regulation. The objective of this work is the use of two genetic approaches to the study of color variation, the analysis of candidate genes and the computational prediction of non-synonym polymorphism effects (nsSNPs). In sheep the wool color is a feature with commercial importance and in identifying breeds. Polymorphisms in different genes have been associated with wool color, but they have not been studied in many breeds that show phenotypic variation regarding such a character. The Creole is a local breed from southern most Brazil that presents a wide range of wool color, varying from white to black, and including several intermediate hues. The melanocortin 1 receptor (*MC1R*) was previously associated with the wool color in the Creole, however, other genes might also be involved in the regulation of color in the breed. This study evaluated the influence of the genes *MC1R*, *ASIP* (*agouti* signaling protein), *TYRPI* (tyrosinase related protein 1) and *KIT* (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) in the Creole breed wool color. Samples from 410 specimens of different colors were analyzed. The variation in the color of the wool was performed by colorimetry. The inheritance pattern of the phenotypes was assessed by crossbreeding individuals of different colors. Polymorphisms in the genes were evaluated by performing sequencing and fragment analysis, and the quantification of the *ASIP* gene expression was performed by Real Time-PCR. It was observed a significant association between polymorphisms in *MC1R* and *ASIP* gene and the wool color in Creole breed. The dominant allele of the *MC1R* gene, caused by p.M73K and p.D121N mutations was found only in pigmented individuals. This allele leads to the constitutive activation of the receptor and therefore in constant production of eumelanin and is epistatic on the *ASIP* gene. In the homozygous to the wild-type allele of *MC1R* the manifestation of white phenotype occurred only in individuals with one allele containing a duplication of the *ASIP* gene. The carriers of the duplicated copy of *ASIP* showed high levels of gene expression while homozygous for the simple copy of the *ASIP* did not expressed the gene, and showed pigmented phenotypes. The results allowed the identification of the influence of

epistatic interaction of *MC1R* and *ASIP* gene in the wool color in Creole breed. The study of candidate genes involved in the pigmentation pathway proved to be a suitable approach for the analysis of variation in pigmentation in these animals. It is expected that the knowledge acquired in this work will assist on establishment of commercial breeding and preservation policies of this sheep breed.

The computational evaluation of non-synonymous polymorphism has been used to determine SNPs that potentially affect the function of the genes and identify the mechanisms responsible for complex diseases and by the variation in phenotypes. The prediction of the effect of polymorphisms in genes using computational tools presents an alternative approach to the study of the genetic of coloration. The human *MC1R* gene has a large number of known polymorphisms, some of which were associated with changes in pigmentation and susceptibility to skin tumors. However, many existing variations in the gene have not been evaluated regarding the functional consequences and its role in the variation of pigmentation. Computational prediction of non-synonymous polymorphisms was performed in the human *MC1R* gene in order to identify the most likely harmful nsSNPs and to establish those with potential effect on the function of *MC1R*. Eleven individual tools (SIFT, MutPred, Polyphen-2, PROVEAN, I-Mutant 3.0, PANTHER, SNPs3D, Mutation Assessor, PhD-SNP, SNPs&GO and SNAP) and two consensus programs (PON-P and PredictSNP 1.0) were used to the analysis of 92 nsSNPs located in the gene.

The programs used are based in evolutionary, structural and computational methods, resulting in the identification of the 14 most damaging nsSNPs (L48P, R67W, H70Y, P72L, S83P, R151H, S172I, L206P, T242I, G255R, P256S, C273Y, C289R and R306H). Despite the differences in the results of the each program the combination of different methods allowed the differentiation of the neutral polymorphisms from the most damaging, showing agreement with the consensus programs. The computational prediction has proved to be an efficient approach for the identification of harmful alleles in the *MC1R* gene and for the prioritization of mutations for further functional and population studies.

## Capítulo I - Introdução

A coloração é uma característica que apresenta uma elevada diversidade entre os animais, ocorrendo variações fenotípicas correspondentes tanto entre espécies diferentes e entre indivíduos de uma mesma espécie. A herança da coloração foi um dos primeiros aspectos morfológicos a ser analisado através de estudos genéticos clássicos (Haldane *et al.* 1915; Little, 1917; revisão em: Anderson, 2009; Hoekstra, 2006; Mills e Patterson, 2009; Hoekstra, 2010) e é um modelo importante para o estudo dos mecanismos responsáveis pela variação no fenótipo e dos fatores que regulam a adaptação e a seleção natural (Nachman, 2005; Protas e Patel, 2008; Hofreiter e Schöneberg, 2010; Hubbard *et al.* 2010; Linderholm e Larson, 2013).

Os avanços realizados desde os primeiros estudos de caracterização genética da coloração dos animais propiciaram o surgimento de novas ferramentas para o estudo da coloração permitindo, através de diferentes abordagens a obtenção de conhecimentos sobre os genes responsáveis pela variação da coloração, sobre os mecanismos envolvidos na sua regulação e sobre a evolução dos fenótipos ao longo do tempo (Jablonski, 2004; McEvoy, Beleza e Shriver, 2006; Alonso *et al.* 2008; de Gruijter *et al.* 2011; Kondo e Hearing, 2011). Embora a base da coloração seja conhecida, diversos aspectos desta característica não foram investigados. Os mecanismos moleculares responsáveis pelos fenótipos existentes em diversas espécies não são conhecidos, bem como o efeito da interação entre os diferentes genes sobre a variação fenotípica em humanos e em outras espécies. O estudo dos processos subjacentes à regulação da coloração pode auxiliar no entendimento dos mecanismos que controlam a variação fenotípica e afetam a evolução adaptativa (Hubbard *et al.* 2010). Estes desafios demandam a realização de pesquisas que utilizem estratégias variadas para o seu entendimento.

A pigmentação exerce diferentes funções nos organismos, tais como proteção contra os efeitos da radiação ultravioleta (UV), mimetismo, camuflagem, termorregulação e atração sexual (Rees, 2003; Takeuchi *et al.* 2004; Brenner e Hearing, 2008). A coloração dos animais é o resultado principalmente da presença de melanina, um pigmento polimérico de alto peso molecular, existente em uma ampla variedade de espécies dos diferentes reinos biológicos (Ito, 2003; Nosanchuk e Casadevall, 2003;

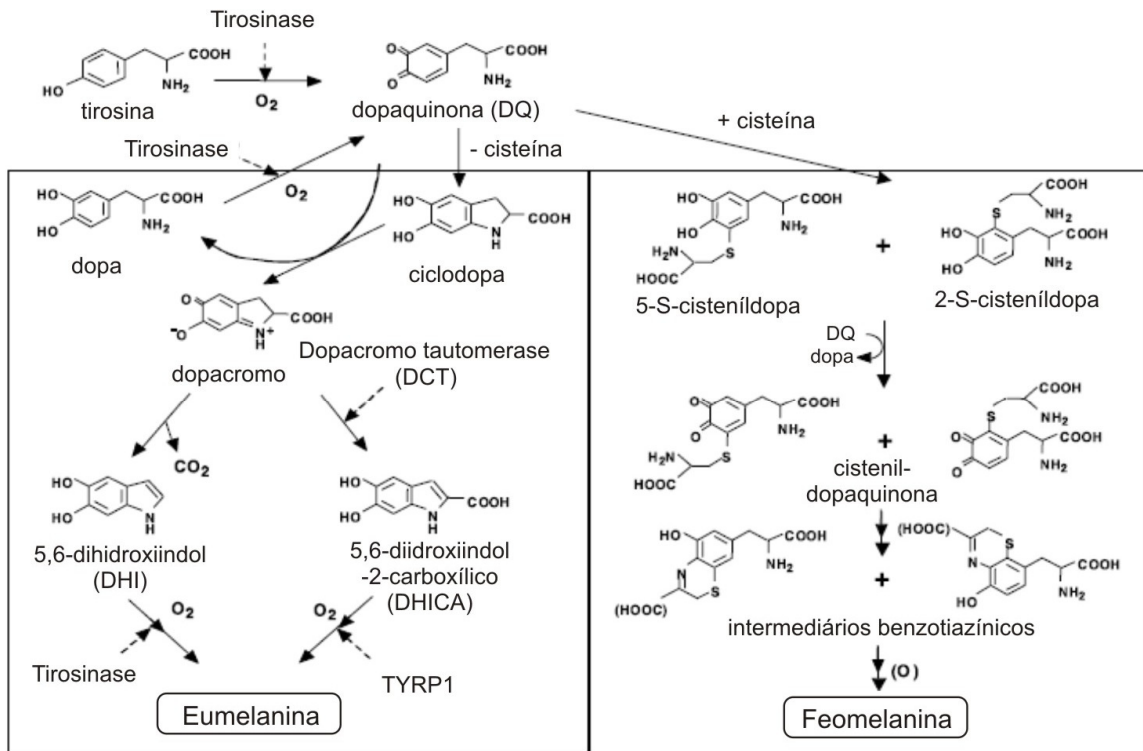
Nosanchuk e Casadevall, 2006). Nos animais, a melanina é sintetizada em células especializadas, chamadas melanócitos, derivadas da crista neural. A produção de melanina ocorre a partir da polimerização dos aminoácidos tirosina e cisteína realizada pela tirosinase (TYR), enzima chave no processo de melanogênese, em organelas chamadas melanossomas. As melanossomas contendo melanina são transferidas para os queratinócitos circundantes propiciando a coloração para os pêlos, pele e olhos dos animais (Ito e Wakamatsu, 2010; Hirobe, Ito e Wakamatsu, 2011). Dois tipos de melanina podem ser produzidos pelos melanócitos, a eumelanina, responsável por cores escuras como preto e marrom, e a feomelanina, responsável pelas cores claras como amarelo e vermelho. A quantidade de pigmento e a proporção entre os tipos de pigmentos produzidos determinam a coloração existente no fenótipo dos indivíduos (Ito e Wakamatsu, 2003; Ito, 2003).

### **A regulação da pigmentação**

A pigmentação é influenciada pelo efeito de diversos genes os quais interagem de maneira complexa para a regulação da coloração dos indivíduos. Estes genes representam diferentes categorias funcionais que atuam ao longo do processo de formação da pigmentação, tais como desenvolvimento e diferenciação dos melanócitos, formação das melanossomas, controle da transcrição das enzimas melanogênicas, transporte e transferência de melanossomas e controle do tipo de melanina sintetizado. Além disso, genes com efeitos sistêmicos podem afetar a coloração de maneira indireta (Jordan e Beermann, 2000; Bennet e Lamoreux, 2003; Sulaimon e Kitchell, 2003; Slominski *et al* 2004; Cieslak *et al.* 2011). Desta forma, o número de genes envolvidos com a variação da coloração soma 127 em camundongos, uma espécie modelo para o estudo da característica (Montoliu *et al.* 2014).

A síntese de melanina inicia-se com duas reações principais realizadas pela tirosinase. Primeiramente ocorre a oxidação da tirosina em L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina) e então a L-DOPA é oxidada para dopaquinona. Estas reações são comuns para a síntese de eumelanina e feomelanina, enquanto o controle das etapas posteriores da rota metabólica irá resultar na produção diferenciada de cada um dos tipos de pigmento (Ito e Wakamatsu, 2008). A síntese de eumelanina seguirá através da transformação de dopaquinona em leucodopacromo, seguida por uma série de reações

de oxidação e redução envolvendo intermediários como 5,6-diidroxiindol (DHI) e ácido 5,6-diidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Estas reações ocorrem através da ação das enzimas *TYR*, *TYRP1* (proteína relacionada à tirosinase 1) e *DCT* (dopacromo tautomerase), resultando na formação de eumelanina (Figura 1). Na síntese de feomelanina a dopaquinona é conjugada à cisteína formando cistenildopa e, através da oxidação de intermediários benzotiazínicos é produzida a feomelanina (Ito, 2003; Wakamatsu, Ohtara e Ito, 2009; Ito e Wakamatsu, 2011).



**Figura 1: Síntese de melanina.** Reações envolvidas na formação dos dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina nos melanossomas. Fonte: Ito, 2003.

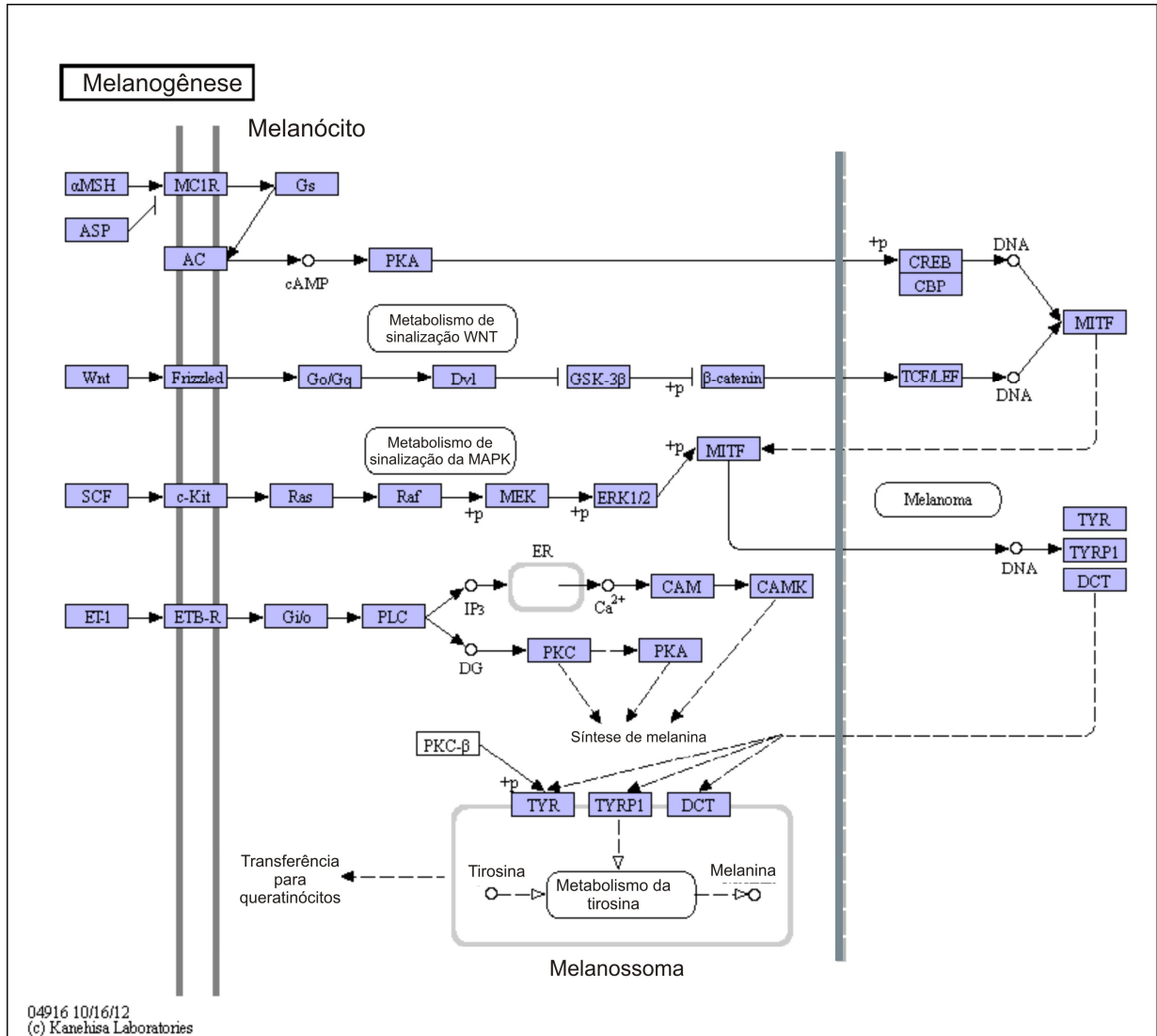
A definição de qual tipo de melanina será sintetizada pelos melanócitos depende da regulação dos níveis de atividade da enzima *TYR*, bem como das enzimas auxiliares *TYRP1* e *DCT*. Baixos níveis de atividade da tirosinase resultam na produção de feomelanina, enquanto a elevação da atividade da tirosinase promove a síntese de eumelanina (Ito, 2003). A rota metabólica da melanogênese envolve diferentes mecanismos de sinalização celular cuja interação resulta no controle da produção do pigmento e na obtenção do fenótipo.

A sinalização para a ativação da eumelanogênese inicia-se com a ligação da melanocortina ou hormônio melanócito estimulante ( $\alpha$ -MSH) ao receptor da

melanocortina-1 (MC1R) localizado na membrana dos melanócitos. O MC1R pertence à família de receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G e é considerado um dos principais controladores da produção de pigmentos em diferentes espécies de animais (Robbins *et al.* 1993; Barsh, 1996). Mudanças conformacionais no MC1R após a ligação do  $\alpha$ -MSH promovem a atividade da proteína G a qual irá ativar a enzima adenilato ciclase, induzindo a formação de 3'-5' adenosina mono fosfato cíclico (AMPc). O AMPc atua como segundo mensageiro intracelular induzindo uma cascata de sinalização através da ativação alostérica de outros componentes reguladores, tais como a proteína kinase (PKA) que irá fosforilar resíduos de serina de outras proteínas. Um dos alvos da PKA é o CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc) o qual interage com o CBP (proteína ligante ao CREB) ativando no núcleo a transcrição do gene fator de transcrição associado à microftalmia (*MITF*). O *MITF* codifica um membro da família de fatores de transcrição zíper de leucina e hélice-alça-hélice básico (bHLH-Zip) e exerce um papel central no controle da pigmentação, influenciando tanto na síntese de melanina, bem como na diferenciação, proliferação e sobrevivência dos melanócitos (Levy, Khaled e Fisher, 2006; Lin e Fisher, 2007; Cheli *et al.* 2009). O *MITF* liga-se às regiões M-box e E-box dos promotores dos genes das enzimas melanogênicas *TYR*, *TYRP1* e *DCT*, e do *MC1R*, regulando a sua transcrição (Saito *et al.* 2003, Slominski *et al.* 2004). A atuação do *MITF* na rede de regulação da melanogênese também é controlada por outros fatores como os genes *PAX3*, *SOX10* e *LEF1*. Mutações nos genes *MITF*, *SOX10* e *PAX3* resultam na síndrome de Waardenburg, caracterizada por alterações na pigmentação da pele em humanos (Bondurand *et al.* 2000; Steingrímsson, Copeland e Jenkis, 2004; Pingault *et al.* 2010; Vachtenheim e Borovanský, 2010; Wan, Hu e He, 2011).

O *MC1R* apresenta um antagonista, chamado de proteína sinalizadora agouti (*agouti signaling protein - ASIP*) o qual interage com o receptor impedindo competitivamente a ligação do  $\alpha$ -MSH. A presença da proteína ASIP resulta assim na ausência da sinalização por AMPc, afetando a cascata de sinalização, inibindo o *MITF* e, por consequência, na redução dos níveis de atividade das enzimas melanogênicas e na produção de feomelanina ao invés de eumelanina (Lu *et al.* 1994; Graham *et al.* 1997; Aberdam *et al.* 1998). Em diferentes espécies a expressão do gene *ASIP* em regiões do corpo específicas e em diferentes momentos do ciclo celular resulta em padrões de pigmentação claras e escura (Hida *et al.* 2009).

Além dos elementos participantes da sinalização via *MC1R* outros genes estão envolvidos na regulação da pigmentação através do controle da síntese de melanina e de outros processos como a diferenciação, migração e sobrevivência dos melanócitos (Figura 2). Outras três vias principais de regulação são a via dos genes *SCF/KIT*, a via do *WNT* e a via da endotelina (Slominski *et al.* 2004; Chang, 2012).



**Figura 2: Melanogênese.** Genes envolvidos na rota metabólica da melanogênese conforme o banco de dados da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). A interação entre os elementos apresentados resulta no controle da síntese de melanina. Fonte: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko04916+K04199](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04916+K04199).

O *SCF* (fator de célula tronco – *stem cell factor*) é um fator de crescimento secretado pelos queratinócitos que se liga ao KIT (homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4 - *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) um receptor tirosina quinase presente na membrana dos



melanócitos, levando à sua fosforilação. Através dos genes *RAS/RAF* o KIT ativa a rota enzimática da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) resultando na fosforilação do MITF e no aumento da transcrição das enzimas melanogênicas (Levy, Khaled e Fisher 2006). O gene *KIT* também está envolvido na proliferação, migração e sobrevivência dos melanócitos, além de atuar na regulação da hematopoiese, na gametogênese, no sistema imunológico e na divisão de outras linhagens celulares. Mutações no gene *KIT* foram associadas com a formação de manchas na pelagem de diferentes espécies e com piebaldismo e tumores em humanos (Ezoe *et al.* 1995; Widlund e Scherer 2003, Park *et al.* 2009).

As proteínas da família de fatores de crescimento e diferenciação *WNT* (*Wingless*) são ligantes dos receptores *FZD* (*Frizzled*) expressos nos melanócitos (Yang-Snyder *et al.* 1996). A via canônica de sinalização *WNT* atua através da proteína de transdução de sinal DVL (*dishevelled*) a qual inibe a enzima glicogênio sintase quinase 3 (*GSK3β*) impedindo a fosforilação e a degradação da β-catenina. O acúmulo de β-catenina resulta na sua translocação para o núcleo onde irá formar complexos com o fator de transcrição TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid-enhancing factor 1*) ativando a transcrição do gene *MITF* (Kishida *et al.* 1999; Yasumoto *et al.* 2002; MacDonald, Tamai e He 2009; Gao e Chen, 2010; Wu e Pan, 2010; Myung *et al.* 2013). A rota de sinalização *WNT* também é essencial para a diferenciação dos melanócitos a partir da crista neural (Widlund e Fisher 2003; Levy, Khaled e Fisher, 2006; Carlson *et al.* 2007).

As endotelinas (EDN1, EDN2 e EDN3) são peptídeos de sinalização parácrinos secretados pelos queratinócitos em resposta à radiação UV que se ligam ao EDNRB um receptor de sete domínios transmembrana acoplado à proteína G presente nos melanócitos. Através da alteração dos níveis de AMPc a sinalização das endotelinas ativa as enzimas MAP quinase e aumenta os níveis de transcrição do gene *TYRP1*, resultando na elevação da melanogênese (Zhang *et al.* 2013). A endotelina também induz a proliferação dos melanócitos e a formação dos dendrócitos responsáveis pela transferência dos melanossomas para os queratinócitos (Reid *et al.* 1996). A rota da endotelina envolve a ativação da enzima fosfolipase C (PLC) que estimula a CAM (calmodulina) e a CAMK (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina) por meio de inositol trifosfato (IP3) e da ativação da proteína quinase C (PKC) via diacilglicerol (DG), resultando na modificação na atividade da TYR através da fosforilação de dois resíduos de serina na enzima (Fuchs *et al.* 2001; Widlund e Fisher 2003; Carlson *et al.*

2007; Stanisz *et al.* 2012). Alterações nos genes *EDN3* e *EDNRB* estão associadas com diferentes tipos de síndrome de Waardenburg (Sato-Jin *et al.* 2008; Pingault *et al.* 2010).

Em adição aos genes diretamente responsáveis pela síntese da melanina e pela diferenciação, divisão e sobrevivência dos melanócitos, genes envolvidos com outros processos, tais como a regulação iônica no interior das melanossomas (*OCA2* - P-protein, *SLC36A1* - *solute carrier family 36 member 1*, *SLC7A11* *solute carrier family 7 member 11*, *SLC45A2* ou *MATP* - *membrane-associated transporter protein*, *SLC24A5* - *solute carrier family 24 member 5*, *ATP7A*, *OAI* - *ocular albinism 1*; Bellono e Oancea, 2014), com o transporte de melanossomas e com a sua transferência para os queratinócitos (*MLPH* - *melanophilin*, *MYO5A* - *myosin VA*, *MYO7A* - *myosin VIIA* e *RAB27A* - *member RAS oncogene family 27A*) e proteínas estruturais (*PMEL17* - *premelanosome protein*) também afetam a pigmentação dos animais (Vachtenheim e Borovansky, 2010). Além disso, genes responsáveis por efeitos sistêmicos que afetam o corpo todo, também podem atuar de maneira indireta modificando o fenótipo da pigmentação. Estes incluem genes de enzimas metabólicas (*OAT* - *ornithine aminotransferase*, *PAH* - *phenylalanine hydroxylase* e *PTS* - *6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase*) proteínas ribossômicas (*RPS19* e *RPS20*), proteínas de adesão (*DST* - *dystonin*), oncogenes (*BCL2* - *B-cell leukemia 2*) e outros (Bennet e Lamoreux, 2003; Montoliu *et al.* 2014).

### **Abordagem de genes candidatos para o estudo da coloração dos animais**

Diversos genes envolvidos na regulação da coloração têm sido identificados através de estudos realizados em diferentes espécies animais. Em muitos casos foi possível determinar as mutações responsáveis pela variação dos fenótipos, tendo sido descritos mais de uma centena de genes associados à variação fenotípica em camundongos (Bennet e Lamoreaux, 2003; Montoliu *et al.* 2014). A interação entre os genes envolvidos regulação da coloração faz com que alterações em qualquer um destes possam afetar o funcionamento dos demais genes, resultando na modificação do fenótipo. O conhecimento do papel dos genes na rota metabólica da pigmentação, bem como a alta conservação na sequência observada entre os genes homólogos nas diferentes espécies permite que os genes que foram associados à coloração em uma

espécie possam ser definidos como prováveis responsáveis pela variação fenotípica observada em outras espécies, uma abordagem conhecida como análise de genes candidatos (Protas e Patel, 2008).

A abordagem de genes candidatos avalia os efeitos de variações genéticas em genes potencialmente envolvidos na característica através de estudos de associação (Kwon e Goate, 2000; Tabor, Risch e Myers, 2002; Zhu e Zhao, 2007). Em geral, a utilização de genes candidatos envolve o sequenciamento da região codificante dos genes e a identificação da associação entre os genótipos e os fenótipos. Os polimorfismos encontrados em associação com os fenótipos devem ser analisados quanto à sua funcionalidade a fim de comprovar a causa da alteração fenotípica e descartar o envolvimento de outras mutações (Kwon e Goate, 2000).

Conforme Kwon e Goate (2000), a escolha de quais genes serão analisados é uma etapa crucial no delineamento da abordagem de genes candidatos. A priorização correspondente deve levar em consideração o papel destes em rotas metabólicas conhecidas e a descrição prévia de associação entre mutações no gene e a característica (Tranchevent *et al.* 2011; Patnala, Clements e Batra, 2013). Esta estratégia baseia-se no princípio de que mutações em genes envolvidos na mesma rota metabólica irão mais provavelmente produzir fenótipos semelhantes. Devido à descrição de um elevado número de genes influenciando na pigmentação nos animais (Bennet e Lamoreux, 2003) em geral é possível estabelecer uma lista de candidatos para associação com os fenótipos de coloração observados em uma espécie.

Os estudos de associação utilizando genes candidatos têm atingido resultados importantes na caracterização da variação da coloração em diferentes espécies (Klungland e Våge 2000; Nachman, 2005; Anderson, 2009; Hubbard *et al.* 2010). Em alguns estudos o sequenciamento das regiões codificadores dos genes candidatos demonstrou que mutações no mesmo gene são responsáveis pela variação fenotípica em espécies com parentesco distante (Hubbard *et al.* 2010). Em algumas análises, substituições no mesmo aminoácido foram descritas em genes homólogos de espécies diferentes, como, por exemplo, no gene *MC1R* na posição 65 em *Peromyscus polionotus* e *Mammuthus primigenius* (Hoekstra *et al.* 2006; Rompler *et al.* 2006), na posição 99 em bovinos e suínos (Klungland *et al.* 1995; Kijas *et al.* 1998) e na posição 121 em suínos e ovinos (Kijas *et al.* 1998; Våge *et al.* 1999). Em outros casos,

entretanto, mutações em genes diferentes produzem fenótipos semelhantes, consistindo assim em uma situação de convergência fenotípica (Hoekstra e Nachman 2003; Nachman, Hoekstra e D'Agostino, 2003; Steiner, Weber e Hoekstra, 2007; Kingsley *et al.* 2009). A convergência dos fenótipos em espécies diferentes pode ser formada por diferentes mecanismos, os quais podem envolver genes diferentes ou ocorrer no mesmo gene. No segundo caso, a evolução de alguns mecanismos pode ter ocorrido: os fenótipos são causados pela mesma mutação; mutações funcionalmente diferentes resultam em fenótipos semelhantes, ou mutações diferentes resultam na mesma consequência funcional (Manceau *et al.* 2010).

O conhecimento do papel dos genes na regulação da pigmentação permite que sejam identificados genes candidatos de acordo com o fenótipo existente especificamente em cada espécie ou população. Por exemplo, a ocorrência de melanismo tem sido associada a variações no gene *MC1R*, responsável pela ativação da produção de eumelanina, em diferentes espécies como em bovinos (Klungland *et al.* 1995), ratos (Barsh 1996), cavalos (Marklund *et al.* 1996), suínos (Kijas *et al.* 1998), onças-pintadas (*Panthera onca*) e gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*; Eizirik *et al.* 2003). Outro exemplo é o albinismo, caracterizado pela ausência total ou parcial de pigmento no corpo dos animais e que foi associado com variações no gene *TYR* em bovinos (Schmutz *et al.* 2004), no furão (*Mustela putorius*, Blaszczyk *et al.* 2007) e em coelhos (Aigner *et al.* 2000).

Por outro lado, é importante ressaltar que muitas vezes a análise de um gene candidato não é capaz de identificar alterações associadas com os fenótipos (Metallinos e Rine, 2000; Mundy e Kelly, 2003; Cheviron *et al.* 2006; Nakayama *et al.* 2008; Wlasiuk e Nachman, 2007; Skoglund e Höglund, 2010; Nakayama *et al.* 2010; Corso, Gonçalves e Freitas, 2012; Gonçalves, Hoekstra e Freitas, 2012; Bradley *et al.* 2013), demonstrando que outros genes devem ser os responsáveis pela variação fenotípica. Desta forma, fenótipos idênticos em diferentes espécies têm sido associados com outros genes responsáveis como, por exemplo, o albinismo, associado ao gene *SLC45A2* em galinhas (Gunnarson *et al.* 2007), cães (Winkler *et al.* 2014) e gorilas (Prado-Martinez *et al.* 2013) e ao gene *OCA2* em *Astyanax mexicanus* (Protas *et al.* 2006).

A análise de genes candidatos apresenta-se como uma estratégia eficiente para a determinação das causas da variação fenotípica em espécies de animais domésticos. Ao

avaliar genes envolvidos na rota metabólica da melanogênese, e para os quais associações com a coloração foram descritas em outras espécies ou outras populações da mesma espécie, espera-se a descrição dos mecanismos responsáveis pelos fenótipos nos organismos de interesse. Os genes considerados candidatos para a variação fenotípica analisados neste trabalho são abordados a seguir.

### **O gene Receptor de Melanocortina 1 (*MC1R*)**

O *MC1R* é o gene de coloração mais amplamente estudado nos animais, tendo sido associado à variação na pigmentação em espécies de diferentes grupos biológicos, incluindo mamíferos, aves, répteis e peixes (Hubbard *et al.* 2010; Switonski, Mankowska e Salamon, 2013). O gene *MC1R* é composto por um único exon que codifica uma proteína de 317 aminoácidos nos humanos e, portanto, de fácil análise em estudos moleculares. O receptor apresenta alta conservação entre diferentes espécies, sendo formado por um domínio N-terminal extracelular, sete domínios transmembrana, três alças intracelulares, três alças extracelulares, e por um C-terminal intracelular (García-Borrón, Sánchez-Laorden e Jiménez-Cervantes 2005; Switonski, Mankoska e Salamon, 2013).

Devido ao seu papel regulador na rota metabólica da melanogênese, modificações no *MC1R* podem apresentar diferentes consequências no fenótipo da coloração. Dentre os genes de coloração o *MC1R* destaca-se por ser o responsável pela variação na pigmentação em diferentes espécies através de alterações de ganho ou de perda de função. Alterações de ganho de função no *MC1R* originam um receptor constitutivamente ativo, o qual estimula a síntese constante de eumelanina resultando em fenótipos escuros. Exemplos de mutações de ganho de função incluem alelos descritos em bovinos (Klungland *et al.* 1995), ovinos (Våge *et al.* 1999), suínos (Kijas *et al.* 1998), ratos (Barsh 1996), *Chaetodipus intermedius*, (Nachman, Hoekstra e D'Agostino, 2003), galinhas (Takeuchi *et al.* 1996), onças (*Panthera onca*), gato-mourisco (*Herpailurus yaguarondi*; Eizirik *et al.* 2003) e mandrião-grande (*Stercorarius skua*; Mundy *et al.* 2004). Por outro lado, alterações que afetam o funcionamento do receptor promovem a perda da função, reduzindo parcialmente ou impedindo na totalidade a sinalização intracelular, resultando na síntese de feomelanina e em fenótipos claros, como observado em alelos de suínos (Kijas *et al.* 1998), bovinos

(Klungland *et al.* 1995), ursos (Ritland, Newton e Marshall, 2001), cavalos (Marklund *et al.* 1996), cães (Newton *et al.* 2000; Everts, Rothuizen e Van Oost, 2000), e *Peromyscus polionotus* (Hoekstra *et al.* 2006). Os efeitos contrários destas alterações no *MC1R* demonstram como diferentes mutações em um mesmo gene podem afetar de maneira distinta o fenótipo da coloração.

Entre as espécies nas quais o *MC1R* foi analisado os animais domésticos apresentam uma grande diversidade de fenótipos associados a mutações no gene (Klungland e Våge, 2003; Cisleak *et al.* 2011). O processo de seleção artificial realizado durante a domesticação permitiu a manutenção de variantes que seriam desfavoráveis em espécies selvagens, resultando em uma diversidade de fenótipos, os quais apresentam diferentes mecanismos moleculares subjacentes (Andersson, 2009; Fang *et al.* 2009; Li *et al.* 2010; Linderholm e Larson, 2013).

Em bovinos três alelos do gene *MC1R* foram descritos, o alelo dominante ( $E^D$ ) formado pelo polimorfismo p.L99P resulta no fenótipo preto, o alelo recessivo *e*, resultante de uma deleção de um nucleotídeo na posição 310 produzindo um códon de terminação prematuro é associado ao fenótipo vermelho, enquanto o alelo selvagem ( $E^+$ ) consiste no receptor funcional (Klungland *et al.* 1995). Estes alelos apresentam frequências variadas nas diferentes raças bovinas, existindo desde raças com uma alta diversidade genotípica até aquelas nas quais um alelo está fixado (Klungland *et al.* 2000; Rouzaud *et al.* 2000; Kriegesmann *et al.* 2001; Berryere *et al.* 2003; Royo *et al.* 2005; Girardot *et al.* 2006; Gutiérrez-Gil, Wiener e Williams, 2007; Sasazaki *et al.* 2007; Mohanty *et al.* 2008; Dreger e Schmutz, 2009; Carruthers *et al.* 2011; Albrecht *et al.* 2012; Schmutz e Dreger, 2013). A interação do *MC1R* com outros genes modifica a coloração esperada para os genótipos deste, formando uma ampla diversidade de fenótipos nos bovinos (Schmutz e Dreger, 2013; Hanna *et al.* 2014).

Em suínos, diferentes mutações no gene *MC1R* afetam a coloração. O alelo  $E^+$  permite a manifestação do fenótipo selvagem, o alelo recessivo *e* é provocado pelo polimorfismo p.A240T e resulta na pigmentação vermelha, o fenótipo preto dominante corresponde aos alelos  $E^{D1}$ , causado pela mutação p.L99P, e pelo o alelo  $E^{D2}$  formado pela mutação p.D121N (Kijas *et al.* 1998). O fenótipo de manchas pretas foi associado a uma inserção de dois nucleotídeos no códon 23 (alelo  $E^P$ ), que provoca uma reversão no alelo  $E^{D2}$  gerando um códon de terminação prematuro (Kijas *et al.* 2001).

Um elevado número de genes foi associado à coloração em cavalos, resultando em uma diversidade de fenótipos (Rieder, 2009). O gene *MC1R* equino apresenta um polimorfismo no códon 83 associado ao fenótipo recessivo alazão (*chestnut*) o qual é epistático sobre o fenótipo preto (Marklund *et al.* 1996).

Nos ovinos o gene *MC1R* codifica para o locus *extensão*, considerado um dos principais determinantes da pigmentação na espécie (Sponenberg, 1997). Våge *et al.* (1999) analisaram o gene *MC1R* em indivíduos pretos e brancos da raça Norwegian Dale, identificando duas mutações, p.M73K e p.D121N, que provocam a ativação constitutiva do receptor, resultando no alelo dominante preto ( $E^D$ ). Todos os animais pretos apresentaram o alelo  $E^D$ , enquanto indivíduos os brancos foram homocigotos para o alelo selvagem ( $E^+$ ). As mesmas mutações foram encontradas em associação com o fenótipo preto dominante nas raças Merino (tabela 1), Damara, Corriedale (Våge *et al.* 2003), Manchega (Calvo *et al.* 2006; Kijas *et al.* 2013), Castellana, Karakul (Royo *et al.* 2008) Massese (Fontanesi *et al.* 2010a; Fontanesi *et al.* 2011), e Minxian Black-fur (Yang *et al.* 2013).

**Tabela 1: Identificação do alelo dominante do gene MC1R em diferentes raças ovinas.**

Raça	Presença $E^D$	Referência
Norwegian Dala	Sim	Våge <i>et al.</i> (1999)
Damara, Black Merino, Black Corriedale	Sim	Våge <i>et al.</i> (2003)
Manchega	Sim	Calvo <i>et al.</i> (2006)
Black Castellana, Karakul	Sim	Royo <i>et al.</i> (2008)
Massese, Valle del Belice	Sim	Fontanesi <i>et al.</i> (2011)
Djallonké Mossi Touareg	Sim	Traoré <i>et al.</i> (2012)
Aragonesa, Salz, Norwegian Pelt	Não	Våge <i>et al.</i> (2003)
Nanping black-boned, Romney Marsh black-boned	Não	Deng <i>et al.</i> (2009)
Xalda	Não	Royo <i>et al.</i> (2008)
Burkina-Sahel	Não	Traoré <i>et al.</i> (2012)

O alelo  $E^D$  não foi observado em algumas raças que apresentam fenótipos pigmentados, tais como Aragonesa, Salz, Norwegian Pelt, Soay, Nanping, Romney Marsh, Xalda, Dubian e Privorian (Våge *et al.* 2003; Beraldi *et al.* 2006; Royo *et al.* 2008; Deng *et al.* 2009; Fontanesi *et al.* 2012; Traoré *et al.* 2012). Estes resultados demonstram que, embora o *MC1R* seja importante para a coloração em algumas raças ovinas, outros genes também estão envolvidos na determinação do fenótipo na espécie.

Na raça Crioula, Hepp *et al.* (2012) avaliaram a influência do gene *MC1R* no controle da variação na coloração da lã existente na raça. Um total de 125 animais de diferentes fenótipos, cobrindo as cores mais comuns na raça foram genotipados para as mutações p.M73K e p.D121N através de PCR-RFLP, com a confirmação dos haplótipos por sequenciamento. Foi demonstrada a associação significativa entre os alelos do gene *MC1R* e a coloração da lã. O alelo E<sup>D</sup> foi encontrado apenas em animais com fenótipos pigmentados, apresentando uma variedade de cores, incluindo preto, marrom, cinza e bege. Todos os indivíduos com o fenótipo branco foram homocigotos para o alelo E<sup>+</sup>. Entretanto, alguns animais pigmentados apresentaram o genótipo E<sup>+</sup>E<sup>+</sup>. Embora a influência do *MC1R* tenha sido observada os resultados indicam que este gene não explica totalmente a segregação da coloração na raça Crioula. Desta forma, outros genes candidatos devem ser analisados para o entendimento da regulação da pigmentação na raça.

### **O gene da Proteína sinalizadora agouti (*ASIP*)**

O gene *ASIP* apresenta um papel importante na regulação da pigmentação nos animais, sendo descrito como um candidato relevante para o estudo da variação na pigmentação. A proteína sinalizadora agouti (*agouti signaling peptide - ASIP*) é uma molécula de 131 aminoácidos que age como um agonista competidor do hormônio estimulante  $\alpha$ -MSH junto ao *MC1R*, inibindo a síntese de eumelanina (Graham *et al.* 1997; Sulaimon e Kitchell, 2003).

As mutações de perda e ganho de função no gene *ASIP* apresentam efeitos fenotípicos opostos em relação ao gene *MC1R*. As alterações de ganho de função no *MC1R* levam a fenótipos escuros devido à produção de eumelanina e a perda de função resulta na síntese de feomelanina, enquanto a perda de função no *ASIP* leva a fenótipos escuros e o ganho de função inibe a produção de eumelanina e, por consequência, gera fenótipos claros (Barsh *et al.* 2000; Hofreiter e Schöenberg, 2010).

A estrutura do gene *ASIP* é complexa e o padrão de expressão da proteína é regulado através de *splicing* alternativo do transcrito primário. A sequência do gene, no camundongo, consiste de três exons codificantes, designados 2, 3 e 4, e por quatro exons não codificantes, 1A, 1A', 1B e 1C, localizados à montante da região codificante



do gene (*upstream*). A formação do RNA mensageiro em camundongo é controlada por dois sistemas de controle responsáveis pela distinção na expressão temporal (envolvendo os exons 1B e 1C) e espacial (incluindo os exons 1A e 1A') da proteína (Dinulescu e Cone, 2000; Voisey e Van Daal, 2002). Em roedores o fenótipo conhecido como agouti é caracterizado pela presença de uma banda amarela nos pêlos, formada devido à síntese de feomelanina induzida pela presença da proteína ASIP no folículo piloso, com o restante do pêlo escuro (Bultman, Michaud e Woychik, 1992). A expressão diferenciada do gene *ASIP* em partes do corpo em camundongos controla diferenças na pigmentação do ventre em relação ao dorso (Vrieling *et al.* 1994).

Mutações no gene *ASIP* associadas a alterações na coloração foram descritas tanto na região codificante quanto em regiões regulatórias (Girardot *et al.* 2006; Mundy e Kelly, 2006; Kingsley *et al.* 2009; Nadeau *et al.* 2008). Alelos que causam o aumento na expressão do *ASIP* resultam em uma maior produção de feomelanina em relação à eumelanina e, por consequência, em fenótipos claros. Por outro lado, alterações genéticas que reduzem a expressão do gene ou afetam a funcionalidade da proteína são associados a fenótipos escuros (Kingsley *et al.* 2009; Hubbard *et al.* 2010). Diversos alelos do gene *ASIP* são conhecidos em camundongos, sendo que os alelos que produzem fenótipos claros (feomelanina) apresentam de dominância em relação aos alelos associados à produção de eumelanina (Bultman, Michaud e Woychik, 1992).

O alelo letal amarelo (*lethal yellow* –  $A^y$ ) em camundongos é caracterizado por uma deleção de aproximadamente 120 kb na região promotora dos genes *ASIP* e *Raly*, resultando na expressão constante do gene *ASIP* e no fenótipo amarelo nos heterozigotos, sendo letal quando em homozigose (Michaud *et al.* 1993; Michaud *et al.* 1994). Além dos efeitos na pigmentação este alelo resulta em diabetes, infertilidade, obesidade e suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores, demonstrando o papel do gene em outros processos metabólicos (Miller *et al.* 1993).

Mutações que resultam na perda de função no *ASIP* foram descritas em diferentes espécies. Eizirik *et al.* (2003) identificaram uma deleção de dois nucleotídeos no exon 2 associada ao fenótipo preto em gatos. Em cães, o polimorfismo p.R96C foi associado com o fenótipo escuro na raça pastor alemão (Kerns *et al.* 2004). Våge *et al.* (1997) demonstraram que uma deleção de 166 nucleotídeos no exon 2 do gene na

raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) está associada com o fenótipo escuro da pelagem (*standard silver*).

Uma deleção de onze nucleotídeos no exon 2 do gene *ASIP* de cavalos que altera a fase de leitura da proteína apresentou associação com o fenótipo preto recessivo em nove raças diferentes (Rieder *et al.* 2001). Uma deleção na região controladora do gene *ASIP* também foi observada em codornas (*Coturnix japônica*). Esta deleção afeta a transcrição do gene, estando envolvida na alteração da pigmentação das penas (Nadeau *et al.* 2008). Em *Peromyscus polionotus*, Kingsley *et al.* (2009) encontraram duas alterações distintas no gene *ASIP*, uma deleção de 125 kb envolvendo a região reguladora e os exons 1 e 2, e um SNP, no códon 65 que resulta em um códon de terminação prematuro. Estas duas alterações foram associadas a fenótipos melânicos em populações distintas. O alelo recessivo preto em coelhos foi descrito por Fontanesi *et al.* (2010b) como sendo causado por uma inserção no exon 2 que resulta em um códon de terminação prematuro, produzindo um peptídeo de apenas 21 aminoácidos.

Em suínos, Drögemüller *et al.* (2006) estudos de quantificação por PCR em Tempo Real demonstraram diferenças na expressão dorsal e ventral do *ASIP*, entretanto, não foram observadas mutações associadas à variação fenotípica, sugerindo a existência de alterações regulatórias.

Em bovinos, embora não tenham sido encontradas mutações na região codificadora, alterações regulatórias resultam em diferenças no padrão de expressão do *ASIP* entre raças com fenótipos distintos, a qual é controlada por pelo menos três promotores distintos. O RNA mensageiro do gene apresenta variações na região 5' e foi analisado através de análises por PCR em Tempo Real, tendo sido observado alterações nos níveis de expressão em diferentes tecidos e órgãos destes animais domésticos (Royo *et al.* 2005; Girardot *et al.* 2005; Girardot *et al.* 2006; Graphodatskaya *et al.* 2006; Albrecht *et al.* 2012).

Três polimorfismos não-sinônimos foram identificados na região codificadora do gene *ASIP* em cabras; entretanto, estes não foram associados com a variação no fenótipo em seis raças caprinas distintas. Uma variação no número de cópias (CNV – *copy number variation*) de aproximadamente 100 kb envolvendo os genes *ASIP* e *AHCY* foi observada em raças com fenótipos claros. Porém, a participação de outras variações não localizadas no gene não foi descartada (Fontanesi *et al.* 2009).

Estudos genéticos clássicos determinaram que o locus *agouti*, codificado pelo gene *ASIP* em ovinos, apresenta uma grande diversidade de alelos com efeitos variados sobre a coloração dos animais. Os fenótipos descritos para os alelos do locus *agouti* variam entre a coloração totalmente branca na lã no alelo dominante ( $A^{Wt}$ ) até o fenótipo preto no alelo recessivo ( $A^a$ ). Alelos intermediários são caracterizados por diferentes padrões de manchas claras e escuras no corpo (Sponenberg, 1997). O gene *ASIP* foi mapeado no cromossomo 13 ovino, através da ligação do fenótipo preto recessivo com marcadores microssatélites na raça Merino (Parsons, Fleet e Cooper, 1999a). Entretanto, Parsons, Fleet e Cooper, (1999b) não observaram associação entre o fenótipo na raça e alterações na região codificante do gene.

Norris e Whan (2008) caracterizaram a estrutura genética do gene *ASIP* em animais das raças Merino, Romanov, Texel e Barbary. Uma repetição *em tandem* de 190 kb foi identificada contendo as regiões codificantes dos genes *ASIP* e *AHCY* (hidrolase da s-adenosil-homocisteína), e a região promotora do gene *ITCH* (*itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase*). A extremidade 5' do ponto de quebra da duplicação está localizada anteriormente à região codificante do *ASIP*, fazendo com que a transcrição deste seja regulada pela região promotora do *ITCH*. Esta alteração resulta na expressão ubiquitária da cópia duplicada do gene *ASIP*. A presença da duplicação foi determinada como a causa do fenótipo branco dominante (alelo  $A^{Wt}$ ) em Merinos. Nos animais com o fenótipo recessivo preto, apenas a cópia simples do *ASIP* foi encontrada. Em adição, polimorfismos na região codificadora do gene foram descritas. Uma deleção de 9 nucleotídeos no exon 2 pode afetar o funcionamento da proteína devido à perda de um tripeptídeo localizado na sequência líder de transporte. Uma deleção de 5 nucleotídeos também no exon 2 resulta na mudança da fase de leitura formando um códon de terminação e um peptídeo de apenas 63 aminoácidos e não funcional. No exon 4 dois SNPs foram descritos, a alteração sinônima g.5051G>C e a mutação não-sinônima g.5172T>A que resulta na mudança de cisteína para serina (p.C123S), afetando uma região de sinalização importante (Smit *et al.* 2002; Norris e Whan, 2008).

A análise do gene *ASIP* em outras raças ovinas indicou a existência de diferentes relações entre os fenótipos e os polimorfismos no gene. Na raça Soay, a duplicação do gene *ASIP* não foi encontrada, tendo sido observada uma forte relação entre polimorfismos no *ASIP* e a coloração (Gratten *et al.* 2010). A maioria dos indivíduos com o fenótipo recessivo (pelagem escura no corpo todo, chamado “self”) apresentou

haplótipos considerados não funcionais, contendo a deleção de 5 nucleotídeos no exon 2 e o alelo A do SNP g.5172T>A no exon 4, enquanto nos animais com o fenótipo selvagem (barriga clara em relação ao restante do corpo escuro) ocorreu uma maior frequência dos haplótipos funcionais. Diferenças na detecção do RNAm do gene sugerem também a existência de alterações regulatórias na raça que resultam na ausência de expressão nos indivíduos com o fenótipo “self”.

Nas raças Dubian e Privorian, os indivíduos portadores da cópia duplicada do *ASIP* apresentaram diferentes fenótipos, incluindo manchas escuras e lã de cores claras, enquanto a ausência da duplicação foi associada com cores escuras (Fontanesi *et al.* 2012). Na raça Massese, Fontanesi *et al.* (2011) relacionaram, embora parcialmente, a presença da duplicação do gene *ASIP* com a cor cinza, enquanto a cópia simples ocorreu em quase todos os animais com a coloração preta.

**Tabela 2: Relação entre a duplicação do gene ASIP e a coloração da lã em diferentes raças ovinas.**

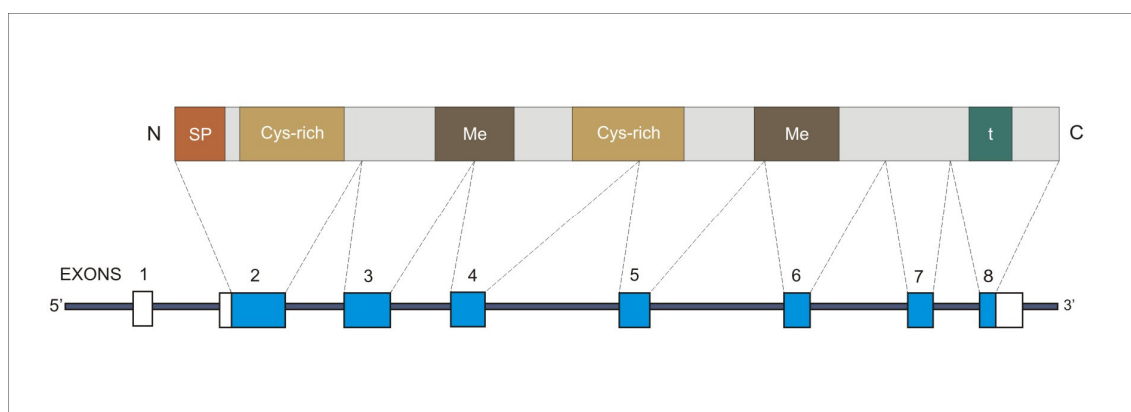
Raça	Duplicação	Fenótipo	Referência
Merino	Presente	Branco	Norris e Whan (2008)
	Ausente	Preto	
Massese	Presente	Cinza	Fontanesi et al. (2010)
	Ausente	Preto	
Appenninica	Presente	Branco	Fontanesi et al. (2011)
Bergamasca	Presente	Branco	
Sarda	Presente	Branco	
Soay	Ausente	Pigmentado	Gratten et al. (2010)
Dubian e Privorian	Presente	Claro	Fontanesi et al. (2012)
	Ausente	Escuro	
Burkina-Sahel	Presente	NA.	Traoré et al. (2012)
Djallonké	Presente	NA.	
Mossi	Presente	NA.	
Burkina-Sahel	Ausente	NA.	

Embora a duplicação do gene seja indicada como responsável pela cor branca na lã dos ovinos, os resultados descritos na literatura demonstram que a combinação de diferentes mecanismos pode estar envolvida na regulação do gene *ASIP* (Norris e Whan, 2008; Gratten *et al.* 2010; Fontanesi et al. 2011; Fontanesi *et al.* 2012). Os diversos fenótipos associados ao *ASIP* nas raças ovinas indicam o gene como candidato responsável pela a variação da coloração. A fim de determinar o processo de funcionamento do gene e esclarecer o seu papel na regulação da coloração nas diferentes raças ovinas, o estudo do *ASIP* deve abranger tanto variações na região

codificadora quanto alterações na sua expressão. A utilização da técnica de PCR em Tempo Real permite a comparação relativa da expressão de dos genes entre indivíduos de diferentes genótipos e indicando a influência dos polimorfismos na regulação da ação do gene (Girardot *et al.* 2006; Royo *et al.* 2008).

### O gene da Proteína relacionada à tirosinase 1 (*TYRP1*)

O locus *marrom* (*brown*) codifica a proteína relacionada à tirosinase 1 (*TYRP1*), uma proteína de membrana dos melanossomas, composta por 537 aminoácidos. O gene é composto por oito exons (Figura 3) e a região codificante inicia-se no segundo exon (Jackson, 1994). O *TYRP1* pertence à família da enzima tirosinase (*TYR*), juntamente com a enzima dopacromo tautomerase (*DCT*), as quais apresentam alta identidade na sequência. A origem do gene *TYRP1* foi proposta a partir de processos de duplicação genética do gene tirosinase (Camacho-Hubner, Richard e Beermann, 2002; Esposito *et al.* 2012). O *TYRP1* está envolvido na síntese de eumelanina, realizando a reação de oxidação da DHICA (Jackson *et al.* 1990; Zdarsky, Favor e Jackson, 1990; Jiménez-Cervantes *et al.* 1994; Sponenberg, 1997; Rieder *et al.* 2001; Guibert *et al.* 2004; Smyth *et al.* 2006). Mutações no gene afetam a conversão do pigmento marrom 5,6-dihidroxiindol em eumelanina, de coloração preta (Kobayashi *et al.* 1994; Kobayashi *et al.* 1998; Cieslak *et al.* 2011).



**Figura 3: TYRP1 ovino.** Organização do gene e estrutura da proteína. Exons em azul: região codificante; SP: peptídeo sinalizador; Cys-rich: região do sítio ativo rica em cisteína; Me: sítio de ligação à metal; t: região transmembrânica. Adaptado de Slominski *et al.* 2004.

O gene *TYRPI* foi associado com variações na coloração em diferentes espécies. Em camundongos Zdarsky, Favor e Jackson, (1990) descreveram alterações não sinônimas relacionadas ao fenótipo marrom. Em gatos, variações no *TYRPI* foram associadas a diferentes fenótipos. O fenótipo *cinnamom* foi relacionado com uma mutação no códon 100 que altera do aminoácido arginina para um códon de terminação, enquanto o fenótipo chocolate foi associado a duas mutações, uma mudança no códon 3 (p.A3G) e uma alteração no introns 6 que afeta o sítio de reconhecimento de splicing do exon 6 (Lyons *et al.* 2005; Schmidt-Küntzel *et al.* 2005).

Em cães três mutações afetam o funcionamento do gene *TYRPI* resultando no fenótipo marrom (Schmutz, Berryere e Goldfinch, 2002), um códon de terminação prematuro na posição 331, uma deleção de um resíduo de prolina no códon 345 e um SNP no exon 2 alterando o códon 41 (p.S41C). Gerding *et al.* (2011) identificaram que o fenótipo cinza está ligado ao gene *TYRPI*, embora não tenha sido encontrada a mutação responsável.

Em cabras, a base genética dos fenótipos preto e marrom, denominados *Valais blacknecked* e *Coppernecked*, foi analisada por Becker *et al.* (2014). O gene *TYRPI*, localizado no cromossomo 8 foi mapeado como candidato através de análise de associação global do genoma (*genome-wide association studies* - GWAS). Quatro polimorfismos não sinônimos foram encontrados, dois dos quais (p.I478T e p.G496D) segregando nos animais dos diferentes fenótipos. O alelo p.496D foi indicado como possível responsável pela variação fenotípica, entretanto, outras variações também podem estar contribuindo com o fenótipo.

O gene *TYRPI* bovino foi mapeado no cromossomo 8 através do estudo de associação com marcadores microssatélites (Berryere *et al.* 2003). Uma mutação no códon 434 resultando na substituição do aminoácido histidina por tirosina apresentou associação com o fenótipo marrom (*dun*) em animais da raça Dexter. Entretanto, não foi observada associação entre polimorfismos no *TYRPI* e a variação na coloração nas raças Simmental, Galloway e Charolês, indicando que outro gene possa ser responsável.

Em suínos a coloração marrom foi mapeada através de estudos de associação genômica (GWAS) com o cromossomo 1, indicando o gene *TYRPI* como candidato. O sequenciamento da região codificante identificou uma deleção de seis nucleotídeos no

exon 8 (c.1484\_1489del) em associação com o fenótipo marrom em diferentes raças (Ren *et al.* 2011).

Em ovinos o locus *marrom* codificado pelo gene *TYRP1* é considerado o principal responsável pela coloração marrom, ocorrendo diferentes tons em diversas raças (Sponenberg, 1997). Na raça Soay, através da utilização de marcadores microssatélites o locus responsável pela segregação dos fenótipos claros e escuros foi mapeado no cromossomo 2 ovino, no qual se localiza o gene *TYRP1* (Beraldi *et al.* 2006). Um polimorfismo no exon 4 foi descrito como responsável pela variação na coloração. Gratten *et al.* (2007) encontraram uma mutação no códon 290 resultando na substituição de uma cisteína por fenilalanina (p.C290F) em associação com o fenótipo claro recessivo na raça.

Raadsma *et al.* (2013) realizaram uma análise quantitativa (QTL) da pigmentação da lã utilizando um cruzamento entre animais das raças Merino e Awassi, apresentando ampla variação na coloração. Uma região do cromossomo 2 contendo o gene *TYRP1* foi indicada como candidata para influenciar diferentes parâmetros da característica. Um SNP não sinônimo (c.2240C>G) no exon 2 resultando na substituição de uma alanina por uma valina apresentou alta significância na variação fenotípica nos animais analisados.

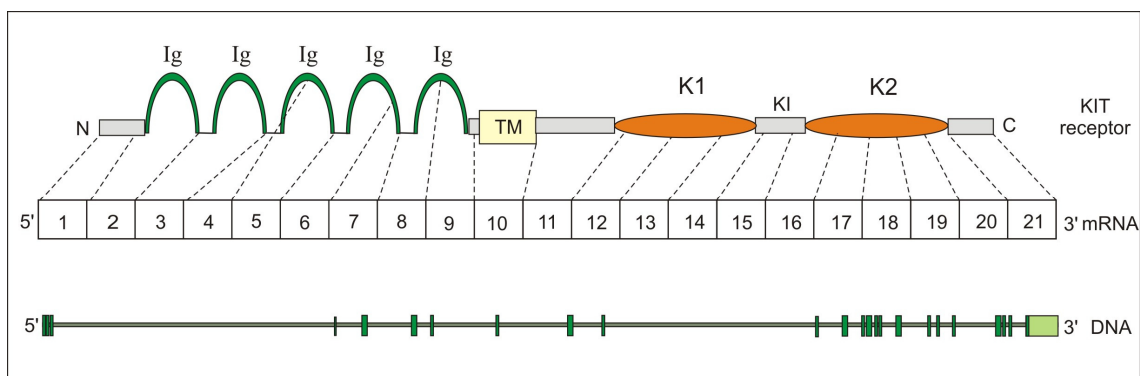
Apesar dos estudos descritos indicarem o gene *TYRP1* como candidato pela variação na coloração, a sua influência não foi analisada em diferentes raças ovinas nas quais uma ampla ocorre uma variedade de cores.

A avaliação da cor da pelagem dos animais de diferentes fenótipos é muitas vezes subjetiva (Meszaros *et al.* 2014). A utilização de técnicas de colorimetria instrumentais permite a adoção de critérios precisos e reprodutíveis para a avaliação da cor (Toth *et al.* 2006). O sistema CIELAB estabelecido pela International Commission on Illumination (CIE, 1995; Minolta, 2007) utiliza as variáveis  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  para o estabelecimento da cor. O parâmetro  $L^*$  indica a intensidade luminosa (luminosidade), variando de 0 a 100. Quanto maior o valor de  $L^*$  mais branca a cor. O parâmetro  $a^*$  apresenta valores de cromaticidade entre verde (negativo) e vermelho (positivo), enquanto  $b^*$  representa cromaticidade entre azul (negativo) e amarelo (positivo) no espaço de cores. O parâmetro  $h^\circ$  (hue) é determinado pela tangente inversa da razão de  $b^*$  por  $a^*$  ( $h^\circ = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$ ) e representa o tom específico.

## O gene receptor tirosina quinase *KIT*

O gene *KIT* codifica um receptor tirosina quinase transmembrana do tipo III que atua como receptor para o *SCF* (fator de célula tronco - *stem cell factor*), com papel importante na regulação da gametogênese, hematopoiese e melanogênese. A proteína do receptor é composta por cinco domínios de imunoglobulina extracelulares, um domínio transmembrana, um domínio justamembrana e um domínio quinase intracelular (Figura 4; Roskoski Jr, 2005).

O gene *KIT* foi primeiramente caracterizado como um proto-oncogene homólogo ao oncogene de sarcoma viral felino *v-kit* sendo nomeado *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*. Posteriormente, o gene foi identificado como o codificante do locus *branco dominante* (*W*) em camundongos, apresentando uma série de alelos associados à variação na pigmentação (Geissler *et al.* 1988; Rönstrand, 2004).



**Figura 4: KIT ovino.** Organização do gene e estrutura proteica do receptor tirosina quinase. Exons em verde escuro: região codificante; Ig: domínio imunoglobulina; TM: região transmembrânica; K1 e K2: sítios de fosforilação; KI: sítio de ativação por quinase. Adaptado de Larizza e Beghini, 2000.

A ligação do *SCF* ao *KIT* leva à dimerização do receptor, à fosforilação de resíduos de tirosina no domínio intracelular e à ativação da ação proteína quinase do receptor, ativando uma cascata de sinalização que interage com diferentes rotas metabólicas, incluindo a ativação do MITF, responsável pelo controle da transcrição das enzimas melanogênicas (Rönstrand, 2004; Slominski *et al.* 2004).

A sinalização através do *KIT* regula o processo de migração dos melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, a partir da corda neural até os diferentes sítios da pele e folículos pilosos. Além disso, o gene *KIT* também influencia a diferenciação dos



melanoblastos em melanócitos, a sobrevivência dos melanócitos e o processo de melanogênese (Slominski *et al.* 2004; Cieslak *et al.* 2011). Interferências na sinalização através do *KIT* causam falhas na migração dos melanoblastos, resultando na formação de manchas brancas nas regiões do corpo para as quais não ocorre a migração. Geralmente estas manchas ocorrem nas extremidades do corpo, por exemplo, nas patas, barrigas e cabeça, entretanto, manchas ao longo do corpo também foram descritas (Cieslak *et al.* 2011). Modificações no *KIT* em humanos resultam em piebaldismo, uma síndrome caracterizada por manchas brancas na pele e cabelos (Spritz *et al.* 1992; Ezo *et al.* 1995; Yang *et al.* 2013b).

O gene *KIT* foi associado às variações na pigmentação em diferentes espécies. Em cavalos, diversas mutações têm sido descritas em associação aos fenótipos de manchas na pelagem, como Roan, Tobiano, Sabino e Branco Dominante (Marklund *et al.* 1999; Brooks & Bailey, 2005; Haase *et al.* 2007; Haase *et al.* 2009; Holl, Brooks & Bailey, 2010). O fenótipo Sabino é causado por uma mutação no intron 16 que resulta na eliminação do exon 17 durante o processamento do RNA (Brooks e Bailey, 2005). O fenótipo Tobiano é provocado por uma inversão no cromossomo 3 que interrompe a região controladora do gene (Brooks *et al.* 2007). Embora o fenótipo Roan tenha sido ligado ao gene *KIT*, não foi encontrada associação com mutações específicas no gene (Marklund *et al.* 1999). Haase *et al.* (2007) descreveram uma heterogeneidade de alelos no gene *KIT* associadas ao fenótipo Branco Dominante. Posteriormente, novas mutações no *KIT* foram descritas em diferentes raças equinas (Haase *et al.* 2009; Haase *et al.* 2011; Hauswirth *et al.* 2013).

Em suínos, alelos do *KIT* causam alterações no fenótipo da coloração. Duas mutações foram associadas com o padrão branco dominante, uma duplicação de 450 kb envolvendo o gene e uma mutação que afeta o *splicing* do exon 17, enquanto o fenótipo de manchas é causado por alterações no número de cópias do gene com modificações regulatórias (Marklund *et al.* 1998; Giuffra *et al.* 1999; Giuffra *et al.* 2002; Pielberg *et al.* 2002; Rubin *et al.* 2012).

David *et al.* (2014) identificaram o gene *KIT* como codificante do locus *dominante branco* (W) em gatos, responsável por efeitos na pigmentação, além de efeitos pleiotrópicos como surdez e hipopigmentação da íris. Duas inserções relacionadas a elementos de retrovírus felino (FERV1) foram associadas com os

fenótipos. A inserção de 623 nucleotídeos no intron 1 carregando a região LTR (*long terminal repeat*) apresentou associação com o fenótipo branco dominante, enquanto a inserção de um elemento FERV1 completo (7125 nucleotídeos) foi associada ao fenótipo de manchas brancas.

Em cães, Wong *et al.* (2012) identificaram uma inserção de uma base no exon 2 resultando na mudança de fase de leitura e em um códon de terminação, formando um receptor truncado. A inserção apresentou segregação completa com o fenótipo de manchas brancas dominante na raça pastor alemão. A ausência de indivíduos homocigotos para o alelo da inserção indica que a alteração é letal nesta condição. Gerding, Akkad e Epplen (2013) descreveram uma deleção de 3 nucleotídeos no exon 13 do gene *KIT* associada ao fenótipo manchado em animais da raça Weimaraner.

O papel do gene *KIT* no locus de manchas (*English spotting*) em coelhos foi descrito por Fontanesi *et al.* (2014), embora a mutação causadora da variação fenotípica não tenha sido encontrada.

Durkin *et al.* (2013) descreveram a associação entre o fenótipo de manchas brancas no dorso (*color sidedness*) em bovinos e duas translocações envolvendo o gene *KIT*, uma de 492 kb do cromossomo 6 para o cromossomo 29 (alelo Cs<sub>29</sub>), e outra, de 575 kb do cromossomo 29 para o cromossomo 6 (alelo Cs<sub>6</sub>). A dominância dos alelos indica alterações na regulação da transcrição do *KIT* devido às translocações. Brenig *et al.* (2014) também encontraram o alelo Cs<sub>29</sub> em associação com o fenótipo nas raças White Galloway e White Park. As mesmas alterações (Cs<sub>6</sub> e Cs<sub>29</sub>) foram encontradas em iaques (*Bos grunniens*) apresentando o fenótipo manchado, indicando a introgressão dos alelos bovinos na espécie (Zhang, Xu e Luo 2014).

O fenótipo de manchas, causado pelo locus *manchado* (*Spotted*) é considerado relativamente comum em ovinos, apresentando variações na extensão das manchas brancas (Sponenberg, 1997). O gene *KIT* ovino, juntamente com outros genes relacionados à pigmentação, apresentou sinais de seleção em diferentes raças, indicando a possível importância deste durante o processo de domesticação (Kijas *et al.* 2012; Fariello *et al.* 2014). Embora o papel do gene na regulação do processo de pigmentação e as alterações descritas em outras espécies indiquem que o gene *KIT* seja um forte candidato, este não foi analisado com relação à variação na pigmentação em ovinos.

## Ovinos Crioulos

A Ovelha Crioula é uma raça naturalizada do sul do Brasil, proveniente dos rebanhos introduzidos no país pelos jesuítas no século XVII, é classificada como uma raça rara que conserva traços dos ovinos que lhe deram origem (Moreira e Silva, 2004). Os animais da raça crioula apresentam porte mediano e possuem a lã composta por mechas de fibras grossas e largas, em forma de cone invertido, com lã fina na base, entremeadas de fibras grossas e de maior comprimento, que caem para os lados do corpo, assemelhando-se a uma manta. A cara e as extremidades são descobertas e tanto os machos quanto as fêmeas podem apresentar chifres, ocorrendo frequentemente a presença de mais de um par de chifres. A raça é dividida em duas variedades, Serrana e Fronteira, com base na região de origem dos rebanhos e em características anatômicas (Vaz *et al.* 1997; Vaz *et al.* 2000; Gonçalves *et al.* 2010; Silva *et al.* 2013).

São animais rústicos e ativos, com comportamento gregário e aguçado instinto de defesa, porém, de fácil manejo, possuindo aptidão para a produção de lã, a qual devido à sua coloração natural, é utilizada nas atividades de artesanato e tapeçaria, agregando valor à criação e contribuindo com a economia local. Também possuem aptidão para a produção de carne magra, com sabor e maciez diferenciados e de peles com qualidade superior quanto à resistência e suavidade. Destaca-se a adaptação dos animais ao clima, a resistência a endoparasitas, a precocidade reprodutiva, elevado índice de natalidade e de sobrevivência e a habilidade materna. A ovelha crioula apresenta uma grande importância social nas comunidades onde outros animais não sobrevivem, contribuindo para a manutenção do homem no campo (Moreira e Silva, 2004; McManus *et al.* 2013).

Através da análise de sequências de DNA mitocondrial e nuclear de diversos rebanhos do RS e Santa Catarina, Gonçalves *et al.* (2010) identificaram 18 haplótipos únicos para os ovinos crioulos, sendo que nenhum destes é compartilhado entre as variedades Serrana e Fronteira, comprovando a existência de distinção genética entre essas, o que corrobora a diferenciação morfológica existente entre os fenótipos destas e indica a necessidade de estudos que venham a detalhar as diferenças entre as variedades a fim de preservar a totalidade do patrimônio genético representado pelas duas.

Durante a metade do século XIX, esta raça era intensamente criada na América do Sul, principalmente no Brasil, Argentina e Uruguai, constituindo quase que a totalidade dos rebanhos existentes no Rio Grande do Sul nos séculos XVIII e XIX. No início do século XX, representavam mais de 50% do rebanho ovino do Rio Grande do Sul, havendo o registro da participação da raça na primeira exposição oficial de animais no Estado, realizada em Porto Alegre em 1901. A crescente demanda da indústria de lã pela melhoria em qualidade e da indústria de carne pelo aumento do tamanho da carcaça levou à progressiva substituição por outras raças e à perda do interesse na raça Crioula por parte dos criadores. O cenário resultou na expressiva diminuição do número de animais, chegando a se aproximar da extinção (Moreira, 2002; Moreira e Silva, 2004). A Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos (ABCOC) foi fundada em 1999, e o reconhecimento oficial da raça pelo Ministério da Agricultura e Pecuária ocorreu em 2000, estabelecendo o padrão racial e estimulando o processo de preservação do patrimônio genético (Vaz, Moreira e Caon, 2003; Moreira e Silva, 2004). Com o objetivo de evitar a perda do material genético existente exclusivamente nas raças locais, os ovinos crioulos estão incluídos no programa de conservação do patrimônio genético brasileiro desenvolvido pela EMBRAPA (Mariane *et al.* 2009).

Uma característica notável da raça Crioula é a diversidade de cores existente na lã dos animais, variando entre o branco e o preto, com diversos tons intermediários, incluindo amarelo, cinza, marrom, bege e cinza. Independente da cor presente no animal, o velo pode apresentar manchas, com faixas ou com bandas de cor diferente nas mechas de lã. (Vaz, Moreira e Caon, 2003; Moreira e Silva, 2004; Moraes e Souza, 2011). Hepp *et al.* (2012) analisaram a influência do gene *MC1R* na determinação da cor da lã na ovelha crioula. Os indivíduos avaliados apresentaram diferentes cores, como branco, preto, marrom, cinza e bege. Os resultados demonstraram a associação entre os alelos do gene e os fenótipos comprovando a ação do gene na regulação da coloração na raça. Entretanto, parte variação da cor dos indivíduos não foi explicada pela presença dos alelos do *MC1R*, indicando que outros genes estão envolvidos. O estudo dos genes responsáveis pela coloração da lã pode auxiliar os criadores na formação de rebanhos para a obtenção de fenótipos desejados.

Este trabalho tem o objetivo de avaliar a influência dos genes candidatos *MC1R*, *ASIP* (proteína sinalizadora *agouti*), *TYRP1* (proteína relacionada à tirosinase 1) e *KIT* (homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4) na coloração

da lã na raça ovina crioula, visando determinar o padrão de herança da característica na raça e colaborar na sua preservação através da manutenção da diversidade fenotípica existente.

### **A predição do efeito de polimorfismos através de abordagem computacional**

Com o desenvolvimento de novas tecnologias para a aquisição e análise da informação genética, incluindo plataformas de sequenciamento de alto rendimento e estudos de associação genômicos (GWAS), tornou-se possível a obtenção de uma grande quantidade de dados sobre a diversidade genética das espécies (Bishop *et al.* 2009; Bush e Moore, 2012). Por meio do sequenciamento do DNA, é possível determinar-se facilmente quais são as mutações existentes nos genes e então correlacioná-las aos fenótipos. Alterações em diversos genes associadas à variação na coloração das espécies tem sido identificadas através de estratégias como o estudo de genes candidatos e a análise genômica, ocorrendo a descoberta de diversos mecanismos moleculares responsáveis pela modificação no funcionamento dos genes subjacentes à variação fenotípica.

Os polimorfismos de um nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - SNPs) correspondem à maior parcela da variação genética, mais de 10 milhões de polimorfismos na espécie humana (Thusberg e Vihinen, 2009). Polimorfismos não sinônimos (nsSNPs) na região codificante dos genes alteram a proteína de diferentes maneiras, podendo afetar o sítio catalítico, levar à incorreta dobradura ou reduzindo a estabilidade da proteína (Vendruscolo *et al.* 2003; Josephy, Kent e Mannervik, 2009; Gorlatova *et al.* 2011). Entretanto, determinar quais polimorfismos apresentam relevância na regulação da variação fenotípica é um desafio para a pesquisa genética. A análise funcional dos nsSNPs envolve a expressão da proteína alterada em linhagens celulares e organismos geneticamente modificados, sendo um processo demorado e trabalhoso frente à grande quantidade de nsSNPs existentes (Mooney, 2005). Desta forma, muitos polimorfismos descobertos em genes candidatos não foram avaliados quanto ao seu impacto na função dos genes e na variação fenotípica.

Uma abordagem computacional dos polimorfismos não sinônimos vem sendo utilizada recentemente a fim de determinar os SNPs que potencialmente afetam o funcionamento dos genes e identificar os mecanismos responsáveis por doenças complexas e pela variação nos fenótipos. Diversas ferramentas foram desenvolvidas

com o objetivo de diferenciar os nsSNPs danosos para a função do gene daqueles neutros ou tolerados (Ng e Henikoff, 2006; Thusberg e Vihinen, 2009; Kumar *et al.* 2014). Estas ferramentas incluem programas que utilizam diferentes estratégias. Uma destas é a análise baseada em sequências, a qual utiliza a informação evolutiva da conservação dos aminoácidos no gene, através de alinhamentos de múltiplas sequências de genes homólogos em diferentes espécies. Os resíduos com alto grau de conservação nas sequências são considerados importantes para a estrutura e função da proteína e, desta forma, alterações nestes sítios são identificadas como deletérias. Métodos baseados na análise estrutural avaliam as alterações nas propriedades físicas e químicas das proteínas devido à mutação, identificando os nsSNPs que afetam a função do gene (Yue, Melamud e Moulton, 2006; Yue e Moulton, 2006; Kumar *et al.* 2014). Outro tipo de programas utiliza métodos de aprendizado por máquinas para prever a associação dos nsSNPs com doenças. Estes métodos comparam as mutações com bancos de dados que contém polimorfismos com efeitos danosos validados por estudos clínicos, e também combinam diferentes informações, como as propriedades estruturais da proteína e a conservação dos aminoácidos (Mooney, 2005).

Mutações deletérias foram identificadas através da abordagem computacional em genes envolvidos com diferentes processos biológicos, tais como os genes *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*; Rajasekaran *et al.* 2007), *ABL1* (*c-abl oncogene 1*; Doss *et al.* 2008), *ABCA1* (*ATP-binding cassette transporter A1*; Brunham *et al.* 2005), *MyH7* (*beta myosin heavy chain*; Kumar *et al.* 2014), *SOD2* (*superóxido dismutase 2*; Carvalho e Mesquita, 2013), *SOD1* (*superóxido dismutase 1*; Moreira *et al.* 2013) e *KIT* (Vanajothi *et al.* 2012).

As diferenças nas estratégias de predição, nas propriedades analisadas, bem como nos bancos de dados utilizados resultam em divergências nos resultados obtidos para um mesmo nsSNP pelos diferentes programas. Ferramentas consenso realizam a análise dos nsSNPs por meio da comparação do resultado de programas individuais, permitindo uma maior acurácia na predição (Olatubosun *et al.* 2012; Bendl *et al.* 2014). A combinação de ferramentas de predição que aplicam abordagens variadas tem sido utilizada a fim de sobrepor as diferenças nos resultados e identificar os polimorfismos mais danosos nos genes de interesse (Thusberg e Vihinen, 2009). Desta forma, por meio da combinação de ferramentas de predição os nsSNPs mais provavelmente patogênicos foram identificados em genes envolvidos em doenças complexas, como cardiopatias

(Kumar *et al.* 2013) e câncer (Reva, Antipin e Sander, 2011; Kumar *et al.* 2012; Kumar e Purohit, 2012; Vanajothi *et al.* 2012).

Os polimorfismos nos genes *TYR*, *TYRP1* e *OCA2* humanos, envolvidos em distúrbios na pigmentação, como em diferentes formas de albinismo ocular, foram analisados utilizando a combinação de diferentes ferramentas de predição, resultando na indicação daqueles mais deletérios (Kamaraj e Purohit, 2013; Kamaraj e Purohit, 2013b; Kamaraj e Purohit, 2014).

A avaliação do efeito dos polimorfismos nos genes de coloração utilizando ferramentas de predição torna possível diferenciar as mutações neutras das danosas e selecionar as com maior potencial deletério para estudos do seu impacto na variação fenotípica através de análises funcionais. O *MC1R* apresenta um papel importante na variedade fenotípica em humanos, estando associado a fenótipos de pigmentação e à suscetibilidade à melanoma e outros cânceres de pele (Sturm *et al.* 2003; Duffy *et al.* 2004). Apesar de uma grande quantidade de polimorfismos ter sido identificada no gene *MC1R* (Garcia-Borrón, Abdel-Malek e Jiménez-Cervantes, 2014), muitos destes não foram avaliados quanto ao seu efeito no funcionamento do receptor e na variação fenotípica. Através da predição do efeito dos nsSNPs utilizando ferramentas computacionais espera-se identificar os polimorfismos mais danosos e que apresentam maior probabilidade de afetar o *MC1R*, permitindo a sua priorização em estudos laboratoriais.

### **O gene *MC1R* em humanos**

O gene *MC1R* é altamente polimórfico em humanos tendo sido identificados aproximadamente mais de uma centena de polimorfismos (Rana *et al.* 1999; Beaumont *et al.* 2011; Garcia-Borrón, Abdel-Malek e Jiménez-Cervantes, 2014). Variações no *MC1R* foram associadas com diferenças na pigmentação da pele e dos cabelos e com elevado risco de desenvolvimento de melanoma e outros cânceres de pele em diferentes populações (Bastiaens *et al.* 2001; Kennedy *et al.* 2001; Beaumont *et al.* 2005; Fernandez *et al.* 2007). O fenótipo ruivo ou RHC (*red hair color*), caracterizado por uma redução nos níveis de eumelanina é uma condição recessiva provocada por diferentes alelos do gene *MC1R*. Além da coloração avermelhada do cabelo, este

fenótipo inclui alterações na pigmentação da pele, presença de sardas a redução da capacidade de bronzeamento (Valverde *et al.* 1995; Rees, 2003; Rees, 2004). As variações p.D84E, p.R151C, p.R160W e p.D294H são consideradas de alta penetrância para o fenótipo RHC e recebem a classificação de R na literatura. Os polimorfismos p.V60L, p.V92M e p.R163Q apresentam baixa penetrância, sendo chamados de alelos r (Valverde *et al.* 1995; Schioth *et al.* 1999; Flanagan *et al.* 2000; Sturm *et al.* 2003; Duffy *et al.* 2004; Wong e Rees, 2005; Sulem *et al.* 2007), enquanto as variantes p.R142H e p.I155T são menos frequentes, tendo sido ligadas ao fenótipo RHC em estudos familiares (Raimondi *et al.* 2008). Adicionalmente as variações p.V60L, p.D84E, p.V92M, p.M128T, p.I155T, p.R160W, p.R163Q, p.C289R e p.D294H foram associadas com maior suscetibilidade para o desenvolvimento de melanoma e outros tumores (Duffy *et al.* 2004; Fernandez *et al.* 2007; Pérez-Oliva *et al.* 2009; Scherer *et al.* 2009; Davies *et al.* 2012).

O impacto funcional das mutações no *MC1R* associadas com RHC e melanoma foi analisado através de estudos *in vitro*. Schioth *et al.* (1999) por meio de estudos de ligação e de transfecção celular demonstraram que as variantes p.R151C, p.R160W e p.D294H afetam fortemente a produção de AMPc em resposta à estimulação por  $\alpha$ -MSH. As variantes p.D84E, p.R151C, p.I155T e p.R160W reduziram a expressão do receptor na superfície celular com a correspondente diminuição na sinalização pelo AMPc (Scott *et al.* 2002; Beaumont *et al.* 2005; Beaumont *et al.* 2007). Os polimorfismos p.R142H e p.D294H apresentaram expressão normal do receptor na superfície dos melanócitos, entretanto, também resultaram em grande redução na resposta à estimulação. Estes resultados indicam que a perda de função do *MC1R* está relacionada à alteração na presença do receptor na membrana celular e à baixa sinalização via proteína G.

A análise dos polimorfismos p.V60M, p.V92M e p.R163Q classificados como de baixa penetrância (r) resultaram em alterações não significativas na afinidade do receptor pelo  $\alpha$ -MSH e na produção de AMPc em resposta à ligação do hormônio (Koppula *et al.* 1997; Ringholm *et al.* 2004). Embora o polimorfismo p.V60M resulte em uma menor estimulação da produção de AMPc em relação ao receptor selvagem, o alelo mutado ainda é capaz de induzir a produção de melanina (Beaumont *et al.* 2005; Beaumont *et al.* 2007).



Ringholm *et al.* (2004) demonstraram que a variante p.V92M possui uma menor afinidade pelo  $\alpha$ -MSH em comparação com o receptor selvagem, e uma redução moderada na produção de AMPc após a estimulação por um análogo do  $\alpha$ -MSH. Estes resultados contrastam com a análise desta variante por Koppula *et al.* (1997) que encontraram níveis de resposta similares ao alelo selvagem e com Beaumont *et al.* (2007) que descreveram uma resposta significativamente maior, além da expressão normal do receptor alterado na superfície celular.

O polimorfismo p.R163Q apresentou uma afinidade pelo  $\alpha$ -MSH levemente reduzida e um decréscimo não significativo na produção de AMPc. Também foi observada uma pequena alteração na expressão do receptor com esta mutação na superfície da célula, indicando que esta alteração não afeta significativamente a função do receptor (Beaumont *et al.* 2005; Beaumont *et al.* 2007; Ringholm *et al.* 2004).

Apesar dos resultados descritos indicarem a importância das mutações no *MC1R* no controle da pigmentação em humanos, muitas das mutações conhecidas no gene em humanos não foram caracterizadas funcionalmente, não sendo conhecido o seu impacto no funcionamento do gene e no fenótipo. O estudo do gene *MC1R* através de diferentes abordagens permitirá o melhor entendimento do seu papel na variação fenotípica e na evolução da pigmentação.

Neste trabalho realizou-se a predição do efeito dos polimorfismos de um nucleotídeo não sinônimos (nsSNPs) no gene *MC1R* humano utilizando diferentes ferramentas computacionais, visando diferenciar os polimorfismos danosos dos neutros e identificar os mais deletérios para o funcionamento do gene.

## Objetivos

### Gerais

Aumentar o conhecimento sobre a regulação genética da pigmentação através da utilização de abordagens de genes candidatos, avaliando a associação dos genes *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* e *KIT* com a coloração da lã na raça de ovinos crioulos, e através da abordagem de predição computacional avaliar o efeito dos polimorfismos no gene *MC1R* humano.

### Específicos

- Realizar o seqüenciamento dos genes candidatos *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1* e *KIT* nos ovinos crioulos, buscando identificar alterações associadas com a variação da cor;
- Caracterizar a variação na coloração da lã na raça crioula através da colorimetria pelo Sistema CIELAB;
- Identificar os mecanismos de herança dos genes envolvidos na regulação da cor da lã nos ovinos crioulos;
- Realizar a análise da expressão do RNA mensageiro (Real Time PCR) do gene *ASIP* em amostras de tecido de pele dos ovinos crioulos visando correlacioná-las com os genótipos e fenótipos dos animais;
- Realizar a predição do efeito dos polimorfismos de um nucleotídeo não sinônimos (nsSNPs) no gene *MC1R* humano utilizando diferentes ferramentas computacionais, identificando os mais deletérios para o funcionamento do gene.

**Capítulo II - The wool color in the Brazilian Creole breed is influenced by epistatic interaction of the *MC1R* and *ASIP* genes.**

Diego Hepp<sup>1</sup>, Gislene Lopes Gonçalves<sup>2</sup>, Gilson Rudinei Pires Moreira<sup>2</sup>, Thales Renato Ochotorena de Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Artigo a ser submetido para a revista Animal Genetics

### **Capítulo III – Prediction of the Damage-associated Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in the Human *MC1R* Gene**

Diego Hepp<sup>1\*¶</sup>, Gislene Lopes Gonçalves<sup>2¶</sup>, Thales Renato Ochotorena de Freitas<sup>1¶</sup>

1 Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Artigo publicado na revista PLoS ONE sob a referência:

Hepp D, Gonçalves GL, Freitas TRO (2015) Prediction of the Damage-Associated Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in the Human *MC1R* Gene. PLoS ONE 10(3): e0121812. doi:10.1371/journal.pone.0121812.

## Discussão geral

Os resultados obtidos permitiram identificar a influência da interação epistática dos genes *MC1R* e *ASIP* na coloração da lã nos ovinos crioulos. A abordagem dos genes candidatos mostrou-se adequada para o estudo da variação coloração nestes animais. Os genes candidatos analisados foram escolhidos devido ao conhecimento dos genes envolvidos na rota metabólica da pigmentação e à ocorrência de polimorfismos previamente associados com a característica em outras espécies ou em outras raças ovinas.

Através do sequenciamento dos genes, da realização de cruzamentos dirigidos entre animais de diferentes cores e da análise da expressão, os alelos presentes e o mecanismo de regulação dos fenótipos brancos ou pigmentados na raça foram esclarecidos. O alelo dominante do gene *MC1R* consiste em uma ativação constitutiva do receptor, resultando na produção de eumelanina e, portanto, no fenótipo pigmentado sempre que este alelo está presente. Por outro lado, os indivíduos homozigotos para o alelo selvagem do *MC1R* possuem um receptor funcional, passível de ser ativado pela melanocortina ou inibido pelo peptídeo *ASIP*. Quando estes indivíduos apresentaram o alelo duplicado do gene *ASIP* ocorreu a inibição da pigmentação, resultando no fenótipo branco. A análise da expressão do *ASIP* por PCR em tempo real confirmou o efeito da duplicação sobre a transcrição. Apenas os portadores do alelo duplicado apresentaram níveis elevados do RNA mensageiro do gene, enquanto os homozigotos para o alelo simples não expressaram o gene, exibindo fenótipos pigmentados.

Embora os genes *MC1R* e *ASIP* tenham sido analisados em outras raças ovinas, demonstrou-se que a combinação de alelos existente em cada população, bem como a sua funcionalidade são determinantes para a diversidade de fenótipos. Desta forma, espera-se que o conhecimento adquirido auxilie na busca por melhorias na criação e na preservação da raça.

A coloração da lã na raça ovina Crioula é uma característica complexa que apresenta uma grande diversidade de cores. Além da influência de diferentes fatores genéticos aspectos ambientais também podem afetar o fenótipo dos indivíduos dificultando o estudo da sua regulação. Através das análises realizadas neste trabalho foi possível identificar que os genes *MC1R* e *ASIP* estão envolvidos no controle da pigmentação nesta raça. Embora exista uma diferença significativa na cor entre os

grupos de animais brancos e coloridos a avaliação colorimétrica demonstrou que a raça apresenta uma ampla variedade de tons a qual demanda maior caracterização.

A predição do efeito de polimorfismos nos genes de coloração utilizando ferramentas computacionais apresenta-se como uma abordagem alternativa para o estudo da genética da coloração. Uma grande quantidade de mutações foram descritas no gene MC1R humano, ressaltando o seu papel na variação fenotípica, entretanto, para muitas destas não foram realizadas análises in vitro do seu impacto sobre o funcionamento do receptor.

Através da combinação do resultado de 11 programas de predição com estratégias distintas foi possível identificar os 14 nsSNPs mais danosos no gene MC1R humano. Os 92 nsSNPs analisados foram classificados do mais neutro, não apresentando nenhum resultado deletério, ao mais danoso, com resultados deletérios em todas as ferramentas analisadas. Devido ao fato de a maioria dos polimorfismos analisados não ter sido estudada quanto aos seus efeitos no funcionamento do gene, estes resultados podem ser utilizados na priorização das mutações a ser analisadas em estudos laboratoriais posteriores e contribuir no entendimento do papel do MC1R na variação fenotípica em humanos.

## Referências bibliográficas

- Aberdam E, Bertolotto C, Sviderskaya EV, Thillot V, Hemesath TJ, Fisher DE, Bennett DC, Ortonne J and Ballotti R (1998) Involvement of Microphthalmia in the Inhibition of Melanocyte Lineage Differentiation and of Melanogenesis by Agouti Signal Protein. *J Biol Chem* 273:19560-19565.
- Aigner B, Besenfelder U, Muller M and Brem G (2000) Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mamm Genome* 11:700-702.
- Albrecht E, Komolka K, Kuzinski, J and Maak S (2012) Agouti Revisited: Transcript Quantification of the *ASIP* Gene in Bovine Tissues Related to Protein Expression and Localization. *PLoS ONE* 7:e35282.
- Alonso S, Izagirre N, Smith-Zubiaga I, Gardeazabal J, Díaz-Ramón JL, Díaz-Pérez JL, Zelenika D, Boyano MD, Smit N and de la Rúa C (2008) Complex signatures of selection for the melanogenic loci *TYR*, *TYRP1* and *DCT* in humans. *BMC Evol Biol* 8:74.
- Andersson L (2009) Studying Phenotypic Evolution in Domestic Animals: A Walk in the Footsteps of Charles Darwin. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 74:319-325.
- Barsh G (1996) The genetics of pigmentation, from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 12:299–305
- Barsh G, Gunn T, He L, Schlossman S and Duke-Cohan J (2000) Biochemical and Genetic Studies of Pigment-Type Switching. *Pigment Cell Res* 13:48-53.
- Bastiaens MT, Huurne JAC, Kielich C, Gruis NA, Westendorp RGJ, Vermeer BJ, Bavinck JNB and Leiden Skin Cancer Study Team (2001) Melanocortin-1 Receptor Gene Variants Determine the Risk of Nonmelanoma Skin Cancer Independently of Fair Skin and Red Hair. *Am J Hum Gen* 68:884-894.
- Beaumont KA, Newton RA, Smit DJ, Leonard JH, Stow JL and Sturm RA (2005) Altered cell surface expression of human *MC1R* variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk. *Hum Mol Genet* 14: 2145–2154.
- Beaumont KA, Shekar SN, Newton RA, James MR, Stow JL, Duffy DL and Sturm RA (2007) Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for *MC1R* variant alleles. *Hum Mol Genet* 16:2249–2260.
- Beaumont KA, Wong SS, Ainger SA, Liu YY, Patel MP, Millhauser GL, Smith JJ, Alewood PF, Leonard JH and Sturm RA (2011) Melanocortin *MCI* receptor in human genetics and model systems. *Eur J Pharmacol* 660:103-110.

- Becker D, Otto M, Ammann P, Keller I, Drögemüller C and Leeb T (2014) The brown coat colour of Coppernecked goats is associated with a non-synonymous variant at the *TYRP1* locus on chromosome 8. *Anim Genet* 10.1111/age.12240.
- Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, Brezovsky J and Damborsky J (2014) PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. *PLoS Comput Biol* 10: e1003440.
- Bennett DC and Lamoreux ML (2003) The color loci of mice – a genetic century. *Pigment Cell Res* 16:333–344.
- Beraldi D, McRae AF, Gratten J, Slate J, Visscher PM and Pemberton JM (2006) Development of a linkage map and mapping of phenotypic polymorphisms in a free-living population of soay sheep (*Ovis aries*). *Genetics* 173.1521–37.
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, Cowan CM and Potter J (2003) *TYRP1* is associated with dun coat colour in dexter cattle or how now brown cow? *Anim Genet* 34:169–75.
- Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, Randerson-Moor J, Aitken JF, Avril M-F, Azizi E, Bakker B, Bianchi-Scarrà G, Paillerets BB, Calista D, Cannon-Albright LA, Chin-A-Woeng T, Dębniak T, Galore-Haskel G, Ghiorzo P, Gut I, Hansson J, Hočevár M, Höiom V, Hopper JL, Ingvar C, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Lubiński J, Mackie R, Malvey J, Mann GJ, Martin NG, Montgomery GW, Nieuwpoort FA, Novakovic S, Olsson H, Puig S, Weiss M, van Workum W, Zelenika D, Brown KM, Goldstein AM, Gillanders EM, Boland A, Galan P, Elder DE, Gruis NA, Hayward NK, Lathrop GM, Barrett JB and Bishop JAN (2009) Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet* 41:920-928.
- Blaszczyk WM, Distler C, Dekomien G, Arning L, Hoffmann KP, Epplen JT (2007) Identification of a tyrosinase (*TYR*) exon 4 deletion in albino ferrets (*Mustela putorius furo*). *Anim Genet* 38:421-423.
- Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le Caignec C, Wegner M and Goossens M (2000) Interaction among *SOX10*, *PAX3* and *MITF*, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9:1907-1917.
- Bradley BJ, Gerald MS, Widdig A and Mundy NI (2013) Coat Color Variation and Pigmentation Gene Expression in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) *J Mammal Evol* 20:263-270.
- Brenig B, Beck J, Floren C, Bornemann-Kolatzki K, Wiedemann I, Hennecke S, Swalve H and Schütz E (2014) Molecular genetics of coat colour variations in White Galloway and White Park cattle. *Anim Genet* 44:450-453.



Brenner M and Hearing VJ (2008) The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol* 84:539-549.

Brooks SA and Bailey E (2005) Exon skipping in the *KIT* gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mamm Genome* 16:893-902.

Brooks SA, Lear TL, Adelson DL and Baley E (2007) A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenet Genome Res* 119:225–230.

Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD and Hayden MR (2005) Accurate Prediction of the Functional Significance of Single Nucleotide Polymorphisms and Mutations in the *ABCA1* Gene. *PLoS Genet* 1: e83.

Bultman SJ, Michaud EJ and Woychik RP (1992) Molecular Characterization of the Mouse *Agouti* Locus. *Cell* 71:1195-1204.

Bush WS, Moore JH (2012) Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput Biol* 8:e1002822.

Calvo JH, Bouzada JA, Jurado JJ and Serrano M (2006) Genetic substructure of the Spanish manchega sheep breed. *Small Rumin Res* 64:116-125.

Camacho-Hübner A, Richard C, Beermann F (2002) Genomic structure and evolutionary conservation of the tyrosinase gene family from *Fugu*. *Gene* 285:59-68.

Carlson JA, Linette GP, Aplin A, Ng B and Slominski A (2007) Melanocyte Receptors: Clinical Implications and Therapeutic Relevance. *Dermatol Clin* 25:541-557.

Carruthers CR, Plante Y and Schmutz SM (2011) Comparison of Angus cattle populations using gene variants and microsatellites. *Can J Anim Sci* 91:81-85.

Carvalho MDC, Mesquita JF (2013) Structural Modeling and In Silico Analysis of Human Superoxide Dismutase 2. *PLoS ONE* 8:e65558.

Chang T-S (2012) Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials* 5:1661-1685.

Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R and Bertolotto C (2009) Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:27-40.

Cheviron ZA, Hackett SJ and Brumfield RT (2006) Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*) is not associated with plumage variation in the blue-crowned manakin (*Lepidothrix coronata*). *Proc Biol Sci* 273:1613-1618.

Cieslak M, Reissmann M, Hofreiter M and Ludwig A (2011) Colours of Domestication. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86:885-899.

Corso J., Gonçalves G.L. & Freitas, T.R.O. (2012) Sequence variation in the melanocortin-1 receptor (MC1R) pigmentation gene and its role in the cryptic coloration of two South American sand lizards. *Genetics and Molecular Biology* **35**, 81-87.

David VA, Menotti-Raymond M, Wallace AC, Roelke M, Kehler J, Leighty R, Eizirik E, Hannah SS, Nelson G, Schäffer AA, Connelly CJ, O'Brien SJ, and Ryugo DK (2014) Endogenous Retrovirus Insertion in the KIT Oncogene Determines White and White spotting in Domestic Cats. *Genetics* **188**:1881-1891.

Davies JR, Randerson-Moor J, Kukulizch K, Harland M, Kumar R, Madhusudan S, Nagore E, Hansson J, Höiom V, Ghiorzo P, Gruis NA, Kanetsky PA, Wendt J, Pjanova D, Puig S, Saiag P, Schadendorf D, Soufir N, Okamoto I, Affleck P, García-Casado Z, Ogbah Z, Ozola A, Queirolo P, Sucker A, Barrett JH, van Doorn R, Bishop DT and Newton-Bishop J. (2012) Inherited variants in the MC1R gene and survival from cutaneous melanoma: a BioGenoMEL study. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**:384-394.

de Gruijter JM, Lao O, Vermeulen M, Xue Y, Woodwark C, Gillson CJ, Coffey AJ, Ayub Q, Mehdi SQ, Kayser M and Tyler-Smith C (2011) Contrasting signals of positive selection in genes involved in human skin-color variation from tests based on SNP scans and resequencing. *Investig Genet* **2**:24.

Deng WD, Shu W, Yang SL, Shi XW and Mao HM (2009). Pigmentation in black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the MC1R gene. *Mol Biol Rep* **36**:431-436.

Dinulescu DM, Cone RD (2000) Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts. *J Biol Chem* **275**:6695-6698.

Doss CGP, Sudandiradoss C, Rajasekaran R, Purohit R, Ramanathan K and Sethumadhavan R (2008) Identification and structural comparison of deleterious mutations in nsSNPs of ABL1 gene in chronic myeloid leukemia: A bio-informatics study. *J Biomed Inform* **41**:607-612.

Dreger DL and Schmutz SM (2009) The variant red coat colour phenotype of Holstein cattle maps to BTA27. *Anim Genet* **41**:109-112.

Drögemüller C, Giese A, Martins-Wess F, Wiedemann S, Andersson L, Brenig B, Fries R and Leeb T (2006) The mutation causing the black-and-tan pigmentation phenotype of Mangalitza pigs maps to the porcine ASIP locus but does not affect its coding sequence. *Mamm Genome* **17**:58-66.

Duffy DL, Box NF, Chen W, Palmer JS, Montgomery GW, James MR, Hayward NK, Martin NG and Sturm RA. (2004) Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet* **13**:447-461.

Durkin K, Coppieters W, Drögemüller C, Ahariz N, Cambisano N, Druet T, Fasquelle C, Haile A, Horin P, Huang L, Kamatani Y, Karim L, Lathrop M, Moser S, Oldenbroek K, Rieder S, Sartelet A, Sölkner J, Stålhammar H, Zelenika D, Zhang Z, Leeb T, Georges M and Charlier C (2012) Serial translocation by means of circular intermediates underlies colour sidedness in cattle. *Nature* 482:81-86.

Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS and O'Brien SJ (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol* 13:448-453.

Esposito R, D'Aniello S, Squarzone P, Pezzotti MR, Ristatore F and Spagnuolo A (2012) New Insights into the Evolution of Metazoan Tyrosinase Gene Family. *PLoS ONE* 7:e35731.

Everts RE, Rothuizen J and Van Oost BA (2000) Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Anim Genet* 31:194-199.

Ezoe K, Holmes SA, Ho L, Bennett CP, Bolognia JL, Brueton L, Burn J, Falabella R, Gatto EM, Ishii N, Moss C, Pittelkow MR, Thompson E, Ward KA and Spritz RA (1995) Novel Mutations and Deletions of the *KIT* (Steel Factor Receptor) Gene in Human Piebaldism. *Am J Hum Genet* 56:58-66.

Fang M, Larson G, Ribeiro HS, Li N and Andersson L (2009) Contrasting Mode of Evolution at a Coat Color Locus in Wild and Domestic Pigs. *PLoS Genet* 5:e1000341.

Fariello MI, Servin B, Tosser-Klopp G, Rupp R, Moreno C, International Sheep Genomics Consortium, Cristobal MS and Boitard S (2014) Selection Signatures in Worldwide Sheep Populations. *PLoS ONE* 9:e103813.

Fernandez LP, Milne RL, Bravo J, Lopez JM, Avilés JA, Longo MI, Benítez J, Lázaro P and Ribas G (2007) MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population. *Carcinogenesis* 28:1659-1664.

Flanagan N, Healy E, Ray A, Philips S, Todd C, Jackson IJ, Birch-Machin MA and Rees JL (2000) Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* 9:2531-2537.

Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall'Olio S, Calascibetta D, Russo V and Portolano B (2010) Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative e allele at the ovine Extension locus. *Small Rumin Res* 91:200-207.

Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall'Olio S, González EG, Finocchiaro R, Davoli R, Russo V and Portolano B (2009) Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. *BMC Genet* 10:47.

Fontanesi L, Dall'Olio S, Beretti F, Portolano B and Russo V (2011) Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (*ASIP*) and melanocortin 1 receptor (*MC1R*) genes. *Animal* 5:8-17.

Fontanesi L, Forestier L, Allain D, Scotti E, Beretti F, Deretz-Picoulet S, Pecchioli E, Vernesi C, Robinson TJ, Malaney JL, Russo V and Oulmouden A (2010) Characterization of the rabbit agouti signaling protein (*ASIP*) gene: Transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. *Genomics* 95:166-175.

Fontanesi L, Rustempašić A, Brkab M and Russo V (2012) Analysis of polymorphisms in the agouti signalling protein (*ASIP*) and melanocortin 1 receptor (*MC1R*) genes and association with coat colours in two Pramenka sheep types. *Small Rumin Res* 105:89-96.

Fontanesi L, Vargiolu M, Scotti E, Latorre R, Pellegrini MSF, Mazzoni M, Asti M, Chiocchetti R, Romeo G, Clavenzani P and De Giorgio R (2014) The *KIT* Gene Is Associated with the English Spotting Coat Color Locus and Congenital Megacolon in Checkered Giant Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *PLoS ONE* 9:e93750.

Fuchs S, Amiel J, Claudel S, Lyonnet S, Corvol P and Pinet F (2001) Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling. *Mol Med* 7:115-124.

Gao C and Chen YG (2010) Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22:717-727.

García-Borrón J, Abdel-Malek Z and Jiménez-Cervantes C (2014) *MC1R*, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. - *Pigment Cell Melanoma Res* 27:699-720.

García-Borrón JC, Sánchez-Laorden BL and Jiménez-Cervantes C (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 18:393-410.

Geissler EN, Ryan MA and Housman DE (1988) The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55:185-192

Gerding WM, Akkad DA and Epplen JT (2013) Spotted Weimaraner dog due to *de novo* *KIT* mutation. *Anim Genet* 44:605-606.

Gerding WM, Schreiber S, Dekomien G and Epplen JT (2011) Tracing the origin of 'blue Weimaraner' dogs by molecular genetics. *J Anim Breed Genet* 128:153-160.

Girardot M, Guibert S, Laforet M-P, Gallard Y, Larroque H and Oulmouden A (2006) The insertion of a full-length *Bos taurus* LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande *Agouti* gene. *Pigment Cell Res* 19:346-355.

- Girardot M, Martin J, Guibert S, Leveziel H, Julien R and Oulmouden A (2005) Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res* 18:34-41.
- Giuffra E, Evans G, Törnsten A, Wales R, Day A, Looft H, Plastow G and Andersson L (1999) The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant white (*I/KIT*) locus. *Mamm Genome* 10:1132-1136.
- Giuffra E, Törnsten A, Marklund S, Bongcam-Rudloff E, Chardon P, Kijas JM, Anderson SI, Archibald AL and Andersson L (2002) A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking *KIT*. *Mamm Genome* 13:569-577.
- Gonçalves GL, Hoekstra HE and Freitas TRO (2012) Striking coat colour variation in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae): a role for the melanocortin-1 receptor? *Biol J Linn Soc Lond* 105:665-680.
- Gonçalves GL, Moreira GRP, Freitas TRO, Hepp D, Passos DT and Weimer TA (2010) Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Anim Genet* 41:308-10.
- Gorlatova N, Chao K, Pal LR, Araj RH, Galkin A, Turko I, Moulton J and Herzberg O (2011) Protein Characterization of a Candidate Mechanism SNP for Crohn's Disease: The Macrophage Stimulating Protein R689C Substitution. *PLoS ONE* 6:27269.
- Graham A, Wakamatsu K, Hunt G, Ito S and Thody AJ (1997) Agouti Protein Inhibits the Production of Eumelanin and Pheomelanin in the Presence and Absence of  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Res* 10: 298-303.
- Graphodatskaya D, Joerg H, Asai-Coakwell M, Janett F and Stranzinger G (2006) Expression and function of agouti signaling protein in cattle. *Anim Sci J* 77:31-41.
- Gratten J, Beraldi D, Lowder BV, McRae AF, Visscher PM, Pemberton JM and Slate J (2007) Compelling evidence that a single nucleotide substitution in *TYRP1* is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proc Biol Sci* 274:619-26.
- Gratten J, Pilkington JG, Brown EA, Beraldi D, Pemberton JM and Slate J (2010). The genetic basis of recessive self-colour pattern in a wild sheep population. *Heredity* 104:206-214.
- Guibert S, Girardot M, Leveziel H, Julien R and Oulmouden A (2004) Pheomelanin Coat Colour Dilution in French Cattle Breeds is not Correlated with the *TYR*, *TYRP1* and *DCT* Transcription Levels. *Pigment Cell Res* 17:337-345.
- Gunnarsson U, Hellström AR, Tixier-Boichard M, Minvielle F, Bed'hom B, Ito S, Jensen P, Rattink A, Vereijken A and Andersson L (2007) Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. *Genetics* 175:867-877.

Gutiérrez-Gil B, Wiener P and Williams JL (2007) Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F<sub>2</sub>-Backcross Charolais × Holstein population. *BMC Genet* 8:56.

Haase B, Brooks SA, Schlumbaum A, Azor PJ, Bailey E, Alaeddine F, Mevissen M, Burger D, Poncet P, Rieder S and Leeb T (2007) Allelic Heterogeneity at the Equine *KIT* Locus in Dominant White (W) Horses. *PLoS Genet* 3:e195.

Haase B, Brooks SA, Tozaki T, Burger D, Poncet PA, Rieder S, Hasegawa T, Penedo C and Leeb T (2009) Seven novel *KIT* mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Anim Genet* 40:623-629.

Haase B, Rieder S, Tozaki T, Hasegawa T, Penedo MC, Jude R and Leeb T (2011) Five novel *KIT* mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Anim Genet* 42:337-339.

Haldane JBS, Sprunt AD, Haldane NM (1915). Reduplication in mice. *J Genet* 5: 133–135.

Hanna LLH, Sanders JO, Riley DG, Abbey CA and Gill CA (2014) Identification of a major locus interacting with *MC1R* and modifying black coat color in an F<sub>2</sub> Nellore-Angus population. *Genet Sel Evol* 46:4.

Hauswirth R, Jude R, Haase B, Bellone RR, Archer S, Holl H, Brooks SA, Tozaki T, Penedo MCT, Rieder S and Leeb T (2013) Novel variants in the *KIT* and *PAX3* genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. *Anim Genet* 44:763-765.

Hepp D, Gonçalves GL, Moreira GRP, Freitas TRO Martins CTDC, Weimer TA and Passos D.T. (2012) Identification of the e allele at the Extension locus (*MC1R*) in Brazilian Creole sheep and its role in wool color variation. *Genet Mol Res* 11:2997-3006.

Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lamoreux ML, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K and Bennett DC (2009) Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:623-634.

Hirobe T, Ito S and Wakamatsu K (2011) The mouse pink-eyed dilution allele of the *P*-gene greatly inhibits eumelanin but not phaeomelanin synthesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:241-246.

Hoekstra HE (2010) From Darwin to DNA: The Genetic Basis of Color Adaptations. In Losos, J. *In the Light of Evolution: Essays from the Laboratory and Field*, Roberts and Co. Publishers pp.277-295.

Hoekstra HE and Nachman MW (2003) Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. *Mol Ecol* 12:1185-1194.

Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA and Crossland JP (2006) A Single Amino Acid Mutation Contributes to Adaptive Beach Mouse Color Pattern. *Science* 313:101-104.

Hoekstra, H E (2006) Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222–34.

Hofreiter M and Schöenberg T (2010) The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 67:2591-603.

Holl H, Brooks S and Bailey E (2010) De novo mutation of *KIT* discovered as a result of a non-hereditary white coat colour pattern *Anim Genet* 41:196-198.

Hubbard JK, Uy JAC, Hauber ME, Hoekstra HE and Safran RJ (2010) Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends Genet* 26:231-239.

Ito S (2003) IFPCS Presidential Lecture: A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Res* 16:230-236.

Ito S and Wakamatsu K (2003) Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 16:523–31.

Ito S and Wakamatsu K (2008) Chemistry of Mixed Melanogenesis—Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochem Photobiol* 84:582–592.

Ito S and Wakamatsu K (2010) Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:63-74.

Ito S and Wakamatsu K (2011) Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:63-74.

Jablonski NG (2004) The evolution of human skin and skin color. *Annu Rev Anthropol* 33:585–623.

Jackson IJ (1994) Molecular and Developmental Genetics of Mouse Coat Color. *Annu Rev Genet* 28:189-217.

Jackson IJ, Chambers D, Rinchik EM and Bennett DC (1990) Characterization of TRP-1 mRNA Levels in Dominant and Recessive Mutations at the Mouse *brown (b)* Locus. *Genetics* 126:451-459.

Jiménez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Uraben K, Hearing VJ, Lozano JA and García-Borrón JC (1994) A New Enzymatic Function in the Melanogenic Pathway. *J Biol Chem*. 269:17993-18001.

Jordan S, Beermann F (2000) Nomenclature for identified pigmentation genes in the mouse. *Pigment Cell Res* 13:70–71.

Josephy PD, Kent M and Mannervik B (2009) Single-nucleotide polymorphic variants of human glutathione transferase T1-1 differ in stability and functional properties. Arch Biochem Biophys 490:24-29.

Kamaraj B and Purohit R (2013) In silico screening and molecular dynamics simulation of disease-associated nsSNP in TYRP1 gene and its structural consequences in OCA3. Biomed Res Int 2013:697051.

Kamaraj B and Purohit R (2013) Mutational analysis of TYR gene and its structural consequences in OCA1A. Gene 513:184-195.

Kamaraj B and Purohit R (2014) Computational Screening of Disease-Associated Mutations in OCA2 Gene. Cell Biochem Biophys 68:97-109.

Kennedy C, Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, Willemze R and Bavinck JNB (2001) Melanocortin 1 Receptor (*MC1R*) Gene Variants are Associated with an Increased Risk for Cutaneous Melanoma Which is Largely Independent of Skin Type and Hair Color. J Invest Dermatol 117:294-300.

Kerns JA, Newton J, Berryere TG, Rubin EM, Cheng JF, Schmutz SM and Barsh GS (2004) Characterization of the dog *Agouti* gene and a *nonagouti* mutation in German Shepherd Dogs. Mamm Genome 15:798-808.

Kijas JMH, Moller M, Plastow G and Andersson L (2001) A Frameshift Mutation in *MC1R* and a High Frequency of Somatic Reversions Cause Black Spotting in Pigs. Genetics 158:779-785.

Kijas JMH, Wales R, Törnsten A, Chardon P, Moller M and Andersson L (1998) Melanocortin Receptor 1 (*MC1R*) Mutations and Coat Color in Pigs. Genetics 150:1177-1185.

Kijas JW, Lenstra JA, Hayes B, Boitard S, Porto Neto LR, San Cristobal M, Servin B, McCulloch R, Whan V, Gietzen K, Paiva S, Barendse W, Ciani E, Raadsma H, McEwan J, Dalrymple B and The International Sheep Genomics Consortium (2012) Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. PLoS Biol 10:e1001258.

Kijas JW, Serrano M, McCulloch R, Li Y, Salces-Ortiz J, Calvo JH, Pérez-Guzmán MD and The International Sheep Genomics Consortium (2013) Genome-wide association for a dominant pigmentation gene in sheep. J Anim Breed Genet 130:468-475.

Kingsley EP, Manceau M, Wiley CD and Hoekstra HE (2009) Melanism in *Peromyscus* Is Caused by Independent Mutations in *Agouti*. PLoS ONE 4:e6435.

Kishida S, Yamamoto H, Hino SI, Ikeda S, Kishida M and Kikuchi A (1999) DIX Domains of Dvl and Axin Are Necessary for Protein Interactions and Their Ability To Regulate b-Catenin Stability. Mol Cell Biol 19:4414-4422.



- Klungland H and Våge DI (2003) Pigmentary Switches in Domestic Animal Species. *Ann N Y Acad Sci* 994:331-338.
- Klungland H, Olsen HG, Hassanane MS, Mahrous K and Våge DI (2000) Coat colour genes in diversity studies. *J Anim Breed Genet* 117:217–224.
- Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S and Lien S (1995) The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6:636-639.
- Klungland, H, Våge, D.I. (2000) Molecular genetics of pigmentation in domestic animals. *Curr Genomics* 1:223-242.
- Kobayashi T, Imokawa G, Bennett DC and Hearing VJ (1998) Tyrosinase Stabilization by Tyrp1 (the brown Locus Protein). *J Biol Chem* 273:31801-31805.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón JC and Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* 13:5818-5825.
- Kondo T and Hearing VJ (2011) Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol* 6:97-108.
- Koppula SV, Robbins LS, Lu D, Baack E, White Jr CR, Swanson NA and Cone RD (1997) Identification of Common Polymorphisms in the Coding Sequence of the Human MSH Receptor (MC1R) With Possible Biological Effects. *Hum Mutat* 9:30-36.
- Kriegesmann B, Dierkes B, Leeb T, Jansen S and Brenig B (2001) Two Breed-Specific Bovine MC1-R Alleles in Brown Swiss and Saler Breeds. *J Dairy Sci* 84:1768-1771.
- Kumar A and Purohit R (2012) Computational screening and molecular dynamics simulation of disease associated nsSNPs in CENP-E. *Mutat Res* 738–739:28–37.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R and Purohit R (2012) *In silico* prediction of a disease-associated STIL mutant and its affect on the recruitment of centromere protein J (*CENPJ*). *FEBS Open Bio* 2:285–293.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R and Purohit R (2013) Roadmap to determine the point mutations involved in cardiomyopathy disorder: A Bayesian approach. *Gene* 519:34-40.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Shukla P, Tiwari S and Purohit R (2014) Computational SNP Analysis: Current Approaches and Future Prospects. *Cell Biochem Biophys* 68:233-239.
- Kwon JM and Goate AM (2000) The Candidate Gene Approach. *Alcohol Res Health* 24:164-168.

- Larizza L and Beghini A (2000) KIT (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 4:96-98.
- Levy C, Khaled M and Fisher DE (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12:406-414.
- Li J, Yang H, Li J-R, Li H-P, Ning T, Pan X-R, Shi P and Zhang Y-P (2010) Artificial selection of the melanocortin receptor 1 gene in Chinese domestic pigs during domestication. *Heredity* 105:274-281.
- Lin JY and Fisher DE (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445:843-850.
- Linderholm A and Larson G (2013) The role of humans in facilitating and sustaining coat colour variation in domestic animals. *Semin Cell Dev Biol* 24:587-593.
- Little C (1917). Evidence of multiple factors in mice and rats. *Am Natur* 51: 457–480.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO and Cone RD (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802.
- Lyons LA, Foe IT, Rah HC and Grahn RA (2005) Chocolate coated cats: TYRP1 mutations for brown color in domestic cats. *Mamm Genome* 16:356-366.
- MacDonald BT, Tamai K and He X (2009) Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* 17:9-26.
- Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB and Hoekstra HE (2010) Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:2439–2450.
- Mariante AS, Albuquerque MSM, Egito AA, McManus C, Lopes MA and Paiva SR (2009) Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. *Livest Sci* 120:204-212.
- Marklund L, Moller MJ, Sandberg K and Andersson L (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses *Mamm Genome* 7:895-899.
- Marklund S, Kijas J, Rodriguezmartinez H, Ronnstrand L, Funa K, Moller M, Lange D, Edforslilja I and Andersson L (1998) Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Res* 8:826-833.
- Marklund S, Moller M, Sandberg K, Andersson L (1999) Close association between sequence polymorphism in the KIT gene and the roan coat color in horses. *Mamm Genome* 10:283-288.

- McEvoy B, Beleza S and Shriver MD (2006) The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. *Hum Mol Genet* 15:R176-R181.
- McManus C, Hermuche P, Paiva SR, Moraes JCF, Melo CR and Mendes C (2013) Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. *Braz J Sci Tech* 1:3.
- Meszáros G, Petautschnig E, Schwarzenbacher H and Sölkner J (2015) Genomic regions influencing coat color saturation and facial markings in Fleckvieh cattle. *Animal Genetics* 46:65-68.
- Metallinos D and Rine J (2000) Exclusion of EDNRB and KIT as the basis for white spotting in Border Collies. *Genome Biol* 1: research0004.1–research0004.4.
- Michaud EJ, Bultman SJ, Klebig ML, Van Vugt MJ, Stubbs LJ, Russell LB and Woychik RP (1994) A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow ( $A^y$ ) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2562-2566.
- Michaud EJ, Bultman SJ, Stubbs LJ and Woychik RP (1993) The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice ( $A^y/A^y$ ) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. *Genes Dev* 7:1203-1213.
- Miller MW, Duhl DM, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM and Barsh GS (1993) Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev* 7:454–467.
- Mills MG and Patterson LB (2009) Not just black and white: Pigment pattern development and evolution in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 20:72-81.
- Mohanty TR, Seo KS, Park KM, Choi TJ, Choe HS, Baik DH and Hwang IH (2008) Molecular variation in pigmentation genes contributing to coat colour in native Korean Hanwoo cattle. *Anim Genet* 39:550-553.
- Montoliu L, Oetting WS, Bennett DC. Color Genes. (2014). European Society for Pigment Cell Res. World Wide Web (URL: <http://www.espcr.org/micemut>).
- Mooney S (2005) Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. *Brief Bioinform* 6:44-56.
- Moraes JCF, Souza CJH (2011) Descrição da Cor da Pelagem em um Rebanho de Ovelhas Crioulas. *Documentos/Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Brazil* 114:1-30.
- Moreira GRP (2002) Participações históricas da ovelha crioula em exposições. *Boletim Informativo ABCOC* 2:9-12.
- Moreira GRP and Silva MC (2004) La retomada de la crianza de ovejas criollas en el Brasil. *La Propaganda Rural*, 1557:92-95.

- Moreira LGA, Pereira LC, Drummond PR and Mesquita JF (2013) Structural and Functional Analysis of Human SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE 8:e81979.
- Mundy NI and Kelly J (2003). Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. Am J Phys Anthropol 121:67–80
- Mundy NI and Kelly J (2006) Investigation of the role of the agouti signaling protein gene (*ASIP*) in coat color evolution in primates. Mamm Genome 17:1205-1213.
- Mundy NI, Badcock NS, Hart T, Scribner K, Janssen K, Nadeau NJ (2004) Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. Science 303:1870-1873.
- Myung PS, Takeo M, Ito M and Atit RP (2013) Epithelial Wnt Ligand Secretion Is Required for Adult Hair Follicle Growth and Regeneration. J Invest Dermatol 133:31–41.
- Nachman MW (2005) The genetic basis of adaptation: lessons from concealing coloration in pocket mice. Genetica 123:125-136.
- Nachman MW, Hoekstra HE and D'Agostino SL (2013) The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. Proc Natl Acad Sci U S A 100:5268-5273.
- Nadeau NJ, Minvielle F, Ito S, Inoue-Murayama M, Gourichon D, Follett SA, Burke T and Mundy NI (2008) Characterization of Japanese Quail *yellow* as a Genomic Deletion Upstream of the Avian Homolog of the Mammalian *ASIP* (*agouti*) Gene. Genetics 178:777-786.
- Nakayama K, Shotake T, Takeneka O and Ishida T (2010) Variations in the Coding Region of the Agouti Signaling Protein Gene Do Not Explain Agouti/Non-agouti Phenotypes in Macaques. J Mammal Evol 17:211-214.
- Nakayama K, Shotake T, Takeneka O and Ishida T. (2008) Variation of the melanocortin 1 receptor gene in the macaques. Am J Primatol 70:778-785.
- Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG and Jackson IJ, Barsh GS (2000) Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. Mamm Genome 11:24-30.
- Ng PC and Henikoff S (2006) Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. Annu Rev Genomics Hum Genet 7:61-80.
- Norris BJ and Whan VA (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep. Genome Res 18:1282-1293.
- Nosanchuk JD and Casadevall A (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol 5:203-223.

Nosanchuk JD and Casadevall A (2006) Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3519-3528.

Olatubosun A, Väliäho J, Härkönen J, Thusberg J, Vihinen M (2012) PON-P: Integrated Predictor for Pathogenicity of Missense Variants. *Hum Mutat* 33:1166-1174

Park HY, Kosmadaki M, Yaar M and Gilchrist BA (2009) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci* 66:1493-1506.

Parsons YM, Fleet MR and Cooper DW (1999) Isolation of the ovine agouti coding sequence. *Pigment Cell Res* 12:394-397.

Parsons YM, Fleet MR and Cooper DW (1999) The Agouti gene: a positional candidate for recessive self-colour pigmentation in Australian Merino sheep. *Aust J Agric Res* 50:1099-1103.

Patnala R, Clements J and Batra J (2013) Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful *in silico* tools. *BMC Genet* 14:39.

Pérez-Oliva AB, Fernández LP, Detorre C, Herráiz C, Martínez-Escribano JA, Benítez J, Teruel JAL, Garcá-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C and Ribas G (2009) Identification and Functional Analysis of Novel Variants of the Human Melanocortin 1 Receptor Found in Melanoma Patients. *Hum Mutat* 30:811-822.

Pielberg G, Olsson C, Syvänen A-C and Andersson L (2002) Unexpectedly High Allelic Diversity at the KIT Locus Causing Dominant White Color in the Domestic Pig. *Genetics* 160:305-311.

Pingault V, Ente D, Moal FDL, Goossens M, Marlin S and Bondurand N (2010) Review and Update of Mutations Causing Waardenburg Syndrome. *Hum Mutat* 31:391-406.

Prado-Martinez J, Hernando-Herraez I, Lorente-Galdos B, Dabad M, Ramirez O, Baeza-Delgado C, Morcillo-Suarez C, Alkan C, Hormozdiari F, Raineri E, Estellé J, Fernandez-Callejo M, Valles M, Ritscher L, Schöneberg T, de la Calle-Mustienes E, Casillas S, Rubio-Acero R, Melé M, Engelken J, Caceres M, Gomez-Skarmeta JL, Gut M, Bertranpetit J, Gut IG, Abello T, Eichler EE, Mingarro I, Lalueza-Fox C, Navarro A, Marques-Bonet T (2013) The genome sequencing of an albino Western lowland gorilla reveals inbreeding in the wild. *BMC Genomics* 14:363.

Protas ME and Patel NH (2008) Evolution of Coloration Patterns. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:425-446.

Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R and Tabin CJ (2006) Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat Genet* 38:107-11.

Raadsma HW, Jonas E, Fleet MR, Fullard K, Gongora J, Cavanagh CR, Tammen I, Thomson PC (2013) QTL and association analysis for skin and fibre pigmentation in sheep provides evidence of a major causative mutation and epistatic effects. *Anim Genet* 44:547-559.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P and Fargnoli MC (2008) MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122: 2753–2760.

Rajasekaran R, Sudandiradoss C, Doss CGP, Sethumadhavan R (2007) Identification and in silico analysis of functional SNPs of the BRCA1 gene. *Genomics* 90:447-452.

Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BH, Sambuughin N, Lin M, Watkins S, Bamshad M, Jorde LB, Ramsay M, Jenkins T, Li WH (1999) High Polymorphism at the Human Melanocortin 1 Receptor Locus. *Genetics* 151:1547-1557,

Rees JL (2003) Genetics of Hair and Skin Color. *Annu Rev Genet* 37:67-90.

Rees JL (2004) The Genetics of Sun Sensitivity in Humans. *Am J Hum Genet* 75:739-751.

Reid K, Turnley AM, Maxwell GD, Kurihara Y, Kurihara H, Bartlett PF and Murphy M (1996) Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* 122:3911-3919.

Ren J, Mao H, Zhang Z, Xiao S, Ding N and Huang L (2011) A 6-bp deletion in the *TYRP1* gene causes the brown colouration phenotype in Chinese indigenous pigs. *Heredity* 106:862-868.

Reva B, Antipin Y, Sander C (2011) Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res* 39:e118.

Rieder S, Taourit S, Mariat D, Langlois B and Guerin G (2001) Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) *Mamm Genome* 12:450-455.

Rieder, S (2009) Molecular tests for coat colours in horses. *J Anim Breed Genet* 126:415-24.

Ringholm A, Klovins J, Rudzish R, Phillips S, Rees JL and Schiöth HB (2004) Pharmacological Characterization of Loss of Function Mutations of the Human Melanocortin 1 Receptor That Are Associated with Red Hair. *J Investig Dermatol* 123:917-923.

Ritland K, Newton C, Marshall HD (2001) Inheritance and population structure of the white-phased "Kermode" black bear. *Curr Biol* 11:1468-72.

Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehffuss L, Baack E, Mountjoy KG and Cone RD (1993) Pigmentation Phenotypes of Variant Extension Locus Alleles Result from Point Mutations that alters MSH Receptor Function. *Cell* 72:827-34.

Römpler H, Rohland N, Lalueza-Fox C, Willerslev E, Kuznetsova T, Rabeder G, Bertranpetit J, Schoneberg T and Hofreiter M (2006) Nuclear gene indicates coat-color polymorphism in mammoths. *Science* 313:62.

Rönstrand L (2004) Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 61:2535-2548.

Roskoski Jr R (2005) Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1307-1315.

Rouzaud F, Martin J, Gallet PF, Delourme D, Goulemot-Leger V, Amigues Y, Menissier F, Leveziel H, Julien R and Oulmouden A (2000) A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (*Mc1r*). *Genet Sel Evol* 32:511-520.

Royo LJ, Alvarez I, Arranz JJ, Fernandez I, Rodríguez A, Pérez-Pardal L and Goyache F (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. *Anim Genet* 39:290-293.

Royo LJ, Álvarez I, Fernández I, Arranz JJ, Gómez E and Goyache F (2005) The coding sequence of the ASIP gene is identical in nine wild-type coloured cattle breeds. *J Anim Breed Genet* 122:357-360.

Rubin CJ, Megens HJ, Martinez Barrio A, Maqbool K, Sayyab S, Schwochow D, Wang C, Carlborg Ö, Jern P, Jørgensen CB, Archibald AL, Fredholm M, Groenen MA, Andersson L (2012) Strong signatures of selection in the domestic pig genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19529-19536.

Saito H, Yasumoto K, Takeda K, Takahashi K, Yamamoto H, Shibahara S (2003) Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. *Pigment Cell Res* 16:261-265.

Sasazaki S, Mutoh H, Tsurifune K and Mannen H (2007) Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. *Meat Sci* 77:161-166.

Sato-Jin K, Nishimura EK, Akasaka E, Huber W, Nakano H, Miller A, Du J, Wu M, Hanada K, Sawamura D, Fisher DE, Imokawa G (2008) Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J* 22:1155-1168.

Scherer D, Nagore E, Bermejo JL, Figl A, Botella-Estrada R, Thirumaran RK, Angelini S, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R (2009) Melanocortin receptor 1 variants and melanoma risk: a study of 2 European populations. *Int J Cancer* 125:1868-1875.

Schioth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE and Rees JL (1999) Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun* 260:488–491.

Schmidt-Küntzel A, Eizirik E, O'Brien SJ and Menotti-Raymond M (2005) *Tyrosinase* and *Tyrosinase Related Protein 1* Alleles Specify Domestic Cat Coat Color Phenotypes of the *albino* and *brown* Loci. *J Hered* 96:289-301.

Schmutz SM and Dreger DL (2013) Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle. *Anim Genet* 44:9-13;

Schmutz SM, Berryere TG and Goldfinch AD (2002) *TYRP1* and *MC1R* genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mamm Genome* 13:380-387.

Schmutz SM, Berryere TG, Ciobanu DC, Mileham AJ, Schmitz BH, Fredholm M (2004) A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm Genome* 15:62-67.

Scott MC, Wakamatsu K, Ito S, Kadakara AL, Kobayashi N, Groden J, Kavanagh R, Takakuwa T, Virador V, Hearing VJ, Abdel-Malek ZA (2002) Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci* 115:2349-2355.

Silva MC, Lopes FB, Vaz CMS, Paulini F, Montesinos IS, Fioravanti MCS, McManus C and Sereno JRB (2013) Morphometric traits in Crioula Lanada ewes in Southern Brazil. *Small Rumin Res* 110:15-19.

Skoglund P and Höglund J (2010) Sequence Polymorphism in Candidate Genes for Differences in Winter Plumage between Scottish and Scandinavian Willow Grouse (*Lagopus lagopus*). *PLoS ONE* 5:e10334.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S and Wortsman J (2004) Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev* 84:1155-1228.

Smit MA, Shay TL, Beaver JE, Notter DR and Cockett NE (2002) Identification of an agouti-like locus. *Anim Genet* 33:383-385.

Smyth IM, Wilming L, Lee AW, Taylor MS, Gautier P, Barlow K, Wallis J, Martin S, Glithero R, Phillimore B, Pelan S, Andrew R, Holt K, Taylor R, McLaren S, Burton J, Bailey J, Sims S, Squares J, Plumb B, Joy A, Gibson R, Gilbert J, Hart E, Laird G, Loveland J, Mudge J, Steward C, Swarbreck D, Harrow J, North P, Leaves N, Greystrom J, Coppola M, Manjunath S, Campbell M, Smith M, Strachan G, Tofts C, Boal E, Copley V, Hunter G, Kimberley C, Thomas D, Cave-Berry L, Weston P, Botcherby MR, White S, Edgar R, Cross SH, Irvani M, Hummerich H, Simpson EH,



Johnson D, Hunsicker PR, Little PF, Hubbard T, Campbell RD, Rogers J, Jackson IJ (2006) Genomic anatomy of the Tyrp1 (brown) deletion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3704-3709,

Sponenberg DP (1997). Genetics of colour and hair texture. In: *The genetics of sheep* Piper LR and Ruvinsky A, New York. pp. 51–86.

Spritz RA, Holmes SA, Ramesar R, Greenberg J, Curtis D and Beighton P (1992) Mutations of the KIT (Mast/Stem Cell Growth Factor Receptor) Proto-Oncogene Account for a Continuous Range of Phenotypes in Human Piebaldism. *Am J Hum Genet* 51:1058-62.

Stanisz H, Stark A, Kilch T, Schwarz EC, Müller CS, Peinelt C, Hoth M, Niemeyer BA, Vogt T, Bogeski I (2012) ORAI1  $Ca^{2+}$  Channels Control Endothelin-1-Induced Mitogenesis and Melanogenesis in Primary Human Melanocytes. *J Invest Dermatol* 132:1443-1451.

Steiner CC, Weber JN and Hoekstra HE (2007) Adaptive Variation in Beach Mice Produced by Two Interacting Pigmentation Genes. *PLoS Biol* 5:e219.

Steingrímsson E, Copeland NG and Jenkis NA (2004) Melanocytes and the *Microphthalmia* Transcription Factor Network. *Annu Rev Genet* 38:365-411.

Sturm RA, Duffy DL, Box NF, Newton RA, Shepherd AG, Chen W, Marks LH, Leonard JH and Martin NG (2003) Genetic Association and Cellular Function of MC1R Variant Alleles in Human Pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* 994:348-358.

Sulaimon SS and Kitchell BE (2003) The biology of melanocytes. *Vet Dermatol* 14:57-65.

Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, Manolescu A, Karason A, Palsson A, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Steinberg S, Pálsson S, Jonasson F, Sigurgeirsson B, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Benediksdottir KR, Aben KK, Kiemenev LA, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2007) Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 39:1443-1452.

Switonski M, Mankoska M and Salamon S (2013) Family of melanocortin receptor (*MCR*) genes in mammals—mutations, polymorphisms and phenotypic effects. *J Appl Genet* 54:461-472.

Tabor HK, Risch NJ and Myers RM (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3:391-397.

Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, Takahashi S (1996) A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 14:164-168.

Takeuchi S, Zhang W, Wakamatsu K, Ito S, Hearing VJ, Kraemer KH, Brash DE (2004) Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15076-15081.

Thusberg J and Vihenen M (2009) Pathogenic or Not? And If So, Then How? Studying the Effects of Missense Mutations Using Bioinformatics Methods. *Hum Mutat* 30:703-714.

Toth Z, Kaps M, Sölkner J, Bodo I and Curik I (2006) Quantitative genetic aspects of coat color in horses. *J Anim Sci* 84: 2623-2628.

Tranchevent LC, Capdevila FB, Nitsch D, De Moor B, De Causmaecker P, Moreau Y (2011) A guide to web tools to prioritize candidate genes. *Brief Bioinform* 12:22-32.

Traoré A, Royo LJ, Kaboré A, Pérez-Pardal L, Álvarez I, Fernández I, Sawadogo L, Tamboura HH and Goyache F (2012) Allelic and genotypic frequencies of *ASIP* and *MC1R* genes in four West African sheep populations. *Afr J Biotechnol* 11:14287-14291.

Vachtenheim J and Borovanský J (2010) “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol* 19:617-627.

Våge DG, Lu D, Klungland H, Lien S, Adalsteinsson S and Cone R (1997) A non-epistatic interaction of *agouti* and *extension* in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat Genet* 15:311-315.

Våge DI, Fleet MR, Ponz R, Olsen RT, Monteagudo LV, Tejedor MT, Arruga MV, Gagliardi R, Postiglioni A, Natrass GS and Klungland H (2003) Mapping and characterization of the dominant black colour locus in sheep. *Pigment Cell Res* 16:693–697.

Våge DI, Klungland H, Lu D and Cone RD (1999) Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* 10:39–43.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL and Thody AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11:328–330.

Vanajothi R, Rajamanikandan S, Sudha A and Srinivasan P (2012) Structural and functional analysis of KIT gene encoding receptor tyrosinase and its interaction with sunitinib and HDAC inhibitors: an in silico approach. *Pak J Biol Sci* 15:121-131.

Vaz CMSL (2000). *Morfologia e Aptidão da Ovelha Crioula Lanada*. 20 p. EMBRAPA Pecuária Sul, Bagé.

Vaz CMSL, Moreira GRP, Caon JEMA (2003) O registro de uma raça: da ovelha crioula à homologação da Raça Ovina Crioula. *Boletim Informativo ABCOC* 4:5-8.

- Vaz CMSL, Oliveira NM, Martins WM and Vaz C (1997) Caracterização de uma população de ovelha crioula lanada quanto a pigmentação In: Anais do 25º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997, Gramado, RS. p. 268.
- Vendruscolo M, Zurdo J, MacPhee CE and Dobson CM (2003) Protein folding and misfolding: a paradigm of self-assembly and regulation in complex biological systems. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 361:1205–1222
- Voisey J and van Daal A (2002) Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 15:10-18.
- Vrieling H, Duhl DM, Millar SE, Miller KA, Barsh GS (1994) Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5667-5671.
- Wakamatsu K, Ohtara K and Ito S (2009) Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:474-486.
- Wan P, Hu Y and He L (2011) Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. *Mol Cell Biochem* 354:241–246.
- Widlund HR and Scherer DE (2003) *Microphthalmia*-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22:3035-3041.
- Winkler PA, Gornik KR, Ramsey DT, Dubielzig RR, Venta PJ, Petersen-Jones SM, Bartoe JT (2014) A partial gene deletion of SLC45A2 causes oculocutaneous albinism in Doberman pinscher dogs. *PLoS ONE* 9:e92127.
- Wlasiuk G and Nachman MW (2007) The Genetics of Adaptive Coat Color in Gophers: Coding Variation at *Mclr* Is Not Responsible for Dorsal Color Differences. *J Hered* 98:567-574.
- Wong AK, Ruhe AL, Robertson KR, Loew ER, Williams DC, Neff MW (2012) A *de novo* mutation in *KIT* causes white spotting in a subpopulation of German Shepherd dogs. *Anim Genet* 44:305-310.
- Wong TH and Rees JL (2005) The relation between melanocortin 1 receptor (*MC1R*) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation. *Peptides* 26:1965-1971.
- Wu D and Pan W (2010) GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35:161-168.
- Yang GL, Fu DL, Lang X, Wang YT, Cheng SR, Fang SL, Luo YZ (2013) Mutations in *MC1R* gene determine black coat color phenotype in Chinese sheep. *ScientificWorldJournal* 2013:675382.

- Yang Y, Zhao R, He X, Li L, Wang K, Zhao L, Tu M, Tang J, Xie Z and Zhu Y (2013) A Novel Splicing Mutation of KIT Results in Piebaldism and Auburn Hair Color in a Chinese Family. *BioMed Res Int* 2013, 689756.
- Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT (1996) A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6:1302-1306.
- Yasumoto K, Takeda K, Saito H, Watanabe K, Takahashi K, Shibahara S (2002) Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J* 21:2703-2714.
- Yue P and Moulton J (2006) Identification and Analysis of Deleterious Human SNPs. *J Mol Biol* 356:1263-1274.
- Yue P, Melamud E and Moulton J (2006) SNPs3D: Candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC Bioinformatics* 7:166.
- Zdarsky E, Favor J and Jackson IJ (1990) The Molecular Basis of *brown*, an Old Mouse Mutation, and of an Induced Revertant to Wild Type. *Genetics* 126:443-449.
- Zhang M-Q, Xu X and Luo S-J (2014) The genetics of brown coat color and white spotting in domestic yaks (*Bos grunniens*). *Anim Genet* 45:652-659.
- Zhang P, Liu W, Yuan X, Li D, Gu W and Gao T (2013) Endothelin-1 enhances the melanogenesis via MITF-GPNMB pathway. *BMB Rep* 46:364-369.
- Zhu M and Zhao S (2007) Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. *Int J Biol Sci* 3:420-427.