

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



# **Envolvimento da ribonuclease humana Dis3L1 em processos de controlo de qualidade da expressão génica**

**David João Clara da Cruz**

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



# **Envolvimento da ribonuclease humana Dis3L1 em processos de controlo de qualidade da expressão génica**

**David João Clara da Cruz**

Dissertação orientada por:

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

Professora Doutora Deodália Dias (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

## **Agradecimentos**

A realização do trabalho apresentado nas páginas seguintes foi possível graças à disponibilidade e ajuda de várias pessoas e instituições, de modo que aproveito este espaço para prestar a todos os intervenientes os meus sinceros agradecimentos.

Ao Doutor João Lavinha, responsável da Unidade de I&D do Departamento de Genética, que autorizou a realização deste trabalho e a minha integração no grupo das Hemoglobinopatias I assim como ao Doutor José Pereira Miguel, Presidente do Conselho Directivo do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

À Doutora Luísa Romão Loison, por me ter aceitado no seu laboratório de Hemoglobinopatias I integrado na Unidade de I&D do Departamento de Genética do INSA, no qual tive a oportunidade de realizar este trabalho, e de adquirir novos conhecimentos e competências e também pela sua disponibilidade e orientação ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Deodália Dias, pertencente ao Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela ajuda, disponibilidade e orientação prestadas ao longo da execução deste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório: ao Doutor Alexandre Teixeira, que me guiou sabiamente ao longo deste percurso e cuja ajuda foi imprescindível na execução deste trabalho; à Ana Ramos por ter sido uma grande amiga, companhia e conselheira ao longo dos muitos dias e horas passadas no laboratório, à Isabel Peixeiro, à Cristina Barbosa, à Ana Morgado e à Rafaela Lacerda pela amizade e por tornarem mais divertidos os dias passados no laboratório. Agradeço a todos por me terem acolhido na equipa e sinto-me grato por toda a ajuda e dicas que me ofereceram, pelas importantes contribuições que fizeram para o meu trabalho e por estarem presentes e partilharem dos meus sucessos e insucessos.

Também quero agradecer a todos os colegas do grupo de Hemoglobinopatias II, que foram sempre prestáveis e bons amigos, e cuja companhia nas horas de intervalo foi sempre muito agradável. De igual forma quero agradecer a todos os colegas do grupo de Oncobiologia que sempre estiveram disponíveis para me ajudar.

É também importante agradecer a todos os meus familiares em especial aos meus pais pelo apoio que deram e pelo sacrifício realizado para que eu pudesse concluir esta fase da minha vida académica.

De igual modo desejo agradecer a todos os meus amigos, em especial ao Paulo, à Sónia e à Alexandra, por estarem sempre disponíveis quando eu precisei, por me terem aturado nos momentos menos bons e terem-me dado força para continuar. Também aos meus inúmeros colegas de mestrado que são os melhores colegas que alguma vez poderia desejar, obrigado a todos por serem fantásticos.

Muito Obrigado a todos!

## Resumo

A expressão génica nos eucariotas envolve um número de etapas interligadas desde a transcrição do material genético até à tradução em proteína, sendo os RNAs mensageiros (mRNAs) os intermediários chave ao longo deste processo. Embora a complexidade da expressão génica dos eucariotas permita um controlo da produção proteica a vários níveis, também torna este processo vulnerável a erros. As células eucariotas desenvolveram mecanismos elaborados de controlo de qualidade do mRNA que asseguram a fidelidade da expressão génica através da detecção e degradação de transcritos anómalos. Como exemplo destes mecanismos de controlo de qualidade temos: o NMD (*Nonsense-mediated mRNA Decay*), que reconhece e elimina mRNAs que contenham codões prematuros de terminação da tradução, e o NSD (*Nonstop mRNA Decay*) que elimina mRNAs que não possuem codões de terminação em fase na grelha de leitura. O exossoma é um complexo proteico evolutivamente conservado que possui actividade ribonucleolítica e que se encontra presente tanto no núcleo como no citoplasma das células eucariotas. Uma das várias funções do exossoma é participar na degradação de mRNAs anómalos portadores de mutações *nonsense* ou de mutações *nonstop*. Como consequência da recente identificação de uma nova ribonuclease, a hDis3L1, como parte integrante do exossoma, este trabalho teve como objectivo avaliar o envolvimento desta subunidade do exossoma humano na degradação inerente ao NMD e ao NSD. Para tal, usaram-se variantes do gene da  $\beta$ -globina humana: um gene portador de mutação *nonsense* e sensível ao mecanismo de NMD ( $\beta$ 39, com uma mutação nonsense no codão 39), um gene sem qualquer codão de terminação em fase ( $\beta$ *nonstop*) e o correspondente gene normal ( $\beta$ n), como genes modelo. Estes genes clonados em vectores de expressão foram usados para transfectar transitoriamente células HeLa em cultura. Simultaneamente, foram realizados testes de *RNA interference* (RNAi) através da transfecção de *small interference RNAs* (siRNAs) específicos para o transcrito que codifica hDis3L1 e, como controlo, siRNAs para um transcrito não específico (luciferase). Nestas condições de inibição da expressão da hDis3L1 ou em condições normais, as células em cultura foram colhidas para extracção do RNA total. O nível de mRNA das globinas foi quantificado por *RT-qPCR* (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*), enquanto que o nível de inibição da expressão de cada transcrito sujeito a RNAi foi avaliado por *RT-PCR* (*semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*). Em condições de baixa expressão de hDis3L1 na célula, pretendeu-se verificar se os transcritos  $\beta$ 39 e  $\beta$ *nonstop* aumentam de expressão, o que indicaria que o mecanismo de NMD e/ou o mecanismo de NSD ficariam inibidos, sugerindo que a ribonuclease hDis3L1 estaria envolvida no processo de degradação de transcritos com mutações *nonsense* ou *nonstop*, respectivamente. De facto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a hDis3L1 participa no mecanismo de NMD, uma vez que se verificou um aumento dos níveis de transcritos *nonsense* aquando da inibição da hDis3L1. Por outro lado, sugerem também que a hDis3L1 não participa no mecanismo de NSD, uma vez que não se verificaram alterações nos níveis dos transcritos *nonstop* em condições de inibição desta subunidade do exossoma. Estes resultados contribuem assim para melhor compreender estes processos de degradação envolvidos no controlo de qualidade da expressão génica e podem contribuir para um possível desenvolvimento de ferramentas específicas para a manipulação do processo de NMD, o qual pode levar ao estabelecimento de terapias específicas direccionadas a patologias, como cancro e muitas doenças genéticas, associadas a este tipo de mutações *nonsense*.

Palavras-chave: Exossoma; hDis3L1; *Nonsense-mediated mRNA Decay*; *Nonstop mRNA Decay*

## **Abstract**

Eukaryotic gene expression involves a series of interconnected steps from transcription to protein synthesis, in which mRNAs are the key mediators along this process. Even though eukaryotic gene expression complexity allows a tight control of protein production at several levels, it also makes this process vulnerable to errors that can occur along the mechanism. Eukaryotic cells have developed elaborated mechanisms of mRNA quality control that ensure genetic expression fidelity through detection and degradation of faulty transcripts. Two examples of these mRNA quality control mechanisms are the NMD (*Nonsense-mediated mRNA Decay*), which can recognise and degrade mRNA with premature stop codons, and the NSD (*Nonstop mRNA Decay*) which degrades mRNAs without any in frame termination codons. The exosome is an evolutionarily conserved protein complex that possesses a ribonucleolytic activity and that is present in the nucleus as well as in the cytoplasm of eukaryotic cells. One of the exosome's several functions is participating in the degradation of abnormal mRNAs carrying nonsense mutations or nonstop mutations. As a result of the recent identification of a novel ribonuclease, hDis3L1, as an integrated part of the exosome, this work aimed to assess the involvement of this human exosome's subunit involvement in the degradation intrinsic to NMD and to NSD. In order to achieve that, several variants of the human  $\beta$ -globin gene were used: a gene carrying a nonsense mutation ( $\beta^{39}$ , with a nonsense mutation at codon 39), a gene without any in frame termination codons ( $\beta^{\text{nonstop}}$ ) and the respective wild-type gene ( $\beta^{\text{n}}$ ), as reporter genes. These genes which were cloned on expression vectors were used to transiently transfect HeLa cells in culture. Simultaneously, small interference RNAs (siRNAs) specific for the transcript coding the hDis3L1 and siRNAs for a non-specific transcript (luciferase), as a control, were also transiently transfected. For these conditions of expression inhibition of hDis3L1 or in normal conditions, cells in culture were harvested to extract total RNA. The globin mRNA levels were quantified by RT-qPCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), while the inhibition of expression of each of the proteins subjected to RNAi was evaluated through RT-PCR (semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). At hDis3L1 low expression conditions, it was assessed if NMD or NSD would be inhibited, suggesting that ribonuclease hDis3L1 would be involved in the degradation mechanism of transcripts carrying nonsense or nonstop mutations, respectively. In fact, the results obtained in this work suggest that hDis3L1 takes part in NMD, since an increase in nonsense transcript levels was seen when the hDis3L1 subunit is inhibited. Our results also suggest that hDis3L1 does not take part in NSD, since changes in nonstop transcript levels were not observed when this subunit was inhibited compared to normal conditions. These results contribute therefore for a better understanding of these mechanisms of mRNA degradation involved in gene expression quality control. Also, they provide aid for a possible future development of specific tools for NMD manipulation, which present a promising role in the establishment of specific therapies directed to pathologies, like cancer and many genetic diseases, associated to nonsense mutations.

Keywords: Exosome; hDis3L1; *Nonsense-mediated mRNA Decay*; *Nonstop mRNA Decay*

## Abreviaturas

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>A</b>                | Adenina   |
| <b>APS</b>              | Persulfato de Amónia ( <i>Ammonium persulfate</i> )   |
| <b>ARE</b>              | Sequências ricas em nucleótidos AU ( <i>AU-rich Elements</i> )                                |
| <b>ATP</b>              | Adenosina trifosfato ( <i>Adenosine-5'-triphosphate</i> )                                     |
| <b>BSA</b>              | Albumina de soro bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )                                       |
| <b>C</b>                | Citosina  |
| <b>CBC</b>              | Complexo de ligação ao <i>Cap</i> ( <i>Cap-Binding Complex</i> )                              |
| <b>CBP</b>              | Proteína de ligação ao <i>Cap</i> ( <i>Cap Binding Protein</i> )                              |
| <b>cDNA</b>             | DNA complementar ( <i>complementary DNA</i> )   |
| <b>cF</b>               | Concentração Final  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>   | Dióxido de carbono  |
| <b>C-terminal</b>       | Carboxi-terminal  |
| <b>CTP</b>              | Codão de Terminação da tradução Prematuro   |
| <b>DCP</b>              | <i>mRNA-decapping enzyme</i>  |
| <b>ddNTP</b>            | Didesoxirribonucleótido   |
| <b>DH5α</b>             | Estirpe de bactérias <i>Escherichia coli</i>  |
| <b>DMD</b>              | Distrofia Muscular de Duchenne ( <i>Duchenne Muscular Dystrophy</i> )                         |
| <b>DMEM</b>             | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>   |
| <b>DNA</b>              | Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )                                    |
| <b>dNTP</b>             | Desoxirribonucleótido   |
| <b>DTT</b>              | Ditiotreitol ( <i>Dithiothreitol</i> )  |
| <b>EDTA</b>             | Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )                 |
| <b>eIF</b>              | Factor eucariota de iniciação da tradução ( <i>eukaryotic translation Initiation Factor</i> ) |
| <b>EJC</b>              | <i>Exon Junction Complex</i>  |
| <b>eRF</b>              | Factor eucariota de terminação da tradução ( <i>eukaryotic translation Release Factor</i> )   |
| <b>FBS</b>              | Soro fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )   |
| <b>G</b>                | Guanina   |
| <b>GTP</b>              | Guanosina trifosfato ( <i>Guanosine triphosphate</i> )  |
| <b>HCl</b>              | Ácido clorídrico  |
| <b>HeLa</b>             | Linha celular humana derivada do carcinoma cervical   |
| <b>HFE</b>              | <i>High Fe</i>  |
| <b>LB</b>               | Luria-Bertani Broth   |
| <b>local A</b>          | Local aminoacilo ( <i>aminoacyl site</i> )  |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>  | Ião Magnésio <sup>2+</sup>  |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Cloreto de magnésio   |
| <b>mRNA</b>             | RNA mensageiro  |
| <b>NGD</b>              | <i>No-go mRNA Decay</i>   |
| <b>NMD</b>              | Dcaimento do mRNA <i>nonsense</i> ( <i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i> )                     |
| <b>NP40</b>             | <i>Nonylphenylpolyethylene glycol</i>   |
| <b>NSD</b>              | Dcaimento do mRNA <i>nonstop</i> ( <i>Nonstop mRNA Decay</i> )                                |
| <b>N-terminal</b>       | Amino-terminal  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>ORF</b>      | Grelha de leitura ( <i>Open Reading Frame</i> )                                    |
| <b>PABP</b>     | Proteína de ligação à cauda poliadenilada ( <i>Poly(A)-Binding Protein</i> )       |
| <b>PABPC1</b>   | PABP 1 citoplasmática  |
| <b>P-bodies</b> | Corpos de processamento ( <i>Processing bodies</i> )                               |
| <b>PBS</b>      | Solução salina de tampão fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )              |
| <b>PCR</b>      | Reacção em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )               |
| <b>PIN</b>      | <i>PilT N-terminus</i>   |
| <b>PP2A</b>     | Proteína fosfatase 2A ( <i>Protein Phosphatase 2A</i> )                            |
| <b>RNA</b>      | Ácido Ribonucleico   |
| <b>RNB</b>      | Domínio catalítico da Ribonuclease II  |
| <b>rpm</b>      | Rotações por minuto  |
| <b>rRNA</b>     | RNA ribossómico  |
| <b>Rrp</b>      | <i>Ribosomal RNA-processing protein</i>  |
| <b>RT-PCR</b>   | Semi-quantitative <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>           |
| <b>RT-qPCR</b>  | <i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>                |
| <b>SDS</b>      | Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )                         |
| <b>SDS-PAGE</b> | <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>                   |
| <b>siRNA</b>    | <i>small interference RNAs</i>   |
| <b>SMG</b>      | <i>Suppressor with morphogenetic effect on genitalia</i>                           |
| <b>snoRNA</b>   | <i>small nucleolar RNA</i>   |
| <b>snRNA</b>    | <i>small nuclear RNA</i>   |
| <b>T</b>        | Timina   |
| <b>TBS</b>      | <i>Tris-Buffered Saline</i>  |
| <b>TBST</b>     | <i>Tris-Buffered Saline TritonX-100</i>  |
| <b>TEMED</b>    | N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina ( <i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i> ) |
| <b>tmRNA</b>    | <i>RNA mensageiro de transferência (transfer-messenger RNA)</i>                    |
| <b>Tris</b>     | Tris(hidroximetil)aminometano ( <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> )           |
| <b>tRNA</b>     | RNA de transferência   |
| <b>U</b>        | Uracilo  |
| <b>UPF</b>      | <i>Up- Frameshift</i>  |
| <b>UTR</b>      | Região transcrita mas não traduzida do mRNA ( <i>Untranslated Region</i> )         |

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Agradecimentos</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Resumo</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Abstract</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Abreviaturas</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Introdução</b>   |           |
| 1. Expressão Génica nos Eucariotas  | 9         |
| 2. <i>Nonsense-Mediated mRNA Decay</i> (NMD)                              | 9         |
| 2.1 Regulação Fisiológica da Expressão Génica pelo NMD                    | 9         |
| 2.2 Origem dos CTPs   | 10        |
| 2.3 Reconhecimento de CTPs  | 10        |
| 2.4 <i>Exon-Junction Complex</i> (EJC)                                    | 12        |
| 2.5 Primeira Ronda da Tradução  | 12        |
| 2.6 Principais Proteínas Envolvidas no NMD                                | 13        |
| 2.7 Activação do NMD  | 13        |
| 2.8 Influência da Proteína de Ligação à Cauda Poliadenilada (PABP) no NMD | 14        |
| 2.9 Mecanismos de Degradação do mRNA <i>Nonsense</i>                      | 15        |
| 2.10 Localização Subcelular do NMD  | 17        |
| 2.11 Perspectivas Clínicas do NMD   | 18        |
| 3. <i>Nonstop mRNA Decay</i> (NSD)  | 19        |
| 3.1 Origem dos Transcritos <i>Nonstop</i>                                 | 19        |
| 3.2 NSD em Eubactérias e Leveduras  | 20        |
| 3.3 NSD em Mamíferos  | 20        |
| 4. O Exossoma Eucariótico   | 22        |
| 4.1 Funções do Exossoma na Célula   | 23        |
| 4.2 Estrutura do Exossoma   | 23        |
| <b>Objectivo</b>  | <b>27</b> |
| <b>Materiais e Métodos</b>  |           |
| Clonagem e Amplificação de Vectores de Expressão                          | 28        |
| Reacção de Sequenciação   | 28        |
| Cultura Celular   | 29        |
| Transfecção de siRNAs   | 29        |
| Extracção de RNA  | 30        |
| Síntese de cDNAs  | 30        |
| RT-PCR  | 31        |
| RT-qPCR   | 31        |
| Western Blot  | 32        |



|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>Resultados</b>   | <b>33</b> |
| <b>Discussão</b>    | <b>39</b> |
| <b>Bibliografia</b> | <b>42</b> |
| <b>Anexos</b>       | <b>46</b> |

## **Introdução**

### **1. Expressão Génica nos Eucariotas**

A expressão génica nos eucariotas envolve um número de etapas interligadas desde a transcrição do material genético até à síntese proteica, sendo os RNAs mensageiros (mRNAs) os intermediários chave ao longo deste processo. A informação genética armazenada nas moléculas de DNA em forma de genes, é transcrita para uma molécula intermédia chamada de precursor do mRNA (pré-mRNA) através de um mecanismo conhecido como transcrição. Durante este processo o pré-mRNA é sujeito a um processamento de maturação através da remoção de intrões (*splicing*), adição da estrutura *cap* na região 5' do transcrito e adição da cauda poliadenilada na região 3', dando origem ao mRNA. Uma vez processado, este é exportado para o citoplasma onde é traduzido em proteína e finalmente degradado [1,2]. Actualmente encontra-se estabelecido que a maior parte, se não todos, os passos da via de expressão génica podem ser alvos de regulação génica [1].

Embora a complexidade da expressão génica dos eucariotas permita um controlo da produção proteica a vários níveis, também torna este processo vulnerável a erros, os quais podem ocorrer em qualquer um dos passos acima referidos. No entanto, as células eucariotas desenvolveram mecanismos elaborados de controlo de qualidade do mRNA que asseguram a fidelidade da expressão génica através da detecção e degradação de transcritos anómalos [1,3]. Estes mecanismos de controlo, também designados de vigilância, operam tanto no núcleo como no citoplasma das células. Por exemplo, mRNAs incorrectamente processados são degradados por mecanismos de vigilância do mRNA no núcleo antes de serem exportados para o citoplasma [4]. No citoplasma, mecanismos de controlo de qualidade degradam mRNAs que possuam codões de terminação da tradução prematuros (CTPs) pela via de *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD), ou mRNAs que não possuam codões de terminação da tradução em fase pela via de *NonStop mRNA Decay* (NSD), impedindo assim a acumulação de péptidos potencialmente tóxicos para as células [1].

Para além dos mecanismos acima referidos existem outros sistemas de controlo de qualidade do RNA ao nível do citoplasma. Alguns exemplos conhecidos são o *Rapid tRNA Decay* (RTD) que tem como alvo tRNAs com modificações incorrectas, o *Nonfunctional rRNA Decay* (NRD) responsável pela degradação de RNAs ribossomais com defeitos funcionais, o mecanismo de *No-Go Decay* (NGD) que degrada transcritos cuja fase de alongamento da tradução se encontra bloqueada e o *Ribosome Extension-mediated Decay* (REMD) que tem como alvo transcritos cuja tradução prossegue para além do codão de terminação na 3'UTR (*Untranslated region*) [5]. Apesar da imensa variedade de mecanismos de controlo de qualidade da expressão génica nas células eucariotas, nesta dissertação vão ser realçados apenas dois destes mecanismos: o NMD e o NSD.

### **2. *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD)**

O NMD é o mecanismo de controlo de qualidade da expressão génica de eucariotas melhor estudado. No entanto, ainda existem muitas particularidades deste sistema que não são ainda conhecidas. Este mecanismo de vigilância pós-transcricional existe em todas as células eucariotas estudadas e usa uma rede elaborada de processos nucleares e citoplasmáticos para reconhecer e eliminar mRNAs que contenham codões de terminação da tradução prematuros, também designados de codões *nonsense*. De outro modo, a tradução de transcritos que contivessem CTPs resultaria na produção de proteínas não funcionais que poderiam adquirir um ganho de função deletério ou um efeito dominante negativo [6,7,8].

#### **2.1 Regulação Fisiológica da Expressão Génica pelo NMD**

Em adição ao seu papel na regulação e eliminação de transcritos anómalos, o NMD também é capaz de modular a expressão de muitos genes cujos mRNAs ocorrem naturalmente

e não contêm CTPs, mas que possuem características reconhecidas pela maquinaria de vigilância e de influenciar vários processos celulares, os quais podem usar o NMD para ajustar a expressão proteica para as necessidades fisiológicas da célula [1,7,9,10,11,12]. Assim, alguns exemplos destes processos celulares nos quais os transcritos fisiológicos regulados pelo NMD estão envolvidos são a manutenção dos telómeros, o ciclo celular, a transcrição, o crescimento celular, o transporte intracelular e a reparação e metabolismo do DNA. Em geral, o NMD parece regular a expressão de cerca de 3% a 10% do transcriptoma dos organismos no qual foi estudado [6,9,10,13].

## 2.2 Origem dos CTPs

Os CTPs podem surgir como resultado de mutações *nonsense* e *frameshift* pontuais na sequência de DNA, de erros de transcrição e de eventos anómalos de *splicing*, entre outras. Transcritos que apresentem uma uORF (*upstream Open Reading Frame*), que contenham codões UGA que codificam a selenocisteína, que contenham um intrão na região 3'UTR, ou que sejam codificados por transposões ou retrovírus podem ser reconhecidos como transcritos portadores de CTPs. Os codões *nonsense* podem também surgir como resultado de *splicing* alternativo ou erros de *splicing*, nos quais existe produção de um codão *nonsense* derivado de um intrão ou uma mudança na grelha de leitura que cria a jusante um CTP. Alguns genes, tais como os receptores das células T e os genes das imunoglobulinas, são sujeitos a rearranjos programados do DNA de modo a multiplicar a sua variedade de receptores antigénicos. Dois terços destes rearranjos criam uma mudança na grelha de leitura que pode originar um CTP numa posição a jusante [2,3,9,14].

## 2.3 Reconhecimento de CTPs

Para assegurar o controlo de qualidade apropriado do mRNA, a maquinaria de NMD tem de distinguir entre codões de terminação prematuros e fisiológicos. O mecanismo usado para esta discriminação é ainda apenas parcialmente entendido. A capacidade de um codão *nonsense* desencadear uma degradação rápida do mRNA depende da sua localização relativamente a elementos da sequência a jusante e proteínas associadas [9].

O efeito de posição no reconhecimento de um CTP é evidente em células de mamífero, nas quais os CTPs localizados no exão mais próximo da extremidade 3' ou na parte 3' do penúltimo exão, normalmente não activam o NMD, enquanto que CTPs localizados mais a montante fazem com que o transcrito mutado sofra uma rápida degradação [8,15,16].

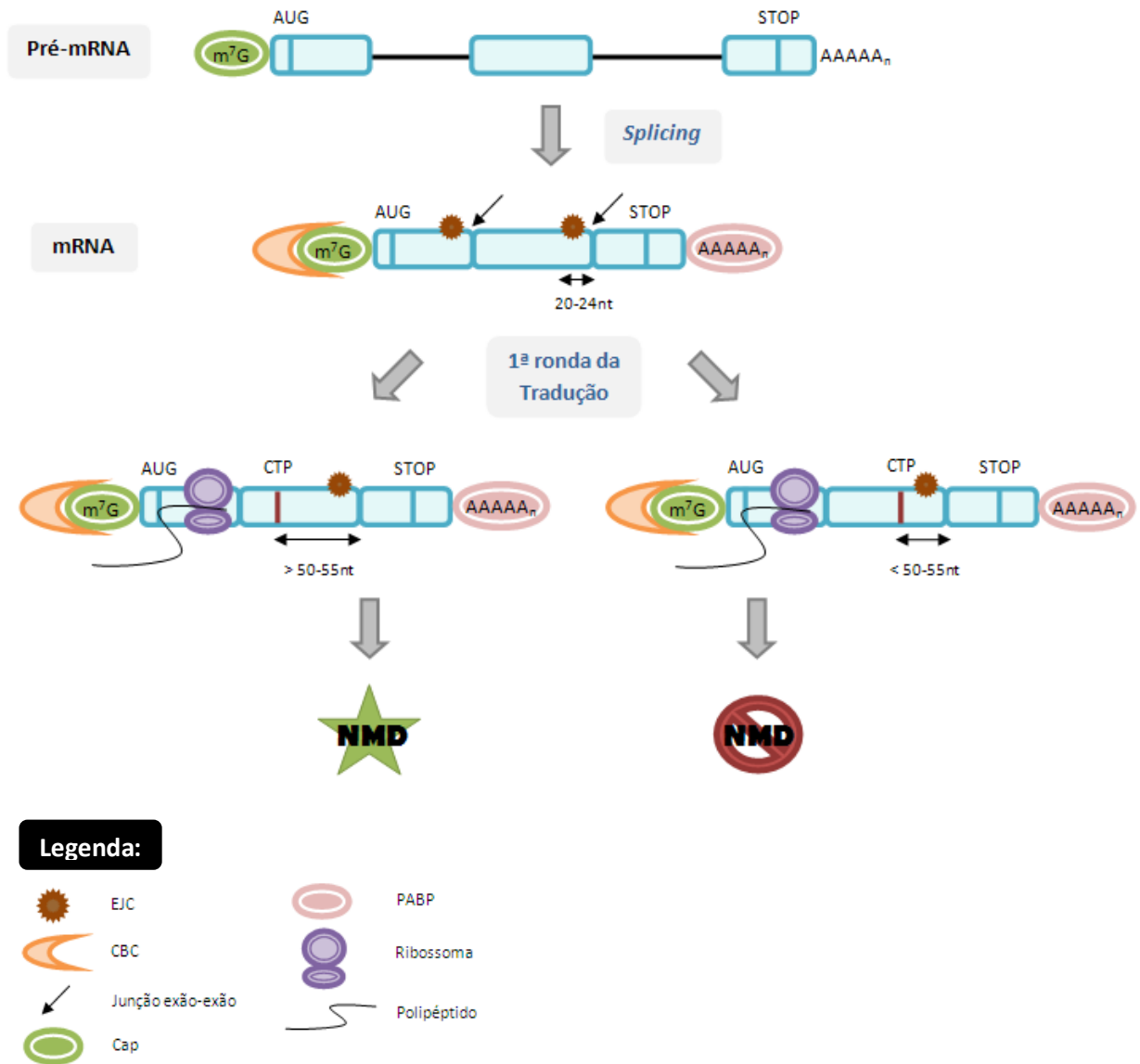
Durante o *splicing* do pré-mRNA (remoção de intrões não codificantes e ligação dos exões), um complexo multiproteico denominado *exon-junction complex* (EJC) é depositado 20-24 nucleótidos a montante das junções exão-exão e mantém-se associado ao mRNA durante a exportação para o citoplasma e iniciação da tradução. Para além de vários outros factores, os EJCs recrutam proteínas *up-frameshift* (UPF), as quais são necessárias para o NMD. Se pelo menos um EJC estiver localizado a jusante do codão de terminação da tradução, ele funcionará como um ponto de referência espacial para a discriminação entre uma paragem prematura ou fisiológica [12,15,16,17].

Geralmente, os codões *nonsense* localizados mais do que 50-55 nucleótidos a montante da última junção exão-exão activam o NMD. A jusante desta fronteira ou num transcrito que não sofreu *splicing* (não tendo ocorrido, portanto, a deposição dos EJCs), um codão *stop* é considerado normal e o mRNA é preservado (ver Figura 1). O facto de a maioria dos codões de terminação naturais se encontrarem no exão final do transcrito está de acordo com esta regra geral [7,16].

Acredita-se que os ribossomas são capazes de remover os EJCs que vão encontrando durante a fase de alongamento da tradução. Quando a tradução termina num codão *nonsense* situado a mais de 50-55 nucleótidos a montante da junção exão-exão, o ribossoma não terá progredido o suficiente ao longo do mRNA para remover o EJC depositado perto dessa junção. Por outro lado, pensa-se que um ribossoma que tenha alcançado um codão *nonsense*

localizado a uma distância igual ou menor que 50-55 nucleótidos a montante da última junção exão-exão ou que se encontre a jusante desta mesma junção, remove o EJC [18].

No entanto, tem-se verificado que transcritos com mutações *nonsense* apresentam uma sensibilidade baixa ao NMD quando o CTP se encontra próximo da extremidade 5' da ORF. Em alguns casos isto resulta de uma reiniciação da tradução num AUG a jusante, mas noutros, o mecanismo de inibição do NMD parece envolver a proximidade do CTP ao AUG iniciador [19].



**Figura 1** – Modelo de reconhecimento de CTPs em mamíferos. O pré-mRNA é processado, através da excisão dos intrões. Os exões são ligados entre si e um EJC é depositado 20-24 nucleótidos a montante de cada junção exão-exão, o mRNA é protegido a 5' e 3' pelo CBC e pela PABP, respectivamente. Na primeira ronda da tradução o ribossoma percorre o mRNA *nonsense*, servindo o EJC como um marcador que permite distinguir um codão de terminação prematuro de um codão de terminação fisiológico. Geralmente, CTPs localizados a mais de 50-55 nucleótidos de distância da junção exão-exão activam o mecanismo de NMD enquanto que CTPs localizados a menos de 50-55 nucleótidos da junção ou localizados a jusante desta mesma junção não activam o NMD.

## 2.4 Exon-Junction Complex (EJC)

Uma característica exclusiva do NMD nos mamíferos é o envolvimento do EJC. Este complexo proteico de cerca de 350 kDa é composto por vários factores. O EJC é uma estrutura dinâmica que se associa com o mRNA no núcleo e a ele mantém-se ligado, mas que modifica a sua composição proteica ao longo do processamento do mRNA, exportação do mesmo para o citoplasma e na sua tradução. Os componentes principais do EJC são as proteínas eIF4III, MAGOH, Y14 e MLN51, que funcionam de plataforma para a montagem e desmontagem dinâmica de muitos factores nucleares e citoplasmáticos adicionais que desempenham funções no transporte, localização subcelular, tradução e degradação do mRNA. Dos muitos componentes adicionais do EJC é de destacar os factores de NMD: UPF2, UPF3a e UPF3b [2,15,17,20].

Os factores do EJC são recrutados e libertados do mRNA em diferentes momentos. De facto, algumas proteínas do EJC associam-se ao pré-mRNA ainda antes do mecanismo de *splicing*. A UPF3b assume-se que se mantém ligada ao mRNA e recruta a UPF2 durante ou pouco depois da exportação do mRNA para o lado citoplasmático do poro nuclear. Algumas proteínas do EJC, tais como a RNPS1, dissociam-se durante ou pouco tempo depois da exportação do mRNA para o citoplasma. Outras, tais como o heterodímero Y14:MAGOH, provavelmente mantêm-se associadas com o mRNA até o ribossoma removê-las durante a primeira ronda da tradução. Permanece ainda pouco claro se o ribossoma apenas remove fisicamente o EJC ou se também o transforma bioquimicamente para facilitar a sua dissociação. No entanto, a fosforilação de Y14 parece ser necessária para a dissociação de alguns factores do EJC [15].

Vários trabalhos indicam que a tradução nas células de mamífero é estimulada pelos factores do EJC: UPF2, UPF3a, UPF3b, RNPS1, Y14 e MAGOH. Tem sido sugerido por alguns autores que o EJC não é necessário para a identificação de CTPs em mamíferos mas que simplesmente funciona como um *enhancer* do NMD. Apesar de se ter demonstrado o papel de vários factores do EJC no NMD dos mamíferos, a activação desta via pode ocorrer independentemente de alguns destes componentes, uma vez que já foi demonstrado que o NMD pode ocorrer independente de factores como a UPF2, UPF3, RNPS1 ou MLN51 [9,10,13,20].

## 2.5 Primeira Ronda da Tradução

De modo a impedir uma elevada produção de proteínas incompletas e potencialmente prejudiciais, as vias de controlo de qualidade têm de possuir mecanismos que reconheçam e eliminem rapidamente transcritos anormais. Assim, os CTPs têm que ser identificados e os respectivos mRNAs degradados durante as primeiras rondas de tradução [18,19].

As células de mamífero parecem utilizar a primeira ronda de tradução para controlo de qualidade e as rondas seguintes para síntese proteica. De facto, vários estudos sugerem que apenas os mRNAs ligados ao *cap-binding complex* (CBC) constituem alvos do NMD [18,19,21].

O CBC é um heterodímero composto por duas subunidades de proteínas de ligação ao *cap* (CBP, *Cap Binding Protein*) – a CBP20 e a CBP80 – que são acopladas à estrutura *cap* dos pré-mRNAs durante a transcrição. Os CBCs promovem o *splicing* e mantêm-se ligados aos mRNAs durante a exportação e até ao início da tradução. Uma vez no citoplasma, as CBPs nucleares são substituídas pelo factor de iniciação da tradução eIF4E e os transcritos tornam-se insensíveis ao NMD. Para além disso, foi sugerido que a CPB80 interage com a UPF1 e promove a interacção entre UPF1 e UPF2 estimulando assim o NMD. Esta observação indica que a presença de CPB80 pode ser necessária para activar o NMD em mamíferos, o qual só pode ocorrer na designada “primeira ronda de tradução” [7,19,21,22].

## 2.6 Principais Proteínas Envolvidas no NMD

Várias proteínas têm sido descritas como essenciais para o mecanismo de NMD. As proteínas UPF fazem parte do âmbito deste mecanismo. Foram originalmente descobertas em *Saccharomyces cerevisiae* e foram identificadas posteriormente nos eucariotas superiores. As proteínas SMG (*supressor with morphogenetic effects on genitalia*) são também factores fundamentais do NMD, ao regularem a actividade da UPF1, tendo sido inicialmente identificadas em *Caenorhabditis elegans* [3,9,22].

A complexa fosfoproteína UPF1 apresenta múltiplos domínios e é recrutada para os mRNAs quando se dá a terminação da tradução, onde interage com os factores eucariotas de terminação eRF1 e eRF3 (*eucaryotic Release Factor 1 e 3*, respectivamente). A UPF1 também interage com a UPF2 e com a proteína de ligação ao *cap*, CBP80. Possui actividade de ATPase dependente de RNA/DNA e actividade de helicase 5'→3' dependente de ATP, as quais são ainda pouco compreendidas mas que parecem ser necessárias para o NMD. Como esperado para uma proteína envolvida na terminação da tradução, a UPF1 humana é maioritariamente citoplasmática, embora consiga ser transportada entre o citoplasma e o núcleo [3,9,16,22].

A UPF2 é também uma fosfoproteína, a qual faz a ligação entre a UPF1 e o EJC, sendo capaz de interagir simultaneamente com ambas a UPF1 e a UPF3, através de domínios de ligação distintos. Além disso, a UPF2 humana tem um domínio de ligação à UPF1 em cada um dos seus terminus (C e N), sendo ambos necessários para o NMD. A UPF2 é uma proteína citoplasmática que se acumula na região perinuclear [3,9,16].

Os mamíferos possuem dois genes UPF3: a UPF3a humana (também designada UPF3) localiza-se no cromossoma 13 e a UPF3b (também designada UPF3x) encontra-se no cromossoma X. As proteínas UPF3a e UPF3b são essencialmente nucleares mas conseguem deslocar-se para o citoplasma. Ambas interagem com Y14 para recrutar a UPF2 para o EJC, no entanto a UPF3b interage mais fortemente do que a UPF3a. Esta diferença no comportamento das proteínas UPF3 é devida à presença de um resíduo de arginina na região C-terminal da UPF3b, que não existe na UPF3a [3,9,16].

As proteínas humanas SMG (SMG1, 5, 6 e 7) conservam características idênticas às atribuídas aos seus ancestrais inicialmente identificados em *Caenorhabditis elegans*. Esta classe de proteínas determina o estado de fosforilação da UPF1 sendo todas necessárias para o NMD [9,10,22].

A SMG1 é uma proteína cinase relacionada com a PIK (*phosphatidylinositol kinase*) que catalisa a fosforilação da UPF1, em resíduos de serina específicos. Esta fosforilação requer UPF2 ou UPF3b – ambas podem funcionar independentemente – e pode estimular a dissociação da eRF3 da UPF1. Assumindo uma função oposta à da SMG1, os outros três factores SMG são proteínas não redundantes que instigam a desfosforilação da UPF1. As SMG5, 6 e 7 ligam-se à UPF1 fosforilada através de um local de ligação para resíduos de fosfoserina (domínio *14-3-3-like*) presente em cada uma destas três proteínas. Uma vez que nenhum destes factores é uma fosfatase, eles parecem recrutar a proteína fosfatase 2A (PP2A) para mediar a desfosforilação da UPF1. As SMG5 e 7 funcionam em conjunto, interagindo através do seu domínio N-terminal de modo a formar um heterodímero estável e estabelecer um complexo com a PP2A e a UPF1 fosforilada. Contrastando, a SMG6 parece actuar mais independentemente, mas também forma um complexo com a PP2A e a UPF1 fosforilada. Ambas a SMG5 e 6 contêm um domínio PIN (*PiIT N-terminus*) C-terminal, o qual está associado com actividade endoribonucleolítica. O domínio PIN da SMG5 não possui resíduos catalíticos essenciais estando assim inactivo, mas a SMG6 apresenta uma actividade de degradação de RNA eficaz. O facto de estes quatro factores SMG serem essenciais para o NMD indica que um ciclo de fosforilação e desfosforilação da UPF1 é fulcral no NMD [3,9,10,22,23].

## 2.7 Activação do NMD

Os actuais modelos para o NMD sugerem que os factores eucariotas de terminação da tradução eRF1 e eRF3, os quais estão envolvidos na terminação da tradução após

reconhecimento do codão *stop*, recrutam a UPF1 não fosforilada para o complexo de terminação durante a primeira ronda de tradução do mRNA. Por sua vez, a UPF1 recruta a SMG1 para formar um complexo transiente denominado SURF (SMG1-UPF1-eRFs). Se um EJC estiver situado a jusante no transcrito, então a UPF1 e a SMG1 do complexo SURF interagem com a UPF2 no EJC, criando o denominado *decay-inducing complex* (DECID). A SMG1 poderá promover ainda mais esta interacção uma vez que utiliza dois domínios independentes para ligar a UPF1 e a UPF2 simultaneamente. Esta interacção causa a dissociação do eRF1 do complexo, uma vez que a UPF2 parece competir com a eRF1 para a ligação à UPF1 [3,9,12,15,22].

Adicionalmente, a interacção entre a UPF1 e o EJC provavelmente induz a fosforilação da UPF1 através da SMG1. Este evento de fosforilação depende da interacção da SMG1 com a UPF2 e o Y14. A UPF1 quando fosforilada é capaz de recrutar o heterodímero SMG5-SMG7 e/ou a SMG6, os quais recrutam a PP2A. Embora o processo exacto ainda seja desconhecido, pensa-se que, uma vez ligada à UPF1 fosforilada, a SMG7 é capaz de recrutar a maquinaria geral de degradação do mRNA, directa ou indirectamente. A SMG7 interage com a UPF1 fosforilada e com a SMG5 através da sua região N-terminal e usa a sua região C-terminal para activar efectivamente a degradação do mRNA. Assim, a SMG7 pode ser considerada como uma importante molécula que liga os eventos a montante e a jusante no mecanismo de NMD. No entanto, recentemente foi demonstrado que a SMG6, para além de ser a endonuclease responsável pela degradação de transcritos nonsense em *D. melanogaster*, também contribui para a degradação de mRNAs com CTPs em células humanas. Existe a possibilidade de este mecanismo de degradação dependente de SMG6 constituir uma via de degradação alternativa ou então poder actuar conjuntamente, numa via comum, com o heterodímero SMG5-SMG7 [3,8,9,10,23].

## **2.8 Influência da Proteína de Ligação à Cauda Poliadenilada (PABP) no NMD**

Dados recentes têm desafiado a suposta necessidade de *splicing* ou da presença de EJCs na activação do NMD em mamíferos – verificou-se que o NMD pode ocorrer na ausência de *splicing* ou de EJCs a jusante do CTP e que a presença de um intrão na região 3'UTR não é suficiente para definir um codão de terminação como prematuro. Isto sugere que o mecanismo de reconhecimento de CTPs pode ser mais conservado entre mamíferos e invertebrados do que se pensava originalmente. De facto, apesar de entre diferentes espécies existirem variações em relação ao reconhecimento de CTPs, é geralmente observado um efeito posicional do CTP no despoletar do NMD em todos os organismos: quanto mais perto os CTPs estão do terminus 3' do mRNA menor é a sensibilidade do transcrito ao NMD [3,9,10,17].

Em *Saccharomyces cerevisiae* e *Drosophila melanogaster*, um codão de terminação parece ser reconhecido como prematuro quando se localiza a uma grande distância da cauda poliadenilada. Pensa-se que este fenómeno resulta de uma fraca interacção entre o eRF3 ligado ao ribossoma em terminação e os factores associados à região 3'UTR, como por exemplo a PABP citoplasmática, que em mRNAs normais, com o codão *stop* em proximidade à cauda poliadenilada, promove uma terminação normal da tradução [9,19,24,25].

A terminação natural, ou fisiológica, é eficiente porque os ribossomas em terminação são capazes de interagir com estas proteínas ligadas à 3'UTR. De modo contrário, num codão *stop* prematuro, a tradução termina ineficientemente (é debilitada ou muito lenta) uma vez que o eRF3 não é capaz de estabelecer estas interacções, resultando numa rápida degradação do mRNA [9,14,19].

Nos eucariotas superiores, os transcritos normais podem conter 3'UTRs de poucos a milhares de nucleótidos. No entanto, mesmo em 3'UTRs excepcionalmente longos, a PABP pode ainda assim ser trazida naturalmente para perto do codão de terminação através do rearranjo estrutural do mRNA podendo assim o transcrito escapar ao NMD. De facto, estudos feitos em células humanas sugerem que, em casos de reconhecimento de CTPs independente



do EJC, a distância física entre o codão de terminação e a PABPC1 (PABP1 citoplasmática) determina se o evento de terminação é aceite como normal [14,19,24].

Assim, a proximidade da PABPC1 pode explicar porque os codões *nonsense* localizados perto do codão de iniciação não induzem o NMD [9,19,24]. De acordo com esta explicação estão os estudos que sugerem uma conformação circular do mRNA durante a tradução em que o *cap* 5' é mantido em proximidade com a cauda poliadenilada através da ligação de uma série de proteínas: PABP, associada à cauda poliadenilada na extremidade 3' e a eIF4E e eIF4G associadas ao *cap* na extremidade 5' [8,10,26,27].

Estas observações sugerem que o NMD nos humanos conservou evolutivamente princípios e componentes elementares dos eucariotas inferiores, e têm levado à proposta de um modelo unificado para o NMD. Este modelo postula que a interacção entre a UPF1 e a eRF3, necessária para a activação do NMD, é inibida quando a tradução termina perto da PABPC1. De facto, segundo publicações recentes, a PABPC1 parece competir com a UPF1 para a ligação ao eRF3. Pelo contrário, quando a PABPC1 está espacialmente distante do evento de terminação, a UPF1 consegue interagir com o eRF3 e o NMD é desencadeado. Esta interacção é potenciada pela presença de um EJC a jusante, o qual oferece uma maior afinidade para o complexo UPF. Nos humanos tal como em outros eucariotas, a PABP citoplasmática parece estar envolvida na promoção de uma terminação correcta da tradução e na inibição da activação do NMD [3,9,10,14,17,19,20,24,25].

## 2.9 Mecanismos de Degradação do mRNA *Nonsense*

Nos mamíferos, os transcritos *nonsense* são rapidamente degradados uma vez que são eficientemente dirigidos para a via normal de degradação dos mRNAs. Além disso, a maioria das ribonucleases que eliminam os mRNAs *nonsense* são as mesmas que actuam nas vias de degradação dos mRNAs normais [10,26,28].

A degradação do mRNA nos mamíferos geralmente inicia-se com a remoção da cauda poliadenilada (desadenilação) por desadenilases. A desadenilação antecede a degradação exonucleolítica 3'→5' efectuada pelo exossoma citoplasmático, um complexo multimérico com actividade exonucleolítica. Após a desadenilação, a estrutura *cap* 5' poderá eventualmente ser removida por um complexo de enzimas *decapping* que incluem a DCP1 e a DCP2, expondo o mRNA a uma degradação imediata 5'→3' pela principal exonuclease citoplasmática, a XRN1 (ver Figura 2A) [8,10,12,26,28,29].

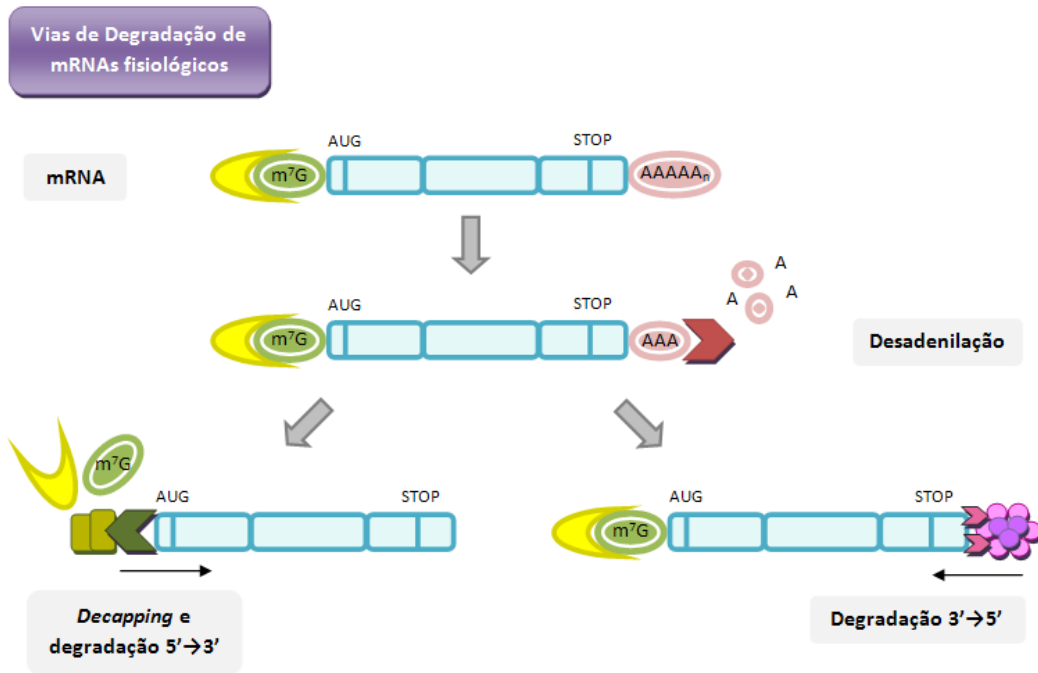
Contrariamente ao que acontece numa degradação normal do mRNA, os transcritos com mutações *nonsense* parecem ser capazes de desencadear um *decapping* directo, ultrapassando a necessidade de uma desadenilação prévia (ver Figura 2B) [30]. Verificou-se que as três proteínas UPF co-imunoprecipitam com a DCP2 o que pode indicar que estes factores recrutam a proteína *decapping* para degradar mRNAs *nonsense* [31].

Ambas as vias de degradação 5'→3' e 3'→5' permitem uma degradação rápida dos transcritos que contêm CTPs e não é claro se um deles é preferencialmente usado no mecanismo de NMD, uma vez que a eficiência deste parece ser influenciado por exonucleases envolvidas nos dois processos [8,10,26,28].

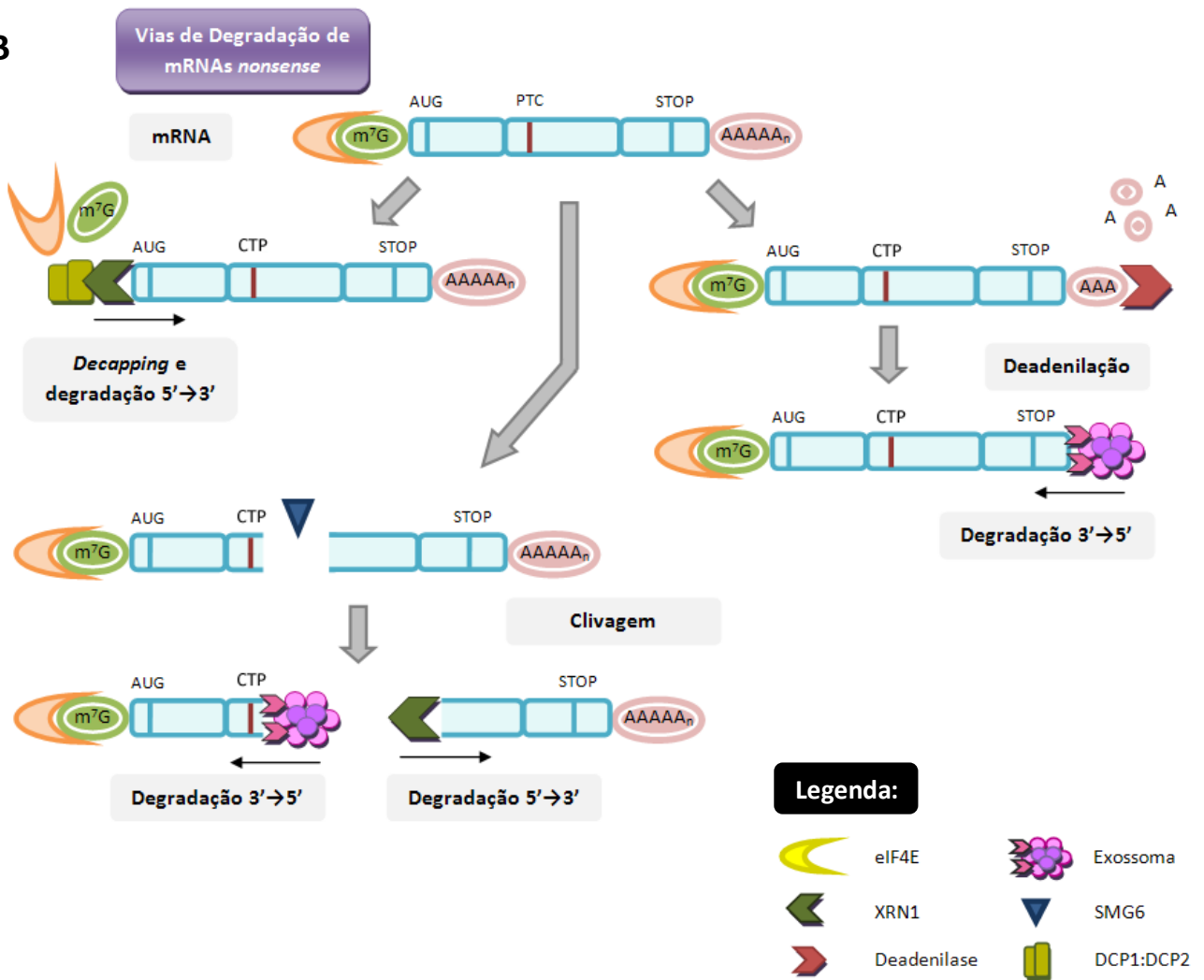
Nas células de mamífero, para além da desadenilação e do *decapping*, a rápida degradação do mRNA *nonsense* pode também ser induzida por clivagem endonucleolítica. Recentemente descobriu-se que a SMG6 é uma endonuclease directamente envolvida na clivagem endonucleolítica de transcritos com CTPs em células humanas, através do seu domínio PIN. A clivagem é feita preferencialmente em locais com sequências específicas perto do CTP e ambos os fragmentos do mRNA são provavelmente dirigidas para uma rápida degradação exonucleolítica sendo o fragmento 5' degradado pelo exossoma e o fragmento 3' pela XRN1 (ver Figura 2B) [8,26].



A



B



**Figura 2** – Vias de degradação de mRNAs fisiológicos e mRNAs *nonsense* em mamíferos. **(A)** A via normal de degradação de mRNAs inicia-se com a desadenilação da cauda poliadenilada, de seguida o transcrito pode seguir um de dois percursos: ou enzimas decapping removem o *cap* na extremidade 5' permitindo a degradação do transcrito pela XRN1 no sentido 5'→3' ou o transcrito é degradado pelo exossoma a partir da extremidade 3' desprotegida no sentido 3'→5'. **(B)** Nos mamíferos os mRNAs *nonsense* podem seguir várias vias de degradação: o transcrito pode sofrer uma desadenilação que permite ao exossoma degradar o transcrito no sentido 3'→5'; um *decapping* directo, independente de desadenilação prévia, que permite à XRN1 degradar o transcrito no sentido 5'→3'; uma clivagem endonucleolítica mediada pela SMG6 na proximidade do CTP gera dois fragmentos desprotegidos numa das suas extremidades permitindo a degradação 3'→5' pelo exossoma da parte 5' do transcrito e a degradação 5'→3' pela XRN1 da parte 3' deste mRNA.

### 2.10 Localização Subcelular do NMD

Apesar de ser inquestionável que o NMD depende da tradução, a qual é geralmente considerada como sendo exclusivamente citoplasmática, existem evidências contraditórias quanto à localização do NMD em mamíferos. De facto, muitos mRNAs com CTPs analisados em células de mamífero parecem ser degradados quando ainda estão fisicamente associados ao núcleo, sugerindo que são submetidos ao NMD no núcleo ou durante a sua exportação para o citoplasma [9,16]. Além do mais, a identificação de factores de tradução e proteínas ribossómicas no compartimento nuclear, juntamente com a descoberta de que aminoácidos se podem associar em polipéptidos no núcleo das células de mamífero, têm alimentado a possibilidade da existência de tradução nuclear [32]. Estas descobertas, juntamente com a restrição do NMD a mRNA ligado a CBC e com a insensibilidade do NMD à inibição da exportação do mRNA, têm também permitido sugerir que o reconhecimento de CTPs e o NMD podem ter lugar no núcleo da célula [9,16,22].

Os factores essenciais para o NMD localizam-se em diferentes compartimentos subcelulares: a UPF3a, a UPF3b e outros componentes do EJC são maioritariamente nucleares; a UPF2 acumula-se ao longo do lado citoplasmático do envelope nuclear; a UPF1 é maioritariamente citoplasmática. No entanto, sabe-se que a UPF1, UPF3a, UPF3b e as proteínas do EJC todas são capazes de se deslocar entre o núcleo e o citoplasma. Assim, foi proposto que os efectores do NMD poderiam na verdade associar-se no núcleo [9].

Contrastando, investigações mais recentes têm concluído que é no citoplasma que a maioria dos transcritos *nonsense* é submetida ao NMD, apesar de alguns poderem ser traduzidos e marcados para degradação enquanto ainda se encontram na região perinuclear, o que representaria o NMD associado ao núcleo [9,16].

Algumas pistas sugerem a possibilidade de o NMD nos mamíferos poder implicar o direccionamento de mRNAs *nonsense* para locais específicos de processamento (*P-bodies*), os quais são estruturas citoplasmáticas dinâmicas que acumulam factores de degradação do RNA, incluindo enzimas e co-activadores *decapping*, assim como exonucleases 5'→3'. Os factores de NMD UPF1, SMG5 e SMG7 são ocasionalmente detectados nos *P-bodies* das células de mamífero, no entanto resultados mais recentes parecem indicar que o NMD não requer a presença destes locais de processamento nos *Metazoa* [8,9,10,26,31,33,34].

Apesar de todos os dados adquiridos até agora a localização celular do NMD nos mamíferos mantém-se um assunto em debate. No entanto, pode-se teorizar que este processo não esteja restrito a um único local da célula mas que uma fracção do NMD possa ocorrer no núcleo, ou em associação com o núcleo, enquanto outra fracção possa ocorrer no citoplasma.

### 2.11 Perspectivas Clínicas do NMD

Tem sido estimado que cerca de 30% de todas as doenças genéticas humanas surgem a partir de mutações *nonsense* ou *frameshift* que geram CTPs. A expressão destes genes mutantes levam à síntese de mRNAs *nonsense* que, se forem traduzidos, conduzem à produção de proteínas truncadas com função residual ou sem função, ou em alguns casos com ganho de função ou com actividade dominante-negativa. O NMD influencia assim a gravidade dos sintomas clínicos causados pela mutação. O NMD pode ser benéfico se, por exemplo, prevenir a produção de proteínas truncadas C-terminalmente que teriam efeitos dominante-negativos, ou pode ser prejudicial se não permitir a produção de proteínas truncadas que ainda assim teriam uma função residual [3,6,7,10].

Em indivíduos heterozigóticos, os transcritos derivados de alelos anómalos são degradados pela via NMD e normalmente levam a um modo de hereditariedade recessiva, uma vez que a proteína normal resultante do alelo funcional consegue compensar, pelo menos em parte, a ausência do transcrito não funcional. [9,10].

A diminuição da quantidade de mRNAs com mutações *nonsense*, um típico fenómeno de NMD, foi primeiro descoberta na  $\beta$ -talassémia, tendo documentado a importância médica deste mecanismo [35]. Nas diferentes formas de  $\beta$ -talassémia, algumas mutações *nonsense* causam um fenótipo suave e recessivo, enquanto outras originam um efeito dominante negativo com a acumulação e precipitação tóxica de cadeias de globina insolúveis. Transcritos de  $\beta$ -globina com CTPs localizados em posições que desencadeiam o NMD estão associados com o modo de hereditariedade recessiva e portadores heterozigóticos assintomáticos. Pelo contrário, CTPs localizados dentro do último éxon do gene da  $\beta$ -globina resultam em transcritos insensíveis ao NMD que produzem proteínas truncadas com efeito dominante negativo, levando a uma forma sintomática de  $\beta$ -talassémia em heterozigóticos e a um modo de hereditariedade dominante [9,27].

Outras doenças com formas dominantes e recessivas devidas à eficiência do NMD são a braquidactilia tipo B, susceptibilidade a infecções micobacterianas, retinite pigmentosa, doença de von Willebrand e deficiência de factor X. O NMD também protege o organismo dos efeitos de mutações adquiridas, tais como as que ocorrem durante a progressão tumoral [10]. Para além disso, a eficiência do NMD parece variar entre indivíduos, uma vez que diferentes fenótipos têm sido observados para a mesma mutação em diferentes indivíduos [9,18]. Nos exemplos acima referidos o NMD fornece um mecanismo de vigilância protector benéfico, no entanto, o NMD pode agravar o fenótipo da doença quando uma proteína truncada mantém a sua função pelo menos parcialmente e não adquire um efeito dominante negativo. Assim, neste caso a perda da função do produto proteico é mais danosa para a célula do que seria a expressão da proteína truncada. Um exemplo deste efeito adverso do NMD é dado pelas formas do gene da distrofina com mutações *nonsense*. Em doenças como a distrofia muscular de Duchenne (*Duchenne muscular dystrophy* ou DMD), fibrose quística, síndrome de Hurler e diabetes insípida nefrogénica ligada ao cromossoma X, tem-se vindo a tentar inibir o NMD de modo a restaurar os níveis de expressão da proteína truncada [10].

Não existem tratamentos eficazes disponíveis para várias doenças genéticas derivadas de mutações *nonsense*. No caso de proteínas truncadas funcionais, a inibição do NMD deverá levar a um alívio dos sintomas ao promover um aumento das concentrações da proteína. No entanto, na maioria dos casos, a função proteica só pode ser restaurada com a produção do péptido completo, o que pode ser conseguido ao promover-se a leitura do CTP como códon codificante, gerando assim proteínas com mutação *missense* mas funcionais. Assim sendo, antibióticos aminoglicosídicos, tais como a gentamicina, têm sido testados no tratamento de doenças genéticas devidas a mutações *nonsense*. Os aminoglicosídeos ligam-se ao ribossoma e reduzem a eficácia do emparelhamento códon-anticódon, sendo capazes de suprimir o reconhecimento do códon *stop*, com a incorporação de um aminoácido na cadeia polipeptídica. Em altas concentrações, a gentamicina promove a leitura através dos códons

*stop* em mRNAs eucariotas, inibindo o NMD e foi demonstrado ser capaz de mitigar os sintomas da fibrose quística. Ainda assim, a baixa eficiência e as consequências na produção e função normais de proteínas, devido à leitura não específica através de codões de terminação normais, são problemas importantes derivados do uso de gentamicina [9].

Uma molécula recentemente desenvolvida, denominada PTC124 ou *Ataluren*, possui a capacidade de fazer selectivamente a leitura através de codões de terminação prematuros mas não de codões de terminação normais. Esta molécula não possui nenhuma relação estrutural com os aminoglicosídeos; é um composto que tem mostrado funcionar com sucesso em ensaios com ratinhos, e encontra-se em testes clínicos em doentes com fibrose quística e DMD [9].

Nos casos em que as proteínas truncadas são funcionais, inibir o NMD pode ser uma abordagem terapêutica apropriada. A inibição do NMD está actualmente a ser testada para regular positivamente a expressão de genes com mutações *nonsense* em alguns distúrbios genéticos humanos. O uso de RNA de interferência para regulação negativa da UPF1 tem sido eficaz na inibição do NMD em cultura de células e pode constituir a base para o desenvolvimento de novas terapias. No entanto, o envolvimento dos efectores do NMD em outras funções biológicas essenciais necessita de ser determinada antes de elegerem estas técnicas como estratégias terapêuticas direccionadas especificamente a um factor particular do NMD. Adicionalmente, sabendo que o NMD também regula transcritos fisiológicos e pode até controlar vários processos celulares, como anteriormente referido, a inibição do NMD pode levar a consequências graves e complexas [36].

O desenvolvimento de terapias benéficas para doenças associadas a mutações *nonsense* que induzem o NMD requer uma melhor identificação e caracterização de todos os factores que influenciam a eficácia do NMD e de todas as consequências da actividade deste mecanismo. Assim, é importante e crucial uma maior compreensão do mecanismo subjacente ao NMD e de todos os seus intervenientes.

### **3. Nonstop mRNA Decay (NSD)**

As células desenvolveram sistemas de vigilância de modo a evitar os efeitos deletérios de mRNAs com codões *stop* prematuros, mas também mRNAs que não possuem codões de terminação em fase na grelha de leitura (*in frame*) designados mRNAs *nonstop*. O NSD tal como o NMD é um sistema de controlo de qualidade da expressão génica dependente da tradução e para o qual foram descritos diferentes mecanismos para degradar mRNAs *nonstop* em bactérias, leveduras e mamíferos [37,38].

#### **3.1 Origem dos Transcritos Nonstop**

Os mRNAs *nonstop* podem ser gerados quando a terminação da transcrição ocorre dentro da região codificante de cistões como consequência de mutações genéticas, pausa transcricional ou uso de locais crípticos de adenilação [22,37]. Mutações ou erros na transcrição que alteram o codão de terminação normal da tradução são outros dos mecanismos capazes de produzir transcritos *nonstop* [39]. Foi estimado que 40 em 3622 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de levedura possuem terminações 3' localizadas a montante do codão de terminação fisiológico, sugerindo que mRNAs *nonstop* são de facto produzidos *in vivo*. Estes mRNAs têm o potencial de produzir proteínas truncadas, que em alguns casos podem adquirir ganho de função ou actividade dominante-negativa. Pensa-se que para circunscrever este perigo, os organismos terão desenvolvido vias de vigilância especializadas que detectam mRNAs *nonstop* e impedem-nos de produzir produtos potencialmente danosos para a célula [37,40].

### 3.2 NSD em Eubactérias e Leveduras

Nas eubactérias, a tradução de mRNAs *nonstop* origina o bloqueio dos ribossomas na região 3' terminal do mRNA, estes são subsequentemente libertados para reciclagem pelo tmRNA, uma molécula única que possui propriedades tanto do tRNA como do mRNA [37]; a região tRNA-like do tmRNA doa alaninas à cadeia peptídica que se encontra bloqueada usando o local A vazio do ribossoma, enquanto que a região mRNA-like do tmRNA desconecta o mRNA *nonstop* e leva à adição de uma pequena cauda peptídica à região C-terminal do polipéptido. O tag C-terminal resultante marca a proteína quimérica para proteólise. Também foi demonstrado que o sistema tmRNA facilita a degradação do mRNA *nonstop* permitindo a degradação 3'→5' por exonucleases que acedem à extremidade 3' que já não se encontra protegida pelo ribossoma [37,39,41,42].

Por outro lado, as leveduras desenvolveram um mecanismo distinto do sistema tmRNA de modo a assegurarem-se que as proteínas aberrantes, resultantes da tradução dos mRNAs *nonstop*, não sejam produzidas. Os mRNAs *nonstop*, nos quais os ribossomas estão bloqueados na região terminal 3', são reconhecidos pelo domínio C-terminal da proteína Ski7, uma proteína associada ao exossoma. Este domínio C-terminal imita estruturalmente os domínios GTPase dos factores de enlongamento da tradução, ligando-se ao local A vazio do ribossoma e promovendo a sua libertação do transcrito. O domínio N-terminal da Ski7 recruta o exossoma assim como o complexo Ski, resultando na degradação do mRNA *nonstop* pela via de degradação 3'→5' (ver Figura 3A) [12,22,37,39,42,43,44]. Na ausência de Ski7, uma segunda via, a via de degradação 5'→3' mediada pela XRN1 pode mediar o NSD em leveduras. Isto parece dever-se à remoção da PABP pelo ribossoma em tradução, esta remoção torna os transcritos susceptíveis a *decapping* assim como a uma redução da eficiência da tradução (ver Figura 3A) [12]. Embora em alguns estudos tenha sido demonstrado que a tradução de mRNAs *nonstop* se encontra substancialmente reprimida em levedura, noutros foi possível detectar uma produção proteica significativa a partir de mRNAs *nonstop* [37].

### 3.3 NSD em Mamíferos

Comparativamente ao conhecimento do NSD em eubactérias e leveduras, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos inerentes à regulação de transcritos *nonstop* em mamíferos. Os primeiros trabalhos efectuados sobre NSD neste grupo taxonómico sugeriram que o mecanismo de NSD em leveduras e mamíferos seria conservado uma vez que se verificou, que nestes últimos, transcritos *nonstop* derivados de construtos com minigenes de β-glucuronidase apresentavam níveis reduzidos de mRNA comparativamente aos respectivos transcritos normais [40]. Para além disso, uma vez que no genoma humano existem homólogos das proteínas Ski de *S. cerevisiae*, esperava-se que o mecanismo de NSD se encontrasse conservado [45].

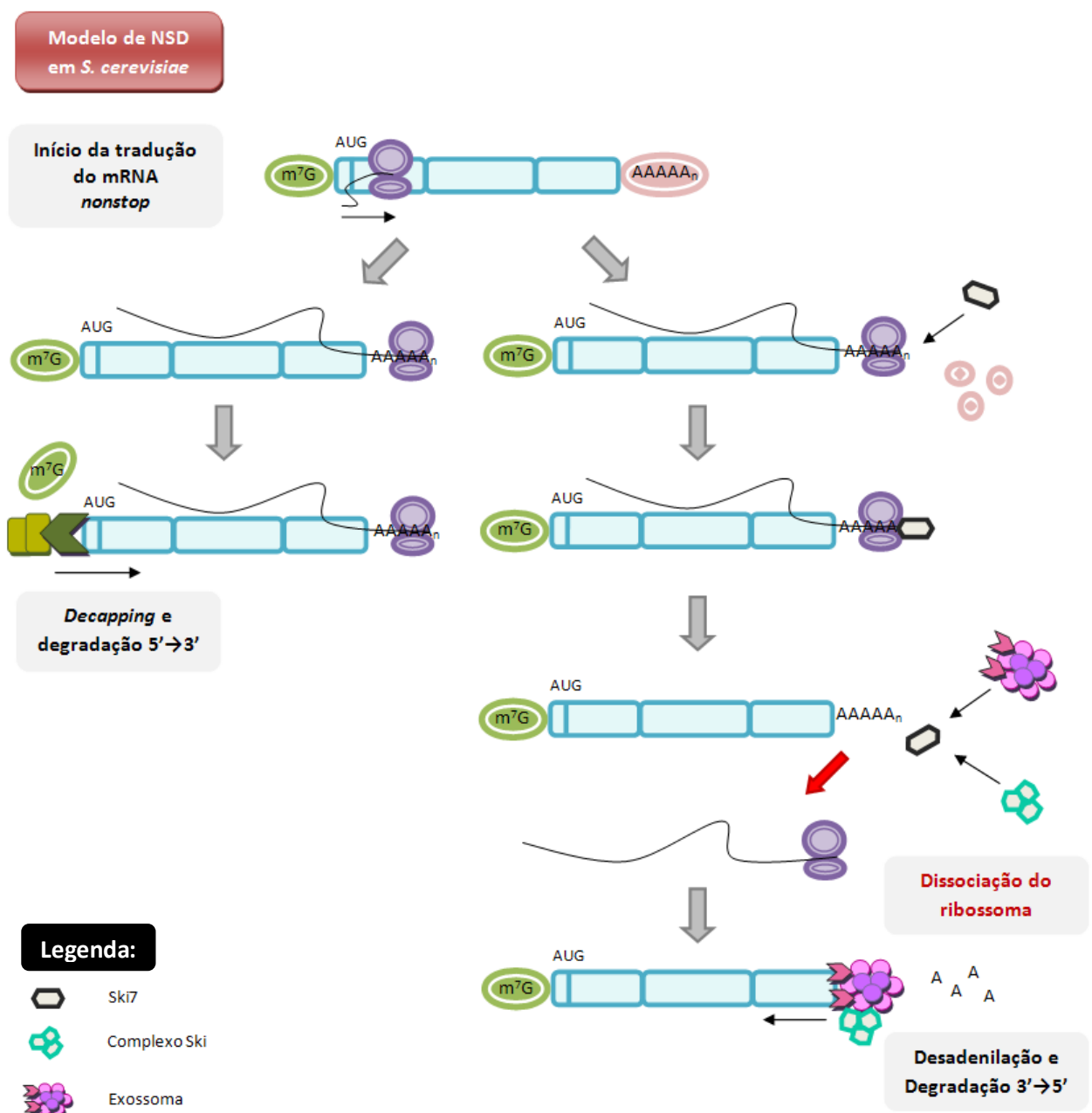
Surpreendentemente, num trabalho mais recente de Akimitsu *et al.* (2008), em que se utilizaram construtos de GFP (*Green Fluorescent Protein*) e de luciferase de pirilampo, descobriu-se que a tradução de mRNA *nonstop* é significativamente reduzida e que não é consequência do decaimento dos níveis de mRNA. A acumulação de mRNA *nonstop* no citoplasma não parece ser prejudicada e a taxa de degradação das proteínas *nonstop* não parece ser elevada. Uma quantidade substancial de mRNA *nonstop* encontra-se associado a polissomas e a tradução independente de *cap* destes transcritos também se encontra reprimida. Também se verificou que os ribossomas traduzem activamente o mRNA mas são prematuramente libertados antes de poderem concluir a tradução, sendo fácil e rapidamente dissociados do mRNA *nonstop*. Estes dados sugerem que os mRNAs *nonstop* em mamíferos são alvo de um bloqueio na tradução numa etapa pós-iniciação [37].

Consequentemente foi proposto um modelo no qual um ribossoma bloqueado no terminus 3' do mRNA leva a uma repressão da tradução ao inibir a terminação da tradução a montante através da potenciação da dissociação do ribossoma (ver Figura 3B) [37].

Como descrito, em células de mamífero foi observada uma repressão da tradução, sem degradação do mRNA *nonstop*. No entanto, estudos de mRNAs *nonstop* em doenças humanas têm reportado reduções consideráveis nos níveis destes mRNAs em quase todos os casos estudados, indicando a ocorrência de NSD. Está no entanto documentado um caso excepcional em que um transcrito *nonstop* causador de doença não é alvo de NSD, verificando-se que para esta mutação particular o sistema de controlo principal para evitar os efeitos deletérios da proteína aberrante ocorre ao nível traducional ou pós-traducional e não através do NSD, como documentado por Akimitsu *et al.* [38].

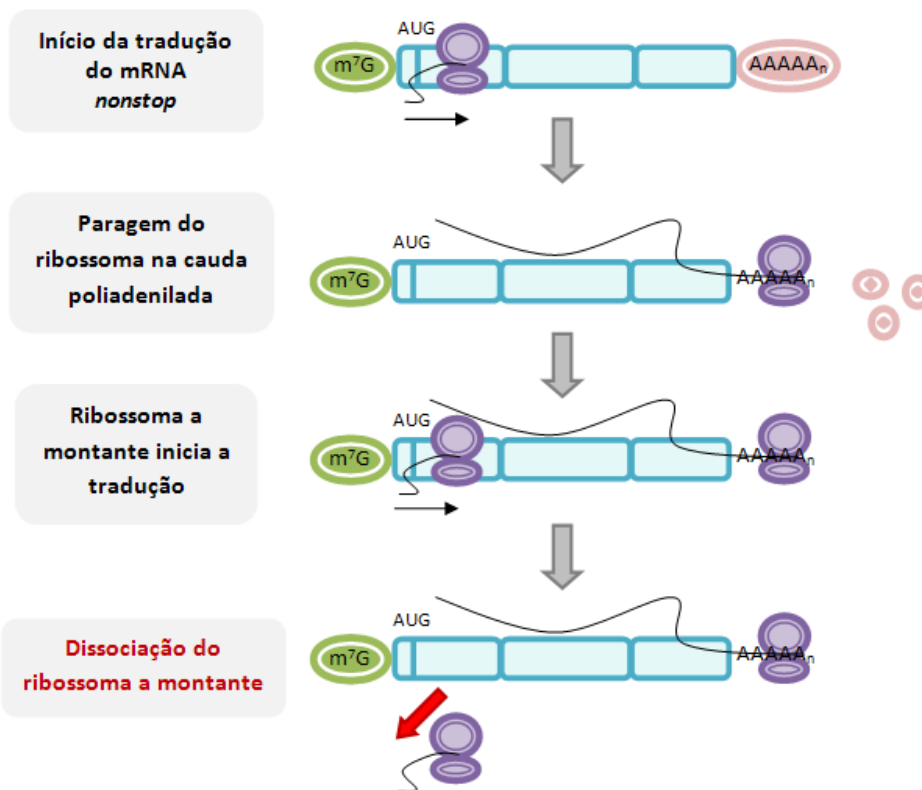
Assim, são necessários mais estudos sobre os mecanismos inerentes ao controlo de mRNAs *nonstop* em células de mamífero de modo a determinar as razões para a observação de diferentes respostas por parte das células à detecção de mRNAs com mutações *nonstop*, assim como dos mecanismos envolvidos na prevenção dos efeitos deletérios destas mutações [38].

A



**B**

### Modelo de Bloqueio Traducional Pós-iniciação



**Figura 3** – Modelos propostos para os mecanismos responsáveis pelo controlo de mRNAs *nonstop* em células de mamífero. **(A)** Um dos modelos propostos para mamíferos baseia-se na ideia de que o mecanismo de NSD em mamíferos e leveduras se encontra conservado. Assim neste modelo o ribossoma em tradução percorre o mRNA *nonstop* e quando atinge a cauda poliadenilada dissocia a PABP e fica retido neste local. A proteína Ski7 é recrutada ligando-se ao ribossoma e promovendo a dissociação deste do transcrito. A Ski7 recruta o exossoma e o complexo Ski que em conjunto são responsáveis pela desadenilação e degradação do mRNA *nonstop* no sentido 3'→5'. Na ausência da proteína Ski7 existe uma segunda via, na qual a ausência de PABP no transcrito permite o *decapping* e degradação no sentido 5'→3' pela XRN1. **(B)** Um modelo mais recente propõe que o ribossoma em tradução atinge a cauda poliadenilada do mRNA *nonstop* dissociando a PABP e ficando retido neste local. A presença deste ribossoma bloqueado exerce uma forte inibição de subsequentes tentativas de tradução do transcrito *nonstop* ao promover a dissociação de ribossomas a montante que iniciem a tradução.

#### 4. O Exossoma Eucariótico

O exossoma é um complexo proteico evolutivamente conservado que possui actividade ribonucleolítica e que se encontra presente tanto no núcleo como no citoplasma. Foi originalmente identificado em *Saccharomyces cerevisiae* pela sua função no processamento do rRNA 5.8S nos nucléolos e a maioria da investigação realizada sobre a sua função tem sido executada tendo a levedura como organismo modelo [46,47,48,49].



#### 4.1 Funções do Exossoma na Célula

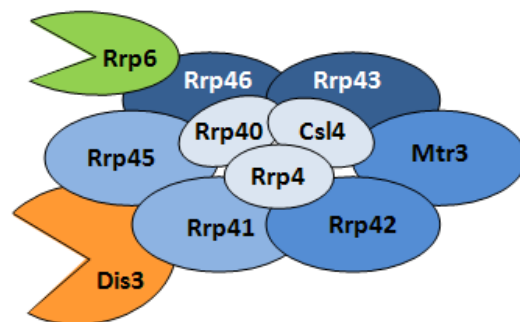
No núcleo, o exossoma participa na maturação de moléculas de RNA estáveis, tais como o rRNA, o snRNA e o snoRNA, assim como na degradação de subprodutos do processamento do RNA. É também responsável pela eliminação de transcritos fisiológicos no citoplasma mas também de transcritos anómalos em várias vias de vigilância do RNA. Assim, encontra-se envolvido em várias vias de degradação como o NMD (que, como já referido, consiste na eliminação de transcritos contendo um codão de terminação prematuro ou CTP), NSD (que consiste na remoção de mRNAs que não contêm codão de terminação) e NGD (consiste na degradação de moléculas de mRNA com sequências que impedem a translocação correcta do ribossoma durante a tradução). O exossoma citoplasmático também participa em vias de metabolismo do RNA mais especializadas, tais como a degradação de transcritos contendo sequências ricas em nucleótidos AU (*AU-rich elements*, ARE) no 3'UTR (*ARE-mediated decay* ou AMD). O exossoma também desempenha um papel substancial na degradação de intermediários da degradação do mRNA que surgem durante o RNA de interferência. Uma nova classe de substratos do exossoma foi também recentemente descoberta a qual engloba transcritos denominados *Cryptic Unstable Transcripts* (CUTs) em levedura e *Promoter upstream transcripts* (PROMPTs) nas células humanas, os quais são sintetizados pela RNA polimerase II a partir de promotores intergénicos. O modo como o exossoma consegue ter como alvo um tão vasto reportório de diferentes moléculas de RNA é ainda algo que se encontra a ser estudado. De qualquer modo, é amplamente assumido que uma possível maneira de regular a sua especificidade é através das interações com complexos acessórios, tais como o complexo de poliadenilação Trf4/Air2/Mtr4p ou TRAMP, que se encontra envolvido na vigilância do RNA nuclear, o complexo Nrd1/Nab3/Sen1, que participa no processamento e degradação de sn/snoRNAs e CUTs, ambos no núcleo e o complexo Ski7 GTPase/Ski envolvido na degradação do RNA assim como em diferentes vias de controlo de qualidade do RNA no citoplasma [8,46,47,48,49,50,51,52,53].

#### 4.2 Estrutura do Exossoma

O exossoma eucariótico é um complexo multimérico de aproximadamente 400 kDa, consistindo em nove subunidades nucleares e várias subunidades catalíticas que a elas se podem associar. A sua estrutura base é bastante conservada entre os eucariotas, seis das subunidades nucleares formam uma estrutura anelar de três heterodímeros (Rrp41/Rrp45, Rrp43/Rrp46, Rrp42/Mtr3) e contêm domínios homólogos à da ribonuclease fosforolítica bacteriana, a RNase PH. Estes heterodímeros são bioquimicamente inertes porque os resíduos catalíticos do centro activo não se encontram presentes na maioria destas subunidades. As três subunidades restantes (Rrp4, Rrp40 e Csl4) contêm domínios de ligação ao RNA e ligam-se no topo do anel formado pelas seis subunidades referidas (ver Figura 4) [8,46,47,48,49,50,51,54].

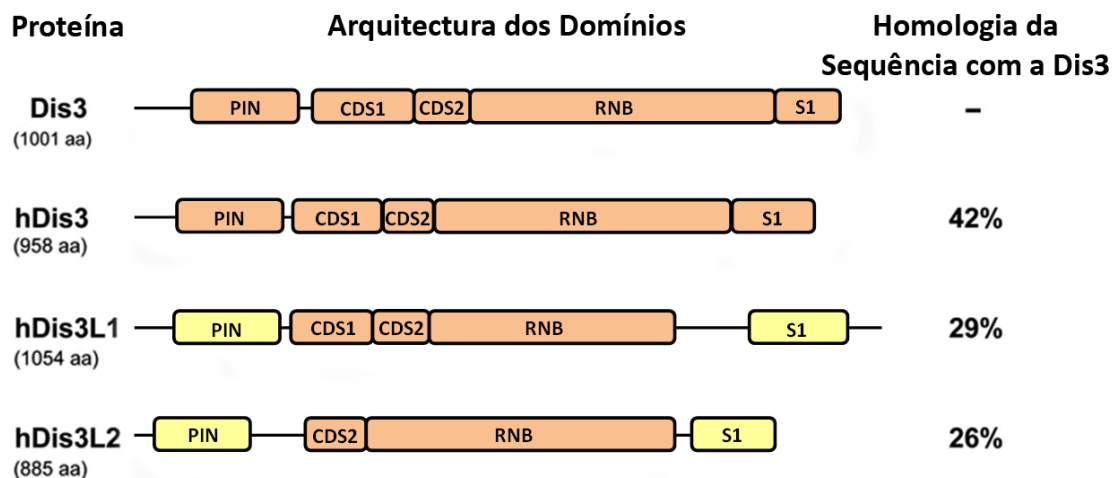
O exossoma de *Saccharomyces cerevisiae* consegue associar-se a uma décima subunidade, a Dis3 (ou Rrp44), uma exoribonuclease de processamento dependente de  $Mg^{2+}$ , sendo a maior subunidade do exossoma (110 kDa) e encontra-se tanto no núcleo como no citoplasma; é uma das raras exonucleases capazes de degradar tanto substratos de cadeia simples como de cadeia dupla. A Dis3 possui um domínio PIN N-terminal seguido por uma região muito similar à RNase II/R da *Escherichia coli*. Esta região homóloga à RNase II/R possui um domínio RNB responsável pela actividade exonucleolítica 3'→5'. O seu domínio PIN, por outro lado, possui uma actividade endoribonucleolítica. A Dis3 encontra-se activa em vários substratos, mas uma actividade mais forte foi observada para substratos ricos em AU, o que pode reflectir um papel do exossoma na degradação de mRNAs contendo AREs. A cooperação entre as actividades endo e exoribonucleolíticas da Dis3 parece crucial para um processamento eficiente de vários substratos naturais do exossoma [8,46,49,51,52,54,55,56].





**Figura 4** – Representação simplificada da estrutura e composição do exossoma eucariótico de onze subunidades. A estrutura base do exossoma é constituída por seis subunidades que formam um anel de três heterodímeros – Rrp41 e Rrp45, Rrp46 e Rrp43, Mtr3 e Rrp42 – sobre os quais se ligam outras três subunidades – Rrp40, Csl4 e Rrp4. A estrutura base de nove subunidades tem capacidade de se ligar a outras subunidades, as quais fornecem a capacidade catalítica ao exossoma, nomeadamente às ribonucleases Dis3 e/ou Rrp6 com as quais pode formar complexos de dez ou onze subunidades.

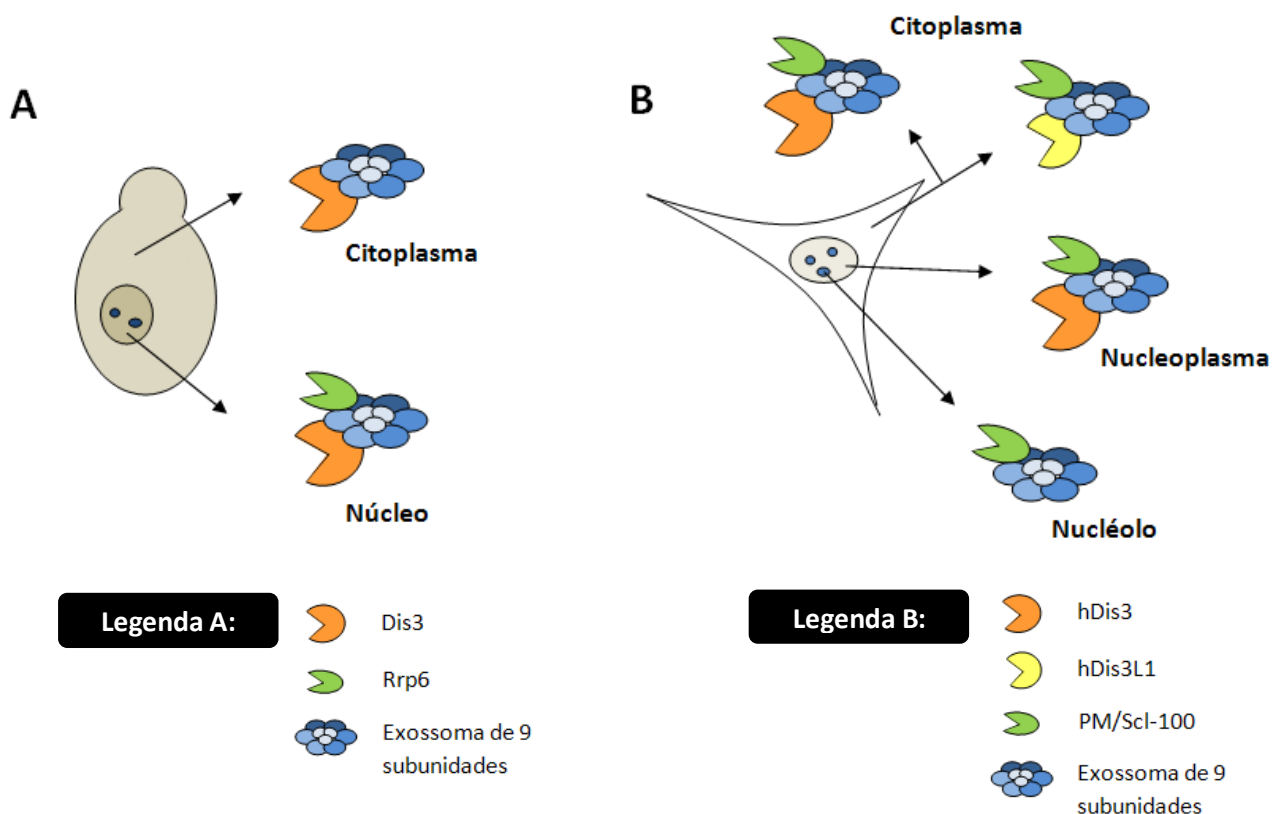
Análises de proteómica identificaram recentemente três ortólogos humanos da Dis3 de levedura, a hDis3, a hDis3L1 (*hDis3-like 1*) e a hDis3L2 (*hDis3-like 2*) possuindo capacidades de interacção variáveis com o núcleo do exossoma, a hDis3L1 é a que possui uma associação mais forte com o exossoma. Com base na análise da sequência de cDNA, parecem existir quatro isoformas da hDis3L1, estas resultam provavelmente de eventos de splicing alternativos, das quais a isoforma de maiores dimensões apresenta 1054 aminoácidos. No caso da hDis3L2 parecem existir cinco isoformas contendo a de maiores dimensões 885 aminoácidos. Um alinhamento das isoformas canónicas das três variantes humanas com a Dis3 de levedura demonstra que em termos de conservação da sequência a hDis3 é a mais homóloga com a Dis3 (42% de semelhança da sequência) comparativamente às outras duas variantes hDis3L (29% e 26% para hDis3L1 e hDis3L2, respectivamente) [55]. Apesar das diferenças ao nível da sequência, em termos de organização dos domínios proteicos verifica-se uma grande semelhança entre as várias proteínas [54]. As três variantes possuem actividade exonucleolítica, uma vez que todas apresentam um domínio RNB altamente conservado. No entanto apenas a hDis3 tem um domínio PIN conservado presente na região N-terminal, sendo a única das três isoformas a possuir actividade endonucleolítica (ver Figura 5). Os domínios PIN são caracterizados por dois ou três resíduos de ácido aspártico invariáveis; tanto a Dis3 como a hDis3 contêm os três resíduos enquanto que na hDis3L1 e na hDis3L2 apenas dois ou um, respectivamente, se encontram conservados. A localização subcelular da hDis3L1 é inteiramente citoplasmática enquanto que a hDis3 é predominantemente nuclear; não existem ainda dados quanto à localização da hDis3L2 na célula. Em levedura, pensa-se que a actividade endonucleolítica da Dis3 permite a degradação de substratos de RNA com certas estruturas secundárias, os quais predominam no núcleo, assim, parece que a actividade endonucleolítica foi mantida apenas num ortólogo humano da Dis3, cuja localização é maioritariamente nuclear, tendo a subunidade cuja localização é exclusivamente citoplasmática, perdido essa função [8,46,49,54,55].



**Figura 5** – Esquema com a estrutura das proteínas Dis3 e Dis3-like em leveduras e em humanos. O diagrama esquemático da Dis3 de *S. cerevisiae* (Dis3), Dis3 humana (hDis3), Dis3-like 1 humana (hDis3L1) e Dis3-like 2 humana (hDis3L2) indica os domínios identificados nestas proteínas: o domínio PIN, dois domínios *cold shock* (CSD1, CSD2), um domínio RNB e um domínio S1 de ligação ao RNA. O amarelo estão identificados os domínios com um baixo nível de conservação. O grau de homologia entre a sequência das proteínas Dis3 humanas e a sequência Dis3 de levedura encontra-se indicado à direita (Imagem adaptada de Staals *et al.*, 2010).

O complexo de dez subunidades de *Saccharomyces cerevisiae* associa-se no núcleo com uma subunidade catalítica adicional, a Rrp6, formando um exossoma de onze subunidades. A Rrp6 é uma exoribonuclease distributiva homóloga à RNase D de *E. coli*, não sendo capaz de degradar mRNAs altamente estruturados. Ao contrário de outras subunidades do exossoma a deleção do gene da Rrp6 não é letal; esta subunidade parece desempenhar um papel menor no metabolismo do RNA nuclear e não é tão fortemente conservada como a Dis3. Ao contrário da Rrp6 da levedura, a ortóloga humana – hRRP6 ou PM/Scl-100 – não se encontra restrita ao núcleo, encontrando-se também no citoplasma; apesar disso, a PM/Scl-100 apresenta propriedades muito similares à Rrp6 da levedura. Curiosamente a hDis3 encontra-se excluída dos nucléolos, local onde a PM/Scl-100 parece acumular-se preferencialmente [46,47,49,51,52,54].

Assim, estes dados sugerem que existem nas células humanas vários complexos do exossoma com diferentes combinações de subunidades catalíticas, situação que difere da levedura na qual se pensa existirem apenas duas formas que são dominantes: um complexo citoplasmático com a Dis3 e um complexo nuclear com ambas as subunidades hDis3 e Rrp6. No entanto, considera-se que as interações da hDis3 e da hDis3L1 com o núcleo do exossoma são muito provavelmente exclusivas na medida em que os seus domínios PIN são altamente homólogos e serão os responsáveis pela ligação destas subunidades ao núcleo do exossoma (ver Figura 6) [49,54].



**Figura 6** – Composição do exossoma de *Saccharomyces cerevisiae* e do exossoma de *Homo sapiens* e localização das respectivas subunidades catalíticas. A estrutura base do exossoma, composto por nove subunidades, localiza-se no citoplasma, nucleoplasma e nucléolos de todos os eucariotas estudados. **(A)** Na levedura a ribonuclease Dis3 encontra-se presente nos três compartimentos e a ribonuclease Rrp6 encontra-se restrita ao núcleo da célula. **(B)** Nas células humanas a proteína homóloga da Rrp6 – a PM/Scl-100 – encontra-se em todos os compartimentos celulares. Um dos parálogos da Dis3 – a hDis3 – tem uma distribuição maioritariamente nuclear, embora se encontre excluída dos nucléolos, enquanto que a hDis3L1 tem uma localização exclusivamente citoplasmática (Imagem adaptada de Chlebowski *et al.*, 2010).

O anel do exossoma tem apenas um efeito modesto nas propriedades enzimáticas das subunidades catalíticas. Apesar de não possuir funções catalíticas o anel apresenta funções muito importantes mediando a interação do ribossoma com substratos e com proteínas ou complexos proteicos que podem activar o exossoma. Também protege algumas moléculas, que poderiam ser reconhecidas como substratos, da degradação. Assim, apesar de não ser necessário para a catálise propriamente dita, o anel é vital para controlar a actividade catalítica do complexo [54].

Nos vários sistemas biológicos a combinação de várias actividades nucleolíticas parece ser comum no que toca à degradação do RNA. Isto é provavelmente muito vantajoso para qualquer célula ao facilitar e acelerar a degradação de substratos com diferentes estruturas secundárias. Isto permite uma degradação rápida e eficaz, particularmente em casos nos quais vários tipos de RNases estão estruturalmente coordenadas como subunidades de um complexo, como é o caso do exossoma eucariota [46].

## **Objectivo**

Como referido anteriormente, uma das várias funções do exossoma é participar na degradação dos mRNAs anómalos portadores de mutações *nonsense* ou de mutações *nonstop*. Como consequência da recente identificação de uma nova ribonuclease, a hDis3L1, como parte integrante do exossoma, este trabalho teve como objectivo avaliar o envolvimento desta subunidade do exossoma humano na degradação inerente ao NMD e ao NSD. Os resultados aqui apresentados poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares associados à degradação dos mRNAs alvo de um destes dois processos de controlo de qualidade da expressão génica. Este estudo pode assim apresentar um papel promissor no estabelecimento de terapias específicas direccionadas a patologias, como cancro e muitas doenças genéticas, associadas a mutações *nonsense*.

## **Materiais e Métodos**

### **Clonagem e Amplificação de Vectores de Expressão**

O gene da  $\beta$ -globina humana normal ( $\beta_n$ ) assim como as suas variantes  $\beta_{39}$  e  $\beta_{nonstop}$  foram clonados no vector pTRE2pur (BD Biosciences) como descrito em Silva et al. (2006). A variante  $\beta_{39}$  contém uma mutação *nonsense* no codão 39 (CAG  $\rightarrow$  TAG) enquanto que a variante  $\beta_{non-stop}$  possui uma mutação *nonstop* no codão *stop* fisiológico (TAA  $\rightarrow$  AAA) e duas mutações *nonstop* (TAA  $\rightarrow$  AAA e TGA  $\rightarrow$  AGA) na sequência 3'UTR de modo a eliminar a existência de qualquer codão *stop in frame* ao longo do 3'UTR (ver Figura 7).

Descongelaram-se 10  $\mu$ L de bactérias competentes E. coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (Invitrogen) lentamente em gelo e posteriormente adicionou-se 1  $\mu$ L do vector de expressão a amplificar. Deixaram-se as bactérias a repousar durante 30 minutos em gelo e de seguida efectuou-se um choque térmico a 42°C durante 45 segundos, deixando-as depois repousar em gelo durante 2 a 10 minutos. À chama adicionaram-se 55  $\mu$ L de meio LB (Luria-Bertani Broth) líquido a 5X, deixando as bactérias recuperar durante 1 hora a 37°C a uma agitação de 600 rpm (rotações por minuto). Plaquearam-se 50  $\mu$ L numa placa de LB-agár suplementado com ampicilina (Sigma) - antibiótico de selecção positiva - e colocou-se esta placa numa estufa a 37°C durante cerca de 16 horas. Posteriormente picou-se uma colónia, a qual foi inoculada em 4 mL de LB líquido suplementado com 4  $\mu$ L de ampicilina (50 ng/ $\mu$ L), que se deixou a crescer a 37°C a uma agitação de 220 rpm. 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 I* (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  $\mu$ L da amostra e diluiu-se em 59  $\mu$ 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**

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  $\beta$ -globina e outra reacção em que se utiliza um *primer reverse* que hibrida na região 3'UTR da  $\beta$ -globina (ver anexo A2). Utilizaram-se 300 ng da amostra, 1 a 2  $\mu$ L de um dos primers referidos a 2  $\mu$ M, 1  $\mu$ 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 perfez-se com água bidestilada até 10  $\mu$ L. O programa de PCR utilizado consistiu numa desnaturação inicial a 96°C durante 30 segundos, seguida de 26 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. 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*.

### **Cultura Celular**

A linha celular HeLa foi mantida em frascos de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt) com 5 e 15 mL de meio de cultura DMEM + GlutaMAX™-I (Gibco), respectivamente, suplementado com 10% de FBS (Gibco) e numa estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As passagens de células foram efectuadas a cada 3/4 dias com diluições normalmente de 1:8 com algumas variações entre 1:3 e 1:10 entre frascos de tamanhos iguais e com variações entre 1:3 e 1:24 entre frascos de diferentes dimensões. A passagem de células foi efectuada através da remoção do meio de cultura do frasco das células e aplicando entre 0.5 a 1 mL de tripsina (Gibco) para lavar e descolar as células do fundo do frasco, aplicando uma segunda vez o mesmo volume de tripsina e deixando actuar durante cerca de 1 a 2 minutos a 37°C. 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.

De modo a manter um stock da linha celular HeLa procedeu-se ao seu congelamento quando as células se encontravam com passagens inferiores à n.º 5. Assim, as células foram mantidas num frasco de 75 cm<sup>2</sup> até atingirem uma confluência de aproximadamente 90% sendo nessa altura descoladas da base do frasco através de duas aplicações de 1 mL de tripsina. De seguida procedeu-se à sua ressuspensão em 3 mL de meio de cultura e foram centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. O meio de cultura foi removido e adicionaram-se 2 mL de meio de congelamento - FBS + 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich) - nos quais se ressuspenderam as células cuidadosamente tendo sido posteriormente divididas por duas ampolas de congelamento. Procedeu-se a um congelamento gradual das células numa *criobox* até -80°C e posteriormente armazenaram-se em azoto líquido. Sempre que necessário procedeu-se ao descongelamento rápido de uma ampola de células na estufa a 37°C e à preparação de um frasco de 75 cm<sup>2</sup> com 18 mL de meio DMEM suplementado com 2 mL de FBS na qual se ressuspenderam cuidadosamente as células e foram deixadas a recuperar durante 24h na estufa a 37°C. Após as 24 horas renovou-se o meio às células. A linha celular HeLa foi mantida em cultura até à passagem n.º 25 e foi utilizada para experiências de transfecção entre as passagens n.º 4 e 25.

### **Transfecção de siRNAs**

A linha celular HeLa foi semeada em placas de 60 mm (Nunc) em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS por placa. A partir de um frasco de cultura utilizou-se a quantidade de células necessárias para que 24 horas depois de semeadas as células apresentassem uma confluência de aproximadamente 50%.

Depois de semeadas as células HeLa foram mantidas numa estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, período de tempo após o qual foram transfectadas

com siRNAs da Thermo Scientific (ver anexo A3) a uma concentração final de 20 nM. Para tal diluíram-se 1.1 µL de cada um dos siRNAs (luciferase, hDis3L1) 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 foi distribuída por cada placa de 60 mm, cujo meio foi previamente substituído. A placa foi novamente colocada na estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 60 horas.

Após o período de 60 horas procedeu-se a nova transfecção. As células foram transfectadas com um reforço de siRNA com uma concentração final de 20 nM e simultaneamente foram transfectadas com 300 ng de diferentes vectores de expressão previamente amplificados ( $\beta$ n,  $\beta$ 39 e  $\beta$ non-stop). A transfecção foi executada do modo previamente descrito, acrescido da adição de 300 ng de diferentes vectores de expressão a cada uma das diluições de 1.1 µL de siRNA em 250 µL de Opti-MEM antes de proceder à mistura com a diluição do agente de transfecção.

### **Extracção de RNA**

Células HeLa foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas com siRNAs e vectores de expressão conforme anteriormente descrito. Trinta horas após a segunda transfecção as células foram lisadas no frio, usando 300 µL de uma solução de lise NP40 em cada placa, após uma prévia dupla lavagem com uma solução de PBS a 4°C. Utilizou-se um raspador para ajudar a colher as células, das quais foi retirado um volume de 40 µL e de seguida adicionados 10 µL de SDS *loading buffer* a 5x tendo sido posteriormente armazenadas a -20°C. Ao restante volume foram adicionados 700 µL de tampão de lise RA1 do kit de extracção de RNA NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) e misturou-se gentilmente no vórtex. Prosseguiu-se com a extracção a partir do passo 3 do protocolo 5.1 (Total RNA purification from cultured cells and tissue with NucleoSpin® RNA II) deste kit de extracção. Sucintamente, 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**

A partir do RNA extraído de células HeLa procedeu-se à síntese do respectivo cDNA por transcrição reversa. Num volume final de 15 µL utilizaram-se 2 µg de RNA, 150 ng de *random primers*, 1.2 µL de dNTP mix a 10 mM e perfez-se o volume com água bidestilada. Aqueceu-se a mistura durante 10 minutos a 65°C e colocou-se rapidamente em gelo durante cerca de 2

minutos. Em seguida adicionaram-se 5 µL de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 0.325 µL de DTT a 0.1M (Invitrogen), 0.5 µL de RNase OUT™ (20 unidades, Invitrogen), 0.5 µL de SuperScript™ II RT (100 unidades, Invitrogen) e perfez-se com água bidestilada para um volume final de 25 µL. Agitaram-se gentilmente os conteúdos da mistura e incubaram-se a 25°C durante 10 minutos, depois a 42°C durante 50 minutos e inactivou-se a reacção aquecendo a 70°C durante 15 minutos.

### **RT-PCR**

As reacções de PCR para semi-quantificar os cDNAs de hDis3L1 e GAPDH foram realizadas em condições similares para os dois transcritos, em que 4 µL de cDNA foram amplificados num volume de reacção de 50 µL usando 36.4 µL de água bidestilada, 5 µL de tampão PCR 10X (ver anexo A1), 0.7 µL de dNTP mix a 25 mM, 0.4 µL de BSA a 0.1% e 0.5 µL de taq DNA polimerase (5 unidades/µL). Para cada cDNA foram previamente efectuadas várias diluições seriadas (1:2, 1:4 e 1:8) tendo sido utilizados 4 µL das diferentes diluições para reacções distintas. Foram utilizados 3 µL de cada par de primers (hDis3L1 F e hDis3L1 R, GAPDH F2 e GAPDH R2 – ver anexo A2) a 10 µM para cada reacção. O programa de PCR utilizado consistiu numa desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 27 ciclos de uma desnaturação a 95°C durante 1 minuto, uma hibridação a 56°C, para os primers de GAPDH, ou a 60°C, no caso dos primers de hDis3L, em ambos os casos durante 30 segundos e uma extensão a 72°C também durante 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C durante 4 minutos. As amostras foram corridas por electroforese num gel de agarose de 1.5 a 2% corado com brometo de etídio. O gel foi posteriormente visualizado num transiluminador (Uvitec) e as bandas foram analisadas densitometricamente usando o software ImageJ (NIH).

### **RT-qPCR**

A quantificação dos transcritos de β-globina foi realizada usando RT-qPCR no sistema de detecção ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Os primers foram desenhados de modo a amplificar especificamente transcritos de mRNA uma vez que hibridam na junção exão 2 – exão 3 da β-globina originando um amplificação de 51 nucleótidos.

O cDNA utilizado foi sintetizado de acordo com o método previamente descrito. Cada amostra foi diluída de 1:15 e usaram-se 5 µL aos quais se adicionaram 12.5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 2.5 µL de cada um dos primers (BcDNART#2F e BcDNART#2R – ver anexo A2) a 1 µM cada um e 2.5 µL de água bidestilada num volume total de 25 µL. A reacção de PCR consistiu numa primeira etapa de desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de uma segunda etapa de 40 ciclos na qual ocorreu uma desnaturação a 95°C durante 15 segundos seguida de uma fase de hibridação e extensão de 60°C durante 30 segundos. Na etapa final procedeu-se a um ciclo de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e 15 segundos novamente a 95°C.

As reacções de PCR foram corridas em triplicado para cada amostra, tendo sido corridas em paralelo diluições seriadas de 1:3, 1:15 e 1:75 de uma amostra padrão de modo a gerar uma recta de regressão linear. Paralelamente, outras reacções com os mesmos cDNAs



diluídos em 1:15 foram corridas para amplificar o gene de resistência à puromicina, usado como controlo interno, com um par de primers (PuroRT#2F e PuroRT#2R – ver anexo A2) a 0.9  $\mu$ M cada que originam um amplicão de 42 nucleótidos. Foram também corridas diluições seriadas de 1:3, 1:15 e 1:75 de uma amostra padrão de modo a traçar uma recta de regressão linear para os níveis de expressão do gene de resistência à puromicina. Os níveis de mRNA das amostras testadas foram derivados das curvas de standardização e expressos como alterações relativas dos níveis de expressão dos transcritos de  $\beta$ -globina depois de normalizados aos respectivos valores do gene de resistência à puromicina.

Para a quantificação dos transcritos de HFE recorreu-se ao mesmo sistema descrito para a  $\beta$ -globina e a puromicina, utilizando-se respectivamente os primers HFE ex7 F e HFE ex7 R para a HFE e os primers Gps1 F e Gps1 R (ver anexo A2) para o controlo interno Gps1 (COP9 *signalosome complex subunit 1*) a 1  $\mu$ M cada. A reacção de PCR foi em tudo semelhante à já descrita para a  $\beta$ -globina com excepção da temperatura de extensão que se realizou a 65°C.

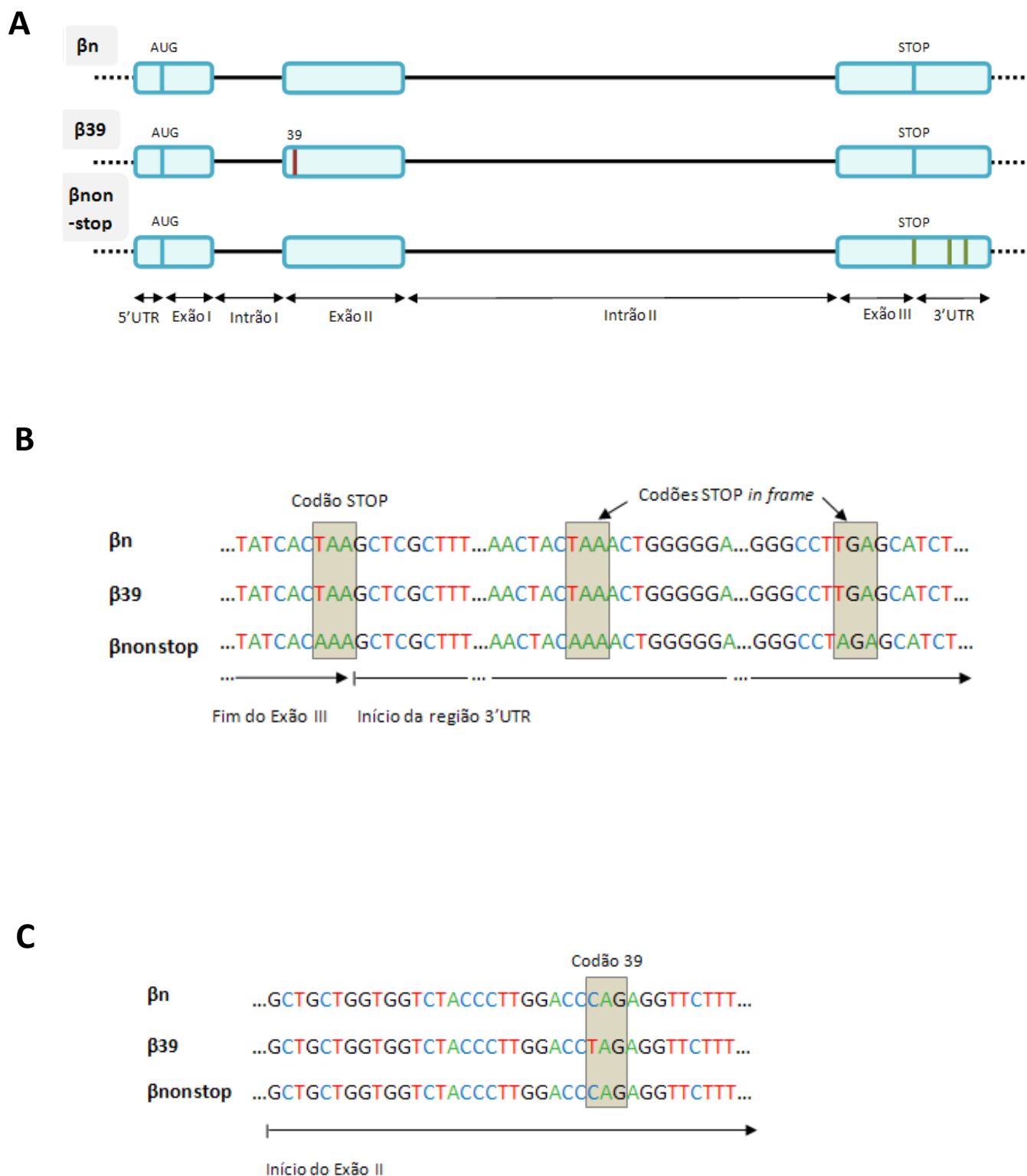
### Western Blot

As amostras dos lisados de células HeLa conservados com SDS buffer a -20°C, cujo método de colheita foi já referido anteriormente, foram aplicadas num gel de SDS-PAGE com um gel de resolução a 10% e um gel de concentração a 4%. Previamente à aplicação procedeu-se à desnaturação das amostras a 95°C durante 10 minutos. A corrida do gel efectuou-se a uma amperagem fixa de 20 mA durante 1 hora. Durante a electroforese, uma membrana de nitrocelulose 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. A membrana foi posteriormente corada com azul de Coomassie e o excesso de corante foi removido com uma solução *Destain* durante 30 minutos. Lavou-se a membrana duas vezes com TBST 1X e bloqueou-se com uma solução de leite em pó em TBST durante 1 hora. Removeu-se o excesso de leite com TBST e procedeu-se à imunomarcção. A membrana foi dividida em duas partes pelo local do marcador de 75 kDa de modo a ter um ensaio para o anticorpo anti-hDis3L1 (106.81 kDa) e para o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina (50 kDa) como controlo interno e de carregamento do gel. Primeiro foi realizada uma incubação com um anticorpo primário policlonal de ratinho anti-hDis3L1 (Abnova) a diferentes diluições (1:200, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2000) durante 1 hora, após a qual se lavou várias vezes a membrana em TBST num total de 20 minutos de lavagem. Paralelamente efectuou-se uma incubação com um anticorpo primário monoclonal de ratinho anti- $\alpha$ -tubulina a uma diluição de 1:5000 nas mesmas condições. Posteriormente foi efectuada a incubação com o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de ratinho, conjugado com peroxidase HPR (horseradish-peroxidase), a uma diluição de 1:4000 durante 1 hora. A membrana foi lavada novamente em TBST por várias vezes durante 30 minutos. Por fim 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 feitas exposições em chapas radiográficas a vários tempos cuja revelação foi efectuada no processador Kodak Medical X-ray Processor 102. A composição das soluções utilizadas encontra-se no anexo A4.

## **Resultados**

No estudo dos mecanismos de NMD e NSD utilizam-se genes modelo cujos níveis de mRNA nas células estudadas mostram o grau de eficiência destes mecanismos. Uma forma de fazer variar esta eficiência passa pela inibição da expressão de componentes importantes para o funcionamento destas vias de controlo de qualidade. Assim, de modo a estudar a eventual participação da exoribonuclease humana hDis3L1 nestes mecanismos recorreram-se a técnicas de RNAi que permitissem diminuir os respectivos níveis de mRNA na célula e consequentemente verificar se essa diminuição tem impacto nos níveis dos transcritos dos genes modelos que são alvo destes processos. Para isso recorreu-se ao gene normal da  $\beta$ -globina ( $\beta$ n), cuja estrutura se encontra representada na Figura 7A, e a duas variações deste gene: o gene  $\beta$ 39 e o gene  $\beta$ nonstop. O gene  $\beta$ 39 possui uma mutação *nonsense* no codão 39 – situado no início do exão II – a qual resulta num codão de terminação da tradução prematuro que torna o transcrito deste gene susceptível ao mecanismo de NMD, e o gene  $\beta$ nonstop que possui uma mutação *nonstop* no codão stop fisiológico que evita a paragem da tradução neste codão e duas mutações *nonstop* em dois locais a jusante na zona 3'UTR que codificariam para dois codões stop em fase, estas três modificações no gene  $\beta$ nonstop tornam o transcrito resultante sensível ao(s) mecanismo(s) celular(es) de detecção de transcritos *nonstop* (ver Figura 7A). Estes três genes já existiam no laboratório inseridos em vectores de expressão tendo-se procedido à sua amplificação em bactérias E.coli DH5 $\alpha$ , e posterior sequenciação para confirmação das respectivas sequências, de modo a poderem ser posteriormente utilizados em experiências de transfecção em células HeLa. As sequências obtidas para os 3 genes modelo junto ao codão 39 encontram-se representadas na Figura 7B e as obtidas junto ao codão stop fisiológico e aos dois codões stop em fase na região 3'UTR encontram-se representadas na Figura 7C.

Para verificar os níveis dos mRNAs correspondentes aos genes modelo em condições de inibição da subunidade hDis3L1 do exossoma procederam-se a experiências de RNAi em células HeLa as quais foram submetidas a um protocolo de 6 dias, como anteriormente descrito, durante o qual foram transfectadas com siRNAs para a hDis3L1 juntamente com cada um dos genes modelo. Como controlo utilizaram-se analogamente siRNAs para a luciferase, um transcrito não específico (para comparar os níveis destes genes numa situação normal, em que não existe inibição da hDis3L1 e também para eliminar artefactos da técnica). Assim, após a colheita das células, verificaram-se os níveis de *knockdown* para a hDis3L1 pela técnica de RT-PCR semi-quantitativo. Um exemplo dos resultados obtidos pode ser visualizado na Figura 8. Os níveis de inibição da hDis3L1 medidos através desta técnica variaram entre os 60% e os 75% tendo apresentado uma média de 67%. Uma vez que o RT-PCR não permite obter uma quantificação rigorosa devido às limitações inerentes à técnica pretendeu-se medir os níveis de *knockdown* da hDis3L1 por Western Blot recorrendo a um anticorpo anti-hDis3L1. Como controlo da quantidade de proteína utilizada no ensaio utilizou-se um anticorpo contra a  $\alpha$ -tubulina. Como pode ser observado na Figura 9 não foi possível obter qualquer sinal para a proteína hDis3L1 para qualquer uma das diluições de anticorpo testadas (1:2000, 1:1000, 1:500, 1:250 e 1:200, esta última não apresentada na imagem), cuja dimensão prevista é de 106.81 kDa, em qualquer das amostras utilizadas (tratadas ou não com siRNA para hDis3L1), tendo sido obtido apenas sinal para a  $\alpha$ -tubulina em todas as amostras testadas e cujo tamanho é de 50 kDa.

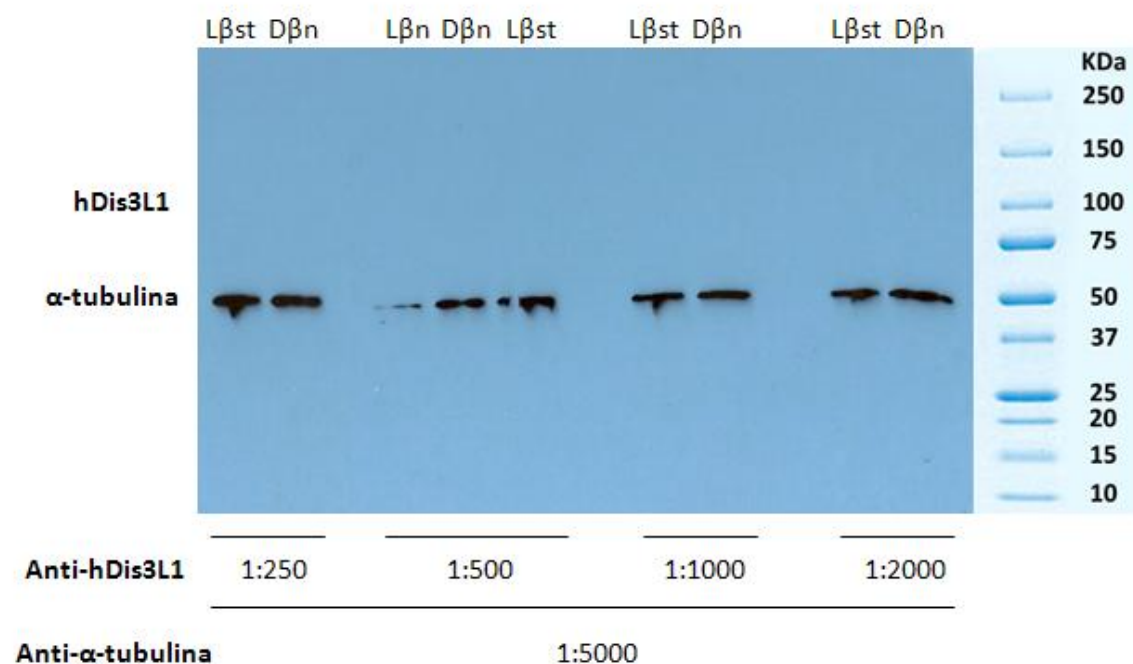


**Figura 7** – Representação dos 3 genes modelo utilizados e das suas respectivas mutações. **(A)** Estrutura dos três genes modelo utilizados, indicando as dimensões relativas da região 5'UTR, dos exões, dos intrões e da região 3'UTR, e também a localização do codão 39 (a vermelho) no gene  $\beta 39$  e das modificações no codão *stop* fisiológico e dos codões *stop* em fase no gene  $\beta nonstop$  (a verde). O tracejado representa o local onde o gene foi inserido no vector de expressão **(B)** Apresentação dos resultados das sequenciações dos DNAs plasmídicos para a zona que ladeia o codão 39 nos três genes modelo, mostrando a modificação efectuada neste codão para o gene  $\beta 39$ . **(C)** Apresentação dos resultados das sequenciações para as zonas que ladeiam o codão *stop* fisiológico e os codões *stop* em fase na região 3'UTR, evidenciando as modificações efectuadas nestes locais para o gene  $\beta nonstop$ .



**Figura 8** – Imagem representativa da análise por RT-PCR semi-quantitativo da quantificação do cDNA de hDis3L1 após tratamento com siRNAs para hDis3L1 comparativamente com tratamento de siRNAs para luciferase. Como normalizador utilizou-se um gene *house-keeping*, o GAPDH, para normalizar os valores obtidos para a hDis3L1.

Estes resultados mostram que por um lado a técnica de western funcionou uma vez que é detectada a proteína  $\alpha$ -tubulina, por outro indicam que possivelmente o anticorpo usado para a detecção da hDis3L1 não tem sensibilidade suficiente para detectar a proteína nos lisados utilizados. É de notar que embora não seja detectada no Western, o mRNA da proteína hDis3L1 é detectado no RT-PCR semi-quantitativo.



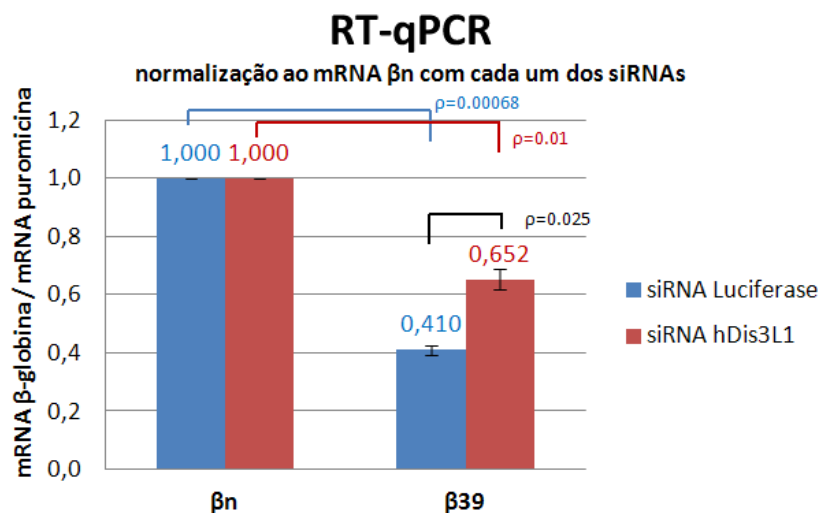
**Figura 9** – Imagem representativa de Western Blot realizado para detecção da proteína hDis3L1. Não se obteve sinal para a proteína hDis3L1 em qualquer um dos ensaios efectuados, tendo-se variado a diluição do anticorpo primário entre 1:200 (não apresentado) e 1:5000. Como controlo, utilizou-se o anticorpo primário a uma diluição de 1:5000 para a  $\alpha$ -tubulina cuja proteína apresenta sinal nos 50 KDa para todos os ensaios efectuados. Utilizaram-se amostras de células tratadas com siRNAs para a luciferase e de células tratadas com siRNAs para a hDis3L1. L $\beta$ st (Células transfectadas com siRNAs para luciferase e plasmídeo  $\beta nonstop$ ); D $\beta$ n (Células transfectadas com siRNAs para hDis3L1 e plasmídeo  $\beta n$ ); L $\beta$ n (Células transfectadas com siRNAs para luciferase e plasmídeo  $\beta n$ ).

Para as experiências cujos valores de *knockdown* da hDis3L1 foram considerados aceitáveis (entre 60 e 75%) pretendeu-se quantificar os níveis dos mRNAs correspondentes aos genes modelos transfectados nas células HeLa recorrendo-se à técnica de RT-qPCR. Os resultados encontram-se compilados nos gráficos apresentados na Figura 10.

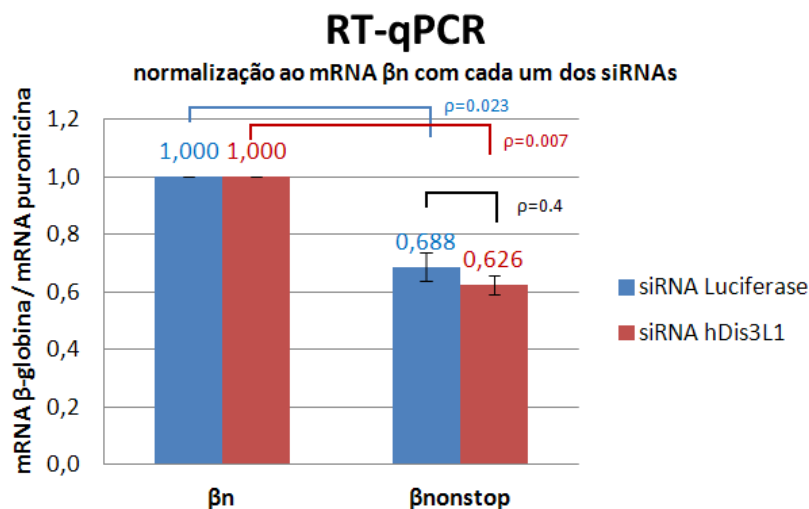
A normalização dos valores obtidos para células transfectadas com o transcrito  $\beta n$  nas condições de co-transfecção com siRNA para luciferase como para siRNA de hDis3L1 (Figura 10, Gráfico 1), permite-nos a visualização da variação dos níveis do transcrito  $\beta 39$  em relação ao transcrito  $\beta n$  na respectiva condição de *knockdown*. Relativamente ao mRNA  $\beta 39$ , sendo alvo do mecanismo de NMD [59] verifica-se que os seus níveis nas células transfectadas com siRNAs para a luciferase, ou seja, em condições normais de níveis de hDis3L1, são 41% comparativamente ao mRNA de  $\beta n$  para condições equivalentes, o que representa um decréscimo significativo ( $p < 0.05$ ) e que está de acordo com o esperado [59]. Contudo, em células submetidas ao *knockdown* da hDis3L1, e que apresentam portanto níveis inferiores deste transcrito (e consequentemente menores níveis de hDis3L1), os níveis do transcrito  $\beta 39$  sobem para 65.2% em relação ao mRNA  $\beta n$ . Esta diferença de 24.2% ( $p < 0.05$ ) entre os níveis de mRNA  $\beta 39$  observada nas células com *knockdown* controlo ou *knockdown* da hDis3L1, representa o efeito da hDis3L1 na estabilização do mRNA  $\beta 39$  em condições de NMD.

Em relação ao transcrito  $\beta nonstop$  é possível verificar que em células transfectadas com siRNAs controlo os níveis do transcrito são cerca de 68.8% relativamente aos níveis de  $\beta n$  num cenário correspondente (Figura 10, Gráfico 2). Para situações de inibição da hDis3L1 verifica-se de modo equivalente níveis de 62.6% entre os valores do mRNA  $\beta n$  e os do mRNA  $\beta nonstop$ . Embora os valores observados do transcrito sejam elevados comparativamente ao que está descrito na literatura [40] este decréscimo nos dois casos é significativo ( $p < 0.05$ ). O *knockdown* da hDis3L1 não apresenta qualquer efeito sobre a estabilização do transcrito  $\beta nonstop$  não sendo significativa ( $p > 0.05$ ) a diferença entre os dois mRNAs nas diferentes condições de *knockdown*.

1

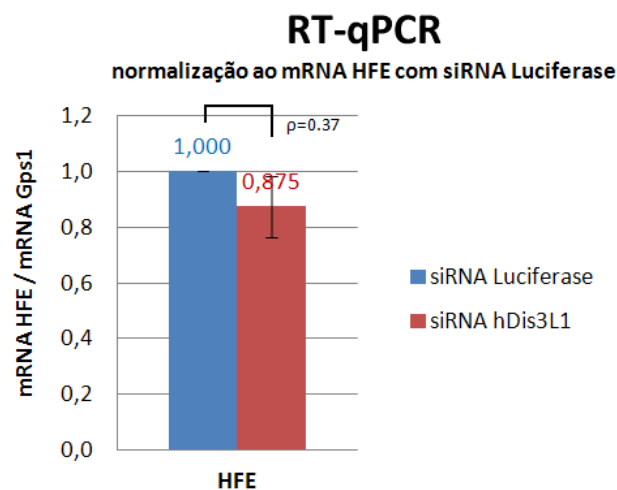


2



**Figura 10** – Quantificação dos transcritos repórter após tratamento das células com siRNAs para luciferase e hDis3L1. Nos gráficos 1 e 2 apresentam-se os níveis relativos dos transcritos de  $\beta$ -globina normalizados aos valores do controlo interno – o gene de resistência à puomicina – para células transfectadas com siRNAs para hDis3L1 ou para luciferase. No gráfico 1 observam-se os níveis dos transcritos  $\beta n$  e  $\beta 39$ , no gráfico 2 os níveis dos transcritos  $\beta n$  e  $\beta nonstop$ . As barras de erro representam o desvio padrão de 2 a 3 ensaios.

Com o intuito de testar o efeito do *knockdown* da hDis3L1 nos níveis de expressão de um transcrito endógeno que é naturalmente alvo de NMD, utilizou-se o transcrito HFE (Dados do laboratório de acolhimento submetidos para publicação). Este gene codifica uma proteína semelhante às proteínas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) classe I e que se encontra mutada na Hemocromatose Hereditária, um distúrbio autossómico recessivo do metabolismo do ferro [57]. Assim, de modo a quantificar o nível de mRNA HFE em células tratadas com siRNAs para a hDis3L1 e com siRNAs para luciferase recorreu-se novamente à técnica de RT-qPCR. Tendo como normalizador dos níveis de mRNA de HFE o mRNA obtido das células transfectadas com siRNA luciferase verifica-se que quando as células são tratadas com siRNAs para hDis3L1 os níveis de HFE parecem sofrer uma ligeira redução de cerca de 12.5% (Figura 11).



**Figura 11** – Quantificação dos transcritos repórter após tratamento das células com siRNAs para luciferase e hDis3L1. No gráfico apresentam-se os níveis relativos dos transcritos de HFE normalizados aos valores do controlo interno, Gps1, para células transfectadas com siRNAs para hDis3L1 ou para luciferase. As barras de erro representam o desvio padrão de 2 ensaios.

## Discussão

Neste trabalho pretendeu-se determinar se a subunidade hDis3L1 do exossoma humano exerce alguma função em dois dos mecanismos de controlo de qualidade da expressão génica, o NMD e o NSD. Com esse intuito, utilizaram-se genes modelo cujos níveis de mRNA nas células estudadas mostram o grau de eficiência destes mecanismos. Uma forma de fazer variar esta eficiência passa pela inibição da expressão de componentes importantes para o funcionamento destas vias de controlo de qualidade.

Neste estudo procedeu-se à transfecção de células HeLa com siRNAs para a hDis3L1, mas também para a luciferase, um transcrito não existente nestas células, como situação controlo. De modo a quantificar a eficiência desta técnica recorreu-se à quantificação dos níveis de mRNA de hDis3L1 por RT-PCR semi-quantitativo. Verificou-se que em média a eficiência do *knockdown* atingiu os 67%. Devido às limitações na quantificação inerentes à técnica de RT-PCR, cuja natureza é apenas semi-quantitativa, procurou-se recorrer a uma técnica mais fidedigna dos valores da eficiência do *knockdown* da hDis3L1 – a técnica de *Western blot*. A quantificação do mRNA pode não ser representativa da actividade e quantidade da proteína existente nas células, devido ao diferente tempo de meia-vida de cada proteína em estudo. A técnica de *Western blot* por sua vez reflecte os níveis relativos de proteína existentes na célula, permitindo afirmar de um modo mais seguro que a técnica de RNAi está a ser eficaz. Apesar de se ter procedido a vários ensaios desta técnica não foi possível observar qualquer sinal para a proteína hDis3L1 para as várias diluições testadas do anticorpo anti-hDis3L1. Uma vez que para o anticorpo da  $\alpha$ -tubulina foi sempre possível detectar as respectivas bandas de 50 kDa, e que para ambos os anticorpos primários foram utilizadas as mesmas condições de ensaio (como por exemplo o mesmo anticorpo secundário), determinou-se que o anticorpo para a hDis3L1 não se encontrava funcional ou não era suficientemente sensível para a detecção da proteína hDis3L1 nas nossas amostras. Assim, para distinguir experiências cuja eficiência de *knockdown* se considerou suficiente para prosseguir para a determinação dos níveis de mRNA dos genes modelo, foi apenas utilizada a técnica de RT-PCR semi-quantitativo.

Após a determinação da eficiência dos *knockdowns* efectuados procedeu-se, para as experiências cujos níveis foram considerados satisfatórios, para a técnica de RT-qPCR, a qual permite determinar com algum rigor os níveis relativos de mRNA correspondentes aos genes modelo transfectados nas células HeLa utilizadas. Os valores observados dos transcritos  $\beta$ n foram utilizados como normalizador tanto em situações de *knockdown* da luciferase como da hDis3L1 de modo a obter uma comparação mais clara entre estes valores e os correspondentes aos transcritos  $\beta$ 39 e  $\beta$ nonstop. Através da análise dos resultados obtidos podemos assim verificar que para os transcritos  $\beta$ 39, que são alvo do mecanismo de NMD, os níveis normais nas células correspondem a 41% ( $p < 0.05$ ) dos níveis de  $\beta$ n, como esperado, o que revela que de facto este transcrito apresenta uma menor estabilidade na célula devido ao seu reconhecimento pela maquinaria de NMD e subsequente degradação [59]. Quando as células são sujeitas ao *knockdown* da hDis3L1 verifica-se que os níveis de  $\beta$ 39 aumentam em cerca de 24.2% comparativamente à situação normal, registando-se um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 41% para 65.2% dos níveis de  $\beta$ 39, o que sugere que de facto a inibição da hDis3L1 tem um impacto no mecanismo de NMD. Esta inibição torna possivelmente o mecanismo de NMD menos eficiente, fazendo com que os mRNAs de  $\beta$ 39 adquiram maior estabilidade e sejam menos eficientemente degradados pela maquinaria de NMD existente na célula. Os resultados aqui obtidos indicam que a hDis3L1 parece ter de facto um papel no mecanismo de NMD nos humanos. Uma vez que a eficiência de *knockdown* obtida rondou os 67%, o que não é considerado particularmente muito alto, aliado ao facto dos valores obtidos por RT-PCR serem apenas indicações gerais da eficiência de *knockdown*, não é de descartar a hipótese de



que para valores superiores de inibição da hDis3L1 seja possível observar um efeito ainda maior na estabilização deste transcrito.

Para os transcritos  $\beta nonstop$  verifica-se que numa situação normal os valores na célula representam aproximadamente 68.8% ( $p < 0.05$ ) dos valores observados para o transcrito  $\beta n$  o que sugere que apesar de não se verificar uma eficiência tão alta como no NMD, verifica-se a participação do mecanismo de NSD no controlo da expressão génica de transcritos *nonstop* em células HeLa. No entanto, uma vez que esta diminuição não é tão pronunciada como no caso do NMD, é possível que para além do mecanismo de NSD, o mecanismo de inibição da tradução pós iniciação de transcritos *nonsense*, sugerido por alguns trabalhos [37,38], pode também exercer um papel importante no controlo da expressão génica destes transcritos. De acordo com os dados aqui obtidos, juntamente com os resultados já publicados por outros grupos de investigação [37,38,40,45] podemos teorizar que estes mecanismos podem funcionar conjuntamente na célula, embora em algumas situações um destes mecanismos possa dominar sobre o outro, dependendo talvez do tipo celular, da disponibilidade dos componentes de cada um dos mecanismos na célula ou do tipo de genes submetidos a estes mecanismos, o que pode justificar a dualidade de resultados obtidos pelos vários grupos nesta temática [37,38,40,45]. Em situações de *knockdown* da hDis3L1 não se verificam variações significativas ( $p > 0.05$ ) nos valores de  $\beta nonstop$  em relação à situação normal o que sugere que a hDis3L1 não se encontra envolvida no NSD. No entanto, uma vez que a eficiência do NSD não parece ser elevada neste tipo celular ou não ser elevada para os genes de  $\beta$ -globina, existe a possibilidade de que em células cujo mecanismo de NSD seja mais eficiente ou em situações em que sejam utilizados modelos mais sensíveis ao NSD, que os resultados do efeito de um *knockdown* da hDis3L1 nesses modelos sejam diferentes daqueles aqui obtidos.

De modo a confirmar a participação generalizada da hDis3L1 no mecanismo de NMD decidiu-se usar um transcrito endógeno que é naturalmente alvo de NMD, o transcrito HFE (dados do laboratório de acolhimento submetidos para publicação). Os resultados de RT-qPCR mostraram uma ligeira diminuição não significativa ( $p > 0.05$ ) dos valores de HFE quando as células são tratadas com siRNAs para a hDis3L1 o que não confirma os resultados obtidos para a  $\beta$ -globina. No entanto, sabe-se que o transcrito principal da HFE, o qual é regulado pelo NMD, apresenta em geral níveis muito baixos nas células [58], assim é possível que a baixa expressão da HFE não permita uma resolução suficiente na medição da variação deste transcrito em condições de inibição da hDis3L1. Este facto aliado aos níveis modestos de *knockdown* obtidos para a hDis3L1 pode justificar a não observação de uma estabilização dos transcritos de HFE nas condições estudadas.

Numa outra abordagem, pretendeu-se testar o sistema da  $\beta$ -globina para um outro gene modelo, o  $\beta 26$ , o qual possui no códon 26 (localizado no éxon I) uma mutação *nonsense* que faz com que este transcrito seja, tal como o  $\beta 39$ , alvo do mecanismo de NMD. Pretendeu-se assim testar se a acção da hDis3L1 sobre os níveis de  $\beta 39$  também se verificava noutro gene modelo alvo do NMD. Foram efectuados ensaios nos quais se transfectaram células HeLa com siRNAs para a XRN1, uma exoribonuclease citoplasmática que se sabe estar envolvida na degradação de transcritos alvo do NMD. Nestes ensaios foram aplicados os mesmos protocolos usados para os siRNAs da luciferase ou da hDis3L1. Desta forma os resultados obtidos poderiam ser utilizados para comparar a amplitude da estabilização dos transcritos dos genes modelo nas condições de inibição da XRN1 ou da hDis3L1. Para estes dois conjuntos de experiências não foi possível obter eficiências de *knockdown* satisfatórias para obter uma quantificação dos transcritos que fosse fidedigna, não tendo sido por isso possível usar estes dados para melhor compreender o grau de envolvimento da hDis3L1 no NMD.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho é possível afirmar que a subunidade hDis3L1 do exossoma humano parece exercer uma função relevante na degradação de transcritos *nonsense* participando assim no mecanismo de NMD em humanos. Por outro lado esta subunidade não parece estar envolvida no mecanismo de degradação de transcritos *nonstop*, não participando por isso no mecanismo de NSD em humanos. No entanto os dados obtidos representam ainda um pequeno passo na clarificação da intervenção desta subunidade do exossoma nestes dois mecanismos de controlo de qualidade da expressão génica. Vários problemas necessitam de ser ainda ultrapassados e várias experiências necessitam de ser executadas de modo a confirmar os resultados obtidos e aqui expostos. Nomeadamente, será necessário aumentar a eficiência de *knockdown* para poder perceber a magnitude do impacto da inibição da proteína hDis3L1 nos mecanismos aqui estudados. Uma forma de melhorar a eficiência do RNAi poderá ser através do aumento da concentração de siRNAs transfectados. Por outro lado será benéfico confirmar os valores de eficiência do *knockdown* através da técnica de *Western blot* utilizando um anticorpo adequado. Em relação aos sistemas de expressão utilizados será importante enriquecer os genes modelos utilizados experimentando este tipo de abordagens com outros genes para além da  $\beta$ -globina de modo a confirmar que estes resultados não são específicos para esta família génica. Para um melhor entendimento da acção da hDis3L1 no NMD deverá ser feita uma comparação dos níveis de estabilização dos transcritos *nonsense* em situações de inibição da expressão de outras ribonucleases que se sabem intervir nestes mecanismos, como é o caso da XRN1, ou de ribonucleases cuja participação ainda é desconhecida, como são exemplo a hDis3, hDis3L2 ou a PM/SCI-100. Uma vez optimizado o *knockdown* seria eventualmente interessante verificar o efeito da hDis3L1 no NMD em outros tipos celulares de modo a comprovar a não especificidade da acção da hDis3L1 no NMD num só tipo celular. Em relação aos mecanismos responsáveis pelo controlo de mRNAs *nonstop* em células de mamífero, ainda existem dúvidas quanto ao processo responsável por este controlo. Porém, existem referências à acção do NSD mas também à acção de um mecanismo de inibição da tradução pós-iniciação independente da degradação deste tipo de transcritos [37,38] sendo necessário esclarecer o funcionamento deste sistema nas células humanas e de mamífero em geral. Concomitantemente, a experimentação com outros sistemas de expressão modificando os genes modelo utilizados e até o tipo de células, pode ser importante para confirmar os resultados obtidos neste trabalho de modo a validar o não envolvimento da hDis3L1 no mecanismo de NSD e também para perceber a importância deste mecanismo no controlo da expressão de mRNAs *nonstop* nas células de mamífero.

Em suma, os resultados aqui obtidos, indicativos de que a subunidade hDis3L1 do exossoma humano tem uma função relevante na degradação de transcritos com mutações *nonsense* sensíveis a NMD, podem assim contribuir para melhor compreender estes mecanismos envolvidos no controlo de qualidade da expressão génica. Este conhecimento pode possibilitar o desenvolvimento de ferramentas específicas para a manipulação do processo de NMD, o qual pode levar ao estabelecimento de terapias específicas direccionadas a patologias, como cancro e muitas doenças genéticas, associadas a este tipo de mutações *nonsense*.

## **Bibliografia**

- [1] Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, Saulière J, Wittkopp N, Izaurralde E (2007) mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Letters* 581(15):2845-2853.
- [2] Chang Y, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. *The Annual Review of Biochemistry* 76:51-74.
- [3] Romão L, Silva AL (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Letters* 583(3):499-505.
- [4] Fasken MB, Corbett AH (2009) Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biology* 6(3):237-241.
- [5] Doma MK, Parker R (2007) RNA Quality Control in Eukaryotes. *Cell* 131(4):660-668.
- [6] Mühlemann O (2008) Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model. *Biochemical Society Transactions* 36(Pt 3):497-501.
- [7] Lejeune F, Maquat L (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology* 17(3):309-315.
- [8] Tomecki R, Dziembowski A (2010) Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism. *RNA* 16(9):1692-1724.
- [9] Mühlemann O, Eberle AB, Stalder L, Orozco RZ (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779(9):538-549.
- [10] Stalder L, Mühlemann O (2008) The meaning of nonsense. *Trends in Cell Biology* 18(7):315-321.
- [11] Rehwinkel J, Raes J, Izaurralde E (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors. *TRENDS in Biochemical Sciences* 31(11):639-646.
- [12] Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 8(2):113-126.
- [13] Azzalin CM, Lingner J (2006) The Double Life of Upf1 in RNA and DNA Stability Pathways. *Cell Cycle* 5(14):1496-1498.
- [14] Amrani N, Dong S, He F, Ganesan R, Ghosh S, Kervestin S, Li C, Mangus DA, Spatrick P, Jacobson A (2006) Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochemical Society Transactions* 34(Pt 1):39-42.
- [15] Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, Ohno M, Dreyfuss G, Ohno S (2006) Binding on a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes and Development* 20(3):355-367.
- [16] Singh G, Jakob S, Kleedehn MG, Lykke-Andersen J (2007) Communication with the Exon-Junction Complex and Activation of Nonsense-Mediated Decay by Human Upf Proteins Occur in the Cytoplasm. *Molecular Cell* 27(5):780-792.
- [17] Wen J, Brogna S (2008) Nonsense-mediated mRNA decay. *Biochemical Society Transactions* 36(Pt 3):514-516.
- [18] Lewis BP, Green RE, Brenner SE (2003) Evidence for the widespread coupling alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *PNAS* 100(1):189-192.
- [19] Rebbapragada I, Lykke-Andersen J (2009) Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? *Current Opinion in Cell Biology* 21(3):394-402.

- [20] 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. *The EMBO Journal* 27(5):736-747.
- [21] Maquat LE, Hwang J, Sato H, Tang Y (2010) CBP80-promoted mRNP rearrangements during the pioneer round of translation, nonsense-mediated mRNA decay, and thereafter. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 75:127-134.
- [22] Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & Development* 21(15):1833-1856.
- [23] Kashima I, Jonas S, Jayachandran U, Buchwald G, Conti E, Lupas AN, Izarraulde E (2010) SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* 24(21):2440-2450.
- [24] Singh G, Rebbapragada I, Lykke-Andersen J (2008) A competition between Stimulators and Antagonists of Upf Complex Recruitment Governs Human Nonsense-Mediated mRNA Decay. *PLoS Biology* 6(4):0860-0871.
- [25] Singh G, Rebbapragada I, Lykke-Andersen J (2008) A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biology* 6(4):0860-0871.
- [26] Newbury SF (2006) Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochemical Society Transactions* 34(Pt 1):30-34.
- [27] Peixeiro I, Silva AL, Romão L (2011) Control of human beta-globin mRNA stability and its impact on beta-thalassemia phenotype. *Haematologica* 96(6):905-913.
- [28] Lejeune F, Li X, Maquat LE (2003) Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylation, and Exonucleolytic Activities. *Molecular Cell* 12(3):675-687.
- [29] Slomovic S, Fremder E, Staals RH, Pruijn GJ, Schuster G (2010) Addition of poly(A) and poly(A)-rich tails during RNA degradation in the cytoplasm of human cells. *PNAS* 107(16):7407-7412.
- [30] Muhrad D, Parker R (1994) Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370(6490):578-581.
- [31] Li Y, Song M, Kiledjian M (2011) Differential utilization of decapping enzymes in mammalian mRNA decay pathways. *RNA* 17(3):419-428.
- [32] Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 293(5532):1139-1142.
- [33] Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Mühlemann O (2010) Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell and Molecular Life Sciences* 67(5):677-700.
- [34] Stalder L, Mühlemann O (2009) Processing bodies are not required for mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 15(7):1265-1273.
- [35] 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  $\beta$ -globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA* 17(5):843-854.
- [36] Neu-Yilik G, Kulozik AE (2008) NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Advances in Genetics* 62:185-243.

- [37] Akimitsu N, Tanaka J, Pelletier J (2007) Translation of nonstop mRNA is repressed post-initiation in mammalian cells. *The EMBO Journal* 26(9):2327-2338.
- [38] Torres-Torronteras J, Rodriguez-Palmero A, Pinós T, Accarino A, Andreu AL, Pintos-Morell G, Martíí R (2011) A novel nonstop mutation in TYMP does not induce nonstop mRNA decay in a MNGIE patient with severe neuropathy. *Human Mutation* 32(4):E2061-E2068.
- [39] Wilson MA, Meaux S, van Hoof A (2007) A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics* 177(2):773-784.
- [40] Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295(5563):2258-2261.
- [41] Ge Z, Mehta P, Richards J, Karzai AW (2010) Non-stop mRNA decay initiates at the ribosome. *Molecular Microbiology* 78(5):1159-1170.
- [42] Inada T, Aiba H (2005) Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *The EMBO Journal* 24(8):1584-1595.
- [43] Schaeffer D, van Hoof A (2011) Different nuclease requirements for exosome-mediated degradation of normal and nonstop mRNAs. *PNAS* 108(6):2366-2371.
- [44] Atkinson GC, Baldauf SL, Haurlyuk V (2008) Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evolutionary Biology* 8:290.
- [45] van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295(5563):2262-2264.
- [46] Tomecki R, Draskowska K, Dziembowski A (2010) Mechanisms of RNA Degradation by the Eukaryotic Exosome. *ChemBioChem* 11(7):938-945.
- [47] Lebreton A, Séraphin B (2008) Exosome-mediated quality control: Substrate recruitment and molecular activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779(9):558-565.
- [48] Vanacova S, Stefl R (2007) The exosome and RNA quality control in the nucleus. *EMBO reports* 8(7):651-657.
- [49] Tomecki R, Kristiansen MK, Lykke-Andersen S, Chlebowsk A, Larsen KM, Szczesny RJ, Draskowska K, Pastula A, Andersen JS, Stepień PP, Dziembowski A, Jensen TH (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *The EMBO Journal* 29(14):2342-2357.
- [50] Kiss DL, Andrulis ED (2010) Genome-wide analysis reveals distinct substrate specificities of Rrp6, Dis3, and core exosome subunits. *RNA* 16(4):781-791.
- [51] Lykke-Andersen S, Brodersen DE, Jensen TH (2009) Origins and activities of the eukaryotic exosome. *Journal of Cell Science* 122(Pt 10):1487-1494.
- [52] Liu Q, Greimann JC, Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127(6):1233-1237.
- [53] Preker P, Nielsen J, Kammler S, Lykke-Andersen S, Christensen MS, Mapendano CK, Schierup MH, Jensen TH (2008) RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science* 322(5909):1851-1854.
- [54] Chlebowsk A, Tomecki R, López ME, Séraphin B, Dziembowski A (2010) Catalytic properties of the eukaryotic exosome. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 702:63-78.

- [55] Staals RH, Bronkhorst AW, Schilders G, Slomovic S, Schuster G, Heck AJ, Raijmakers R, Puijn GJ (2010) Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *The EMBO Journal* 29(14):2358-2367.
- [56] Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M, Arraiano CM, van Hoof A (2008) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature Structural & Molecular Biology* 16(1):56-62.
- [57] Martins R, Silva B, Proença D, Faustino P (2011) Differential *HFE* gene expression is regulated by alternative splicing in human tissues. *PLoS One* 6(3):e17542.
- [58] Sánchez M, bruguera M, Rodés J, Oliva R (2001) Complete characterization of the 3' region of the human and mouse hereditary hemochromatosis *HFE* gene and detection of novel splicing forms. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 27(1):35-43.
- [59] Inácio A, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, Faustino P, Lavinha J, Liebhaber SA, Romão L (2004) Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of Biological Chemistry* 279(31):32170-32180.

## Anexos

### A1 - Tampão de PCR 10X

- 27.41 mL água bidestilada
- 16.75 mL Tris-HCl pH 8.8 2 M, cF= 670 mM
- 4.15 mL Sulfato de Amônia (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M, cF= 166 mM
- 1.68 mL MgCl<sub>2</sub> 2 M, cF= 67 mM
- 13.4 µL EDTA 0.25 M, cF= 0.067 mM

Autoclavou-se a solução a 121°C durante 20 minutos. Antes de usar adicionaram-se 70.4 µL de β-mercaptoetanol 14.2 M, cF= 100 mM, a cada alíquota de 10 mL.

**Tabela A2 - Oligonucleótidos**

| Nome       | Gene                     | Organismo           | Posição   | Direção | Aplicação    | Sequência 5'→3'            |
|------------|--------------------------|---------------------|-----------|---------|--------------|----------------------------|
| Dis3L F    | hDis3L1                  | <i>H. sapiens</i>   | 265 cDNA  | Forward | RT-PCR       | atgcagacagcttgtcaagc       |
| Dis3L R    | hDis3L1                  | <i>H. sapiens</i>   | 693 cDNA  | Reverse | RT-PCR       | tgggtactccttcccatgg        |
| GAPDH F2   | GAPDH                    | <i>H. sapiens</i>   | 48 cDNA   | Forward | RT-PCR       | acagtcagccgcattctt         |
| GAPDH R2   | GAPDH                    | <i>H. sapiens</i>   | 141 cDNA  | Reverse | RT-PCR       | acgaccaaattccgttgactcc     |
| BcDNART#2F | β-globina                | <i>H. sapiens</i>   | 345 cDNA  | Forward | RT-qPCR      | gtggatcctgagaacttcaggct    |
| BcDNART#2R | β-globina                | <i>H. sapiens</i>   | 395 cDNA  | Reverse | RT-qPCR      | cagcacacagaccagcacgt       |
| PuroRT#2F  | Resistência à Puromicina | <i>S. alboniger</i> | 496 CDS   | Forward | RT-qPCR      | cgcaacctcccccttctacg       |
| PuroRT#2R  | Resistência à Puromicina | <i>S. alboniger</i> | 537 CDS   | Reverse | RT-qPCR      | ggtgacggtgaagccgag         |
| HFE ex7 F  | HFE                      | <i>H. sapiens</i>   | 291 cDNA  | Forward | RT-qPCR      | aagcattctgtcttgaagggca     |
| HFE ex7 R  | HFE                      | <i>H. sapiens</i>   | 341 cDNA  | Reverse | RT-qPCR      | ctgagctgtatatggtatcctgaagc |
| Gps1 F     | Gps1                     | <i>H. sapiens</i>   | 1530 cDNA | Forward | RT-qPCR      | cgagtccaagtacgcctcatg      |
| Gps1 R     | Gps1                     | <i>H. sapiens</i>   | 1582 cDNA | Reverse | RT-qPCR      | ggttgctctcatctcgtcca       |
| 5' UTR     | Beta-globina             | <i>H. sapiens</i>   | 1 DNA     | Forward | Sequenciação | acatttgcttctgacacac        |
| 3' UTR     | Beta-globina             | <i>H. sapiens</i>   | 1606 DNA  | Reverse | Sequenciação | gcaatgaaaataaatgtttttat    |

**Tabela A3 - siRNAs**

| Nome                                      | mRNA alvo  | Organismo         | Sequências 5'-3'  |
|---|------------|-------------------|---|
| hDis3L1 s e hDis3L as Pair 1              | hDis3L1    | <i>H. sapiens</i> | rCrCrA rUrGrU rArArC rCrGrU rArArG rArArU rAdTdT e rUrArU rUrCrU rUrArC rGrGrU rUrArC rArUrG rGdTdT |
| Luciferase GL2 e Luciferase GL2 as Pair 1 | Luciferase | <i>P. pyralis</i> | rCrGrU rArCrG rCrGrG rArArU rArCrU rUrCrG rAdTdT e rUrCrG rArArG rUrArU rUrCrC rGrCrG rUrArC rGdTdT |



#### A4 - 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 10%:

- 2.45 mL Água destilada
- 1.25 mL Tris-HCl pH 8.8 1.5 M
- 1.25 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

##### Azul de Coomassie:

- 1.25g Brilliant Blue G (Sigma)
- 225 mL Metanol
- 50 mL Ácido acético
- Água destilada até 500 mL

##### Destain:

- 225 mL Metanol
- 50 mL Ácido acético
- Água destilada até 500 mL

##### TBS 10X:

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

##### TBST 1X:

- 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