

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**O mecanismo de decaimento do mRNA mediado por
mutações *nonsense* e a iniciação da tradução**

Miguel da Silva Matos Barbeiro

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**O mecanismo de decaimento do mRNA mediado por
mutações *nonsense* e a iniciação da tradução**

Miguel da Silva Matos Barbeiro

Tese orientada por:

Doutora Luísa Romão Loison (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge)

Professora Doutora Ana Crespo (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

Agradecimentos:

Não poderia deixar de expressar a minha profunda e sincera gratidão a todos aqueles que partilharam, de alguma forma, o período durante o qual frequentei este mestrado e, em particular, este estágio que culmina com o presente documento.

Em primeiro lugar, ao Doutor João Lavinha, responsável da Unidade de I&D do Departamento de Genética, que aceitou simpaticamente a minha inclusão no seu extenso grupo de investigação. À Doutora Luísa Romão Loison por me ter aceite no seu laboratório e principalmente por me saber encaminhar e mostrar o tipo de comportamento e mentalidade que devemos adotar num laboratório de investigação.

À Doutora Ana Crespo por ter aceitado ser a minha orientadora interna desta tese e pelo enriquecimento ao nível científico que me transmitiu, quer ao longo das aulas, quer em diversas conversas. Foi uma personalidade inspiradora e a razão da minha escolha para orientadora interna.

Ao caríssimo Doutor Alexandre Teixeira cujo acompanhamento sistemático me surpreendeu: Para além de sabiamente me orientar ao longo de todo o percurso experimental e de me estimular à reflexão científica foi, sem dúvida um excelente educador ensinando-me a ter mais discernimento, a pensar criticamente sobre diversos assuntos e, no fundo, por me expor àquilo que se espera que um cientista faça ao longo da vida. Foi um verdadeiro colega e agradeço-lhe toda a paciência que demonstrou comigo mesmo nos momentos em que não a merecia. Agradeço a todas as colegas de laboratório com quem partilhei as bancadas, agradáveis momentos, conversas e instrução: à Ana Ramos por todo o seu apoio, sinceridade e boa disposição; à Rafaela Lacerda pela simpatia, simplicidade e alegria. À Cristina Barbosa e Cláudia Onofre por serem um exemplo de profissionalismo.

A todo o pessoal do laboratório de oncobiologia pela sua extrema simpatia, apoio e animação.

Queria também agradecer à minha família por todo o seu apoio incondicional e sem os quais, por diversas razões, não estaria onde estou. A todos os meus amigos com quem partilho a minha vivência e um agradecimento muito especial à Diana Amaral, minha noiva, que torna tudo muito mais fácil.

Resumo:

A expressão génica nos eucariotas é um mecanismo celular que envolve múltiplas etapas interligadas, desde a transcrição à tradução proteica, nos quais o RNA mensageiro (mRNA) é um intermediário fulcral. O material genético armazenado nos cromossomas em forma de genes é constituído por DNA e é passado para uma molécula intermédia, o mRNA, através do processo de transcrição. Sendo esta molécula de mRNA o molde para a produção de proteínas através do mecanismo de tradução. Após a sua transcrição e ainda no núcleo, a maioria dos mRNAs eucarióticos sofre uma maturação onde lhe é introduzido um complexo proteico na extremidade 5' (estrutura cap) e uma cauda poli(A) na extremidade 3'. Após o seu transporte para o citoplasma inicia-se o mecanismo de tradução proteica. O processo da iniciação da tradução requer vários factores proteicos (eIF), entre eles, o eIF4F liga-se à estrutura cap através da subunidade eIF4E. Outros constituintes deste complexo são o factor eIF4A, uma ATPase e helicase dependente de RNA, e o factor eIF4G que se associa à subunidade ribossomal 40S através da interacção com a proteína eIF3. A proteína de ligação à cauda poli(A) (PABPC1) também interage com o factor eIF4G, o que resulta na circularização do mRNA. Actualmente, sabe-se que a complexidade do mecanismo bioquímico envolvido na tradução em eucariotas se reflecte em processos a montante, como por exemplo, no mecanismo de decaimento de mRNAs mediado por mutações *nonsense* (NMD). O mecanismo de NMD elimina rápida e selectivamente mRNAs portadores de codões *nonsense* [codões de terminação da tradução prematuros (PTCs)]. Estes codões não codificam aminoácidos e a sua presença em transcritos impede a tradução de proteínas completas. Se sintetizadas, as proteínas truncadas resultantes serão, provavelmente, não funcionais ou poderão mesmo ter um efeito deletério no metabolismo celular. O facto de aproximadamente um terço das doenças genéticas e muitas formas de cancro serem devidas a mutações *nonsense*, justifica o interesse no estudo do mecanismo de NMD e de como este processo multifacetado reflecte a complexidade da maquinaria de tradução do mRNA, assim modulando o fenótipo da doença genética humana. A identificação e caracterização dos mecanismos envolvidos no NMD e na regulação da tradução, em associação com determinada doença genética, ou em processos de tumorigénese, permitem o esclarecimento da etiopatofisiologia dessas doenças genéticas e do cancro que por sua vez, possibilitam o estabelecimento de novos biomarcadores com potencial

aplicabilidade no rastreio, diagnóstico, prognóstico e/ou terapia deste tipo de doenças que, em muitos casos, são, nos países desenvolvidos, um problema de Saúde Pública.

Uma questão fundamental para se conhecer o mecanismo de NMD, relaciona-se com a discriminação entre um PTC e um codão de terminação natural da tradução. Anteriormente, foi demonstrado que mRNAs portadores de codões de terminação próximos do AUG, i.e., portadores de uma pequena grelha de leitura (por exemplo, 15 codões), apresentam resistência ao NMD (Peixeiro, 2011). Mais recentemente, verificou-se que pelo facto do mRNA poder circularizar durante o processo de tradução, a proteína PABPC1 pode localizar-se na proximidade de um ribossoma em terminação da tradução, competindo pela ligação entre este e a maquinaria de NMD, tendo como consequência a inibição do mecanismo de NMD (Silva e Romão, 2009). O objectivo deste projecto é investigar as interacções proteicas envolvidas no mecanismo de tradução, utilizando complexos de pré-iniciação, iniciação e terminação da tradução formados *in vivo* (linha celular HeLa) em mRNAs modelo da beta-globina humana normal ou com uma mutação *nonsense* no codão 39 e de que modo estas interacções estão também envolvidas no mecanismo de NMD.

Palavras chave: mRNA; mecanismo de decaimento do mRNA por mutações *nonsense*; tradução; eIF3.

Abstract

Gene expression in eukaryotic cell is a mechanism that involves many interrelated steps from transcription to protein translation, in which the messenger RNA (mRNA) is the key intermediate. The genetic material stored in the form of chromosomes consists of DNA organized as genes and is passed to an intermediate molecule, mRNA, through the process of transcription, being the mRNA molecule the template for production of proteins via translation mechanism. After transcription, the majority of eukaryotic mRNAs are subjected to a maturation where is removed the introns and is introduced a protein complex at the 5' (cap structure) and a poly (A) tail at the 3' end. After transport to the cytoplasm the mechanism of protein translation starts. The process of initiation of translation requires several protein factors (eIF), including the eIF4F that binds to the cap structure via the eIF4E subunit. Other constituents of this complex are factor eIF4A, an ATPase and helicase dependent RNA, and eIF4G factor that is associated with the 40S ribosomal subunit through interaction with the protein eIF3. The binding protein poly (A) tail (PABPC1) also interacts with factor eIF4G, which results in circularization of the mRNA. Currently, it is known that the complexity of biochemical mechanism involved in translation in eukaryotes is reflected in processes, such as the mechanism of mRNA decay mediated by nonsense mutations (NMD).

The mechanism of NMD rapidly and selectively eliminates mRNAs carrying nonsense codons [premature translation termination codons (PTCs)]. These codons do not have any correspondent amino acid and mRNAs carrying PTCs are subjected to degradation. However, if these truncated proteins are synthesized, are likely to be non-functional or may even have a deleterious effect on cell metabolism. The fact that approximately one third of genetic diseases and many forms of cancer are caused by nonsense mutations, justifies the interest in the study of the mechanism of NMD and how this multifaceted process reflects the complexity of the machinery of translation of the mRNA, thereby modulating the phenotype of human genetic disease. The identification and characterization of the mechanisms involved in the regulation of NMD and translation in association with particular genetic disease or tumorigenesis process, allows the establishment of new biomarkers with potential applicability in screening, diagnosis, prognosis and / or therapy of these diseases, which in many cases are in developed countries, a public health problem.

A key issue to know the mechanism of NMD, relates to the discrimination between one PTC and a natural termination codon of translation. Previously, it was shown that patients with mRNAs stop codons near the AUG, ie, patients with a small reading frame (for example, the beta-globin mRNAs carrying a PTC on codon 15) have resistance to NMD (Peixeiro, 2011). More recently, it has been found that due to the mRNA circularization during the translation process, the protein PABPC1 may be located near the translation terminating ribosome and competing for the connection between this and the NMD machinery, resulting in the NMD inhibition mechanism (Silva e Romão, 2009). The aim of this project is to investigate protein interactions involved in translation mechanism using pre-initiation, translation initiation and termination complex formed in vivo (HeLa cell line) using mRNAs of the wild-type human beta-globin or carrying a nonsense mutation in codon 39, and how these interactions are also involved in the mechanism of NMD.

Keywords: mRNA; nonsense-mediated mRNA decay; translation; eIF3.

Abreviaturas

A	Adenina
ARE	Sequências ricas em nucleótidos AU (<i>AU-rich Elements</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Citosina
CBC	Complexo de ligação ao <i>Cap</i> (<i>Cap-Binding Complex</i>)
CBP	Proteína de ligação ao <i>Cap</i> (<i>Cap Binding Protein</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>complementary DNA</i>)
cF	Concentração Final
CO₂	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxi-terminal
CTP	Codão de Terminação da tradução Prematuro
ddNTP	Didesoxirribonucleótido
DH5α	Estirpe de bactérias <i>Escherichia coli</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleótido
DTT	Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
eIF	Factor eucariota de iniciação da tradução (<i>eukaryotic translation Initiation Factor</i>)
EJC	<i>Exon Junction Complex</i>
eRF	Factor eucariota de terminação da tradução (<i>eukaryotic translation Release Factor</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
G	Guanina
GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine triphosphate</i>)
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Linha celular humana derivada do carcinoma cervical
LB	Luria-Bertani Broth
local A	Local aminoacilo (<i>aminoacyl site</i>)
MPN	Mpr1-Pad1-N-terminal
Mg²⁺	Íon Magnésio ²⁺
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NMD	Decaimento do mRNA <i>nonsense</i> (<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>)
NP40	<i>Nonylphenylpolyethylene glycol</i>
NSD	Decaimento do mRNA <i>nonstop</i> (<i>Nonstop mRNA Decay</i>)
N-terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (<i>grelha de leitura</i>)
PABP	Proteína de ligação à cauda poliadenilada (<i>Poly(A)-Binding Protein</i>)

PABPC1	PABP 1 citoplasmática
P-bodies	Corpos de processamento (<i>Processing bodies</i>)
PCI	Proteossome-COP9-initiation factor
PBS	Solução salina de tampão fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PP2A	Proteína fosfatase 2A (<i>Protein Phosphatase 2A</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossómico
RT-PCR	Semi-quantitative <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
siRNA	<i>small interference RNAs</i>
SMG	<i>Suppressor with morphogenetic effect on genitalia</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
T	Timina
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline TritonX-100</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>)
tmRNA	<i>RNA mensageiro de transferência (transfer-messenger RNA)</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano (<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
tRNA	RNA de transferência
U	Uracilo
UPF	<i>Up- Frameshift</i>
UTR	Região transcrita mas não traduzida do mRNA (<i>Untranslated Region</i>)

Índice:

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	6
Abreviaturas	8
Introdução	11
Objectivo	24
Materiais e Métodos	25
Amplificação de Plasmídeos	25
Reacção de Sequenciação	26
Cultura de Células	27
Transfecção de Plasmídeos	27
Extracção de RNA e Proteínas	28
Síntese de cDNAs	28
-Transcriptase Reversa	28
-PCR (Reacção de Polimerização em Cadeia)	29
Digestão dos plasmídeos	29
Transfecção de siRNAs	29
Extracção de Proteínas e Imunoprecipitação	31
Western Blot	32
Resultados	34
Discussão	40
Bibliografia	42
Anexos	47

Introdução:

Expressão génica em eucariotas:

Designa-se por tradução o processo celular através do qual a sequência nucleotídica que constitui o mRNA é lida e traduzida em proteínas. Este mecanismo, de carácter fundamental para o funcionamento da célula, é sujeito a uma complexidade, sincronicidade e controlo de vários factores e componentes celulares (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Para além disso, exige uma série de estratégias de vigilância, de modo a garantir a eliminação de proteínas com defeitos, que possam pôr em causa o seu normal funcionamento (Chang et al, 2007).

A tradução é um dos passos da expressão génica. A expressão génica tem início com a transcrição do material genético, sob a forma de DNA, existente no núcleo, para outro tipo de ácido nucleico, o mRNA. Após maturação, ainda no núcleo, o mRNA é conduzido para o citoplasma onde é lido por ribossomas e finalmente, com o recurso a uma extensa maquinaria celular, é obtido o produto final, as proteínas (Fig.1 e 2), macromoléculas com função de estrutura e de suporte, mas também com uma importância fulcral para a comunicação e reacções celulares através de enzimas, receptores, hormonas, etc. Foi devido a toda esta relevância inegável que o processo ficou conhecido pelo dogma central da biologia molecular.

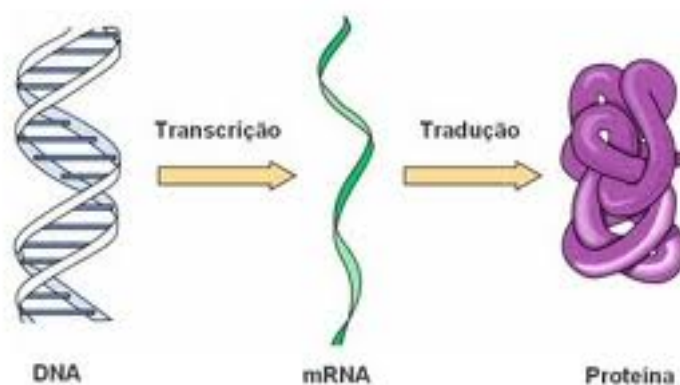


Fig.1: Esquema ilustrador do dogma central da biologia molecular. Adaptado de <http://biologia-geologia11a.blogspot.pt/2010/10/sintese-de-proteinas.html>

Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD):

Para que toda a dinâmica da tradução ocorra sem efeitos deletérios para a célula, um dos mecanismos de controlo desenvolvidos pela célula chama-se NMD (nonsense mediated decay) e permite a degradação de mRNAs que possuam codões de terminação prematuros (Behm-Ansmant & Izaurralde, 2006). Estes codões podem ter origem em diversos factores nomeadamente em mutações (Kuzmiak & Maquat, 2006).

A maturação do pré-mRNA é um processo que envolve uma série de reacções. Entre elas destaca-se a remoção de intrões, que correspondem a sequências de nucleótidos que não são codificáveis através do mecanismo de Splicing, a adição de um complexo proteico (cap) à extremidade 5' e de uma cauda de adeninas chamada cauda poli(A) à extremidade 3' (Fig.2). Estas modificações co- e pós-transcricionais tornam o mRNA maduro e fornecem-lhe maior estabilidade à degradação (Moore, 2005). Durante todo este processo o mRNA interage e é reconhecido por proteínas, constituindo um complexo formado por mRNA e proteínas (Isken & Maquat, 2007). Esta dinâmica é importante na medida em que permite mediar a sua localização celular e responder também a inúmeros sinais celulares (Silva & Romão, 2009). Um estreito controlo deste mecanismo é essencial para a sobrevivência celular e, como tal, as células desenvolveram estratégias que permitem degradar transcritos que contenham informação aberrante e prejudicial para as células.

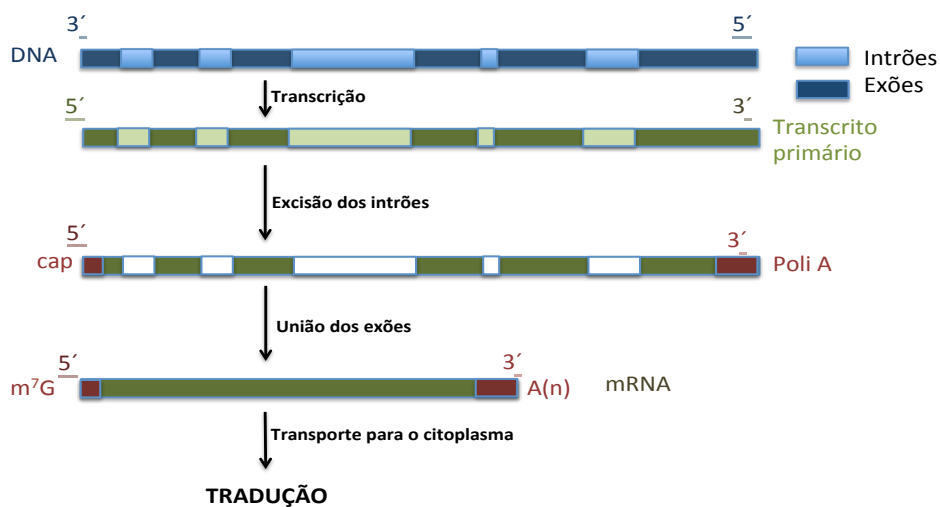


Fig.2: Figura ilustrando as várias fases do processamento do mRNA até este se tornar maduro.

O nonsense mediated decay (NMD) com esta particularidade de eliminar transcritos que possuam codões de terminação prematura (PTC), além de proteger a célula da acumulação de péptidos potencialmente tóxicos também funciona como modelador de doenças genéticas e regulador de transcritos fisiológicos que participam em vários processos celulares (Behm-Ansmant et al, 2007).

Origem e reconhecimento dos PTCs:

Os codões de terminação prematura (PTCs) podem ter origem ao nível do DNA através de alterações somáticas ou germinativas (deleções e inserções em frame-shift que podem dar origem a PTCs a jusante, mutações num intrão ou exão que podem resultar na remoção inadequada do intrão no mRNA originando um PTC) e ao nível do RNA devido a erros na transcrição ou no processamento do pré-mRNA (Nicholson et al, 2010). Durante o processo de maturação do pré-mRNA em mamíferos, mais concretamente na fase do splicing, na qual são removidos os intrões, é colocado a cerca de 20-24 nucleótidos a montante de cada junção exão-exão, um complexo de proteínas denominado complexo junção exão-exão (EJC) (Le Hir et al, 2001). Este complexo tem um papel importante em NMD, porque possui um conjunto de proteínas que vão competir com os factores de terminação normal da tradução. Deste modo, se um mRNA possuir um PTC a menos de cerca de 55 nt a montante da última junção exão-exão, o ribossoma -que ocupa uma área de cerca de 12 nucleótidos (nt) a montante e cerca de 15 nt a jusante no mRNA- durante a primeira ronda da tradução, ao encontrar o PTC já removeu o EJC, o que impossibilita a activação do NMD e posterior degradação do mRNA. Isto acontece, porque no EJC encontramos vários factores, entre eles a Upf2 e UPf3, que modelam o NMD, juntamente com a Upf1, proteína essencial para o mecanismo de NMD e é recrutada para o complexo após reconhecimento do PTC (Kashima et al, 2006).

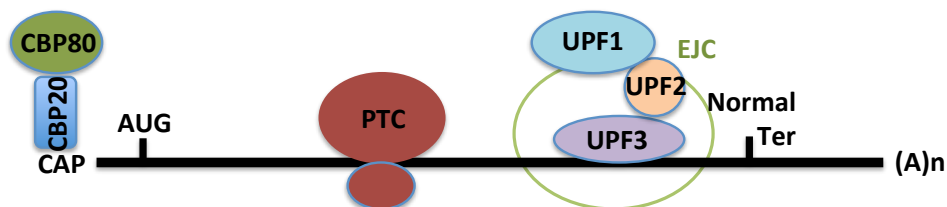


Fig.3: Principais factores de transcrição intervenientes no NMD e localização prematura do PTC e sua relação com a activação da degradação do mRNA.

Numa terminação normal da tradução, o codão de terminação vai desencadear a ligação dos factores de terminação eRF1 e eRF3 ao local A do ribossoma o que faz quebrar a ligação éster que liga o péptido formado ao tRNA no local P, libertando o péptido no citoplasma. Por outro lado se o ribossoma encontra um PTC a proteína UPF1 vai ligar-se aos factores de terminação desencadeando assim a activação do mecanismo de NMD.

Tradução proteica:

O processo da tradução é complexo e pode ser dividido em 4 fases principais: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem do ribossoma.

Iniciação (recrutamento do ribossoma):

A iniciação requer a cooperação de diversos factores de iniciação da tradução em eucariotas (eIFs) (Livingstone et al, 2010) e termina aquando da formação do sistema ribossomal 80S com as suas duas subunidades 40S e a 60S unidas e prontas a dar continuidade, isto é, continuando a leitura dos codões a partir do codão de iniciação começando assim a formar o péptido codificado no mRNA.

Em eucariotas, o codão de iniciação, tipicamente AUG, é detectado através de um mecanismo de varrimento da subunidade ribossomática 40S acoplada a diversos factores. Um deles denominado complexo ternário transfere o tRNA iniciador com a metionina. A metionina é o aminoácido iniciador por excelência e está associado ao respectivo tRNA, ao factor eIF2 e a GTP (Gebauer & Hentze, 2004). Este complexo vai-se ligar à unidade 40S do ribossoma juntamente com mais factores nomeadamente eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5, formando o complexo pré-iniciação 43S.

O eIF1 tem uma importância crucial na selecção do codão iniciador permitindo a discriminação por parte do ribossoma de emparelhamentos errados e evitando a hidrólise induzida pela eIF5 da eIF2-GTP, com a libertação do Pi. (Fig. 4) A eIF1A promove também a selecção do codão iniciador libertando a eIF1 na presença do AUG. A eIF3 desempenha entre outras funções, a de recrutar o complexo de pré-iniciação para o mRNA (Holcik & Pestova, 2007).

A ligação deste complexo ao mRNA necessita ainda da intervenção do factor eIF4F que promove a abertura da zona 5'UTR possibilitando a acoplagem do ribossoma (Jackson et al,

2010). Este factor é constituído pela eIF4E que se liga à m⁷G cap; pela helicase eIF4A e pela eIF4G que age como proteína de suporte consolidando os factores eIF4E, eIF4A, eIF3 e a PABPC1, que é a proteína citoplasmática de ligação à cauda poli(A), existente na zona 3'UTR do mRNA. A interacção simultânea de todos estes factores dá indícios duma circularização do mRNA aproximando os limites 3'UTR do 5'UTR (Wells et al, 1998). Assim que o complexo de pré-iniciação 43S está devidamente ligado ao mRNA começa o varrimento do ribossoma ao longo da zona 5'UTR até encontrar o codão de iniciação AUG. Este codão na maioria das vezes funciona numa situação de contexto óptimo o que significa que depende da sequência dos nucleótidos que o ladeiam e se não for o caso, o complexo continua o trajecto na direcção 5'-3'. Este contexto óptimo corresponde à sequência denominada KOZAC, GCC(A/G)CCAUGG com uma purina na posição -3 e com uma Guanina na +4, considerando o A do AUG como +1 (Kozac, 1991).

Deste modo, o varrimento é parado e dá-se a hidrólise do GTP no complexo eIF2-GTP-Met-tRNA_i. Com este passo, liberta-se a eIF2-GDP e outros factores como eIF1, eIF1A e eIF5 permitindo assim que a subunidade ribossomal 60S se ligue à subunidade menor constituindo o complexo de iniciação 80S (Jackson et al, 2010).

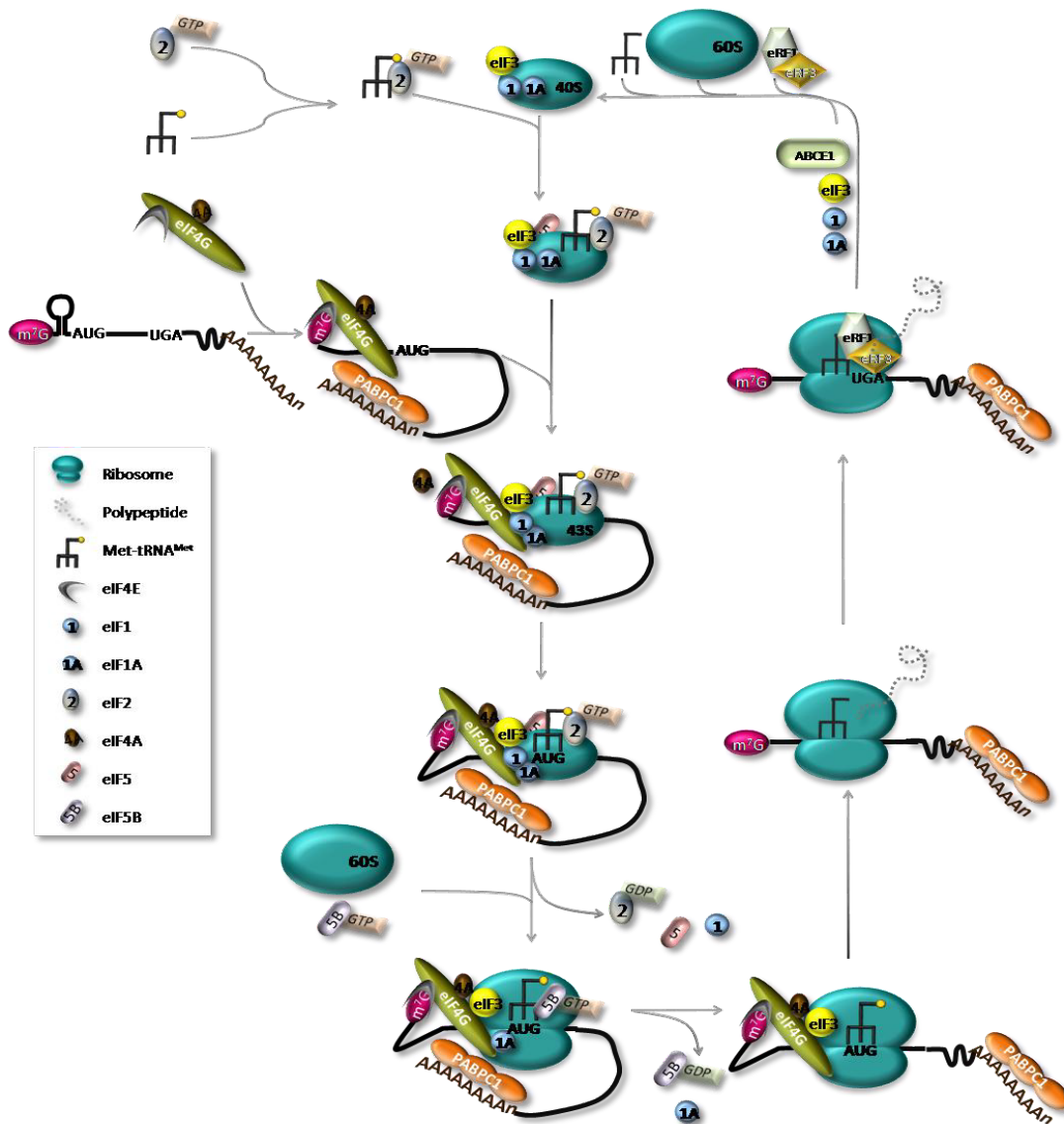


Fig.4: Iniciação da tradução. Adaptado de Peixeiro (2011)

Alongamento:

Durante a fase de alongamento vão ser adicionados aminoácidos à medida que o ribossoma avança na grelha de leitura em intervalos de 3 nucleótidos, correspondendo a um códon, que codifica um aminoácido. Assim, o factor de alongamento eEF1A encarrega-se de levar o aminoacil-tRNA (tRNA carregado com o respectivo aminoácido) ao local A do ribossoma através da hidrólise de GTP (Pestova, 2007). A cadeia polipeptídica que está no local P passa para o local A e em seguida, de novo para o local P simultaneamente passando o tRNA desacetilado para o local E, ambos pela acção da eIF2 e por hidrólise de GTP(Fig.5) (Pisarev et al, 2007).

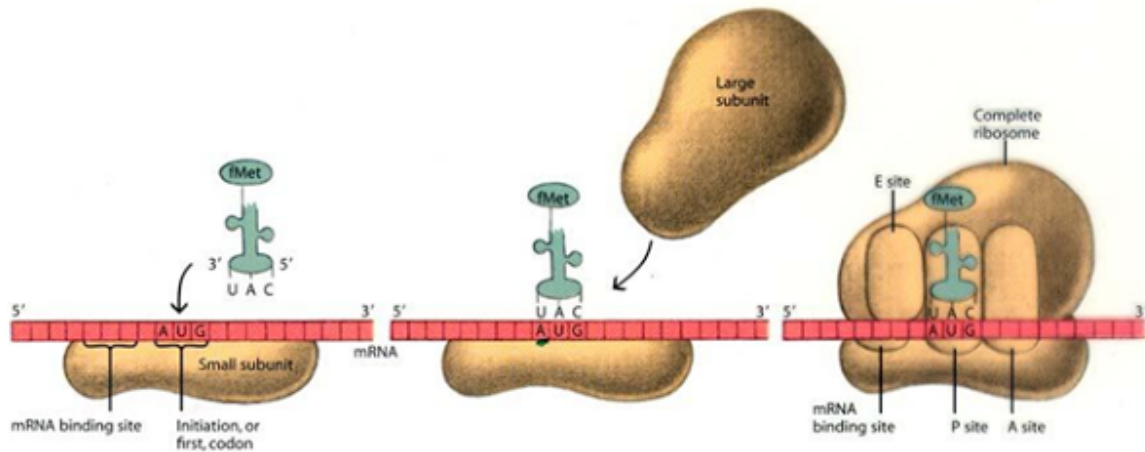


Fig.5 Esquema representativo do mecanismo da tradução onde é possível observar os locais A, P e E no ribossoma. Adaptado de <http://biocienciasedu.blogspot.pt/>.

Terminação:

A terminação é desencadeada quando um codão de stop atinge o local A do ribossoma. Como não existe aminoácido correspondente a este codão, o factor de terminação eRF1 liga-se ao ribossoma desencadeando a quebra da ligação éster no local P. O factor eRF3 assegura que esta hidrólise seja rápida e garante a remoção do eRF1 após a libertação do péptido (Pestova, 2007).

Reciclagem do ribossoma:

Com a terminação as duas subunidades do ribossoma voltam a separar-se ficando a 60S livre e a 40S ligada ainda ao mRNA. O factor eIF3j medeia a libertação do mRNA da 40S. A reiniciação pode ocorrer após a tradução duma uORF se a subunidade 40S permanecer ligada ao mRNA após a terminação. Pode acontecer, no entanto que a subunidade 40S perca condicionalmente após a terminação a capacidade de reiniciação. O recrutamento de novo do complexo ternário permite a aquisição da competência para a reiniciação. A eficiência da reiniciação depende das características em “cis” do mRNA, do tempo da tradução da uORF e dos factores de iniciação envolvidos no início da tradução (Pisarev et al, 2007).

Controlo de qualidade do mRNA:

O mecanismo de controlo da qualidade do mRNA que está melhor caracterizado em eucariotas é o NMD. Este permite a detecção e a rápida eliminação de mRNAs defeituosos na

célula que poderiam implicar de outro modo situações nefastas (Chang et al, 2007). Como já foi referido, o mecanismo entra em acção através da detecção de codões de terminação prematura. Contudo, para além de eliminar transcriptos com PTCs, o NMD tem um papel importante na regulação da expressão génica. Através de técnicas de “wide screen” genómicos de células inibidas para NMD, em levedura, *Drosophila* e células humanas, foi possível averiguar que entre 3% a 10% do transcriptoma é controlado por NMD (He et al, 2003). Exemplos de alvos para NMD natural incluem transcritos que contêm uma ORF regulatória a montante da ORF primária, as chamadas uORFs(upstream Open Reading Frame), intrões situados em 3'UTR e 3'UTR longos (Nicholson et al, 2010).

β-talassémia e a importância biológica do NMD:

A importância biológica do NMD é justificada na medida em que cerca de 30% das doenças genéticas herdadas são causadas devido a PTCs, e para além disso, a severidade do fenótipo pode ser determinada também pela influência do mecanismo de NMD. Para ilustrar este mecanismo o exemplo da β-talassémia é apropriado. A β-talassémia é caracterizada pela ausência ou redução da quantidade da proteína beta-globina (β-globina), uma das subunidades da hemoglobina (Weatherall, 2000). A distribuição espacial de um PTC no mRNA da β-globina pode ter como consequência diferentes destinos patológicos num indivíduo. No transcrito da β-globina, se existir um PTC situado próximo do codão de iniciação AUG, o NMD não é activado devido à proximidade da PABPC1 ao complexo de terminação como explicado posteriormente nesta introdução. Contudo, os heterozigóticos não têm sintomas da doença uma vez que as cadeias traduzidas são muito pequenas e facilmente eliminadas proteoliticamente, junto com as cadeias de β-globina em excesso. Se o PTC está situado a jusante do codão 23 e a mais de 55 nt a montante da última junção exão-exão o mecanismo de NMD é activado ocorrendo degradação do mRNA e protegendo os heterozigóticos uma vez mais da β-talassémia. Se, pelo contrário, o mRNA da β-globina possuir PTCs a menos de 55 nt da última junção exão-exão ou na parte 5' do exão 3 estes mRNAs escapam ao NMD, mas a produção peptídica é suficientemente reduzida para ser eliminada pelos mecanismos proteolíticos salvaguardando uma vez mais os heterozigóticos do efeito da doença. Contudo, num cenário onde estes PTCs estão localizados mais a jusante no exão 3, as β-globinas truncadas codificadas são grandes de mais e ultrapassam a capacidade proteolítica da célula

causando a precipitação tóxica de grânulos insolúveis de globina e conseqüentemente conferem aos heterozigóticos a doença (Peixeiro et al, 2011).

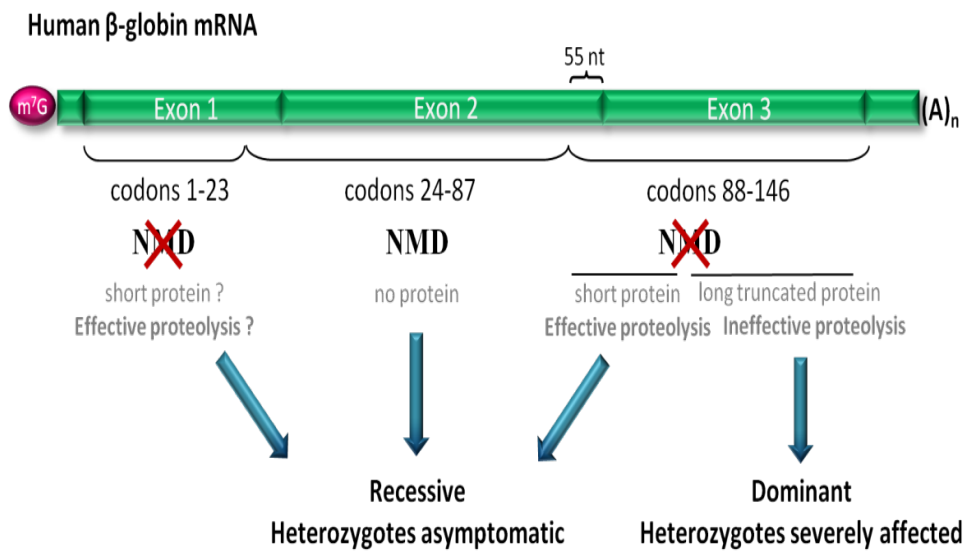


Fig.6: mRNA da β -globina humana e sua relação com o mecanismo de NMD tendo em consideração a posição do PTC no referido mRNA. Adaptado de Peixeiro, 2011.

Reconhecimento de PTCs e o papel dos EJs:

O mecanismo que permite a distinção de um PTC de um codão de terminação normal tem sido uma das áreas sujeitas a maior pesquisa em NMD. Sabe-se que o envolvimento do mecanismo de splicing no NMD é exclusiva dos mamíferos. De facto, em levedura o mecanismo de NMD é independente das junções exão-exão e em *C.elegans* e *D.melanogaster* verificou-se existirem situações alvo de NMD por transcritos originados a partir de genes que não possuem intrões (Longman et al 2007). De qualquer forma, o envolvimento do splicing em NMD levou à formulação de um modelo em que os EJs constituem o critério que permite diagnosticar um PTC, funcionando como uma marca e distinguindo-o de um codão de terminação normal. Apesar de diversos estudos reportarem a activação de NMD na ausência de EJs, estes casos representam uma minoria em comparação com o decaimento do mRNA resultante da existência de EJs a jusante de um PTC. Por isso, estes EJs são considerados como potentes activadores de NMD (Stalder & Muhlemann, 2008).

No decorrer dos últimos anos, têm surgido dados que demonstram a existência de uma excepção a esta regra geral. Deste modo, há evidências de que a PABPC1, que se liga à

extremidade 3'UTR (cauda poli(A)) do mRNA está envolvida no reconhecimento de PTCs, competindo com a Upf1 pela interacção com o complexo de terminação e efectivamente estimulando a terminação da tradução (Peixeiro, 2011). De facto, foi demonstrado que basta a PABPC1 encontrar-se na vizinhança de um PTC que é razão suficiente para inibir o NMD, mesmo que o PTC reúna todas as condições de activação do mecanismo de NMD (como por exemplo a existência de um EJC a jusante) (Ivanov et al, 2008; Silva e Romão, 2009). Destes resultados podemos concluir que quanto maior for a distância entre o PTC e a cauda poli(A), maior será a probabilidade desse transcrito ir para NMD, sendo a presença do EJC a jusante, um forte potenciador do processo. De acordo com a lógica deste modelo, a existência de um PTC perto do início da tradução (do codão AUG) seria, por si só, suficiente para remeter o transcrito para degradação (NMD). Contudo, foi descrito um caso em que tal situação não se verifica. O transcrito da β -globina humana com PTC no codão 15, ou seja, na proximidade do codão de iniciação AUG apresenta níveis aproximadamente semelhantes aos do transcrito normal (Silva et al, 2008) Com o objectivo de compreender o mecanismo molecular que está implicado neste efeito derivado da proximidade do PTC ao AUG, foi proposto um modelo no qual a PABPC1, se encontra na vizinhança do AUG inicial, uma vez que nas fases iniciais da tradução ocorre a circularização do mRNA, servindo essa mesma proteína de elo entre a cauda poli-A, situada a 3' e a eIF4G, presente na extremidade 5' do transcrito (Fig. 7). As evidências experimentais apontam que diversos factores de iniciação da tradução permanecem a interagir durante os primeiros passos do alongamento da tradução o que poderia justificar a presença da PABPC1 nesta fase, e de, conseqüentemente, a inibição do mecanismo de NMD, concretamente (Peixeiro, 2011).

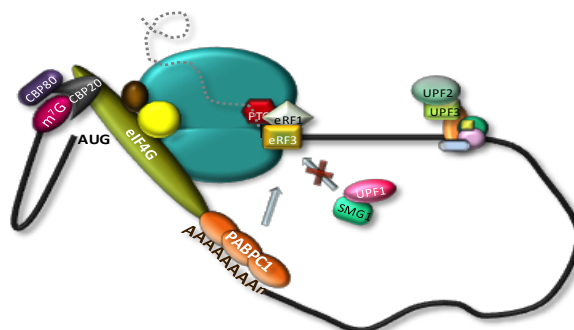


Fig.7: Modelo da circularização do mRNA proposto: A circularização do mRNA na ronda inicial da tradução aproxima a PABPC1 do PTC (perto do AUG inicial) competindo com UPF1 e inibindo o mecanismo de NMD. Adaptado de Silva e Romão (2009).

Factor de iniciação da tradução eIF3:

Um dos factores de iniciação de tradução chave nestas interações é o eIF3, um complexo multiproteico constituído por 13 subunidades (Fig.8), cuja estrutura e organização tem sido desvendada, se bem que ainda de forma incompleta através de cristalografia, espectrometria de massa e estudos de imunoprecipitação, que permitem prever as interações das várias subunidades no complexo eIF3. Este mesmo complexo, interage com o ribossoma e com a proteína eIF4G, funcionando como elo de ligação entre os dois durante o processo de varrimento do mRNA pelo ribossoma. Esta ligação ao ribossoma e ao eIF4G, levanta a questão que subunidades da eIF3 estão envolvidas neste processo. De facto, foi sugerido que as subunidades eIF3F e eIF3H são fortes candidatos para as interações com eIF4G e com o ribossoma (Peixeiro, 2011).

As funções das diferentes subunidades individuais que constituem a eIF3, apesar de não terem sido esclarecidas nem completamente compreendidas, pensa-se serem conservadas transversalmente aos eucariotas (Zhou et al, 2008). A apoiar esta afirmação verifica-se que as 6 subunidades da eIF3 em levedura (eIF3A, B, C, G, I e J) estão também conservadas em mamíferos (Hinnebusch, 2006). Experiências levadas a cabo para reconstrução da eIF3 humana *in vitro* apontam que o número funcional consiste nas subunidades eIF3A, B, C, E, F e H (Masutani et al, 2007). Um estudo relativamente mais recente recorrendo a técnicas de espectrometria de massa indica a formação de 3 módulos mostrando estabilidade: eIF3(A:B:I:G) semelhante ao núcleo de eIF3 em levedura; a eIF3(C:D:E:L:K) e a eIF3(F:H:M) (Zhou et al, 2008). De qualquer forma, a eIF3 dos mamíferos evoluiu incluindo subunidades adicionais, provavelmente com função reguladora e de suporte do complexo, possibilitando a realização de um número maior de interações entre as proteínas e o RNA. De facto, foi observado (Hinnebusch, 2000) que a eIF3E possui um domínio PCI e a eIF3F e eIF3H um domínio MPN, que se encontram também em grande complexos proteicos, implicados na interacção proteína-proteína. Estudos apontam que determinadas subunidades possam regular mRNAs específicos e que a presença da eIF3F e H esteja a exercer controlo sobre a forma como o complexo 43S varre a 5'-UTR de um conjunto particular mRNAs (Ray et al, 2008; Kim et al, 2007). Outros estudos referem redundância de funções (Choudhuri et al, 2010) ou funções de suporte (Masutani et al, 2007) para as subunidades adicionais da eIF3. Um estudo feito por Zhou e colegas (Zhou et al, 2008) refere que as subunidades eIF3F:H:M formam um módulo estável

localizado na periferia do complexo permanecendo isolado relativamente a interações com as outras subunidades de eIF3. No mesmo estudo, é referida a importância da eIF3H na ligação do trímero(F:H:M) à subunidade central eIF3C. Assim, a importância das subunidades eIF3F e H na aproximação de eIF4G e PABPC1 ao ribossoma durante a iniciação da tradução, que deverá manter-se durante os primeiros passos do alongamento, poderá estar ligada à necessidade de uma maior regulação da tradução nos eucariotas (Peixeiro, 2011). Para além disso, em plantas a subunidade eIF3H ajuda a prevenir a perda permanente da competência para a reiniciação (Roy et al, 2010) sugerindo o seu envolvimento na ligação entre eIF4G e o complexo ribossomal 40S.

As interações estabelecidas entre a extremidade 5'-UTR do mRNA e a cauda poli(A) ocorrem durante a primeira ronda da tradução e envolvem a PABPC1 com o factor de iniciação eIF4G (Silva e Romão, 2009). Este factor também interage com a eIF3, sendo considerado, por isso, uma proteína de suporte de conformação no mecanismo traducional (Amrani et al, 2008). As observações feitas de que a eIF3 pode permanecer ligada ao ribossoma durante a fase inicial do alongamento, funcionando assim como elo de ligação entre a eIF4G e o mRNA e a subunidade ribossomal 40S corrobora a ideia de que subunidades de eIF3 possam estar envolvidas na associação PABPC1-eIF4G aos arredores do PTC próximo do AUG inicial. Assim sendo, a força com que se verifica o NMD seria determinada pela distância física entre a PABPC1 e o PTC, quanto mais perto estas entidades, mais facilmente perde a Upf1 o lugar em detrimento da eIF3 pela ligação à PABPC1, efectuando-se a terminação da tradução ao invés de se processar o mecanismo de NMD (Peixeiro, 2011).

A eIF3 tem um papel elementar no mecanismo da tradução. Contudo, outra função preponderante coloca este factor de tradução sob investigação, pois é também regulador da reiniciação da tradução. Este processo ocorre após a leitura e tradução de uma *upstream open reading frame* (uORF) se a subunidade 40S do ribossoma permanecer ligada ao mRNA. Havendo a terminação da tradução da uORF ocorre a libertação da subunidade ribossomal 60S e o recrutamento de novo do complexo ternário que possibilita a identificação do AUG da ORF principal determinando a competência para reiniciar a tradução (Kozak, 2001). É sugerido que os factores de tradução envolvidos no retomar do varrimento poderão permanecer associados, ainda que de forma temporária, com o ribossoma durante a fase de alongamento. Aumentando a extensão da uORF ou o tempo de deslocação do ribossoma pode criar maior probabilidade de haver dissociação dos factores envolvidos (Kozak, 2001.) Estudos recentes em levedura

implicam as subunidades eIF3A e G neste processo (Cuchalova et al, 2010) e em plantas a eIF3H parece estar envolvida na reiniciação durante a tradução do mRNA com uORFs (Roy et al, 2010).

Existe um caso de estudo (Neu-Yilik et al, 2011) que aponta a reiniciação da tradução em PTCs próximos de AUG inicial como causa para a resistência ao NMD. Essa reiniciação aconteceria a 3' do PTC em mRNA da β -globina. Contudo, no gene da β -globina utilizado foi incorporado um intrão exógeno na zona 5'-UTR, o que torna o exão 1 num exão 2 funcional, podendo esse facto estar relacionado com o resultado obtido nessa experiência. Noutros trabalhos, utilizando o gene nativo da β -globina sem alterações, mesmo que seja detectado algum nível de reiniciação numa situação com PTC próximo do AUG inicial, esta não é suficiente para restabelecer o NMD (Silva et al, 2006; Peixeiro, 2011).



Fig. 8: Factor de transcrição eIF3 com as 13 subunidades proposto em Peixeiro (2011).

Objectivos:

Este projecto de mestrado teve como principal objectivo avaliar a implicação das subunidades F e H do factor de iniciação da tradução eIF3 na interacção entre o eIF4G e o ribossoma no início da tradução e como essa interacção se remodela entre a primeira ronda de tradução (onde ocorre NMD, por excelência) e as seguintes. Para responder a estas questões foi necessário realizar uma depleção das subunidades eIF3F e eIF3H recorrendo à técnica RNA de interferência (siRNA), e, posterior imunoprecipitação com o anticorpo da subunidade eIF3H ou eIF3F analisando os complexos proteicos resultantes por Western Blot

Materiais e Métodos:

Amplificação de plasmídeos:

Plasmídeos contendo os genes modelo para realizar as experiências (beta-globina normal (β_n) e beta-globina com um PTC no codão 39 (β_{39}) foram amplificados utilizando para isso, bactérias *Escherichia Coli* competentes. Todas as operações envolvendo a manipulação de bactérias foram cuidadosamente executadas à chama do Bico de Bunsen. Retiraram-se 50 μ L de bactérias competentes para um eppendorf deixando-as descongelar lentamente em gelo. Adicionou-se 10 μ L dos respectivos plasmídeos com concentração 0,2ng/ μ L. Os plasmídeos amplificados foram os: pTRE β_N (gene da beta-globina normal), pTRE β_{15} (gene da beta-globina com um PTC no codão 15, resistente ao mecanismo de NMD), pTRE β_{39} (gene da beta-globina com um PTC no codão 39 sensível ao mecanismo de NMD), todos a partir do vector de expressão pTRE que possui incorporado o gene de resistência à ampicilina. As bactérias ficaram meia hora em gelo e em seguida foram sujeitas a um choque térmico consistindo em 45 segundos a 42°C e depois mais 2 minutos no gelo. Pretende-se com este procedimento tornar as paredes celulares bacterianas permeáveis à entrada dos respectivos plasmídeos. Depois, adicionaram-se 250 μ L de meio LB e colocaram-se as bactérias durante 1 hora a 37°C com rotação de 600rpm de forma a recuperarem. Terminado este tempo plaquearam-se 50 μ L em caixa de Petri com meio LB suplementado com ampicilina, antibiótico de seleção positiva, e deixaram-se crescer as bactérias durante um período de 16-18 horas. Passado o tempo, retirou-se uma colónia que se introduziu em 4mL de LB líquido com ampicilina (50ng/ μ L) voltando a colocar as bactérias a crescer a 37 °C desta vez com agitação de 220rpm.

Aproximadamente 16 horas depois usou-se a minicultura para extracção de DNA plasmídico através da utilização de um kit de extracção e purificação de plasmídeos *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1 (peqlab)* seguindo o respectivo protocolo Low Copy-number. Sumariamente sedimentaram-se as bactérias com uma centrifugação a 3000 rpm durante três minutos e efectuou-se uma lise alcalina. De seguida adsorveu-se o DNA plasmídico a uma membrana de sílica que é submetida a várias lavagens que vão purificar o DNA de proteínas e outros contaminantes. Após a eluição do DNA plasmídico retirou-se 1 μ L da amostra e diluiu-se em 59 μ L de água bidestilada estéril. Verificaram-se os níveis de absorvância num espectrofotómetro,

cujos valores indicaram a concentração do DNA em solução e a qualidade do mesmo. As sequências dos plasmídeos amplificados foram confirmadas por sequenciação automática, como explicado abaixo, e conservaram-se os plasmídeos a -20°C.

Reacção de sequenciação:

Os plasmídeos amplificados foram sequenciados para a verificação da não existência de mutações. Previamente ao envio das amostras da amplificação dos vectores de expressão para a sequenciação automática foi necessário proceder a uma reacção de amplificação dessas amostras com ddNTPs marcados com fluorocromos. Para tal realizaram-se duas reacções em paralelo para cada plasmídeo que se pretendeu sequenciar – uma reacção com um *primer forward* que hibrida na região 5'UTR da β -globina e outra reacção em que se utiliza um *primer reverse* que hibrida na região 3'UTR da β -globina de forma a abranger toda a sequência do gene a sequenciar. Utilizaram-se 200 ng da amostra(DNA), 1 μ L de um dos primers referidos a 2 μ M, 2 μ L da solução *bigdye* (consiste num tampão que contém dNTPs normais e ddNTPs marcados com diferentes fluorocromos numa proporção de cerca 100:1, para além da enzima e co-factores necessários à reacção de amplificação) e perpez-se com água bidestilada até 10 μ L. O programa de PCR utilizado consistiu numa desnaturação inicial a 96°C durante 30 segundos, seguida de 25 ciclos de uma desnaturação a 96°C durante 10 segundos, uma hibridação a 50°C durante 7 segundos e uma extensão a 60°C durante 4 minutos e 30 segundos. As amostras foram enviadas para a Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge onde se procedeu à sua sequenciação pelo método de *dye-terminator sequencing*.

Deste modo confirmou-se que a sequência dos plasmídeos amplificados estava correcta, onde a variante β 39 contém uma mutação *nonsense* no codão 39 (CAG \rightarrow TAG) enquanto que a variante β 15 tem uma mutação do mesmo tipo no codão 15 (CAG \rightarrow TAG).

Cultura de células:

Culturas celulares foram realizadas com células HeLa (Henrietta Lacks), uma linha celular derivada de células do cancro do colo do útero. (extremamente duráveis e prolíficas, tornando-se numa das linhas celulares mais antigas e utilizadas.) As células foram mantidas em frascos T25 e T80 com cerca de 5-6mL e 14-15mL de meio de cultura, respectivamente em estufas a 37°C na presença de 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado foi DMEM + GlutaMAX™-I (Gibco), suplementado com 10% de FBS (Gibco). As passagens de células foram efectuadas a cada 3/4 dias com diluições normalmente de 1:4. Para a passagem de células foi removido do meio de cultura do frasco sendo aplicado entre 1 a 2 mL de tripsina (Gibco)(conforme o frasco em causa, T25 ou T80, respectivamente) para lavar as células dos vestígios de meio ainda existente no frasco e que pode inibir a tripsina, aplicando uma segunda vez 0,5 ou 1mL de tripsina (T25 ou T80, respectivamente). A desagregação e descolamento das células é feito durante cerca de 2 minutos na estufa de cultura a 37°C e na presença de 5% de CO₂. Em seguida, provocando o desprendimento das células com algumas pancadas na lateral do frasco para ter a certeza que as células não ficavam agarradas ao frasco inviabilizando a passagem, ressuspenderam-se as células no meio DMEM suplementado com 10% de FBS e a quantidade desejada foi passada para um novo frasco, previamente preparado com este mesmo meio. Agitou-se em cruz de forma às células ficarem uniformemente distribuídas no frasco. De seguida as células foram mantidas em estufas até nova passagem como acima referido.

Transfecção de plasmídeos:

Células HeLa foram semeadas em placas P35 com 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS, numa quantidade de modo a encontrarem-se no dia seguinte com confluência na ordem dos 70%. As células foram mantidas até à transfecção na estufa a 37°C com atmosfera a 5% de CO₂. Na transfecção foram diluídos 200ng do plasmídeo em questão (pTREβN ou pTREβ39) em 125 µL de OPTI-MEM® I 1x (Gibco). Diluíram-se à parte 4 µL de lipofectamine™ 2000 Reagent em 125 µL de OPTI-MEM e aguardaram-se 5 minutos à temperatura ambiente de forma a estes compostos estabilizarem no meio. Em seguida, a cada diluição do plasmídeo

acrescentou-se uma diluição da lipofectamina. Misturaram-se bem e ficaram a incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após a incubação foi acrescentada esta mistura a cada P35, com o meio previamente trocado. Agitou-se em cruz de forma as células ficarem uniformemente distribuídas na placa e guardaram-se na estufa a 37°C com atmosfera suplementada com 5% de CO₂.

Extracção de RNA e Proteínas:

Cerca de 24 horas após a transfecção dos plasmídeos, as células nas placas P35, foram lisadas em gelo com 100 µL de PLB (1X) tendo sido previamente sujeitas a lavagem dupla com 2000mL de PBS (1x). Após a raspagem e colecta das células para os respectivos eppendorfs estas foram centrifugadas a 12.000rpm a 4 °C , durante 1-2 minutos e recolhido o sobrenadante da seguinte forma: 20 µL colocados num eppendorf onde se juntou 5 µL de tampão de carregamento SDS a 5x e armazenamento a -20°C; o restante volume foi utilizado no protocolo de extração de RNA NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel). Adicionaram-se 350 µL da solução RA1 deste kit de extracção e misturou-se no vórtex. Continuou-se o protocolo a partir do passo 4 do mesmo. Basicamente, reduziu-se a viscosidade dos lisados por filtração, adsorveu-se o RNA a uma membrana de sílica, eliminou-se através de digestão o eventual DNA contaminante que possa ter-se também ligado a esta membrana, adicionando uma solução de rDNase e procederam-se a várias lavagens com diferentes soluções para remoção dos sais, metabolitos e componentes celulares macromoleculares. O RNA purificado foi então finalmente eluído em condições de baixa força iónica com água *RNase-free* e foi guardado a -80°C.

Síntese de cDNAs:

Transcriptase Reversa:

O RNA extraído foi submetido ao processo de transcrição reversa para sintetizar o respectivo cDNA. Num volume final de 20,7 µL utilizaram-se 2 µg de RNA, 150 ng de *random primers*, 1.5 µL de dNTP mix a 10 mM e perpez-se o volume com água bidestilada. O RNA foi desnaturado durante 10 minutos a 65°C e colocou-se rapidamente em gelo durante cerca de 2 minutos. Em seguida adicionaram-se 6 µL de tampão 5X First-Strand (Invitrogen), 3 µL de DTT a 0.1M (Invitrogen), 0,3 µL de RNase OUT™ (Invitrogen), 0,75 µL de Nzytech RT e perpez-se com água bidestilada para um volume final de 30 µL. Agitaram-se gentilmente os conteúdos da mistura. A

reação de transcrição reversa foi iniciada com a incubação da mistura a 25°C durante 10 minutos, seguido de 50°C durante 50 minutos e inactivou-se a reação aquecendo a 85°C durante 5 minutos.

PCR (Reacção de Polimerização em Cadeia):

3 µL de cDNA foram amplificados usando 25 µL de tampão B (dpB), 0,5 µL de taq DNA polymerase. Foram utilizados 0,5 µL de cada primer (FW 5'UTR e RV 3'UTR) a 10 µM. O programa de PCR utilizado consistiu numa desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de uma desnaturação a 95°C durante 30 segundos, uma hibridação a 55°C e uma extensão a 72°C 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C durante 7 minutos. As amostras foram corridas por electroforese num gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. O gel foi posteriormente visualizado num transiluminador (Uvitec).

Digestão dos plasmídeos:

Para um volume final de 30 µL foram usados 8µg de DNA para se efectuar a digestão com as enzimas de restrição HIND III e BsrGI (1 µL cada) na presença do respectivo tampão. A digestão foi efectuada durante 2 horas a 37°C. Os produtos da digestão foram visualizados por electroforese em 1% gel de agarose.

Transfecção de siRNAs:

A técnica de RNA de interferência é um processo através do qual moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNA) silencia a expressão génica, quer induzindo, através de uma sequência específica, a degradação de mRNA complementar ou inibindo a tradução (Mittal, 2004). Tem a vantagem de se poder fazer a correspondência entre um fenótipo e a perda da função de um gene específico (Sharp, 1999). Cadeias longas de dsRNA foram inicialmente muito utilizadas para técnicas de *knockdown* em *C.Elegans* (Sharp, 1999), mas a sua utilização em mamíferos foi posta em causa por sequências de dsRNA maiores do que 30 pares de bases provocarem uma resposta antiviral/interferon, resultando na inibição completa da síntese proteica (McManus, 2002). Contudo esta visão mudou quando se descobriu que moléculas curtas de dsRNA

sintetizadas quimicamente, com cerca de 21-22nucleótidos, chamadas de small interfering RNAs (siRNAs) eram capazes de ser alvo de mRNA de mamíferos sem provocar a resposta de interferões (Elbashir et al, 2001).

O mecanismo de acção do silenciamento génico por RNAi envolve a actividade de ribonuclease III de uma enzima chamada DICER que gera, a partir de dsRNA longo as sequências de 21-22 nucleótidos (siRNAs). Estes são incorporados num complexo proteico chamado RISC (RNA-induced silencing complex) que possui actividade de RNA-helicase dependente de ATP para separar a cadeia dupla de siRNA em cadeia simples. A cadeia antissense guia o complexo RISC para o mRNA homólogo, onde a endonuclease associada a RISC quebra o mRNA alvo numa posição central inactivando-o (Mittal, 2004). Hoje em dia é possível desenhar e encomendar vários siRNAs de acordo com o alvo em estudo, nosso caso foram então desenhados siRNAs específicos para o mRNA da eIF3F e H.

Células HeLa foram semeadas em placas P60 de modo a encontrarem-se no dia seguinte com confluências na ordem dos 30-40%. Para isso, a partir de um T80 com 100% de confluência, lavou-se e tripsinizou-se com 1 mL as células e colocou-se 7mL de meio DMEM com 10% de FBS. Ressuspendeu-se para misturar bem as células e retirou-se 1 mL para um Falcon com 24mL de DMEM+10%FBS. Após nova ressuspensão, colocou-se 5mL em cada P60. Depois de semeadas, as células permaneceram em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ durante as 24 horas seguintes.

Passado esse tempo as células foram transfectadas com os respectivos siRNAs, neste caso de eIF3F(RNA alvo) e de luciferase (usado como controlo negativo, de forma às células em estudo estarem todas nas mesmas condições. Este siRNA não tem qualquer alvo nas células HeLa uma vez que o gene de Luciferase não existe nesta linha celular), utilizando-se uma concentração de 400pmol por placa. Foram então colocados 4µL do respectivo siRNA (com uma concentração inicial de 100 µM) a estabilizar em 250 µL de OPTI-MEM® I 1x (Gibco) e à parte diluíram-se 6 µL do agente de transfecção lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) em 250 µL de Opti-MEM, seguido de 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. Após este período, a cada diluição de siRNA foi adicionada uma diluição de lipofectamine™ 2000 Reagent. Depois de misturadas foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 minutos. Por fim, cada uma destas misturas (500 µL/placa) foi distribuída por cada placa de 60 mm, cujo meio foi previamente substituído, voltando a guardá-las na estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Cerca de 24 horas depois foi trocado o meio às placas P60 e passadas mais 24 horas foi feito um reforço de siRNA onde utilizou-se 200pmol de siRNA por placa seguindo o mesmo protocolo usado na primeira transfecção. No dia seguinte as células foram lisadas e procedeu-se à extracção proteica.

Extracção de Proteínas e Imunoprecipitação:

As células foram lisadas a frio com 200 µL de tampão NP40 por placa sendo anteriormente lavadas duas vezes com 3mL de solução de PBS 1X. As células foram colhidas utilizando-se um raspador e colocaram-se em eppendorfs que se centrifugaram a 4°C durante 10 minutos a 5000rpm de forma a precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante de cada experiência foi junto com o seu homólogo numa eppendorf de 1,5mL(foram feitas 2 placas por siRNA). Em seguida retiraram-se 35 µL que se diluíram em 9 µL 5X tampão SDS. Foram aquecidos a 95°C durante 5 minutos e guardados posteriormente a -20°C. Estas amostras constituem a PréIP (ou seja foram usadas posteriormente para controlo da proteína existente antes da imunoprecipitação).

Por outro lado, dividiram-se 180 µL de lisados em eppendorfs de 500 µL para serem tratados com 2µL RNase OUT (Nzytech) e colocados 30 minutos a 4°C e 180 µL de lisados para tratamento com 2µL RNase cocktail (30 minutos a 37 °C.)

Posteriormente, incubou-se o respectivo anticorpo (3 µL) anti eIF3H com os respectivos lisados, durante 2 horas a 4°C, num rotar.

A imunoprecipitação foi efectuada com “beads” de agarose acopladas à Protein G. Para tal, foram preparadas “beads” de agarose retirando o equivalente a 80 µL de beads para cada eppendorf e centrifugando 1500 RPM durante 30 segundos. Removeu-se o sobrenadante com uma seringa de 2 mL e uma agulha de 0,6x25mm, adicionou-se 1 mL de tampão de Lise (ver anexo) e colocou-se 5 minutos na plataforma rotativa a 4°C. Voltou-se a centrifugar nas condições anteriores e repetiu-se este procedimento 3x. No final, ressuspendeu-se as “beads” num volume de tampão de lise correspondente ao retirado inicialmente e guardaram-se a 4°C. Para evitar ligações não específicas de proteínas às “beads” os extractos celulares foram incubados com 80µl de “beads” durante 2horas a 4°C com rotação. Após incubação foram

centrifugados 1 minuto a 2000 rpm, a 4°C sendo o sobrenadante coletado para novas eppendorfs descartando assim as “beads” usadas.

Para a precipitação da proteína em estudo e do complexo proteico a ela ligada, introduziram-se 80 µL de beads em cada eppendorf e colocaram-se durante 2 horas na plataforma rotativa a 4°C. Finalizado este tempo, centrifugou-se a 2000rpm durante 1 minuto a 4°C, retirou-se o sobrenadante com seringa e guardou-se a -20°C (PÓS_IP). De forma a lavar as “beads” das proteínas que não estavam especificamente ligadas ao anticorpo em causa, adicionou-se 400 µL de tampão de lise às “beads”, colocou-se no rotar 5 minutos a 4°C e voltou-se a centrifugar 1 minuto a 2000 rpm, a 4°C. Este processo foi repetido mais 2X, findo o qual adicionaram-se 25 µL de 2X tampão SDS e guardaram-se os eppendorfs a -20°C.

Western Blot:

Amostras resultantes da imunoprecipitação e respectivos controlos internos foram aplicadas num gel de SDS-PAGE de 10 poços com resolução de 12%. Antes de carregar as amostras procedeu-se à desnaturação das proteínas e complexo beads-proteína durante 10 minutos a 65°C. Foram carregados 10 µL de cada amostra no respectivo poço e 8 µL do marcador. A corrida do gel efectuou-se a uma amperagem fixa de 20 mA durante 1 hora. Durante a electroforese, uma membrana de PVDF foi hidratada em metanol e posteriormente lavada em água bidestilada. A transferência das proteínas para a membrana foi efectuada a uma voltagem fixa de 100V durante 1 hora. Terminado este passo e devido a termos que usar diferentes anticorpos para identificar as diferentes proteínas, a membrana foi cortada sensivelmente abaixo da zona dos 50 kDa e um pouco acima dos 100 kDa. As membranas foram bloqueadas com uma solução de leite em pó com TBS+1%Tween excepto para o fragmento entre 50 e 100kDa que foi bloqueado com solução de leite em pó com TBS+0,5%Triton, ambas durante 1 hora, com agitação à temperatura ambiente. Removeu-se o excesso de leite das membranas com lavagens nos respectivos detergentes e procedeu-se à imunomarcação. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários e respectivas diluições: eIF4G(1:500)(membrana acima dos 100 kDa) e PABPC1(1:500); eIF4E(1:1000) e eIF3F(1:500)(membrana abaixo dos 50kDa). A incubação foi realizada durante a noite (+/-16 horas) e os anticorpos foram diluídos no tampão primário TBS-1%Tween+5%BSA excepto para a PABPC1 que por ter sinal mais forte

e ser menos específica no reconhecimento da proteína alvo necessita de um detergente mais forte, 5% milk+TBS-0,5% Triton. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com uma duração total de 25 minutos (10x10x5) e em seguida as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários anti-cabra de coelho e anti-cabra de rato (ambos 1:4000) juntos na mesma incubação, durante 1 hora. As membranas foram lavadas novamente 3x durante 20 minutos (10x5x5). Para a detecção das proteínas foi realizada uma reacção do tipo ECL (*Enhanced chemiluminescence*) durante 1 minuto, a qual consiste na incubação da membrana numa mistura de duas soluções (solução 1 e 2) contendo ácido cumárico, peróxido de hidrogénio e luminol. De seguida foram feitos diferentes tempos de exposição das membranas a chapas radiográficas a vários tempos cuja revelação foi efectuada no processador Kodak Medical X-ray Processor 102.

Resultados:

Ao iniciar o conjunto de experiências necessárias para responder aos objectivos propostos neste trabalho, houve genes modelo com os quais tive de me familiarizar. Foi o caso das variantes βN e $\beta 39$, do gene da β -globina humana. Esses variantes, disponíveis incorporadas no plasmídeo pTRE, foram inicialmente sujeitas a amplificação utilizando bactérias competentes de E.Coli, constituindo o stock a partir do qual realizei as minhas experiências. A variante βN é constituída pelo gene selvagem da β -globina, enquanto que no $\beta 39$ o gene da β -globina possui um codão prematuro de terminação da tradução na posição 39(Fig 9).

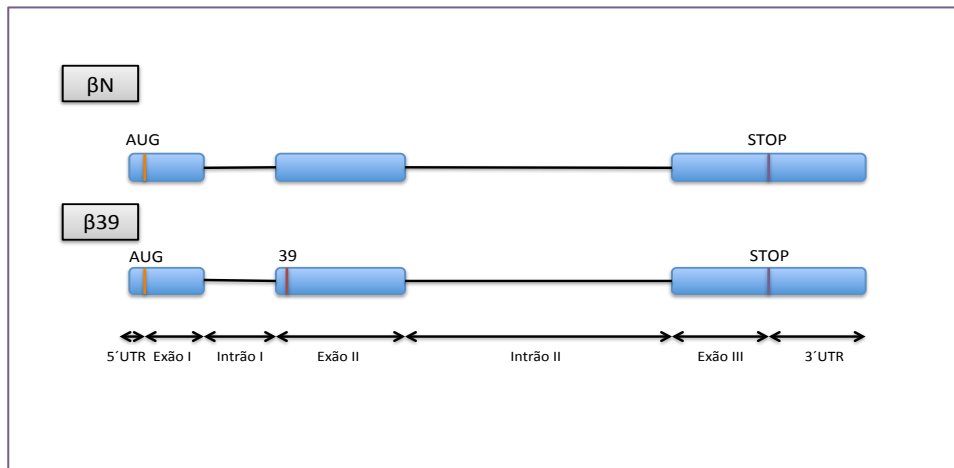
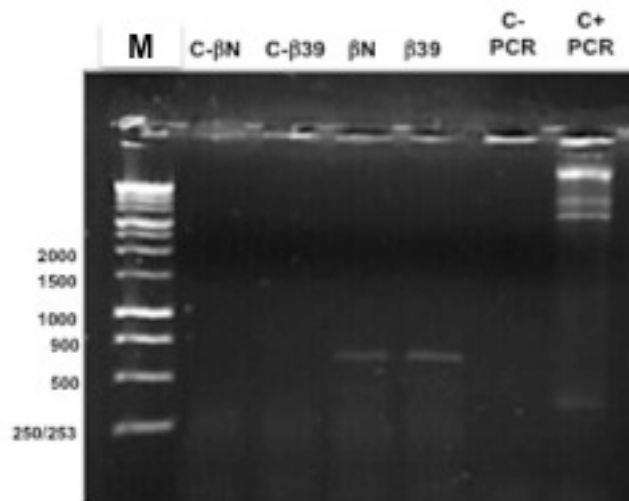


Fig.9 : Tamanho relativo das variantes da β -globina humana utilizadas βN e $\beta 39$, revelando a extensão aproximada das regiões que constituem os intrões e os exões. Estão também assinalados os codões STOP e o local da mutação na variante $\beta 39$.

Uma vez constituído o stock de plasmídeos, medido e registados as suas concentrações, a zona de interesse foi amplificada por PCR sendo a sua integridade verificada por electroforese em gel de agarose(Fig.10).

PCR resultante da amplificação de plasmídeos pTRE β N e pTRE β 39



c- β N: PCR tendo como template o controlo negativo da RT para o β N; **c- β 39**: PCR tendo como template o controlo negativo da RT para o β 39; **β N/ β 39**: amostras relativas à purificação do RNA de pTRE β N/ β 39; **c+**: Controlo positivo do PCR para 3 μ L de DNA [pTRE β N]=115 ng/ μ L; **c-PCR**: controlo negativo do PCR feito sem template de DNA.

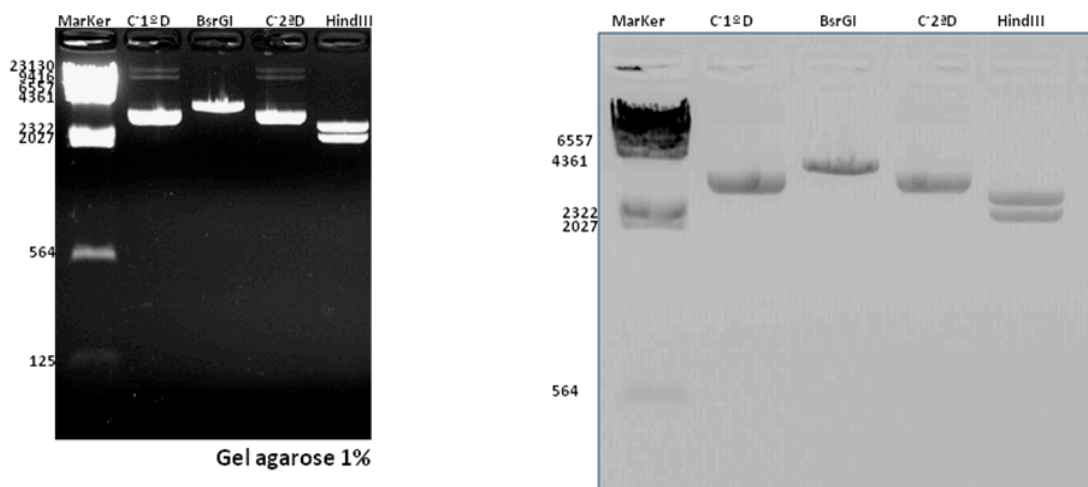
Fig. 10 : PCR de cDNA de β N e β 39. Gel de agarose a 1%.

Ambas as amostras de cDNA relativas quer ao β N quer ao β 39 foram positivamente amplificadas com os respectivos tamanhos de fragmentos esperados (800 bp) (Fig.10). Os respectivos controlos negativos das amostras não revelaram qualquer tipo de amplificação o que significa que as amostras iniciais de RNA não estavam contaminadas com DNA plasmídico. Foi corrido também neste gel de electroforese em agarose o plasmídeo pTRE β N o qual apresentou 3 bandas correspondem às 3 possíveis conformações do plasmídeo. Cada conformação oferece maior ou menor resistência à passagem pelo gel. Deste modo, por ordem da maior resistência linear, superenrolado e circular em cadeia simples. O controlo negativo do PCR representa a realização do ensaio de PCR na ausência de qualquer DNA como molde de forma a controlar qualquer contaminação existente nas soluções usadas na técnica. Podemos assim confirmar que as amostras que foram utilizadas nas experiências subsequentes estavam em boas condições para serem empregadas na realização de futuros protocolos.

Uma outra forma de verificar se os plasmídeos tinham sido amplificados correctamente e que continham o gene de interesse foi recorrendo ao uso de enzimas de restrição. Na figura 11 mostra-se um exemplo onde se utilizou esta técnica com o plasmídeo pTRE β N e utilizando as enzimas BsdGI e HindIII. Como as enzimas de restrição reconhecem e cortam sequências

específicas no DNA (neste caso cada enzima de restrição tinha somente um local de corte no plasmídeo em estudo) foram então escolhidas enzimas que cortassem, uma dentro da sequência do gene em estudo e outra no plasmídeo (fora dessa sequência). Após digestão, a corrida em electroforese em gel de agarose apresentou os fragmentos de tamanhos esperados indicando a presença do gene em estudo (Fig.11).

Digestão enzimática do plasmídeo pTREβN com as enzimas BsrGI e HindIII



Marcador: Lambda DNA/HindIII;

Controlo negativo da 1ª Digestão(C1ªD): pTREβN sem enzima BsrGI;

BsrGI (1ª Digestão): linearizou o PL num fragmento teórico de 5540pb;

Controlo negativo da 2ª Digestão(C2ªD): pTREβN sem enzima HindIII;

HindIII(2ª digestão): Fragmentou o PL em 2 fragmentos com tamanhos esperados de 2467 pb e 3073 pb.

Fig.11: Digestão enzimática do plasmídeo pTREβN.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a interacção de subunidades do complexo factor de tradução eIF3 com o ribossoma na dinâmica do processo da tradução. Relativamente a este, foram realizadas manipulações experimentais tendo em conta o processo de RNAi, ou seja RNA de interferência consistindo na transfecção e incorporação de siRNAs-constituídos por pequenas sequências oligonucleotídicas de RNA de cadeia dupla, normalmente sintetizadas em

laboratório- em células HeLa. Após a transfecção destes oligonucleótidos nas células, estes siRNAs vão ligar-se aos mRNAs celulares alvo, específicos por complementariedade e através de mecanismos próprios vão conduzi-los à degradação (ver material e métodos), diminuindo drasticamente os seus níveis na célula, resultando numa conseqüente ausência ou menor síntese proteica do péptido em questão. As proteínas constituintes do complexo proteico eIF3 foram então deletadas recorrendo a esta técnica.

Com esse intuito, através da técnica de siRNA procedeu-se à depleção da subunidade eIF3 F e H (proteínas anteriormente elegidas como possíveis elos de ligação entre eIF4G e o ribossoma) (Fig.12 e 13). Após depleção, aplicou-se a técnica de imunoprecipitação (IP) de forma a imunoprecipitar a subunidade eIF3H (se foi realizada a depleção da subunidade eIF3F) ou eIF3F (se foi realizada a depleção da subunidade eIF3H). Nesta técnica é usado um anticorpo igG policlonal específico para a proteína que se pretende imunoprecipitar. Após incubação dos lisados com este anticorpo introduz-se no sistema “beads” de agarose de Proteína-G que conseguem reconhecer e ligarem-se especificamente às imunoglobulinas (anticorpo) levando à sua precipitação por gravidade devido a presença da agarose. Após precipitação da subunidade em estudo verificou-se através da técnica de Western Blot, quais as proteínas que foram co-imunoprecipitadas com a proteína em causa. Nesta técnica de imunoprecipitação a co-imunoprecipitação de proteínas pode ocorrer porque a proteína em estudo está em contacto directo entre as várias proteínas precipitadas ou porque as proteínas co-imunoprecipitadas estavam ligadas por exemplo ao RNA sendo arrastadas pela precipitação da proteína em estudo que por sua vez estaria também de alguma forma ligada ao mesmo RNA. Para esclarecer estas interações, a imunoprecipitação foi efectuada na presença ou ausência de RNases (Fig.12.A e B, linhas 5-8). Outro facto que pode levar a uma má interpretação dos resultados da imunoprecipitação é o caso em que as proteínas se liguem inespecificamente às “beads” de agarose (Fig.12.B, linha 4). Para evitar esse efeito os lisados foram incubados previamente com as “beads” e sem anticorpo, o que levou a que a maioria das proteínas que se ligavam às “beads” de agarose fosse removida do sistema antes da imunoprecipitação com o anticorpo específico (Fig.12.A, linha 3-4).

Após a IP analisaram-se as amostras com a técnica de Western Blot, utilizando vários anticorpos específicos para as proteínas em estudo (Fig.12 e 13):

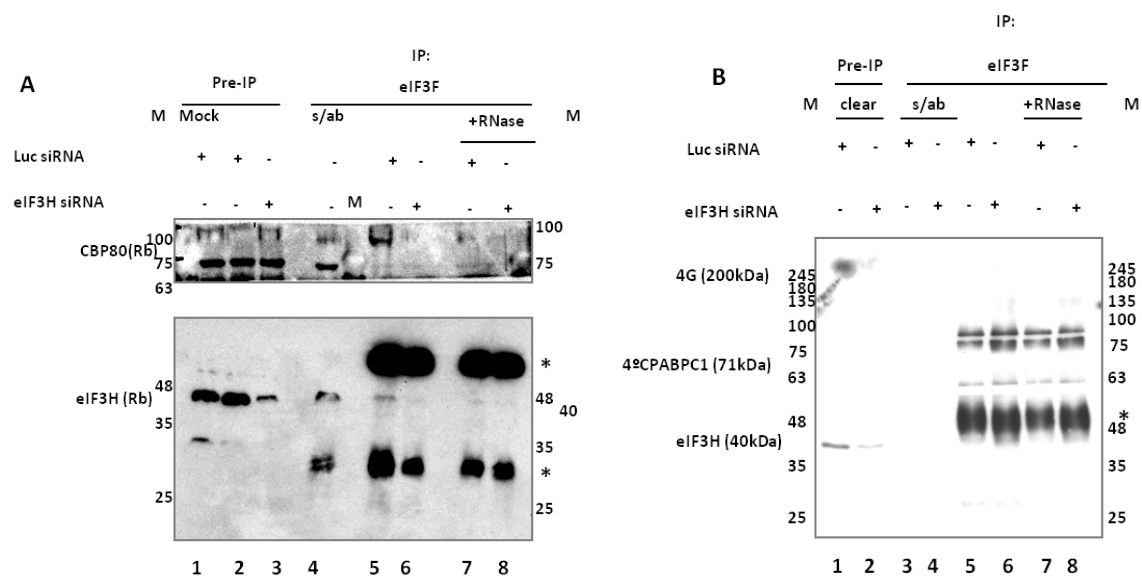


Fig.12: Imagens representativas de Western Blot realizado para detecção de várias proteínas nas amostras decorridas da experiência da imunoprecipitação onde se realizou a precipitação da subunidade eIF3F dos extractos celulares submetidos previamente à depleção da subunidade eIF3H. (A) Imunoprecipitação realizada sem incubação prévia das agarose “beads” com os extractos celulares. Tendo sido usados os anticorpos para a detecção por Western Blot do CBP80 (80kDa) e eIF3H (40kDa). (*) Cadeias pesadas e leves dos anticorpos (B) Imunoprecipitação realizada com incubação prévia das agarose-beads com os extractos celulares. Tendo sido usados os anticorpos para a detecção por Western Blot do eIF4G (200kDa), PABPC1 (71kDa) e eIF3H (40kDa).

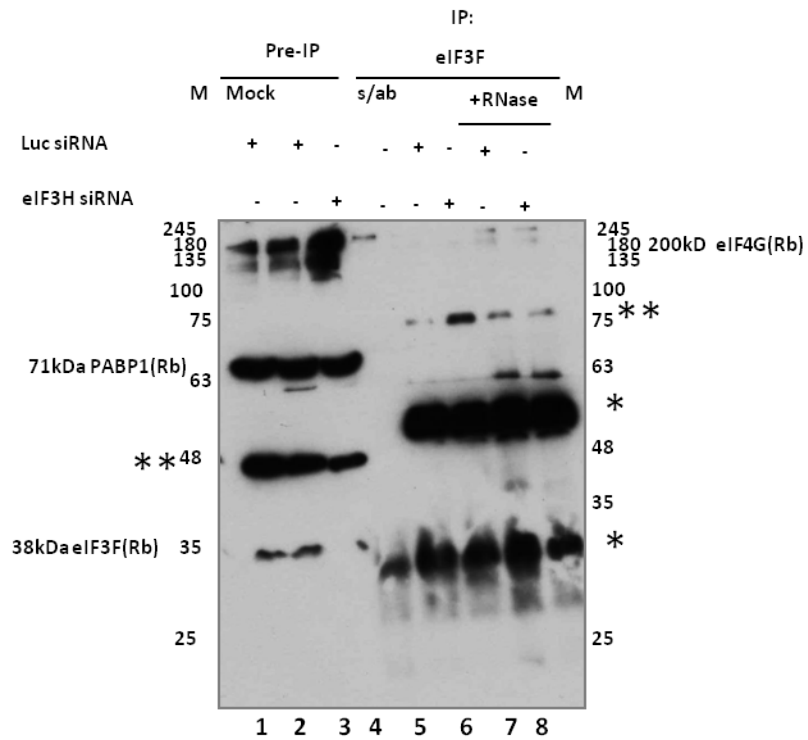


Fig.13: Western Blot realizado para detecção das proteínas eIF4G, PABPC1 e eIF3F nas amostras obtidas da experiência da imunoprecipitação onde se realizou a precipitação da subunidade eIF3F dos extratos celulares submetidos previamente à depleção da subunidade eIF3H. (*) cadeias pesadas e leves do anticorpo eIF3F. (**) Bandas inespecíficas.

Discussão:

Neste trabalho pretendeu-se, como objectivo principal, avaliar a implicação das subunidades e IF3F e eIF3H na interacção com e IF4G e o ribossoma. Com esse intuito, utilizaram-se genes modelo cuja expressão génica é bem conhecida permitindo um controlo adequado nas experiências subsequentes.

O primeiro passo consistiu na depleção da subunidade eIF3H e F recorrendo à técnica de siRNAs a qual apresentou uma eficiência de depleção das proteínas em estudo (eIF3H e 3F) à volta dos 80% (Fig.12.B, linha 2 e Fig.13 respectivamente). Como controlo de forma a avaliar o efeito que a técnica de siRNA, só por si, exerce nas células, foi utilizado oligonucleotido de siRNA tendo como alvo o RNA da luciferase, isto porque este RNA não existe nas células usadas não interferindo assim em nenhuma via metabólica das células HeLa. As imunoprecipitações realizadas nestes extractos celulares representam assim as condições normais da célula. Durante a realização da técnica de imunoprecipitação foi percebido que várias proteínas poderiam ligar-se inespecificamente às “beads” de agarose, indicando assim falso positivos na identificação por Western Blot das proteínas em estudo (Fig.12, linha 4 e Fig.13, linha 4). De forma a evitar a ocorrência destas interacções inespecificas, os extratos celulares foram previamente submetidos a uma incubação com “beads” de agarose acopladas à proteína G. Embora em alguns casos se tenha conseguido através desta incubação a eliminação da contaminação com proteínas que se ligavam inespecificamente às beads de agarose (Fig.12.B, linha 4) nem sempre foi eficaz (Fig.13, linha 4). De facto, umas das formas de evitar estas interacções inespecificas seria aumentarmos as forças iónicas no tampão de lise usado para lisar as células. Infelizmente, no nosso caso não foi possível aumentarmos a concentração do detergente usado para a lise das células, uma vez que em todas as IPs realizadas não foi possível detectar as proteínas de interesse (Fig.12 e 13 , linhas 5-8), demonstrando que a integridade dos complexos formados pelas proteínas a imunoprecipitar estava afectado, talvez devido às concentrações usadas de detergente no tampão de lise. Outra das razões pela qual não foram detectadas as proteínas imunoprecipitadas, poderá dever-se ao facto de estas terem sido perdidas durante as lavagens dos imunoprecipitados uma vez que poderá ter ocorrido um fraco reconhecimento das “beads” de agarose acopladas à proteína G ao anticorpo. Por outras palavras o compromisso entre uma imunoprecipitação sem interacções inespecificas e

simultaneamente mantendo as interações proteicas não foi conseguido. Uma forma de ultrapassar este problema seria realizar estas experiências na presença de um agente que fizesse uma ligação cruzada covalente (crosslinking) entre as várias proteínas. Desta forma poderíamos usar tampões com concentrações maiores de detergente de forma a evitar as contaminações com ligações inespecíficas e não interferindo com a integridade dos complexos proteicos a imunoprecipitar. Existem várias formas de se fazer o crosslinking de proteínas e que podem ser usados na técnica de imunoprecipitação. Dependendo do objectivo da imunoprecipitação, e dando somente alguns exemplos, poderá usar-se como agente de crosslinking: (1) Formaldeído-composto dipolar altamente reactivo que resulta na formação de crosslinks de proteína-ácido nucleico, proteína-proteína, sendo este crosslinking reversível; (2) Reagentes que marcam os resíduos sulfídricos das proteínas para uma posterior ligação covalente com biotina; (3) Luz ultravioleta que forma ligações covalentes irreversíveis entre proteínas e oligonucléotidos. Devido a constrangimentos de tempo não foi possível otimizar as imunoprecipitações recorrendo a estes agentes de crosslinking e continuar as experiências de forma a ver o efeito da depleção destas subunidades no mecanismo de NMD ao qual é sujeito mRNA β 39.

Bibliografia:

Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A (2008) Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* **453**(7199): 1276-1280

Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2006) Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* **20**(4): 391-398

Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, Sauliere J, Wittkopp N, Izaurralde E (2007) mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* **581**(15): 2845-2853

Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* **76**: 51-74

Choudhuri A, Evans T, Maitra U (2010) Non-core subunit eIF3h of translation initiation factor eIF3 regulates zebrafish embryonic development. *Dev Dyn* **239**(6): 1632-1644

Cuchalova L, Kouba T, Herrmannova A, Danyi I, Chiu WL, Valasek L (2010) The RNA recognition motif of eukaryotic translation initiation factor 3g (eIF3g) is required for resumption of scanning of posttermination ribosomes for reinitiation on GCN4 and together with eIF3i stimulates linear scanning. *Mol Cell Biol* **30**(19): 4671-4686

Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188–200

Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 827-835

He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A (2003) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell* **12**(6): 1439-1452

Hinnebusch AG (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N.; Hershey, J.W.B. and Mathews, M.B., eds.), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* **31**(10): 553-562

Holcik M, Pestova TV (2007) Translation mechanism and regulation: old players, new concepts. Meeting on translational control and non-coding RNA. *EMBO Rep* **8**(7): 639-643

Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* **21**(15): 1833-18

Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, Hentze MW, Kulozik AE (2008) Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* **27**(5): 736-747

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-127

Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, Ohno M, Dreyfuss G, Ohno S (2006) Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* **20**(3): 355-367

Kim BH, Cai X, Vaughn JN, von Arnim AG (2007) On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. *Genome Biol* **8**(4): R60

Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**(30): 19867-19870

Kozak M (2001) Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res* **29**(24): 5226-5232

Kuzmiak HA, Maquat LE (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* **12**(7): 306-316

Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ (2001) The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* **20**(17): 4987-4997

Livingstone M, Atas E, Meller A, Sonenberg N (2010) Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Phys Biol* **7**(2): 021001

Longman D, Plasterk RH, Johnstone IL, Caceres JF (2007) Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway. *Genes Dev* **21**(9): 1075-1085

Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H (2007) Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J* **26**(14): 3373-3383

Mittal, (2001) Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature*, **5**, 355-365

Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**(5740): 1514-1518

Nicholson P, Muhlemann O (2010) Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem Soc Trans* **38**(6): 1615-1620

Neu-Yilik G, Amthor B, Gehring NH, Bahri S, Paidassi H, Hentze MW, Kulozik AE (2011) Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human β -globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA*

McManus, M. T. & Sharp, P. A. (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Rev. Genet.* **3**, 737–747

Peixeiro I (2011), The role of mRNA translation on nonsense-mediated decay inhibition of transcripts carrying a short open reading frame, 31-67

Peixeiro I, Silva AL, Romao L (2011) Control of human beta-globin mRNA stability and its impact on beta-thalassemia phenotype. *Haematologica* **96**(6): 905-913

Pestova TV, Lorch, J.R., and Hellen, C.U.T. (2007) *The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In Translational control in biology and medicine. Michael B. Mathews, Nahum Sonenberg, John W.B. Hershey, eds., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**(2): 286-299

Ray A, Bandyopadhyay A, Matsumoto T, Deng H, Maitra U (2008) Fission yeast translation initiation factor 3 subunit eIF3h is not essential for global translation initiation, but deletion of eif3h+ affects spore formation. *Yeast* **25**(11): 809-823

Roy B, Vaughn JN, Kim BH, Zhou F, Gilchrist MA, Von Arnim AG (2010) The h subunit of eIF3 promotes reinitiation competence during translation of mRNAs harboring upstream open reading frames. *RNA* **16**(4): 748-761

Sharp, P. A. (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* **13**,139–141.

Silva AL, Pereira FJ, Morgado A, Kong J, Martins R, Faustino P, Liebhaber SA, Romao L (2006) The canonical UPF1-dependent nonsense-mediated mRNA decay is inhibited in transcripts carrying a short open reading frame independent of sequence context. *Rna* **12**(12): 2160-2170

Silva AL, Ribeiro P, Inacio A, Liebhaber SA, Romao L (2008) Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Rna* **14**(3): 563-576

Silva AL, Romao L (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett* **583**(3): 499-505

Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**(4): 731-745

Stalder L, Muhlemann O (2008) The meaning of nonsense. *Trends Cell Biol* **18**(7): 315-321

Weatherall DJ (2000) Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *BMJ* **321**(7269): 1117-1120

Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**(1): 135-140

Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, Schenauer MR, Yokoi-Fong T, Barsky D, Leary JA, Hershey JW, Doudna JA, Robinson CV (2008) Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18139-18144

Anexos:

-Soluções para o protocolo de Western Blot

SDS loading buffer 5x:

- Tris-HCl pH 6.8 0.2 M
- Glicerol 25%
- SDS 11.25%
- DTT 0.525 M
- Azul de Bromofenol 0.25%

Gel SDS de resolução a 12%:

- 2.2 mL Água destilada
- 1.25 mL Tris-HCl pH 8.8 1.5 M
- 1.5 mL Acrilamida 40%
- 50 µL SDS 10%
- 50 µL APS
- 2.5 µL TEMED

Gel SDS de concentração a 4%:

- 1.5 mL Água destilada
- 250 µL Tris-HCl pH 6.8 0.5 M
- 200 µL Acrilamida 40%
- 20 µL SDS 10%
- 40 µL APS
- 2 µL TEMED

Blott Buffer 25X

- 1,25g de SDS
- 145g de TRIS
- 72,5g de Glicina
- Água destilada até 1L

Blott Buffer 1X

- 40mL de Blott Buffer
- 200mL de Metanol
- Água destilada até 1L

TBS 10X:

- 151.25 g Tris
- 219 g NaCl
- Água destilada até 2.5 L
- HCl até atingir pH 7.6

TBS-Tween 1%

- 100mL TBS 10X
- 1000 µL Tween
- Água destilada até 1L

TBST 0,5%:

- 100 mL TBS 10X
- 500 µL Triton X 100 (Sigma)
- Água destilada até 1 L

TBST-milk 5%:

- 2.5 g Leite em pó (Molico - Nestlé)
- TBST até 50 mL

Solução ECL 1:

- 980 µL de Tris-HCl pH 8.8 100 mM
- 5 µL Ácido cumárico (Sigma)
- 15 µL Luminol (Fluka)

Solução ECL 2:

- 1 mL de Tris-HCl pH 8.8 100 mM
- 3 µL Peróxido de Hidrogénio

Solução Lysis/Binding/Washing Buffer usada na IP:

-1M TRIS-HCl pH 7,5	750 µL [50mM]
-5M NaCl	600 µL [100mM]
-1M MgCl ₂	750 µL [10mM]
-10% NP40	15 µL [0,1%]
-100x Proteinase inhibitor	150 µL
H ₂ O	12735 µL

Sequência dos primers usados na amplificação dos plasmídeos por PCR:

5'UTR: 5' ACATTTGCTTCTGACACAAC 3'

3'UTR: 5'ATAAAAAACATTTATTTTCATTGC 3'

Sequência dos siRNAs usados:

eIF3F: GUGAAGGAGAAAUGGGUUUdTdT

eIF3H:AAACCCAUUUCUCCUUCACdTdT

Anticorpo:

eIF4G- ABCAM, Rabbit Polyclonal

eIF3H- Cell Signalling, Rabbit IgG monoclonal

eIF3F- ABCAM, Rabbit Polyclonal

PABPC1- Cell Signalling, Rabbit Polyclonal

