

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



# Tradução independente de *cap* da proteína humana *up-frameshift 1 (UPF1)* e cancro

**Neuza Sofia Augusto Silva Bacalhau**

**Orientador(es):**

Professora Doutora Luísa Maria Ferreira Romão Loison

Professora Doutora Sandra Cristina Cara de Anjo Casimiro

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre  
em Oncobiologia

**2020**



Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



# **Tradução independente de *cap* da proteína humana *up-frameshift* 1 (UPF1) e cancro**

**Neuza Sofia Augusto Silva Bacalhau**

**Orientador(es):**

Professora Doutora Luísa Maria Ferreira Romão Loison

Professora Doutora Sandra Cristina Cara de Anjo Casimiro

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre  
em Oncobiologia

**2020**



**Tradução independente de *cap* da proteína humana *up-frameshift 1* (UPF1) e cancro**

Neuza Sofia Augusto Silva Bacalhau

**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 19 de janeiro de 2021.**



“A ciência compõe-se de erros, que por sua vez são passos para a verdade.”

Júlio Verne



# Agradecimentos

---

Mais uma grande etapa da minha vida concluída. Em 2016, quando me candidatei a este mestrado não contava ser selecionada, mas fui, o esforço foi grande para terminar esta batalha mas consegui!

Com mais um capítulo de vida concluído surgem o nome das personagens que me acompanharam ao longo deste percurso.

Começo por agradecer às instituições que permitiram que este trabalho fosse realizado: Faculdade de Medicina de Lisboa da Universidade de Lisboa, por me ter aceitado como aluna e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), por me ter permitido desenvolver este trabalho nas suas instalações, mais precisamente à Dr<sup>a</sup> Glória Isidro, coordenadora do Departamento de Génica Humana (DGH).

Realizar a tese final de mestrado não foi uma tarefa fácil, pois tive que a conciliar a minha atividade profissional com a académica. Agradeço à minha orientadora Doutora Luísa Romão e ao meu superior hierárquico, Hildeberto Correia. Obrigada pelo esforço e dedicação em me ajudar a conciliar ambas as atividades. À Doutora Luísa Romão agradeço por me ter permitido desenvolver este projeto no seu laboratório e por me ter acolhido de forma calorosa, de facto só me conhecia dos corredores do DGH, e tratou-me de igual forma relativamente aos seus colaboradores. Agradeço muito toda a compreensão demonstrada ao longo da realização deste projeto.

Na orientação deste trabalho de igual forma outras duas pessoas foram muito importantes, a Rafaela e a Juliane. Estas duas colegas apresentavam sempre uma alternativa para o que não corria bem e conseguiam sempre transmitir motivação e entusiasmo relativamente ao meu projeto, nunca me deixaram desmotivar nos momentos mais difíceis. Para além disso muito me foi ensinado e partilhado também a nível pessoal, com a Rafaela partilhei a gravidez do primeiro filho, a trabalhar num laboratório onde muitos perigos existem nesta fase da nossa vida. Ambas foram sem dúvida a minha grande orientação no laboratório, o meu norte e o meu sul, conseguindo muitas vezes orientar-me para este ou oeste. Obrigada por tudo minhas “Sub-Orientadoras”, sem a vossa ajuda este projeto não teria sido concluído.

Aos restantes elementos do laboratório do Metabolismo do MRNA, Rafael, Joana, Patrícia, Paulo, Manuel e Bruna agradeço a forma como me receberam, as discussões científicas enriquecedoras, os festejos das pequenas vitórias e a ajuda prestada para

solucionar as minhas derrotas. Agradeço ainda o facto de estarem sempre disponíveis para me ajudar, esclarecer e ouvir. Um especial agradecimento à Bruna, que muito me ensinou e apoiou quando a vida me impossibilitou de realizar algumas tarefas laboratoriais. Obrigada!

Agradeço também, as amizades que encontrei nesta etapa da minha vida, foi no mestrado que tive o prazer de conhecer as minhas queridas amigas Sofia e Catarina. Obrigada meninas por entenderem que apesar de partilhar convosco a minha vida académica, estávamos em fases distintas a nível pessoal. Um obrigada especial à Catarina pelo apoio e ajuda incondicional. Esta minha amiga, foi imprescindível para concluir este projeto. Nem tenho palavras para descrever o que me ajudou, é sem dúvida uma pessoa incrível e uma amiga para a vida!

Às minhas amigas de infância, Catarina, Vânia, Rita e a todos os meus amigos de vida Mariana, Paulo, Lara, Raquel, Filomena e Sílvia, obrigada pela confiança, apoio e incentivo, só de falar convosco regressava novamente toda a vontade e força de terminar esta longa batalha.

À minha família um muito obrigada por me acompanharem ao longo de mais uma caminhada difícil. Aos meus pais, tios, primos, avós, sogros muito obrigada por TUDO!

À Carolina, a minha irmã, a minha filha adotiva, a minha amiga pequena, uma das pessoas mais especiais da minha vida, obrigada! Obrigada, por acreditar em mim quando eu já não acreditava, obrigada por dizer “Tu consegues mana!” quando eu pensava já ter desistido, obrigada por tratar do nosso pequeno com todo o amor e carinho para eu estar horas infinitas a trabalhar no computador, obrigada pelos almoços que fazia para eu me dedicar ao meu projeto, obrigada pelos mimos de apoio, incentivo e força para continuar a minha caminhada. Obrigada miúda! Não é por seres a minha única irmã, mas de facto és única!

Por vezes os últimos são os primeiros, obrigada André! Obrigada a este Homem, com H grande por estar ao meu lado (não é tarefa fácil)! Obrigada pelo que és e significas para mim na vida. Foste muito importante na realização deste “nosso” projeto. Obrigada ao meu marido, namorado, companheiro de vida, amigo e agora pai do meu filho, obrigada por partilhar comigo este longo caminho. O caminho percorrido até aqui nem sempre foi fácil, encontramos muitas pedras, algumas subidas, muitas descidas, numerosas quedas, algumas mais aparatosas que outras...De tudo ao longo deste percurso, o que tive sempre mais certo foi o seu apoio e companheirismo. Sempre que

caía estava lá para me ajudar a levantar, quando chorava secava as minhas lágrimas, quando falava, ouvia-me com toda a atenção, mesmo não entendendo o que dizia, quando o dia corria mal e chegava frustrada e com vontade de desistir de tudo, incentivava-me a continuar sem olhar para trás. Obrigada André por tudo o que lutámos juntos! Poderia agradecer e escrever obrigada vezes infinitas que seriam todas poucas!

Ao longo deste mestrado, fui mãe. Nasceu o meu filho José Filipe. Mesmo com meses, já aprendi muito com ele, principalmente a avaliar o que realmente é importante na vida! Também foi por ele, que nunca desisti de concluir esta etapa da minha vida académica. Pretendo ensinar-lhe nunca desistir dos nossos sonhos, por mais impossíveis que nos pareçam. Obrigada Zé, por me teres escolhido para tua mãe e por me ensinares tanto com o olhar, choro e riso!

Obrigada a todos por me terem acompanhado e lutado comigo pelo meu sonho!

MUITO Obrigada!

Neuza B.



# Resumo

---

A regulação da síntese proteica desempenha um papel crítico no crescimento celular. O início da tradução é fortemente regulado por uma concentração equilibrada de fatores envolvidos na síntese das proteínas e é considerada um passo limitante da síntese proteica. Na maioria dos casos (tradução canónica), o início da tradução é um mecanismo dependente de *cap*, que se inicia com o recrutamento da subunidade 40S do ribossoma e vários fatores de iniciação, para a estrutura *cap*, localizada na extremidade 5' do mRNA. De seguida, este complexo denominado 48S, faz a leitura de toda a região 5' transcrita não-traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*) até atingir o primeiro codão de iniciação em contexto de Kozak favorável. Contudo, vários transcritos, entre os quais oncogenes, fatores de crescimento e proteínas envolvidas na regulação da morte celular programada, conseguem manter os seus níveis de expressão proteica em circunstâncias que condicionam a iniciação canónica da tradução. Este mecanismo alternativo de iniciação da tradução ocorre sem a necessidade de reconhecimento da estrutura *cap* e/ou de leitura da 5'UTR. Como exemplo, temos a tradução independente de *cap* mediada por um local interno de entrada do ribossoma (IRES, do inglês *internal ribosome entry site*). A tradução mediada por IRES requer várias proteínas atuando em *trans*, conhecidas como ITAF (do inglês *IRES trans-acting factor*). Este mecanismo envolve o recrutamento direto do ribossoma para a vizinhança do codão de iniciação sem o envolvimento da estrutura *cap*. Este mecanismo não-canónico de iniciação da tradução pode sustentar a síntese proteica sob condições de stress e promover/combater a tumorigénese.

A *up-frameshift 1* humana (UPF1, do inglês *up-frameshift 1*) é uma proteína-chave envolvida no mecanismo de degradação rápida de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA do inglês *messenger ribonucleic*) portadores de mutações *nonsense* (NMD, do inglês *nonsense-mediated mRNA decay*), replicação e homeostase de telómeros, e progressão do ciclo celular, desempenhando por isso um papel crucial na célula. Resultados anteriores do grupo de investigação onde desenvolvi este trabalho mostram que esta proteína tem a capacidade de ser traduzida de forma independente de *cap*, mediada por IRES, em condições normais, mas também em condições prejudiciais à iniciação da tradução canónica, como hipóxia ou stress do retículo endoplasmático, em linhas celulares de cancro do colo do útero e colorretal.

Na presente dissertação, propusemos caracterizar o significado biológico da tradução mediada pelo IRES existente na 5'UTR de *UPF1*. Para tal, testámos a relevância da

tradução independente de *cap* de UPF1 em mecanismos em que esta é crucial, tal como o NMD, através do silenciamento de *UPF1* endógeno recorrendo a siRNA dirigidos à 3'UTR de *UPF1* e promovendo a tradução de UPF1 de forma independente de *cap* recorrendo a mRNA transcritos *in vitro* a partir dos plasmídeos em estudo. Os resultados do silenciamento de *UPF1* foram bastante eficazes, no entanto, não foi possível obter resultados com diferenças significativas entre os níveis de expressão de mRNA controlo e mRNA com o IRES da 5'UTR de *UPF1*. É necessário utilizar um plasmídeo dicistrónico para obter resultados mais fiáveis relativamente à funcionalidade biológica de UPF1 traduzida via IRES cujas clonagens já foram conseguidas.

Acreditamos que os resultados obtidos são o primeiro passo para uma melhor caracterização de UPF1 traduzida via IRES, podendo este mecanismo ser bastante útil no desenvolvimento de novas terapias no combate ao cancro.

**Palavras-chave:** expressão génica eucariótica, iniciação da tradução, tradução independente da estrutura *cap*, local interno de entrada do ribossoma (IRES), UPF1.

# Abstract

---

The regulation of protein synthesis plays a critical role in cell growth. The start of translation is strongly regulated by a balanced concentration of factors involved in protein synthesis and is considered a limiting step in protein synthesis. In most cases (canonical translation), the onset of translation is a cap-dependent mechanism, which begins with the recruitment of the 40S subunit of the ribosome and various initiation factors, to the cap structure, located at the 5' end of the mRNA. Then, this complex called 43S, reads the entire 5' transcribed untranslated region (5'UTR) until it reaches the first initiation codon in the context of favorable Kozak. However, several transcripts, including oncogenes, growth factors and proteins involved in the regulation of programmed cell death, manage to maintain their levels of protein expression in circumstances that condition the canonical initiation of translation. This alternative translation initiation mechanism occurs without the need to recognize the cap structure and / or to read the 5'UTR. As an example, we have the independent translation of cap mediated by an internal ribosome entry site (IRES). IRES-mediated translation requires several trans-acting proteins, known as ITAF (IRES trans-acting factor). This mechanism involves the direct recruitment of the ribosome to the vicinity of the initiation codon without the involvement of the cap structure. This non-canonical translation initiation mechanism can support protein synthesis under stress conditions and promote / combat tumorigenesis.

The human up-frameshift 1 (UPF1) is a key protein involved in the mechanism of rapid degradation of messenger ribonucleic acids (mRNA from the messenger ribonucleic) carrying nonsense mutations (NMD) mRNA decay), telomeric replication and homeostasis, and cell cycle progression, therefore playing a crucial role in the cell. Previous results from the research group where I developed this work show that this protein has the ability to be translated independently of cap, mediated by IRES, under normal conditions, but also under conditions that are harmful to the initiation of canonical translation, such as hypoxia or stress of the endoplasmic reticulum, in cervical and colorectal cancer cell lines.

In this dissertation, we proposed to characterize the biological meaning of the translation of the IRES existing in the 5'UTR of *UPF1*. To this end, we tested the relevance of the independent translation of UPF1 cap in mechanisms in which it is crucial, such as NMD, by silencing endogenous UPF1 using siRNA digested at UPF1 3'UTR and promoting the translation of UPF1 independently from cap using mRNA

transcribed in vitro to from the study plasmids. The results of the *UPF1* silencing were quite effective, however, it was not possible to obtain results with significant differences between the levels of expression of control mRNA and mRNA with the *UPF1* 5'UTR IRES. It is necessary to use a dicistronic plasmid to obtain more reliable results regarding the biological functionality of UPF1 translated via IRES, whose cloning we have already concluded.

We believe that the results obtained are the first step towards a better characterization of UPF1 translated via IRES, and this mechanism can be very useful in the development of new therapies to fight cancer.

**Keywords:** eukaryotic gene expression, translation initiation, cap independent translation, internal ribosome entry site (IRES), UPF1.

# Índice

---

Agradecimentos.....	ix
Resumo .....	xiii
Abstract .....	xv
Índice.....	xvii
Índice de Figuras .....	xix
Índice de Tabelas .....	xxii
Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos .....	xxiii
1. Introdução.....	1
1.1 Expressão Génica .....	1
1.2 Tradução.....	4
1.2.1 Iniciação .....	4
1.2.2 Alongamento.....	6
1.2.3 Terminação e Reciclagem .....	7
1.2.3.1 Terminação prematura da tradução e degradação do mRNA mediada por mutações <i>nonsense</i> .....	8
1.3 Mecanismos de tradução não canónica .....	11
1.3.1 Tradução mediada por IRES.....	11
1.4 Significado fisiológico e patológico da tradução mediada por IRES.....	15
1.4.1 Tradução mediada por IRES e cancro .....	16
1.5 Tradução mediada por IRES e UPF1: a combinação em cancro.....	17
1.5.1 Proteína UPF1 .....	17
1.5.2 Tradução mediada por IRES e UPF1.....	20
1.5.3 UPF1 e cancro.....	21
1.6 IRES e alvos terapêuticos .....	23
2. Objetivos.....	25
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Construção dos plasmídeos .....	27
3.2 Cultura celular .....	29
3.3 Transcrição <i>in vitro</i> .....	29

3.4 Desenho de siRNA para a 3'UTR do mRNA de <i>UPF1</i> .....	30
3.5 Transfeção celular com DNA plasmídico, mRNA transcrito <i>in vitro</i> ou siRNA....	31
3.6 Western blot.....	31
3.7 Extração de RNA.....	33
3.8 Síntese de cDNA e PCR em tempo real (RT-qPCR) .....	33
3.9 Análise estatística .....	34
4. Resultados e Discussão.....	35
4.1 Resultados anteriores.....	35
4.1.1 Capacidade da 5'UTR de <i>UPF1</i> de induzir a expressão de FLuc num contexto dicistrónico .....	35
4.1.2 A existência de um promotor críptico na 5'UTR de <i>UPF1</i> .....	37
4.2 Estabelecimento das condições experimentais .....	40
4.2.1 Sequenciação das construções plasmídicas.....	41
4.2.2 Verificação do <i>tag</i> Flag por WB.....	45
4.2.3 Teste da eficiência dos siRNA no silenciamento de <i>UPF1</i> .....	47
4.3 Relevância biológica do IRES presente na 5'UTR de <i>UPF1</i> no processo de NMD .....	51
4.4 Construção do plasmídeo dicistrónico .....	54
5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	57
6. Bibliografia .....	59

# Índice de Figuras

---

Figura 1: Representação esquemática das etapas e mecanismos de regulação da expressão génica.....	2
Figura 2: Iniciação da tradução dependente de <i>cap</i> e principais vias de regulação. ....	6
Figura 3: Modelo para a degradação do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i> ) mediado por mutações nonsense (NMD do inglês <i>nonsense-mediated mRNA decay</i> ). ....	10
Figura 4: Modelo do início da tradução dependente do local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês <i>internal ribosome entry site</i> ). ....	12
Figura 5: A proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ) e SMG1 estão na interface de processos importantes para a regulação génica e do genoma em células de mamíferos.....	20
Figura 6: Vetor multicistrónico baseado na entrada interna do ribossoma (IRES do inglês <i>internal ribosome entry site</i> ).....	23
Figura 7: Representação esquemática das construções plasmídicas monocistrónicas com a grelha de leitura aberta (ORF do inglês <i>open reading frame</i> ) da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ). ....	27
Figura 8: Representação esquemática das construções dicistrónicas. ....	28
Figura 9: Representação esquemática dos vetores utilizados para verificar se a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês <i>untranslated region</i> ) da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ) é capaz de iniciar a tradução independente de <i>cap</i> . ....	35
Figura 10: A expressão da proteína repórter FLuc (Firefly luciferase) é mediada pela região 5' transcrita não traduzida (UTR do inglês <i>untranslated region</i> ) da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ) num contexto dicistrónico. ....	36
Figura 11: Representação esquemática das construções usadas para verificar se a região 5' transcrita não traduzida (UTR do inglês <i>untranslated region</i> ) da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ) contém um promotor críptico. ....	38
Figura 12: A região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês <i>untranslated region</i> ) da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ) contém um promotor críptico ativo em todas as linhas celulares testadas. ....	39
Figura 13: Resumo do percurso experimental para verificar a eficiência do local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês <i>internal ribosome entry site</i> ) existente na região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês <i>untranslated region</i> ) da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ). ....	40

Figura 14: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag com o <i>primer #2</i> .....	41
Figura 15: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag com o <i>primer #7</i> .....	42
Figura 16: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag com o <i>primer #1</i> . ....	42
Figura 17: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag com o <i>primer #3</i> . ....	43
Figura 18: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag com o <i>primer #3</i> . ....	43
Figura 19: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag com o <i>primer #1</i> . ....	44
Figura 20: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag com o <i>primer #3</i> . ....	44
Figura 21: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag com o <i>primer #3</i> . ....	45
Figura 22: Avaliação da expressão da proteína de fusão <i>up-frameshift 1</i> – Flag (UPF1-Flag) em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês <i>human cervical cancer-derived cell line</i> ). ....	46
Figura 23: Avaliação da expressão da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ), e dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i> ) de <i>UPF1</i> após silenciamento com ácido ribonucleico de interferência (siRNA do inglês <i>small interfering RNA</i> ) em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês <i>human cervical cancer-derived cell line</i> ). ....	49
Figura 24: Avaliação da expressão da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ) endógena, após silenciamento com ácido ribonucleico de interferência (siRNA do inglês <i>small interfering RNA</i> ) com diferentes reforços em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês <i>human cervical cancer-derived cell line</i> ). ....	50
Figura 25: Transcritos obtidos <i>in vitro</i> a partir dos plasmídeos pH3-UPF1-UPF1-Flag e pH3-HBB-UPF1-Flag. ....	52
Figura 26: Avaliação da proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1 do inglês <i>up-frameshift 1</i> ), traduzida através do local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês <i>internal ribosome entry site</i> ). ....	53
Figura 27: Verificação dos produtos resultantes da digestão enzimática com a enzima <i>HindIII</i> . ....	54

Figura 28: Verificação da presença da grelha de leitura aberta (ORF do inglês <i>open reading frame</i> ) da proteína verde fluorescente (GFP do inglês <i>green fluorescent protein</i> ) nas colónias de bactérias <i>E. coli</i> transformadas com a ligação dos plasmídeos pH3-HBB-UPF1-Flag + GFP ou pH3-UPF1-UPF1-Flag + GFP.....	55
Figura 29: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag com o <i>primer</i> #3.....	56

# Índice de Tabelas

---

Tabela 1  <i>Primers</i> utilizados na sequenciação dos plasmídeos em estudo. ....	29
Tabela 2  siRNA direcionados à 3'UTR de <i>UPF1</i> .....	30
Tabela 3  Anticorpos e condições de utilização dos mesmos na técnica de Western blot utilizados neste estudo.....	32
Tabela 4  Sequências de <i>primers</i> utilizados na PCR em tempo real. ....	33

# Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

---

°C graus Celsius

µg micrograma

µl microlitro

**4E-BP** do inglês *eIF4E-binding protein*

**A** adenina

**aa** aminoácido

**aa-tRNA** do inglês *tRNA binding amino acid*

**ABCE1** do inglês *ATP binding cassette subfamily E member 1*

**ADP** do inglês *adenosine triphosphate*

**ATM** do inglês *ataxia telangiectasia mutated kinase*

**ATP** do inglês *adenosine triphosphate*

**bp** do inglês *base pair*

**C** citosina

**CAP** carcinoma adenoescamoso pancreático

**CAT-1** do inglês *cationic amino acid transporter*

**CBP** do inglês *cap-binding protein*

**CDK11** do inglês *cyclin-dependent kinase 11*

**cDNA** do inglês *mRNA-complementary deoxyribonucleic acid*

**CHC** carcinoma hepatocelular

**CITE** do inglês *cap-independent translation enhancer*

**CMV** citomegalovírus

**c-Myc** do inglês *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

**CO<sub>2</sub>** dióxido de carbono

**C-terminal** do inglês *carboxyl terminus*

**DCP1a** do inglês *decapping mRNA 1a*

**DMEM** do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO** do inglês *dimethyl sulfoxide*

**DNA** ácido desoxirribonucleico

**ECL** luminescência eletroquímica

**eEF** do inglês *eukaryotic elongation factor*

**eIF** do inglês *eukaryotic initiation factor*

**EJC** do inglês *exon–exon junction complex*

**eRF** do inglês *eukaryotic release factor*

**FBS** do inglês *fetal bovine serum*

**FGF** do inglês *fibroblast growth factor*

**FLuc** do inglês *Firefly luciferase*

**G** guanina

**G(5')ppp(5')A** estrutura não funcional análoga ao *cap*

**G(5')ppp(5')G** estrutura funcional análoga ao *cap*

**GFP** do inglês *green fluorescent protein*

**Gln** do inglês *glutamin*

**Gly** do inglês *glycine*

**GMP** do inglês *guanosine monophosphate*

**GTP** do inglês *guanosine triphosphate*

**h** hora

**HBB** do inglês *human beta-globin*

**HCT116** do inglês *Human pre-metastatic colorectal carcinoma-derived cell line*

**HeLa** do inglês *Human cervical cancer-derived cell line*

**HIF1 $\alpha$**  do inglês *hypoxia inducible factor 1 alpha subunit*

**IRES** do inglês *internal ribosome entry site*

**ITAF** do inglês *IRES trans-acting factor*

**Kb** do inglês *kilo base pair*

**KD** do inglês *knock-down*

**LB** Luria-Bertani

**local-A** local aceitador

**local-E** do inglês local *exit*

**local-P** local peptidil

**LUC** Luciferase

**m<sup>7</sup>G** do inglês *7-methylguanosine*

**MALAT1** do inglês *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*

**Met** do inglês *methionine*

**Met-tRNA<sup>i</sup>** do inglês *methionine binding initiator transporter ribonucleic acid*

**min** minuto

**mL** mililitro

**mm** milímetro

**mRNA** do inglês *messenger ribonucleic acid*

**mRNP** do inglês *messenger ribonucleoprotein*

**mTOR** do inglês *mammalian target of rapamycin*

**N** qualquer nucleótico

**NCM460** do inglês *Human normal intestinal mucosa-derived cell line*

**ND** não digerido

**nm** nanómetro

**NMD** do inglês *nonsense-mediated mRNA decay*

**NT** não transfectado

**NTC** do inglês *normal termination codon*

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**ON** do inglês, *over-night*

**ORF** do inglês *open reading frame*

**p/v** peso por volume

**PABP** do inglês *poly(A)-binding protein*

**PCR** do inglês *polymerase chain reaction*

**PDGF** do inglês *platelet-derived growth factor*

**Pi** do inglês inorganic phosphate

**PIC** do inglês *pré-iniciation complex*

**PLB** do inglês *passive lysis buffer*

**pmol** picomole

**Poi** polimerase

**Poly(A)** do inglês *polyadenylated*

**pré-mRNA** precursor do ácido ribonucleico mensageiro

**PTC** do inglês *premature termination codon*

**PVDF** fluoreto de polivinilideno

**R** purina (A ou G)

**RBP** do inglês *ribonucleoprotein*

**RLuc** do inglês *Renilla luciferase*

**RNA** ácido ribonucleico

**RNA Poi** RNA polimerase

**RT** do inglês, *reverse transcription*

**SDS** do inglês *sodium dodecyl sulphate*

**SL** do inglês *stem loop*

**SLBP** do inglês *binding protein stem loop*

**SMD** do inglês *Staufen1-mediated mRNA decay*

**SMG** do inglês *suppressor with morphogenetic effect on genitalia*

**snRNP** do inglês *small nuclear ribonucleoprotein*

**STAU1** do inglês *double-stranded RNA-binding protein Staufen*

**SURF** SMG1–UPF1–eRF1–eRF3

**T** timidina

**TA** temperatura ambiente

**TC** do inglês *ternary complex*

**TERRA** do inglês *telomeric repeat-containing RNA*

**TISU** do inglês *translation initiator of short 5'UTR*

**tRNA** do inglês *transporter ribonucleic acid*

**tRNA<sub>i</sub>** do inglês *initiator transfer ribonucleic acid*

**U** uracilo

**UPF1** do inglês *up-frameshift 1*

**UTR** do inglês *untranslated region*

**v/v** volume por volume

**VEGF** do inglês *vascular endothelial growth factor*

**WB** do inglês *Western blot*

**XIAP** do inglês *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

**Y** pirimidina (C ou U)



# 1. Introdução

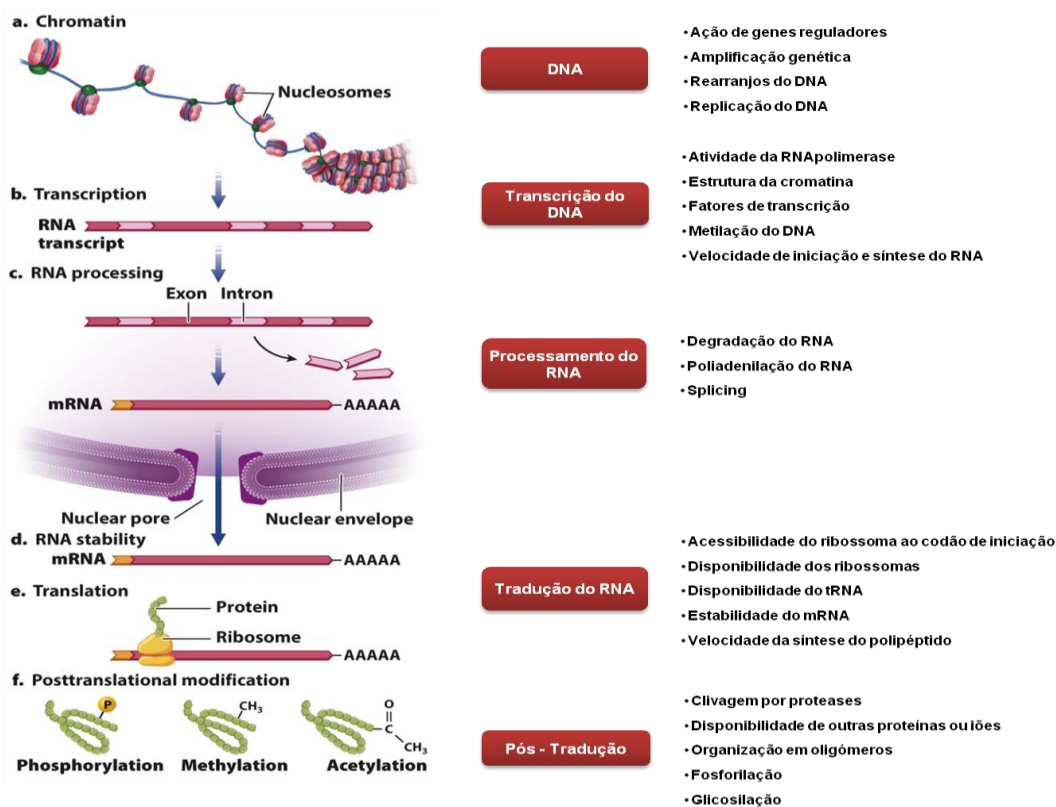
---

## 1.1 Expressão Génica

A expressão génica é um processo altamente complexo que traduz as informações armazenadas no ácido desoxirribonucleico (DNA) em ácidos ribonucleicos (RNA) e/ou proteínas<sup>1,2</sup>. Este processo permite às células iniciar, aumentar, diminuir ou cessar a síntese de proteínas tendo em conta os estímulos intra e extracelulares a que estão a ser expostas<sup>1,3,4</sup>.

Nas células eucarióticas a expressão génica envolve diferentes etapas, nomeadamente: transcrição do DNA para o precursor do ácido ribonucleico mensageiro (pré-mRNA), processamento do pré-mRNA originando o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*), exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, tradução do mRNA e processamento da proteína (Figura 1)<sup>2</sup>. Estudos bibliográficos mostram uma interação entre os eventos acima descritos, afirmando que etapas consecutivas são interdependentes e influenciadas umas pelas outras de forma física e funcional<sup>2</sup>. As etapas da expressão génica vão ser descritas de forma individual e sumária seguidamente.

A transcrição ocorre no núcleo das células eucarióticas e diz respeito ao processo através do qual, a célula sintetiza RNA a partir de DNA<sup>2,5,6</sup>. Existem três tipos de RNA polimerases (RNA Pol) nas células eucarióticas (RNA Pol I, II e III), no entanto a RNA Pol II é a enzima responsável pela transcrição de genes<sup>2,5</sup>. A transcrição pode ser dividida em: iniciação, alongamento e terminação<sup>6</sup>.



**Figura 1: Representação esquemática das etapas e mecanismos de regulação da expressão gênica.** A expressão gênica é um mecanismo complexo que permite converter a informação do ácido desoxirribonucleico (DNA) em proteínas, apresentando um importante papel no funcionamento celular. Envolve diferentes etapas que são altamente reguladas: acessibilidade ao DNA, transcrição do DNA, processamento do precursor do ácido ribonucleico mensageiro (pré-mRNA), tradução do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) e regulação dos produtos pós-traducionais (figura adaptada de <sup>5</sup>).

O início da transcrição requer a RNA Pol II e proteínas auxiliares (fatores gerais de transcrição) para se formar o complexo de pré-iniciação <sup>6</sup>. Este complexo reconhece elementos reguladores de DNA no promotor principal e, através da ligação de alguns fatores de transcrição a sequências consenso do promotor, como a *TATA box*, a RNA Pol II é direcionada para um local próximo do início da transcrição <sup>6,7</sup>. Antes da síntese de RNA, a dupla hélice de DNA é desenrolada para permitir a interação entre o DNA e a RNA Pol II <sup>6</sup>. Após esta interação, os fatores de transcrição de alongamento são recrutados para ajudar a enzima na formação do novo transcrito <sup>2,6</sup>. Na terminação da transcrição, a RNA Pol II atinge o fim do gene e tanto a enzima como o transcrito são libertados do local de transcrição e do DNA <sup>2,8</sup>. Os pré-mRNA são em seguida processados em mRNA maduros antes de serem exportados para o citoplasma <sup>9</sup>. O processamento dos transcritos está dividido em três fases: *capping* da extremidade 5', *splicing* e processamento da extremidade 3' <sup>10</sup>.

O *capping* da extremidade 5' é a primeira fase do processamento dos pré-mRNA e ocorre logo após a RNA Pol II ter transcrito os primeiros 25 a 30 nucleótidos <sup>9,10</sup>. Primeiro, o trifosfato no primeiro nucleótido é hidrolisado num difosfato <sup>9,10</sup>. Em

seguida, é transferido um monofosfato de guanosina (GMP do inglês *guanosine monophosphate*) para o primeiro nucleótido do pré-mRNA e por fim a guanina do GMP sofre metilação na posição N7<sup>9,10</sup>. Este processo confere estabilidade ao transcrito e mais tarde interfere com o recrutamento dos ribossomas para o mRNA no início da tradução<sup>9,10</sup>. O *splicing* é um processo através do qual os intrões (regiões não codificantes) são removidos do pré-mRNA e os exões (regiões codificantes) são ligados<sup>10</sup>. Para a maquinaria celular identificar as regiões acima descritas, existem sequências consenso no pré-mRNA que permitem detetar o início e o fim do intrão<sup>9</sup>. A remoção dos intrões é catalisada pelo spliceossoma – constituído por pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP do inglês *small nuclear ribonucleoprotein*). A deteção de sequências específicas no pré-mRNA permite a montagem do spliceossoma bem como a remoção de intrões e a junção de exões. O intrão deve possuir um local doador (na extremidade 5' do intrão), onde tipicamente apresenta uma sequência de nucleótidos guanina (G) uracilo (U) situada numa região altamente conservada; um local de ramificação (próximo à extremidade 3' do intrão) que inclui um nucleótido de adenina (A) envolvido na formação do lariato e um local aceitador (na extremidade 3' do intrão) que termina com uma sequência AG conservada. A montante do local aceitador do intrão existe uma região rica em pirimidinas (Y - Citosina (C) e U), de comprimento variável (de 20 a 50 nucleótidos)<sup>9,10</sup>.

Por fim, o pré-mRNA sofre o processamento da extremidade 3', onde ocorre a clivagem e poliadenilação da extremidade 3' do mesmo<sup>10</sup>. A clivagem do pré-mRNA ocorre entre duas sequências conservadas, a jusante, 10-30 nucleótidos, AAUAAA e a montante, 10 nucleotídeos, de uma região rica em U ou GU. Após clivagem, ocorre a adição de uma cauda poliadenilada (poly(A), do inglês *polyadenylated*), que protege o mRNA da degradação<sup>8,10,11</sup>.

Após todo o processo descrito anteriormente, o pré-mRNA passa a designar-se de mRNA e está agora apto a ser transportado do núcleo para o citoplasma onde será traduzido *à posteriori*<sup>2</sup>. Para exportar o mRNA existem várias moléculas que se ligam ao mesmo formando ribonucleoproteínas (mRNP do inglês *messenger ribonucleoprotein*)<sup>2,12</sup>. As mRNP interagem com proteínas existentes nos poros nucleares e, juntamente com outras proteínas de exportação, permitem o transporte do mRNA para o citoplasma<sup>12</sup>. Depois disso, as mRNP sofrem remodelação para preparar o mRNA para a tradução<sup>2,12</sup>.

O produto final da expressão génica são as proteínas sintetizadas a partir do mRNA, este mecanismo bioquímico complexo designa-se de tradução e é exposto no capítulo

seguinte.

## 1.2 Tradução

A tradução é um processo cíclico de iniciação, alongamento, terminação e reciclagem necessário para desenvolvimento, homeostase e função celular<sup>13,14</sup>. Nos eucariotas, a grande maioria dos genes codificantes encontra-se no genoma nuclear e a tradução ocorre no citoplasma; este processo ocorre nos ribossomas em conjunto com vários fatores acessórios permitindo a conversão de mRNA em proteínas<sup>13,15,16</sup>. As diferentes etapas da tradução serão descritas nos capítulos seguintes.

### 1.2.1 Iniciação

A iniciação é a primeira etapa da tradução, devido à sua complexidade pensa-se que poderá ser um passo limitante à síntese proteica e como tal seja a etapa mais regulada a nível molecular; este processo é assistido por mais de 25 polipéptidos. Dada a sua importância, a base molecular deste processo é estudada intensivamente para elucidar os pormenores moleculares de potencial controlo<sup>14,17,18</sup>.

O início da tradução na maioria dos mRNA ocorre de forma canónica, ou seja é um mecanismo dependente de *cap* (Figura 2)<sup>19</sup>. Tendo por base o mecanismo referido anteriormente, o início da tradução nas células eucarióticas ocorre com a formação do complexo ternário (TC do inglês *ternary complex*). Este complexo, tal como o nome indica, tem três componentes: fator de iniciação eucariota 2 (eIF do inglês *eukaryotic initiation factor*), guanosina trifosfato (GTP do inglês *guanosine triphosphate*) e o RNA de transferência iniciador (tRNA<sub>i</sub> do inglês *initiator transporter ribonucleic acid*) ligado a uma metionina (Met do inglês *methionine*) (Met-tRNA<sub>i</sub> do inglês *methionine binding initiator transporter ribonucleic acid*)<sup>3,13,14</sup>. O eIF2 é um fator heterotrimérico composto pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas a uma subunidade central  $\gamma$ <sup>15,20</sup>.

O TC forma-se por duas fases, eIF2 $\gamma$  liga-se ao GTP e ao Met-tRNA<sub>i</sub>, enquanto que, eIF2  $\alpha$  e  $\beta$  são responsáveis pela estabilização da ligação ao RNA de transferência (tRNA do inglês *transfer ribonucleic acid*)<sup>3,13-15,20</sup>.

A etapa seguinte do início da tradução é a formação do complexo de pré-iniciação 43S (PIC do inglês *complex pré-iniciation*). A subunidade ribossómica 40S liga-se aos eIF 1, 1A, 3, 5 e ao TC, formando um complexo multifatorial, onde existe a estabilização da interação da subunidade ribossómica 40S com o TC<sup>20</sup>. eIF1 e 1A ligam-se à pequena subunidade ribossómica provocando alterações conformacionais na mesma;

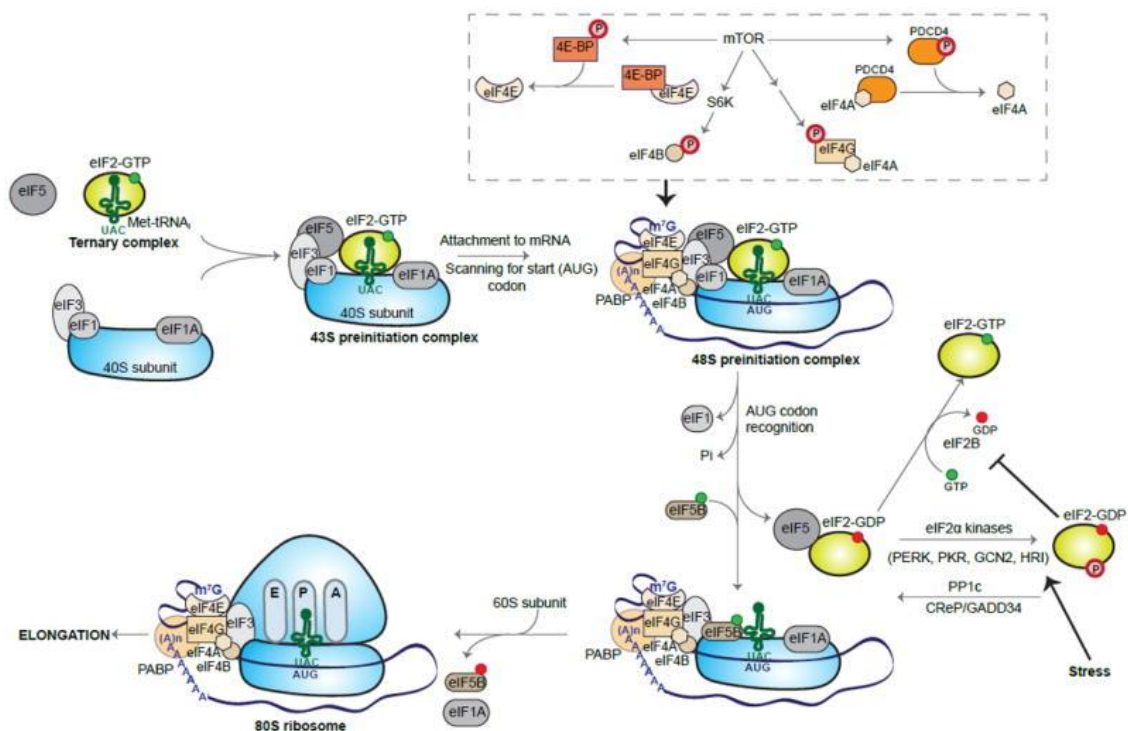
eIF3 interage com a subunidade 40S e com todos os fatores do complexo multifatorial referido anteriormente, funcionando como uma ponte de ligação entre eles. O eIF5 serve como um adaptador entre eIF3 ligado à subunidade 40S e TC, através da interação com as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  de eIF2<sup>20,21</sup>. Após terminado este processo, o PIC está pronto a ser recrutado para as extremidades 5' dos mRNA ativados para tradução<sup>20</sup>.

A ativação dos mRNA para tradução é realizada pela proteína de ligação à cauda poly(A) (PABP do inglês *poly(A)-binding protein*) e pelo complexo eIF4F (composto por: eIF4E (proteína que reconhece a estrutura *cap* na extremidade 5' do mRNA), eIF4G (molécula adaptadora) e eIF4A (enzima com atividade de ATPase e helicase))<sup>20</sup>. eIF4E recruta o eIF4G e eIF4A para a extremidade 5' do mRNA. eIF4E liga-se à estrutura *cap* e eIF4A desenrola as estruturas secundárias de RNA existentes na proximidade da região 5' do transcrito. EIF4G e eIF4B (outro fator de iniciação eucariótico) são reconhecidos por melhorarem a atividade helicase de eIF4A. eIF4G e eIF4B interagem diretamente com eIF4A, promovendo a alteração da sua conformação para um estado ativo<sup>20,22</sup>. É também importante referir que outra capacidade do eIF4G é juntar as extremidades 5' e 3' do transcrito através da interação de eIF4E e PABP, permitindo a circularização do mRNA e estimulando a tradução<sup>13,20</sup>.

Posteriormente a todas as etapas referidas anteriormente o mRNA está sinalizado para tradução e é através do eIF4G e eIF3 que ocorre o recrutamento do PIC para a extremidade 5' do mRNA formando assim o complexo 48S<sup>3,13,14,19,20</sup>. Após a ligação do complexo 43S ao mRNA, este começa a percorrer a região transcrita 5' não traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) base por base até encontrar um codão de iniciação numa sequência em contexto de Kozak favorável<sup>3,13-15,17,19,20</sup>. A sequência consenso que permite o início da tradução é caracterizada por um resíduo de purina na posição -3 e uma guanina na posição +4 (as posições referidas anteriormente têm em conta que o complexo 43S percorre a região 5'UTR de 5' para 3' e que a adenina do codão de iniciação, AUG, ocupa a posição +1)<sup>15,19</sup>. A leitura da 5'UTR do mRNA é assegurada pelo eIF4A e outras enzimas com capacidade helicase e está dependente de adenosina trifosfato (ATP do inglês *adenosine triphosphate*)<sup>15,19,23</sup>.

Assim que o AUG é selecionado, o complexo 43S muda para uma conformação fechada, assegurando que no local de descodificação do ribossoma, local peptidil (local-P), se dá o emparelhamento com o anticodão correspondente no Met-tRNA<sub>i</sub>. O Met-tRNA<sub>i</sub> é ancorado ao PIC pelo GTP que se encontra ligado ao eIF2; uma combinação perfeita com um codão de iniciação desencadeia a deteção e a hidrólise

irreversível do GTP do TC, eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>. Com a libertação de eIF2-guanosina difosfato (GDP do inglês *guanosine diphosphate*) e outros eIF (eIF 6, 5, 3 e 2) catalisados pelo eIF5B, a subunidade ribossômica grande (60S) une-se para formar o complexo de iniciação 80S pronto para aceitar o aminoacil-tRNA (aa-tRNA do inglês *tRNA binding amino acid*), apropriado no local aceitador (local-A) e sintetizar a primeira ligação peptídica<sup>13,14,24</sup>. O eIF2-GDP é reciclado para eIF2-GTP pelo eIF2B permitindo assim a formação de um novo complexo ternário<sup>13,14,24 15,19,20</sup>.



**Figura 2: Iniciação da tradução dependente de *cap* e principais vias de regulação.** A tradução inicia-se com a formação do complexo de pré iniciação 43S (PIC do inglês *complex pré-iniciation*) - Subunidade ribossômica 40S, fator de iniciação eucariótico 1 (eIF, do inglês *eukaryotic initiation factor*), eIF1A, eIF3, eIF5 e o complexo ternário: eIF2 - guanosina trifosfato (GTP do inglês *guanosine triphosphate*) – metionina (Met do inglês *methionine*) – RNA de transferência iniciador (tRNA<sub>i</sub> do inglês *initiator transfer ribonucleic acid*) (eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>). O PIC é recrutado para a extremidade 5' do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) pelo complexo eIF4F (eIF4E, eIF4G e eIF4A) e eIF4B. A circularização do mRNA é promovida pela interação entre eIF4G e proteína de ligação à cauda poly(A) (PABP inglês *poly(A)-binding protein*). O mRNA é percorrido na direção de 5' a 3' até que o 43S encontre um códon de iniciação (AUG), desencadeando a libertação de eIF1, fosfato inorgânico (Pi do inglês *inorganic phosphate*), eIF5 e eIF2-guanosina difosfato (GDP do inglês *guanosine diphosphate*). A união da subunidade ribossômica 60S ao PIC e a libertação de vários fatores de iniciação, incluindo eIF1A, são catalisadas pelo eIF5B, levando à formação do ribossoma 80S. O eIF2-GDP é reciclado para eIF2-GTP pelo fator eIF2B. Sob condições de stress, a fosforilação da subunidade α do eIF2 (eIF2α) prejudica a reciclagem e a formação do complexo ternário. A iniciação da tradução também é regulada pela via sinalização da rapamicina em mamíferos (mTOR do inglês *mammalian target of rapamycin*), que pode direta ou indiretamente fosforilar eIF4G, eIF4B, 4E-BP (4E-BP do inglês *eIF4E-binding protein*)<sup>13</sup>.

### 1.2.2 Alongamento

O segunda etapa da tradução é o alongamento que começa com o emparelhamento do anticodão do Met-tRNA<sub>i</sub> com o códon de iniciação, AUG, no local-P do ribossoma

<sup>13,25</sup>. O segundo codão da grelha de leitura aberta (ORF do inglês, *open reading frame*) está no local-A do ribossoma, a aguardar o aa-tRNA compatível. O aa-tRNA surge no local-A do ribossoma associado a GTP e ao fator de alongamento eucariótico (eEF do inglês *eukaryotic elongation factor*) 1A – formando assim um complexo ternário <sup>13,21,25</sup>.

O reconhecimento do codão correspondente pelo tRNA, desencadeia a hidrólise de GTP por eEF1A, libertando eEF1A-GDP do tRNA o que permite a acomodação de aa-tRNA no local-A <sup>13,25</sup>. A formação da ligação peptídica entre o aminoácido recebido e o peptidil-tRNA ocorre rapidamente <sup>13,25</sup>. Esta reação é catalisada pela peptidiltransferase no centro da subunidade ribossómica grande, desencadeando o movimento das subunidades ribossómicas, conseqüentemente, o tRNA desacetilado fica em estado híbrido, com a extremidade aceitadora no local de saída (local-E, *E* do inglês *exit*) do ribossoma e a outra extremidade com o anticodão no local-P <sup>21,25</sup>. A translocação do tRNA desacetilado e do peptidil-tRNA para os locais-E e P, respetivamente, requer hidrólise de GTP pela GTPase <sup>13,21</sup>. Esta translocação permite que local-A esteja vazio para aceitar o próximo aa-tRNA permitindo um novo ciclo de alongamento <sup>13,25</sup>.

Este ciclo é repetido até que o ribossoma encontre um codão *stop* (UAA, UGA ou UAG) no local-A, o que desencadeia a terminação da tradução, descrita no capítulo seguinte <sup>13</sup>.

É ainda importante referir que cada ciclo de alongamento tem em seguida um evento de reciclagem, pois, após a hidrólise de GTP por eEF1A e conseqüente dissociação do ribossoma, o eEF1A-GDP deve ser reciclado para sua forma ativa pelo eEF1B que catalisa a troca de nucleótidos de guanina no eEF1A <sup>21,25</sup>.

### 1.2.3 Terminação e Reciclagem

O alongamento termina quando o último codão da ORF entra no local-A do ribossoma. O codão referido anteriormente designa-se codão *stop* e pode apresentar-se com três tripletos de nucleótidos diferentes (UAA, UGA ou UAG) <sup>21,24,25</sup>. Este acontecimento dá início à última etapa da tradução, a terminação, culminando na libertação do péptido pelo ribossoma <sup>24</sup>. Neste processo, a ligação éster entre a cadeia polipeptídica e o tRNA do local-P deve ser hidrolisada pelo centro da peptidil transferase da grande subunidade ribossómica para permitir a libertação do polipeptídeo recém-sintetizado <sup>21</sup>. A terminação da tradução é auxiliada por dois fatores de terminação eucariótica (eRFs do inglês *eukaryotic release factor*) 1 e 3 <sup>13,25</sup>. eRF1 é um fator proteico em forma de tRNA composto por três domínios que reconhecem o codão *stop* e estimulam

a libertação da cadeia peptídica formada <sup>13,21,25,26</sup>. O seu domínio N-terminal possui sequências conservadas que são responsáveis pelo reconhecimento de codões através de interações codão-anticodão <sup>25,26</sup>. Por outro lado, o domínio do meio desempenha um papel crucial na hidrólise da ligação de éster polipeptídeo-tRNA, pois contém um motivo de glicina-glicina-glutamina (Gly-Gly-Gln (Gly do inglês *glycine* e Gln do inglês *glutamin*)) universalmente conservado que interage com a peptidil transferase <sup>25,26</sup>. Finalmente, o domínio C-terminal medeia a associação entre eRF1 e eRF3 <sup>25,26</sup>. eRF3 é uma GTPase que acelera a libertação dos peptídeos e aumenta a eficiência da terminação da tradução de maneira dependente de GTP <sup>13,25</sup>.

Após o reconhecimento do codão *stop*, o complexo ternário eRF1-eRF3-GTP liga-se ao local-A do ribossoma onde ocorre a hidrólise de GTP <sup>13,25</sup>. Após a hidrólise de GTP, o eRF3 é libertado do ribossoma <sup>13,25</sup>. Nesta fase, o ribossoma ainda está ligado ao tRNA desacetilado, ao mRNA e, possivelmente ao eRF1. Seguidamente, ocorre a reciclagem da maquinaria de tradução caracterizada pela dissociação das subunidades ribossómicas e consequente libertação do mRNA e do tRNA desacetilado <sup>21,25</sup>. Os mecanismos subjacentes a este processo são ainda pouco conhecidos <sup>21,25</sup>.

Estudos recentes revelaram que o membro 1 da subfamília E da cassete de ligação a ATP (ABCE1 do inglês *ATP-binding cassette E*) é um candidato provável para promover a reciclagem ribossómica <sup>13,24,25</sup>. Alguns modelos propõem que o ABCE1 converta a energia química da hidrólise do ATP em movimentos mecânicos que podem promover a separação física das subunidades ribossómicas <sup>13,25</sup>. Além do papel na reciclagem, o ABCE1 também parece contribuir para a libertação do polipeptídeo durante o término da tradução <sup>24,25</sup>.

#### 1.2.3.1 Terminação prematura da tradução e degradação do mRNA mediada por mutações *nonsense*

Quando ocorrem mutações na sequência de DNA de um gene específico, a produção da proteína correspondente pode ficar comprometida. Um dos tipos mais comuns de mutação que inativa a função do gene, promovendo o término prematuro da tradução, são as mutações que resultam em codões de terminação prematura da tradução (PTC do inglês *premature termination codon*) <sup>27</sup>. Os PTC (UAA, UGA ou UAG) estão situados a montante do codão de terminação normal e induzem a terminação prematura da tradução de mRNA <sup>28,29</sup>.

Um PTC interrompe a integridade do mRNA, originando uma ORF que, traduzida, pode resultar num fragmento polipeptídico potencialmente tóxico <sup>30</sup>. Por norma, a

presença de um PTC produz proteínas truncadas não funcionais e/ou instáveis. Os mRNA contendo PTC também são frequentemente instáveis, promovendo uma redução rápida na abundância de mRNA. Juntos, estes dois eventos reduzem o nível de proteína funcional produzida <sup>31</sup>.

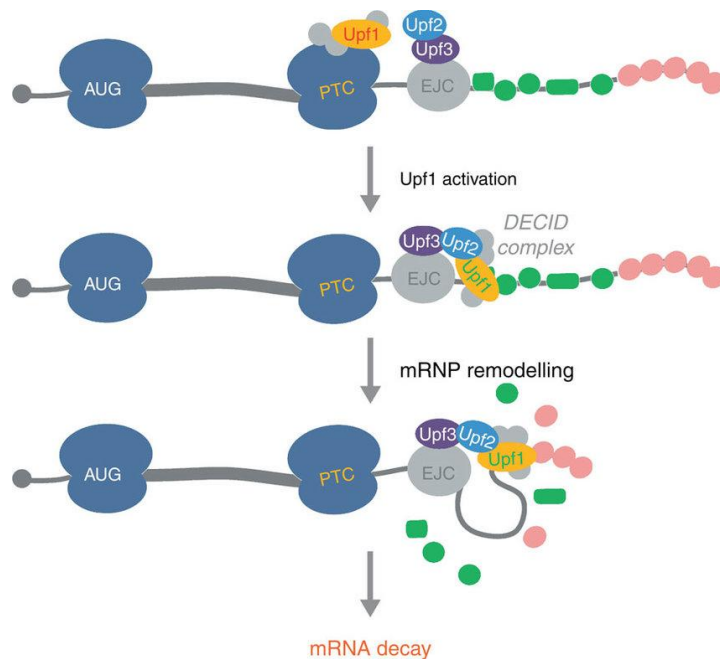
Para evitar a acumulação destes fragmentos polipeptídicos, os mRNA mutados são reconhecidos e degradados pela via de degradação de mRNA mediada por mutações *nonsense* (NMD do inglês *nonsense mediated decay*) <sup>28,30,32,33</sup>.

O NMD está fortemente acoplado à tradução, uma vez que este mecanismo é desencadeado quando o ribossoma chega ao PTC. A terminação prematura é um evento mecanicamente diferente da terminação normal, pois parece ser menos eficiente, refletindo assim diferentes complexos de mRNP em PTC e codões de terminação normais (NTC do inglês *normal termination codon*). A ineficiência da terminação prematura é desencadeada pela estrutura de mRNP a jusante de um PTC que, por sua vez, pode levar a uma fraca ligação do fator de libertação no local-A ou a uma lenta dissociação dos fatores de libertação após a hidrólise peptídica <sup>34</sup>. Pensa-se que essas deficiências sejam corrigidas pelo recrutamento da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) no complexo de terminação prematura. A ativação das suas atividades ATPase e helicase promove a reutilização do ribossoma e desencadeia o processo de NMD <sup>35</sup>.

Na maioria dos mRNA, o codão de terminação reside no último exão do gene. Consequentemente, todos os complexos de junção de exões-exões (EJC do inglês *exon-exon junction complex*) são dissociados do mRNA durante a etapa de alongamento da tradução. Nesses casos, o mRNA é estável devido à falta de EJC a jusante do codão de terminação da tradução. Quando estamos perante um PTC, na última junção exão-exão, os EJC permanecerão a jusante do mesmo, servindo como um marcador molecular para induzir NMD <sup>36</sup>. Quando no local-A do ribossoma é detetado um PTC, é recrutado o complexo SURF: SMG1-UPF1-eRF1-eRF3, que vai comunicar com o EJC a jusante do PTC detetado através da interação de UPF1 presente no complexo SURF com UPF2 presente no EJC <sup>37</sup>.

A via de NMD nas células humanas envolve vários fatores, tais como as proteínas UPF. UPF1 é considerado o fator mais importante para NMD, visto aparentar ser o regulador central do mecanismo acima referido <sup>30,33</sup>. Esta proteína regula a degradação do mRNA sensível ao NMD e a remodelação do complexo de vigilância de mRNA através de ciclos de fosforilação/desfosforilação. UPF1 é fosforilada por SMG1 em resíduos serina específicos no terminal C <sup>27</sup>, o que facilita a montagem de fatores

de degradação e, conseqüentemente, desencadeia a degradação do mRNA sensível ao NMD<sup>38</sup>. A fosforilação de UPF1 desencadeia a repressão da tradução dependente de eIF3 durante o processo de NMD. A UPF1 fosforilada, mas não hipofosforilada, interage diretamente com o eIF3, a fim de impedir a junção da subunidade ribossômica 60S, induzindo assim a repressão da tradução<sup>28</sup>. Além disso, UPF1 fosforilada também interage com a SMG5, SMG6, SMG7 e com a proteína co-regulatória 2 do recetor nuclear rico em prolina humana (PNRC2 do inglês *proline-rich nuclear receptor co-regulation protein 2*), em seguida, desencadeia a degradação do mRNA sensível ao NMD, Figura 3. A associação de SMG6 com UPF1 fosforilada desencadeia a degradação do mRNA pela endonuclease SMG6 (degradação endonucleolítica mediado por SMG6). Por outro lado, a associação do heterodímero SMG5/SMG7 com UPF1 fosforilada desencadeia a degradação do mRNA pela desidradilase e enzima de *decapping* (degradação exonucleolítica mediada por SMG5/SMG7)<sup>38-40</sup>. A hidrólise de ATP por UPF1 leva à desmontagem do complexo mRNP direcionado para NMD, o que é crítico na etapa final da degradação do RNA e está envolvido na reciclagem de fatores NMD e outras proteínas de ligação ao RNA<sup>41</sup>.



**Figura 3: Modelo para a degradação do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) mediado por mutações nonsense (NMD do inglês *nonsense-mediated mRNA decay*).** Quando ocorre a terminação prematura da tradução devido a um codão de terminação prematura (PTC do inglês *premature termination codon*), a proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) e os fatores associados ao processo de NMD são recrutados. A proteína UPF1, interage com UPF2 e UPF3 já vinculadas a um complexo de junção exão-exão (EJC – do inglês *exon-exon junction complex*), formando o complexo DECID. UPF1 é ativada desencadeando o processo de NMD<sup>42</sup>.

## 1.3 Mecanismos de tradução não canónica

Muitos dos mRNA eucarióticos são traduzidos pela via canónica, no entanto uma parte dos transcritos eucarióticos pode ser traduzido através de mecanismos alternativos de tradução<sup>19,43</sup>. Os mecanismos de tradução não canónica descritos até agora são mecanismos dependentes do reconhecimento da estrutura *cap* e independentes da leitura da 5'UTR do transcrito ou mecanismos independentes do reconhecimento da estrutura *cap* e da leitura da 5'UTR do mRNA<sup>19</sup>. Quando estamos perante mRNA com a 5'UTR demasiado curta, a tradução dos mesmos é mediada pelo elemento iniciador da tradução de 5'UTR curta (TISU do inglês *translation initiator of short 5'UTR*) com o reconhecimento da estrutura *cap*. Neste caso o codão de iniciação, AUG, está no meio da sequência TISU próximo da estrutura *cap*<sup>19</sup>. O mecanismo de tradução não canónico, independente do reconhecimento da estrutura *cap* e da leitura da 5'UTR do mRNA baseia-se no deslocamento do ribossoma diretamente para o codão de iniciação<sup>19</sup>. Um exemplo deste tipo de mecanismo é a tradução independente de *cap* pelo intensificador da tradução independente de *cap* (CITE do inglês *cap independent translation enhancer*)<sup>44</sup>. Este mecanismo é independente do reconhecimento da estrutura *cap*, no entanto, requer o leitura da região 5'UTR<sup>44</sup>.

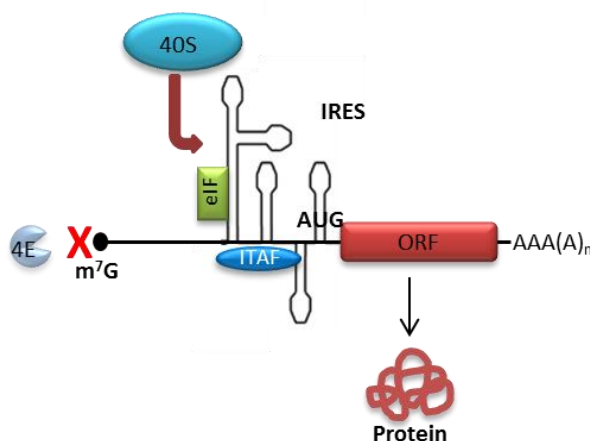
Outro mecanismo não canónico de tradução é a tradução mediada pelo local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*). Este mecanismo também é um mecanismo independente de *cap* e será descrito com mais detalhe no próximo capítulo<sup>43,45</sup>.

### 1.3.1 Tradução mediada por IRES

A tradução mediada por IRES é independente do reconhecimento da estrutura *cap* e requer o recrutamento do ribossoma para um local próximo do codão de iniciação<sup>45</sup>.

Foi através do estudo da expressão génica viral que este mecanismo de tradução foi descoberto, sendo que os primeiros dados bibliográficos existentes referem o uso do mecanismo de tradução IRES pelos mRNA dos vírus da encefalomiocardite e poliovírus<sup>46</sup>. Estes estudos, mostraram que os IRES possuem estruturas secundárias e terciárias complexas que interagem com os elementos da maquinaria celular de tradução canónica, permitindo a ancoragem da mesma e conseqüentemente uma tradução independente do reconhecimento da estrutura *cap* e leitura da 5'UTR do transcrito<sup>46</sup>. A iniciação da tradução mediada por IRES pode basear-se apenas nas interações entre o IRES e o ribossoma ou pode ser auxiliada por outros fatores proteicos que não estão envolvidos na tradução dependente de *cap* (Figura 4)

designados de fatores de ação em *trans*-IRES (ITAF do inglês *IRES trans-acting factor*)<sup>45,46</sup>. Os mecanismos subjacentes à função dos ITAF ainda não são conhecidos<sup>45,46</sup>. No entanto, já existem algumas hipóteses relativamente à sua funcionalidade e distribuição celular (núcleo/citoplasma)<sup>45,46</sup>. Relativamente à sua funcionalidade surgem três teorias possíveis. Os ITAF: (1) podem remodelar as estruturas espaciais do IRES para produzir conformações com maior ou menor afinidade para os componentes da maquinaria celular de tradução; (2) podem ser utilizados como adaptadores entre o mRNA e o ribossoma, permitindo ou não a sua interação; (3) podem substituir os fatores canónicos como mediadores das interações mRNA e ribossoma<sup>45,46</sup>. Relativamente à sua distribuição celular, existem diferentes hipóteses. Uma das hipóteses sugere que os ITAF se associam aos elementos IRES no núcleo, capturando o mRNA e conseqüentemente inibindo a tradução<sup>46</sup>. Outra hipótese pondera que os ITAF e os mRNA contendo IRES estão em compartimentos celulares diferentes, núcleo e citoplasma respetivamente. Apesar de duas hipóteses diferentes, quer os mRNA ligados a ITAF quer os ITAF não associados são translocados do núcleo para o citoplasma onde ocorre a tradução dos mRNA dependentes de IRES<sup>46</sup>.



**Figura 4: Modelo do início da tradução dependente do local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*).** Estruturas secundárias de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) (representadas por *stem-loops*) podem recrutar diretamente a subunidade ribossômica 40S para o codão de iniciação (AUG) da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) ou para a vizinhança do mesmo, não ocorrendo o processo de leitura da região 5' transcrita não traduzida (UTR do inglês *untranslated region*). Esta interação pode ser direta ou parcialmente indireta, exigindo a assistência de alguns fatores de iniciação canónicos (eIF do inglês *eukaryotic initiation factor*) e / ou outros fatores (ITAF do inglês *IRES trans-acting factor*)<sup>17</sup>.

Muitas das referências bibliográficas que existem sobre IRES são sobre IRES virais. Sabe-se que alguns vírus compartilham sequências primárias de IRES ou têm semelhanças relativamente às suas estruturas secundárias<sup>47</sup>. Foi possível classificar quatro grupos de IRES, tendo em conta a sua estrutura e necessidade de utilizar fatores proteicos<sup>48</sup>. No grupo I, os IRES podem ligar-se diretamente ao ribossoma,

sem o auxílio de fatores proteicos canónicos de tradução e/ou ITAF e de Met-tRNA<sup>i</sup> <sup>48</sup>. No grupo II estão enquadrados os elementos IRES que usam alguns fatores proteicos canónicos de tradução, como eIF3 e eIF2, e precisam do Met-tRNA<sup>i</sup> para iniciar a tradução independente de *cap* <sup>48</sup>. Nos grupos III e IV encontramos IRES que necessitam de fatores proteicos canónicos de tradução e ITAF <sup>48</sup>. Estes dois grupos diferem apenas quanto ao local do início de tradução, no grupo III a tradução tem início no IRES enquanto no grupo IV, o início da tradução ocorre no codão de iniciação AUG a jusante do IRES <sup>48</sup>.

Apesar de menos estudados, sabe-se que existem vários mRNA eucarióticos com capacidade de serem traduzidos de forma dependente de IRES <sup>46</sup>. Tal como acontece com os mRNA virais traduzidos através de IRES, os mRNA eucarióticos para serem traduzidos através deste método, necessitam de uma quantidade reduzida de fatores de iniciação canónicos de tradução e/ou ITAF específicos <sup>46</sup>. Em contrapartida os IRES nos mRNA eucarióticos são menos estruturados e ainda não existem descritas sequências comuns entre eles <sup>46</sup>.

A síntese proteica consome grande parte da energia e dos recursos celulares. Sob condições desfavoráveis de obtenção de energia surge como resposta ao ambiente hostil, a garantia apenas de processos vitais à célula. Esta resposta celular tem como finalidade canalizar a energia celular para a recuperação da situação desfavorável em que a célula se encontra <sup>45,49</sup>. Temos como exemplos de condições desfavoráveis o stress do retículo endoplasmático (RE), hipoxia, deficiência de nutrientes, mitose e diferenciação celular.

Para recuperar das condições hostis anteriormente citadas, a tradução canónica é prejudicada e a tradução de mRNA específicos ocorre apenas através de mecanismos de tradução não canónica, como por exemplo a tradução mediada por IRES <sup>45,46</sup>. Existem vários mecanismos pelos quais a tradução dependente de *cap* é inibida <sup>47</sup>. A via de sinalização mTOR pode impedir que eIF4E se ligue à estrutura *cap* e conseqüentemente não ocorra a formação do complexo eIF4F, inibindo, assim, o início da tradução canónica <sup>50,51</sup>.

mTOR é uma serina/treonina-cinase que desempenha um papel fundamental no controlo do crescimento e metabolismo celular tendo em conta a disponibilidade de nutrientes, o stress celular e os níveis energéticos da célula <sup>50</sup>. Esta enzima regula a tradução de proteínas por meio de proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BP do inglês *binding proteins 4E*) que se podem encontrar fosforiladas ou não <sup>51</sup>. As 4E-BP competem com o eIF4G pela ligação ao eIF4E <sup>51</sup>. Perante condições de crescimento

desfavoráveis, mTOR apresenta baixa atividade e conseqüentemente as 4E-BPs não estão fosforiladas podendo competir com eIF4G pela ligação ao eIF4E, o que impede a formação do complexo eIF4F, inibindo desta forma a tradução canônica de proteínas<sup>50</sup>. Em contrapartida, quando as condições de crescimento celular são favoráveis, a atividade de mTOR é elevada fosforilando as 4E-BP. A fosforilação destas proteínas promove a sua dissociação de eIF4E, deixando este último fator disponível para a formação do complexo eIF4F e conseqüentemente a tradução canônica de proteínas<sup>50</sup>.

Outro mecanismo central de inibição da iniciação da tradução canônica durante o stress celular é a fosforilação da subunidade eIF2 $\alpha$ <sup>47</sup>. Quando eIF2 $\alpha$  está fosforilado liga-se a eIF2B, impedindo a troca PIB-GTP necessária para a reciclagem de eIF2<sup>47</sup>. Sem a conversão de eIF2-GDP em eIF2-GTP, a formação do complexo ternário e conseqüentemente a tradução canônica são inibidas<sup>47</sup>.

A repressão da tradução canônica tem como conseqüência a não tradução de mRNA que codificam proteínas cruciais para a sobrevivência celular e recuperação do stress em causa (por exemplo, proteínas apoptóticas, proteínas supressoras de tumores, ciclinas, fatores de transcrição, proteínas recetoras, canais celulares, fatores de crescimento e proteínas transportadoras)<sup>45,46</sup>. Nem sempre os IRES estão ativos quando a tradução dependente de *cap* é inibida<sup>45</sup>. Tendo em conta o stress celular e as conseqüências da inibição da tradução dependente de *cap*, apenas os mRNA que contêm IRES selecionados serão traduzidos<sup>45,46</sup>.

Além da tradução mediada por IRES sob condições de stress, como resposta à inibição da tradução canônica, os IRES celulares também existem em vários processos fisiológicos, como a espermatogénese, a plasticidade dos neurónios e a diferenciação celular<sup>45</sup>. Em condições fisiológicas normais, onde a tradução dependente de *cap* está totalmente ativa, a expressão de IRES é permitida em mRNA que contêm 5'UTR altamente estruturadas, o que é incompatível com a leitura eficiente da 5'UTR por mecanismos canônicos<sup>46</sup>.

Por outro lado, o mecanismo de tradução mediado por IRES também pode ser utilizado quando a tradução canônica não é eficaz na produção de proteínas, existindo mRNA que podem ser traduzidos pelo mecanismo dependente de *cap* e pelo mecanismo mediado por IRES<sup>52</sup>. É o caso da neurogranina, uma proteína de ligação à calmodulina neuronal que é expressa em células nervosas<sup>52</sup>. Estas células têm níveis relativamente baixos de eIF4E e, como tal, a tradução dependente de *cap* não é eficiente para garantir a expressão de todos os mRNA transcritos<sup>52</sup>. Perante situações

semelhantes à descrita anteriormente, a tradução mediada por IRES pode ser utilizada quando determinados mRNA não são traduzidos eficazmente através da tradução canónica<sup>52</sup>.

Concluindo, os IRES celulares têm dois papéis principais na célula<sup>45,46</sup>. Em condições fisiológicas normais, auxiliam a tradução de mRNA que não atingem os níveis de proteína necessários através da tradução dependente de *cap*, produzindo baixos níveis de proteína<sup>46,52</sup>. Por outro lado, perante condições que impedem a tradução canónica de ocorrer, a tradução mediada por IRES garante a produção robusta de um grupo seletivo de proteínas necessárias para responder ao stress ou condição que desencadeou o comprometimento do início da tradução dependente de *cap*<sup>45,46</sup>.

## 1.4 Significado fisiológico e patológico da tradução mediada por IRES

A maioria dos IRES celulares é encontrada em mRNA cujos produtos proteicos são necessários para o crescimento celular e controlo da morte celular<sup>53,54</sup>. Tendo em conta o capítulo anterior, ficou explícito que a tradução mediada por IRES é um importante mecanismo celular na regulação da expressão génica com significado em condições fisiológicas e/ou de stress<sup>46,53</sup>. Perante determinadas condições fisiológicas a síntese proteica dependente de *cap* é reduzida, mas os mRNA que codificam proteínas envolvidas na adaptação celular ao stress continuam a ser traduzidos<sup>53,54</sup>. Por exemplo, quando existe indisponibilidade de aminoácidos nas células, eIF2 $\alpha$  é fosforilado diminuindo a síntese de proteínas obtidas a partir da tradução canónica<sup>46,53</sup>. Esta reação de fosforilação induz a transcrição de genes transportadores de aminoácidos, como CAT-1 (do inglês *cationic amino acid transporter*), através da sua tradução mediada por IRES<sup>46,53</sup>.

Relativamente à regulação génica durante o processo de mitose a tradução mediada por IRES também demonstrou desempenhar um papel bastante importante<sup>46</sup>. A cinase 11 dependente de ciclina (CDK11 do inglês *cyclin-dependent kinase 11*) está envolvida na formação do fuso acromático e é traduzida através do mecanismo de IRES na transição das fases do ciclo celular (G2 (fase G2 do ciclo celular, G do inglês *gap*)/M(mitose)), onde a tradução dependente de *cap* está inibida<sup>46,53</sup>. Durante a apoptose, é através da tradução mediada por IRES que são mantidos os níveis de fatores indutores de apoptose e c-myc.

Quando existe um stress celular de hipoxia, as células conseguem preservar a tradução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês *vascular*

*endothelial growth factor*) e do fator induzível por hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$  do inglês *hypoxia inducible factor 1 alpha subunit*) através da tradução mediada por IRES<sup>53</sup>. Sucintamente, após tradução, o HIF-1 $\alpha$  promove a expressão do VEGF com a finalidade de proteger e adaptar as células a níveis baixos de oxigénio, promovendo a sobrevivência celular<sup>55</sup>.

Após descrever algumas das situações fisiológicas onde a tradução mediada por IRES visa promover a adaptação e sobrevivência celular é importante ressaltar que este modo de tradução também pode beneficiar condições patológicas. A presença de elementos IRES em alguns genes envolvidos na regulação da sobrevivência celular aumenta a possibilidade da desregulação da tradução mediada por IRES contribuir para a tumorigénese. No capítulo seguinte será descrita de que forma este tipo de tradução não canónico pode contribuir para o desenvolvimento tumoral.

#### 1.4.1 Tradução mediada por IRES e cancro

O microambiente tumoral é caracterizado por condições celulares desfavoráveis tais como hipoxia, deficiência de nutrientes e stress genotóxico e oxidativo. Perante tais condições a tradução canónica é prejudicada<sup>45,54</sup>. Tal como já foi referido, perante alguns eventos inibitórios da tradução dependente de *cap* é necessário recorrer a uma tradução mediada por IRES, para a síntese de determinadas proteínas chave na recuperação celular ao stress, promovendo a sobrevivência e adaptação celular ao mesmo. Quando se tratam de células malignas a tradução mediada por IRES de proteínas reguladoras chave promovem a proliferação e progressão tumoral<sup>45,54</sup>. Os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF do inglês *fibroblast growth factors*) são essenciais para a proliferação e diferenciação de uma grande variedade de células e tecidos<sup>45</sup>. Alguns deles (por exemplo FGF1 e FGF2), contém elementos IRES nas suas 5'UTR, permitindo a sua expressão mesmo quando a tradução canónica está comprometida<sup>45</sup>. A expressão de FGF2 está associada a tumores sólidos e a tumores hematopoiéticos, sendo a sua tradução considerada uma etapa bastante crítica no processo de tumorigénese<sup>45</sup>. Outro fator de crescimento, crítico na regulação da migração e proliferação de células mesenquimais, cuja expressão aberrante já está associada à progressão tumoral, é o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF do inglês *platelet-derived growth factor*) na sua forma B<sup>56</sup>.

As células malignas possuem uma elevada taxa de proliferação, conseqüentemente, pode ocorrer um défice do fator de crescimento; para colmatar este défice, as células tumorais têm a capacidade de induzir a tradução mediada por IRES de transcritos específicos. Um destes transcritos é um dos inibidores intrínsecos mais potentes das

caspases, o mRNA da proteína inibitória da apoptose ligado ao cromossoma X (XIAP do inglês *X-linked inhibitor of apoptosis protein*)<sup>57-59</sup>. Esta proteína tem a capacidade de inibir a apoptose das células tumorais, protegendo-as de determinados tratamentos<sup>45,56</sup>. Este fator anti-apoptótico aumenta quando as células tumorais são expostas a radiação, tornando-as resistentes à radioterapia<sup>56-59</sup>. Perante o stress oxidativo causado pela quimioterapia, as células tumorais têm como resposta a capacidade de traduzir outras proteínas antiapoptóticas através de elementos IRES<sup>56-59</sup>. Esta capacidade confere resistência às células tumorais perante alguns químicos. Concluído, uma tradução mediada por IRES de fatores antiapoptóticos permite às células malignas criar resistência à quimioterapia e radioterapia<sup>56-59</sup>.

Os ITAF, também desempenham um papel crucial na progressão tumoral, promovendo o crescimento do tumor, o progresso do ciclo celular, resistência à morte celular programada e angiogénese. Os processos anteriormente citados são motivados pela tradução aberrante mediada por IRES devido à desregulação da localização dos ITAF nas células tumorais<sup>60</sup>.

## 1.5 Tradução mediada por IRES e UPF1: a combinação em cancro

### 1.5.1 Proteína UPF1

A UPF1 é uma proteína de aproximadamente 140 kDa, evolutivamente conservada com atividades de ATPase e helicase<sup>42,61</sup>. É codificada pelo gene *UPF1* localizado no cromossoma 19 (p13.2-p13.11). A UPF1 é uma proteína multifuncional envolvida em diferentes processos, nomeadamente: NMD, estabilidade do RNA, reparação e replicação do DNA, progressão do ciclo celular, homeostase de telómeros e degradação de mRNA mediada por Staufen 1 (SMD do inglês *Staufen 1-mediated mRNA decay*), detalhadamente descrito nos parágrafos seguintes (Figura 5)<sup>42,61</sup>.

A função mais bem documentada de UPF1 diz respeito à sua função essencial no processo de NMD. Sumariamente, este mecanismo é um mecanismo de vigilância que degrada rapidamente mRNA aberrante – portador de codões com mutações *nonsense* –, impedindo a acumulação de proteínas truncadas não funcionais ou potencialmente prejudiciais à célula. O NMD também está envolvido na regulação da expressão de determinados transcritos normais, descrito em detalhe no capítulo 1.2.3.1 Terminação prematura da tradução e degradação do mRNA mediada por mutações *nonsense*<sup>42,61,62</sup>.

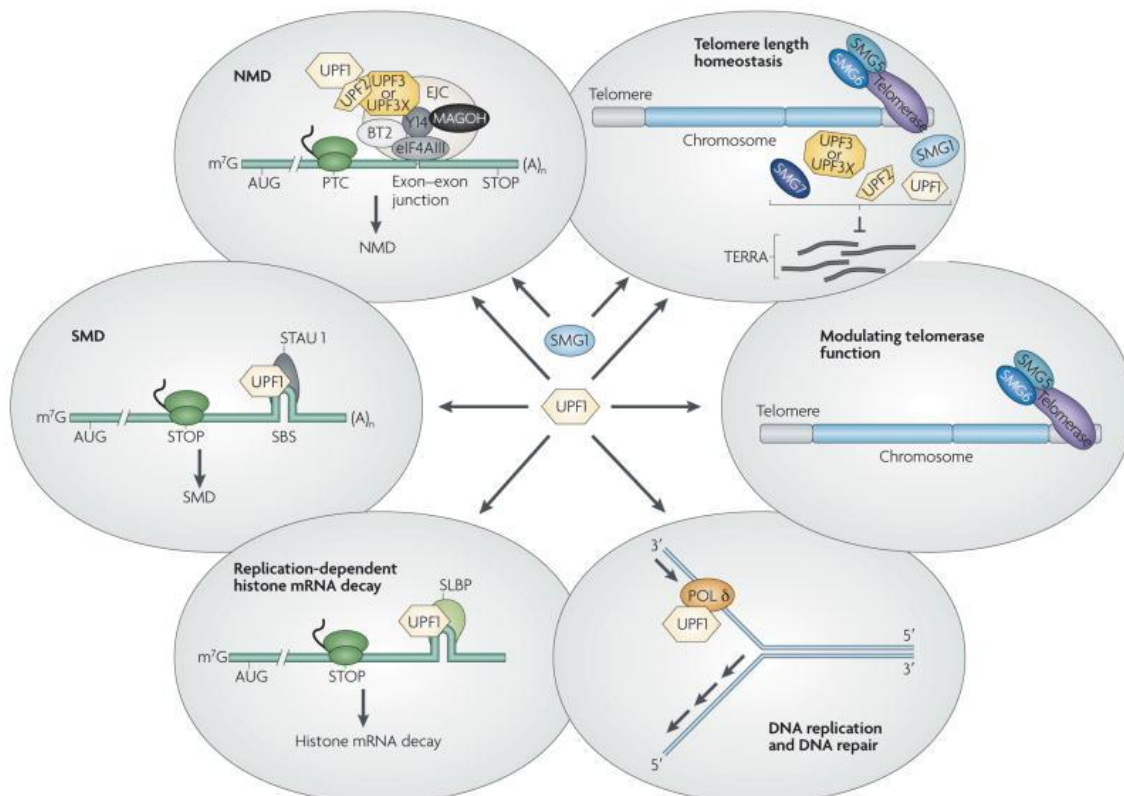
Além da sua função no processo de NMD, UPF1 também está envolvida no processo de SMD, através da ligação direta com a proteína *Staufen 1* a uma cadeia dupla de RNA (STAU1 do inglês *double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1*)<sup>63</sup>. Ambas as vias de degradação de mRNA disputam UPF1 e o domínio de ligação de STAU1 com UPF1 sobrepõe-se ao domínio de ligação de UPF1 com UPF2 (fator envolvido no NMD). O *knock-down* (KD) de STAU1 inibe o SMD, aumentando assim a atividade de NMD, enquanto o KD de UPF2, inibe o NMD, aumentando a atividade de SMD<sup>64</sup>. A interação entre as vias SMD e NMD forma uma importante rede de regulação da expressão génica, onde UPF1 desempenha um papel central<sup>28</sup>. UPF1 também está envolvida na degradação do mRNA histónico no final da fase S do ciclo celular ou após inibição da síntese de DNA<sup>61,65</sup>. Em condições normais os mRNA histónicos não apresentam cauda poly(A) na extremidade 3'. Em vez da cauda poly(A), nesta região do transcrito existe uma estrutura em *stem loop* altamente conservada<sup>65</sup>. Esta região é reconhecida pela proteína de ligação ao *stem loop* (SLBP do inglês *stem loop binding protein*)<sup>65</sup>. Preferencialmente, o fator de iniciação de tradução, proteína de ligação ao *cap* 80/20 (CBP do inglês *cap binding protein*) está ligado a SLBP promovendo a tradução da proteína, no entanto em condições de stress e fim de replicação, a UPF1 é fosforilada e liga-se a SLBP, ocorrendo o *decapping* do mRNA e consequentemente a sinalização do mesmo para degradação pelas exoribonucleoproteínas<sup>28,61,65</sup>.

Estudos recentes demonstraram que UPF1 não é apenas importante nas vias de degradação do mRNA, mas também é essencial para a replicação do DNA durante a fase S do ciclo celular sendo necessária para a progressão da fase S e estabilidade do genoma<sup>29,33</sup>.

Alguns estudos realizados, revelaram que UPF1 interage fisicamente com a DNA polimerase, sendo esta interação crucial para a progressão da fase S e a replicação do DNA<sup>61</sup>. A quantidade de UPF1 nas fases M e início da fase G1 (fase G1 do ciclo celular, G do inglês *gap*) do ciclo celular é baixa, começando a aumentar a meio de G1 e atingindo o seu nível mais alto durante a fase de síntese do ciclo celular (S)<sup>61</sup>. Em situações de défice de UPF1, pode ocorrer uma paragem precoce da fase S do ciclo celular, interrompendo assim o processo de replicação do DNA<sup>61</sup>. UPF1 está também envolvida na reparação do DNA durante a fase S do ciclo celular, pois quando esta se encontra em baixos níveis provoca a paragem do ciclo celular em fase S e reparação do DNA mediado pela proteína cinase ataxia telangiectasia mutadas (ATM do inglês *ataxia telangiectasia mutated kinase*) e relacionada a ATM e Rad3 (ATR)<sup>66,67</sup>. A ATR responde principalmente à paralisação da replicação do material genético, interferindo

na resposta a quebras na dupla hélice de DNA<sup>66</sup>. A fosforilação da histona H2AX pela cinase ATR vai provocar a formação de  $\gamma$ -H2AX desempenhando um papel fundamental no recrutamento e acumulação de proteínas de reparação de DNA nos locais de quebra da dupla hélice de DNA<sup>66</sup>. Por tudo o que foi referido acredita-se que esta proteína é importante na reparação do DNA e na manutenção da integridade do mesmo<sup>66,67</sup>.

A homeostase dos telómeros é outra das importantes funções que UPF1 desempenha na célula<sup>28,68</sup>. Estas estruturas são essenciais para a estabilidade dos cromossomas. Em 2007, foi demonstrado por Azzalin e seus colaboradores que os telómeros de mamíferos são transcritos em moléculas de RNA constituídos por repetições teloméricas (TERRA, do inglês *Telomeric repeat-containing RNA*)<sup>28,68,69</sup>. As moléculas TERRA ligam-se à cromatina nos telómeros desprotegendo as extremidades do cromossomas<sup>28</sup>. As proteínas SMG1, SMG6 e UPF1 regulam negativamente a associação TERRA à cromatina, protegendo assim as extremidades dos cromossomas da perda de telómeros<sup>28,69</sup>. Foi também demonstrado que a replicação eficiente de telómeros requer a existência da proteína UPF1<sup>68</sup> pois quando esta se encontra em níveis baixos, os telómeros são frágeis refletindo defeitos associados à sua replicação<sup>28</sup>.



**Figura 5: A proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) e SMG1 estão na interface de processos importantes para a regulação gênica e do genoma em células de mamíferos.** A UPF1 está envolvida em múltiplas vias de vigilância de ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA). A UPF1 participa no processo de degradação do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) quando este é portador de um codão de terminação prematuro (PTC do inglês *premature termination codon*); a UPF1 é fosforilada pela SMG1, o que desencadeia a degradação do mRNA portador de mutações *nonsense* (NMD do inglês *nonsense-mediated mRNA decay*); a UPF1 participa também na degradação do mRNA mediada pela proteína de ligação ao RNA, Staufen 1 (STAU1 do inglês *double-stranded RNA-binding protein Staufen*) (SMD do inglês *Staufen1-mediated mRNA decay*) e na degradação do mRNA histónico, durante o qual a proteína UPF1 se liga à proteína de ligação ao stem-loop (SLBP do inglês *stem-loop binding protein*) do mRNA. A UPF1 interfere também na replicação e reparação do DNA, estando associada à DNA polimerase (Pol)  $\delta$ . Finalmente, as proteínas UPF1 e SMG1 parecem funcionar na estabilidade do genoma, modulando a função da telomerase e regulando o comprimento dos telómeros <sup>28</sup>.

### 1.5.2 Tradução mediada por IRES e UPF1

Tal como foi referido anteriormente, a tradução mediada por IRES ocorre quando a tradução dependente de *cap* é inibida por condições ambientais hostis <sup>49,52,70</sup>. A maioria dos IRES celulares é encontrada em mRNA cujos produtos proteicos são necessários para o crescimento celular e controlo da morte celular <sup>53,54</sup>.

Sabe-se que a tradução mediada por IRES é um importante mecanismo celular na regulação da expressão gênica com significado em condições fisiológicas e/ou de *stress* <sup>46,53</sup>.

UPF1 é uma proteína envolvida em vários mecanismos celulares, descritos anteriormente com mais detalhe no capítulo 1.5.1 Proteína UPF1. Estudos recentes propuseram que o mais provável é que esta proteína use este mecanismo alternativo de iniciação da tradução para regular a sua expressão em situações em que a homeostase celular é afetada<sup>17</sup>. De facto, observou-se que a atividade de tradução independente de *cap* mediada pela 5'UTR do transcrito de *UPF1* ocorre e é semelhante em linhas celulares de cancro colo-retal e cancro do colo do útero, confirmando a capacidade da 5'UTR de *UPF1* mediar o início da tradução independente da estrutura *cap*<sup>17</sup>. Tendo em conta que foram testadas várias linhas celulares, pode-se assim afirmar que a tradução independente de *cap* de *UPF1* não é específica de tecido, mas um mecanismo omnipresente em todos os tipos celulares, servindo como mecanismo regulador para sustentar a síntese de proteínas em situações nas quais a proteína é necessária, mas o mecanismo canónico de tradução não é exequível<sup>17</sup>. É o caso da progressão entre as fases S e G2 no ciclo celular em que a proteína UPF1 é necessária e os seus níveis de expressão são mantidos<sup>71</sup>. Além disso, esta proteína é expressa na maioria dos tecidos em níveis médios a altos, sugerindo que a sua regulação deve ocorrer de maneira semelhante em diferentes tecidos<sup>17</sup>.

Foi também observado que a região 5'UTR de *UPF1* tem um promotor críptico (essencial em toda a sua sequência) apresentando assim a capacidade de promover o início da transcrição a jusante do IRES<sup>17</sup>.

Ainda são necessário estudos mais aprofundados, no entanto, a estimulação controlada ou a repressão do início da tradução não canónica de proteínas, como a UPF1, pode ser útil para desenvolver novas terapias no combate a determinadas patologias, nomeadamente, o cancro<sup>17</sup>.

### 1.5.3 UPF1 e cancro

O cancro é uma das principais preocupações médicas mundiais, segundo a Agência Internacional para a Investigação do Cancro, da Organização Mundial da Saúde (OMS). A mortalidade no último ano atingiu aproximadamente de 10 milhões de pessoas e surgiram cerca de 19 milhões de novos casos da doença.

A instabilidade do genoma é um pré-requisito para o desenvolvimento desta patologia surgindo quando os sistemas de vigilância, proteção e manutenção do genoma falham, não conseguindo manter a sua integridade. A ineficácia destes sistema deve-

se a defeitos herdados ou induzidos pela exposição a agentes ambientais (por ex., produtos químicos, agentes biológicos e radiação) <sup>72,73</sup>.

Tendo em conta o que já foi referido, pode-se afirmar que UPF1 é considerada um potencial supressor de tumor, pois regula negativamente a proliferação de células malignas <sup>29,74</sup>. No entanto, estes genes nas células cancerígenas geralmente sofrem mutações genéticas e modificações epigenéticas aberrantes <sup>75</sup>.

A primeira publicação que refere a relação entre UPF1 e cancro foi descrita em carcinoma adenoescamoso pancreático (CAP) <sup>76</sup>. O CAP é um tumor bastante agressivo, com prognóstico reservado e elevado potencial metastático. *Liu* e seus colaboradores, detetaram que UPF1 é regulada negativamente no CAP e o gene de *UPF1* está comumente mutado neste tipo de tumor <sup>76</sup>. Estas mutações vão alterar a funcionalidade da proteína resultante, perturbando assim o processo de NMD, visto UPF1 ser a proteína principal na regulação do mesmo <sup>30,76</sup>. A descoberta de mutações no gene *UPF1* em CAP representa o primeiro exemplo conhecido de alterações genéticas que podem interferir com o NMD, sendo consideradas, as primeiras assinaturas moleculares deste tipo de carcinoma <sup>29,33,76</sup>.

A regulação negativa de *UPF1* também foi observada em carcinoma hepatocelular (CHC) <sup>29</sup>. *Chang* e seus colaboradores verificaram que a regulação negativa de UPF1 estava associada à progressão maligna do CHC. O silenciamento epigenético do gene *UPF1* foi observado em linhas celulares de CHC com baixa expressão proteica de UPF1. Conclui-se assim, que o silenciamento de *UPF1* pode ser necessário para a tumorigénese e tem potencial para ser desenvolvido como um biomarcador para o fenótipo maligno do CHC, possuindo relevância na previsão do prognóstico e monitorização da progressão tumoral <sup>29</sup>. Foi também demonstrado que a regulação negativa de UPF1 está associado à diminuição da sobrevivência das pacientes com este tipo de carcinoma <sup>29</sup>.

Segundo outros estudos, a regulação negativa da UPF1 está também associada a cancro gástrico e correlacionada negativamente com a expressão do transcrito 1 associado a metástases do adenocarcinoma pulmonar (MALAT1 do inglês *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*) <sup>33</sup>. Este estudo refere que a baixa expressão de UPF1 interfere com o processo de NMD tal como acontece no CAP, impedindo a degradação de MALAT1, sobre-expresso nas células cancerígenas <sup>33</sup>. Ficou provado que UPF1 consegue controlar a expressão de MALAT1 e

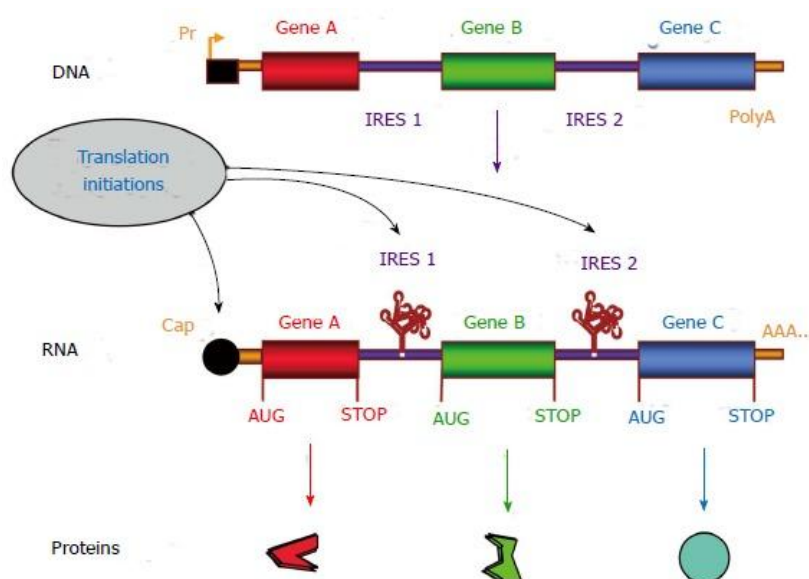
consequentemente a via UPF1/MALAT1 pode ser um alvo terapêutico para o cancro gástrico <sup>33</sup>.

## 1.6 IRES e alvos terapêuticos

Como mencionado anteriormente, uma tradução de mRNA mediada por IRES pode contribuir para o desenvolvimento de patologias, nomeadamente cancro <sup>45,46</sup>. Por este motivo, elementos IRES podem ser estudados com um objetivo terapêutico <sup>77</sup>. Estes estudos estão centralizados em descobrir drogas/antagonistas que interrompam ou impeçam as interações do IRES com o ribossoma e/ou com fatores auxiliares na sua função <sup>77</sup>. Temos como exemplos a utilização de oligonucleotídeos *antisense* que atuam de duas formas diferentes, orientando e destruindo os IRES através de RNases ou impedindo a interação do IRES com o ribossoma e a utilização de inibidores de pequenas moléculas, cujo mecanismo de ação ainda está em estudo, no entanto acredita-se que estes mecanismos sejam usados para impedir a ligação do ribossoma com o mRNA, tendo assim a capacidade de inibir alguns IRES celulares cancerígenos, nomeadamente c-myc e VEGF <sup>77</sup>.

Apesar de tudo o que foi publicado, as terapias até agora existentes apresentam como maior dificuldade a entrega eficiente das moléculas terapêuticas nas células alvo, sendo necessário realizar mais estudos nesta área <sup>77</sup>.

Por outro lado, os IRES podem ser utilizados para desenhar vetores multicistronicos para promover a tradução de vários genes utilizando o mesmo mRNA (Figura 6) <sup>78</sup>.



**Figura 6: Vetor multicistrico baseado na entrada interna do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*).** O vetor baseado em IRES contém vários genes, separados por IRES, que estão

sob o controlo do mesmo promotor representado por Pr. Com esta unidade de transcrição, um único ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) pode codificar genes diferentes. O início da tradução ocorre na extremidade 5' pelo mecanismo dependente de *cap*, resultando na tradução da primeira grelha de leitura (gene A). Ocorre o início de tradução independente de *cap* em cada IRES clonado, resultando na tradução dos genes B e C, <sup>78</sup>.

Como exemplo concreto desta metodologia, temos o vetor dicistrónico a expressar FGF2 e a induzir um angiogénico rico em cisteína 61 (Cyr61 do inglês *cysteine-rich angiogenic inducer 61*) num modelo de músculo isquémico dos membros posteriores de camundongo, estimulando assim a angiogénese <sup>79</sup>. O uso deste vetor dicistrónico provou ser mais eficiente e exibir menos efeitos secundários (mais seguro nos ensaios clínicos) do que o uso de dois vetores monocistrónicos <sup>79</sup>.

Existe uma grande especificidade de tradução tendo em conta o tecido e células onde determinado gene é expresso <sup>78</sup>. Este conceito de especificidade traducional do tecido pode ser aplicada à terapêutica, acoplando IRES e promotores específicos de determinado tecido criando assim vetores com maior segurança e especificidade <sup>78</sup>.

Dado que a tradução mediada por IRES é preferencial em condições de stress, os vetores multicistrónicos utilizando IRES podem ser utilizados no tratamento de patologias onde o ambiente celular é desfavorável como é o caso de patologias isquémicas e cancro <sup>78</sup>.

## 2. Objetivos

---

Sob condições desfavoráveis e privação de energia, a tradução dependente de *cap* é inibida e é a tradução mediada por IRES que auxilia a síntese de proteínas-chave envolvidas na resposta ao stress, crescimento celular e apoptose<sup>45,46,49</sup>. No cancro, existem muitos mRNA, cuja expressão está desregulada e em que a tradução se inicia com elementos IRES, o que pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão tumoral<sup>45,54</sup>. A tradução mediada por IRES parece desempenhar um papel fundamental na promoção da tumorigénese. É de extrema importância o estudo da regulação destes mRNA tendo em conta os diferentes stresses a que as células são expostas e como a transformação neoplásica é desencadeada.

A UPF1 é uma proteína envolvida em diversos mecanismos relacionados com o crescimento celular e manutenção da integridade genómica e, como tal, é considerada por alguns autores como uma proteína supressora de tumores<sup>29,42,61,62</sup>.

O grupo de investigação onde desenvolvemos o projeto verificou que a 5'UTR de UPF1 tem a capacidade de desencadear um mecanismo de tradução mediado por IRES; no entanto, ainda não sabemos qual a função biológica deste mecanismo<sup>17</sup>.

O nosso objetivo geral foi investigar a função biológica do IRES existente na 5'UTR de *UPF1* no processo de NMD. Para tal, propusemos os seguintes objetivos específicos:

- Testar a relevância da tradução independente de *cap* de UPF1 para o NMD quando as células são submetidas a condições de stress que inibem o início da tradução dependente de *cap*.
- Abordar as consequências funcionais da tradução independente de *cap* de UPF1 na progressão do ciclo celular.
- Avaliar se/como a tradução não-canónica de UPF1 contribui para a sobrevivência, mobilidade, proliferação e capacidade de invasão das células cancerígenas.
- Compreender ainda um possível mecanismo que contribua para a sobrevivência/morte das células cancerígenas ou para a sua resistência/eficácia à terapêutica.

[Tradução independente de *cap* da proteína humana *up-frameshift 1* (UPF1) e cancro.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Construção dos plasmídeos

O plasmídeo monocistrónico com a ORF de UPF1 (pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag) foi gentilmente cedido pelo Dr. Mühlemann, University of Bern, Switzerland. Este plasmídeo foi modificado no laboratório pela doutora Rafaela Lacerda, através da técnica de SOEing PCR (PCR do inglês *polymerase chain reaction*), tendo sido clonada a 5'UTR da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*) (controlo negativo) e a 5'UTR de *UPF1* a montante da ORF de *UPF1*, originando dois plasmídeos distintos, pH3-HBB-UPF1-Flag e pH3-UPF1-UPF1-Flag, respetivamente (Figura 7). Um *hairpin loop* estável foi clonado a montante das 5'UTR de ambos os plasmídeos para impedir a reiniciação da tradução.



**Figura 7: Representação esquemática das construções plasmídicas monocistrónicas com a grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*).** Cada unidade transcricional usa o promotor do citomegalovírus (CMV), representado pela primeira caixa cinzenta à esquerda da figura. As caixas pretas representam as diferentes sequências clonadas a montante do codão de iniciação de *UPF1*. pH3-HBB-UPF1-Flag representa o plasmídeo com a região 5' transcrita não-traduzida da beta-globina humana (HBB 5'UTR), representando o controlo negativo para a tradução independente de *cap* e pH3-UPF1-UPF1-Flag representa o plasmídeo clonado com 5'UTR de *UPF1*. Ambos os plasmídeos contêm a sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, que impede a reiniciação da tradução, clonada a montante da 5'UTR. Os três plasmídeos representados na figura apresentam a ORF UPF1 (caixas cinzento-claras) ligada à sequência Flag. O marcador Flag está representado pelas caixas cinzentas à direita com «Flag» em branco, clonado em fase com a ORF de *UPF1*, a jusante desta.

Como estratégia alternativa, foi construído no âmbito deste projeto um plasmídeo dicistrónico, em que o primeiro cistrão é traduzido de forma dependente de *cap* e o segundo cistrão de forma independente de *cap*. Para este efeito, foi utilizado um plasmídeo contendo a ORF da proteína fluorescente verde (GFP do inglês *green fluorescent protein*), gentilmente cedido pelo doutor Marco Candeias, Universidade de Quioto, Japão. O plasmídeo contendo a ORF de *GFP* e os plasmídeos pH3-HBB-UPF1-Flag e pH3-UPF1-UPF1-Flag foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* (New England Biolabs). O produto da digestão foi separado por electroforese em gel

de agarose 1,5% e as bandas correspondentes à GFP (720 pares de bases (bp do inglês *base pair*)) e aos plasmídeos pH3-HBB-UPF1-Flag e pH3-UPF1-UPF1-Flag linearizados (~9 quilo pares de base (kb do inglês *quilo base pair*)) foram isoladas. As bandas foram purificadas utilizando o kit DNA Clean & Concentrator™ -5 (Zymo Research). A quantificação do DNA plasmídico foi realizada usando o aparelho NanoDrop™ (Thermo Scientific), medindo a absorvância a 260 nanómetros (nm). Após a quantificação, os fragmentos foram ligados na proporção 7:1 (inserto:vetor) utilizando a enzima T4 ligase (NZYtech). Posteriormente, as células competentes de *E. coli* NZY5α (NZYTech) foram transformadas com as construções acima mencionadas. As bactérias foram cultivadas em placas de ágar Luria-Bertani (LB) suplementadas com 100 µg/mL de ampicilina, *over-night* (ON) a 37 °C. Após este período, foram selecionadas 4 colónias de cada placa e o DNA plasmídico foi extraído utilizando o kit de NZYMiniprep (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante. A seleção das colónias positivas foi realizada por digestão enzimática com a enzima *HindIII*, sendo o critério de seleção a presença de uma banda com ~720 bp, que corresponderia à ORF de *GPF*. O DNA plasmídico dessas colónias foi sequenciado por sequenciação de Sanger. Os plasmídeos resultantes foram designados pGFP-H3-HBB-UPF1-Flag e pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag (Figura 8).



**Figura 8: Representação esquemática das construções dicistrônicas.** GFP (do inglês *green fluorescent protein*) representa o cistron traduzido de forma dependente da estrutura *cap*, que codifica para a proteína verde fluorescente (caixas cinzento-escuras). ORF UPF1 representa a grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) da região codificante da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) (caixas cinzento-claras à direita na figura). As caixas cinzento-claras à esquerda na figura representam o promotor do citomegalovírus (CMV). As caixas pretas representam as diferentes sequências clonadas a montante do codão de iniciação de *UPF1*. pGFP-H3-HBB-UPF1-Flag representa o plasmídeo com a região 5' transcrita não-traduzida da beta-globina humana (HBB 5'UTR) e pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag representa o plasmídeo com a 5'UTR de *UPF1*. Ambos os plasmídeos contêm a sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, que impede a reiniciação da tradução, clonada a jusante do cistron da *GFP*. Ambos os plasmídeos têm um marcador Flag (caixas cinzentas com «Flag» em branco) clonado em fase com a ORF de *UPF1*, a jusante desta. Estes construtos têm como finalidade testar a função biológica da tradução independente da estrutura *cap*.

Todos os plasmídeos foram sequenciados pelo método de Sanger para verificar a correção das sequências. Foram utilizados *primers* para diferentes locais dos plasmídeos em estudo (

Tabela 1). Os *primers* #1, #2, #3, #4 e #5 utilizaram-se para verificar a sequência inicial do plasmídeo, nomeadamente a integridade do promotor, sequência de *hairpin*,

sequência da respetiva 5'UTR clonada e ATG no seu contexto de iniciação de tradução. Foram verificadas as regiões de junção entre as diferentes sequências anteriormente referidos, bem como a grelha de leitura aberta de *UPF1*. Os primers #6 e #7 foram utilizados para verificar a região final do gene permitindo observar a presença do Flag e codão *stop*.

Tabela 1| *Primers* utilizados na sequenciação dos plasmídeos em estudo.

Designação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> na direção 5' → 3'
#1	TTGACGCAAATGGGCGGTAG
#2	GAGTTCGAGTTCACCGACTTTACT
#3	GAACCCACTGCTTACTGGCTTATCG
#4	GTCTTGGCTACACTGTCGTCCACA
#5	TAATACGACTCACTATAGGG
#6	CTAGAAGGCACAGTCGAGG
#7	AATCACAAATCGACGTGGCGCTCTC

### 3.2 Cultura celular

As células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês *human cervical cancer-derived cell line*) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) suplementado com soro bovino fetal (FBS do inglês *fetal bovine serum*) (Gibco) a 10% volume/volume (v/v). As células foram mantidas a 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em atmosfera húmida; o meio foi trocado a cada dois ou três dias dependendo da confluência celular. Para transfeção, as células foram cultivadas em placas de 35 milímetros (mm) durante 24 h, atingindo confluência celular de ~30-40%, para transfeção com ácido ribonucleico de interferência (siRNA do inglês *small interfering RNA*), ou ~70-80%, para transfeção com DNA plasmídico ou mRNA transcrito *in vitro*.

### 3.3 Transcrição *in vitro*

O primeiro passo da transcrição *in vitro* passa pela linearização do plasmídeo, para tal utilizou-se a enzima de restrição *PvuI* (New England Biolabs) cujo local de restrição está após a sequência Flag. Os fragmentos linearizados foram purificados com DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) e 1 µg deste produto purificado foi transcrito *in vitro* com o kit T7 Quick High Yield RNA Synthesis (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada mRNA transcrito, foram

utilizadas duas estruturas *cap* diferentes, de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs).  $m^7G(5')ppp(5')G$  RNA ( $m^7G$  do inglês *7-methylguanosine*) representa uma estrutura análoga ao *cap* e  $G(5')ppp(5')A$  RNA, representa uma estrutura não-funcional análoga ao *cap*. As amostras de RNA foram tratadas com Turbo DNase (Ambion) para degradar possíveis vestígios de DNA nas amostras e, em seguida, foram poli-adeniladas com E. coli Poly(A) Polymerase (New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante. Os transcritos resultantes foram purificados por extração com fenol/clorofórmio (pH 4,7, Ambion), precipitados com etanol absoluto e eluídos em água livre de RNases de acordo com procedimentos convencionais. A qualidade de todos os transcritos obtidos foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de agarose-formaldeído.

### 3.4 Desenho de siRNA para a 3'UTR do mRNA de *UPF1*

Com o objetivo de avaliar apenas a tradução independente de *cap* de UPF1, foi necessário fazer KD do mRNA endógeno de *UPF1*. Para esse efeito, foram desenhados siRNA dirigidos à 3'UTR do mRNA referido anteriormente.

Para desenhar os siRNA recorreu-se ao software [http://www.rnaiweb.com/RNAi/siRNA\\_Design/](http://www.rnaiweb.com/RNAi/siRNA_Design/), seguindo as seguintes indicações:

- Identificar uma região AA (N19), TT ou NA (N21) ou NAR (N17) YNN, onde N é qualquer nucleótido, R é purina (A, G) e Y é pirimidina (C, U)
- siRNA com conteúdo de G + C entre 35-60%
- Evitar locais de 4 ou mais repetições de nucleótidos
- Evitar sequências que compartilhem um certo grau de homologia com outros genes

Para avaliar a homologia com outras sequências, foi utilizada a ferramenta NCBI Blast (Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)). Após avaliar estas características, foram identificados 2 siRNA que cumpriam todos os critérios acima mencionados (Tabela 2). Aos siRNA foram adicionados prolongamentos de 3'-dTdT, sendo sintetizados em duplex e anelados (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 2| siRNA direcionados à 3'UTR de *UPF1*.

Designação do siRNA	siRNA na direção 5'→3'	Conteúdo GC
siRNA UPF1 3'UTR 1	CGCCUGGCUUGGGGUGUCA	56.5%
siRNA UPF1 3'UTR 2	GAGCUAAGCAACGUGGC	47.8%

### **3.5 Transfeção celular com DNA plasmídico, mRNA transcrito *in vitro* ou siRNA**

A transfeção celular foi realizada utilizando o reagente de transfeção Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Transfetou-se 1,5 µg de DNA ou 4 µg de mRNA transcrito *in vitro*. Sumariamente, por cada placa de 35 mm: o material a transfetar foi diluído em 250 mL de meio Optimem (solução 1) e 4 mL de Lipofectamine foram diluídos em 250 mL de Optimem (solução 2). Após 5 minutos (min) de incubação da solução 2, juntaram-se ambas as soluções e deixou-se incubar por 20 min à temperatura ambiente (TA). Durante o período de incubação efetuou-se a troca de meios às placas de cultura celular. Após o período de incubação a transfeção celular foi realizada gota a gota e as células foram incubadas entre 20 a 24 h no caso da transfeção ser realizada com DNA plasmídico e entre 4 a 8 h se a transfeção for com mRNA transcrito *in vitro*. Durante os períodos anteriormente referidos as células foram mantidas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida.

No caso dos siRNA, as células foram transfetadas com 200 pmol de cada siRNA. Vinte e quatro horas após a primeira transfeção as células foram transfetadas com um reforço do siRNA (50 pmol, 75 pmol ou 100 pmol) juntamente com os plasmídeos de interesse. As células foram colhidas 48 h após a primeira transfeção com siRNA. Quando a atividade experimental necessita de uma transfeção de mRNA e o mesmo é transcrito *in vitro*, a transfeção é realizada ~40 h após a transfeção com o siRNA e as células são colhidas 4 a 8 h após a última transfeção.

### **3.6 Western blot**

As amostras foram lisadas em tampão de amostra de Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) (5x, v/v; NZYTech) e posteriormente desnaturadas a 95 °C durante 15 min. As proteínas da amostra foram separadas de acordo com o peso molecular através da eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE) durante 1 h com uma voltagem de 100 volts e transferidas cerca de 1 h para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) a uma amperagem fixa de 20 miliamperes. As membranas foram previamente ativadas com metanol e após transferência foram bloqueadas tendo em conta as proteínas a detetar (Tabela 3). Após bloqueio da membrana, os anticorpos primários e secundários foram incubados de acordo com as indicações do fabricante.

**Tabela 3| Anticorpos usados neste estudo e condições de utilização dos mesmos na técnica de Western blot.** Os anticorpos anti-UPF1 e anti-Flag foram utilizados como anticorpos primários e os anticorpos anti-IgG de rato e anti-IgG de coelho foram utilizados como anticorpos secundários; o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina foi utilizado como controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal

Anticorpo	Diluição	Tampão a utilizar	Condições
Anti-UPF1 (sintetizado em coelho, Cell Signaling)	1: 250	BSA 5% peso/volume (p/v) em 1x (v/v) TBS Tween a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich)	ON, 4 °C
Anti-FLAG (sintetizado em rato, Sigma-Aldrich)	1: 1000	Leite em pó desnatado a 5% (p/v) em 1x (v/v) TBS Tween 20 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich)	1h à TA
Anti- $\alpha$ -tubulina (sintetizado em murganho, Sigma-Aldrich)	1:50 000	Leite em pó desnatado a 5% (p/v) em 1x (v/v) TBS Tween 20 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich)	1h à TA
Anti-IgG de rato (anticorpo secundário conjugados com peroxidase, Bio-Rad)	1: 4000	Leite em pó desnatado a 5% (p/v) em 1x (v/v) TBS Tween 20 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich)	1h à TA, com agitação suave
Anti-IgG de coelho (anticorpo secundário conjugados com peroxidase, Bio-Rad)	1:3000	Leite em pó desnatado a 5% (p/v) em 1x (v/v) TBS Tween 20 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich)	1h à TA, com agitação suave

A imunodeteção foi realizada por quimioluminescência, utilizando o sistema de luminescência eletroquímica (ECL). Foram utilizados quatro reagentes: reagente ECL, luminol, peróxido de hidrogénio e ácido cumárico que originaram duas soluções extemporâneas colocadas em contacto com a membrana de PVDF. A degradação do peróxido de hidrogénio em hidrogénio e oxigénio foi provocada pela peroxidase existente nos anticorpos secundários; O oxigénio reagiu com o luminol queimando a chapa de revelação (chapa de raio X) tendo em conta a quantidade de proteína existente. O tempo de contacto entre soluções e membrana depende do anticorpo a revelar. As chapas de raio X foram reveladas no processador de raios X da Kodak Medical (Carestream Health).

### 3.7 Extração de RNA

Para efetuar a extração de RNA as células foram lisadas com um tampão de lise (PLB do inglês *passive lysis buffer*). O RNA total das células transfectadas foi isolado utilizando o kit de extração de RNA Nucleospin II (Macherey-Nagel), seguindo as instruções do fabricante. Quando necessário, as amostras foram tratadas com DNase I livre de RNases (Ambion) e o RNA foi purificado com igual quantidade de fenol/clorofórmio, pH 4,7 (Ambion), precipitado com etanol absoluto e eluído em água livre de RNases de acordo com procedimentos padrão.

### 3.8 Síntese de cDNA e PCR em tempo real (RT-qPCR)

A cadeia simples de DNA complementar do mRNA (cDNA, do inglês *mRNA-complementary DNA*) foi sintetizada com 1 µg de RNA total pela transcriptase reversa (RT, do inglês *reverse transcription*, NZYtech) de acordo com as instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR do inglês *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*) foi realizada num equipamento ABI7500 (Applied Biosystems) com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A expressão do gene alvo foi normalizada à do gene *GAPDH* e os dados foram analisados pelo método  $\Delta\Delta Ct$ <sup>80</sup>.

Os valores de Ct dos amplicões de mRNA de *UPF1* ou *GADD45A* foram comparados com o respetivo homólogo nas condições de siRNA de Lucifrase (Luc), arbitrariamente definidos como 1. As eficiências de amplificação de cada par de *primers* foram determinadas pelas respetivas curvas de calibração. As sequências dos *primers* utilizados estão disponíveis na Tabela 4. É de ressaltar que foram realizadas 3 experiências independentes e como controlo de contaminação com DNA, foi realizado um PCR em que não incluímos a enzima transcriptase reversa na síntese de cDNA.

Tabela 4| Sequências de *primers* utilizados na qPCR na direção 5'→ 3'.

Designação do <i>Primer</i>	<i>Primer Foward_F</i>	<i>Primer Reverse_R</i>
UPF1-RT	CTACCAGGAGGTGGAGATCG	GCACACAGGACAGGATGATG
GADD45A-RT	GGAGGAATTCTCGGCTGGAG	CGTTATCGGGGTCGACGTT
GAPDH-RT	CCATGAGAAGTATGACAACAGCC	GGGTGCTAAGCAGTTGGTG

### **3.9 Análise estatística**

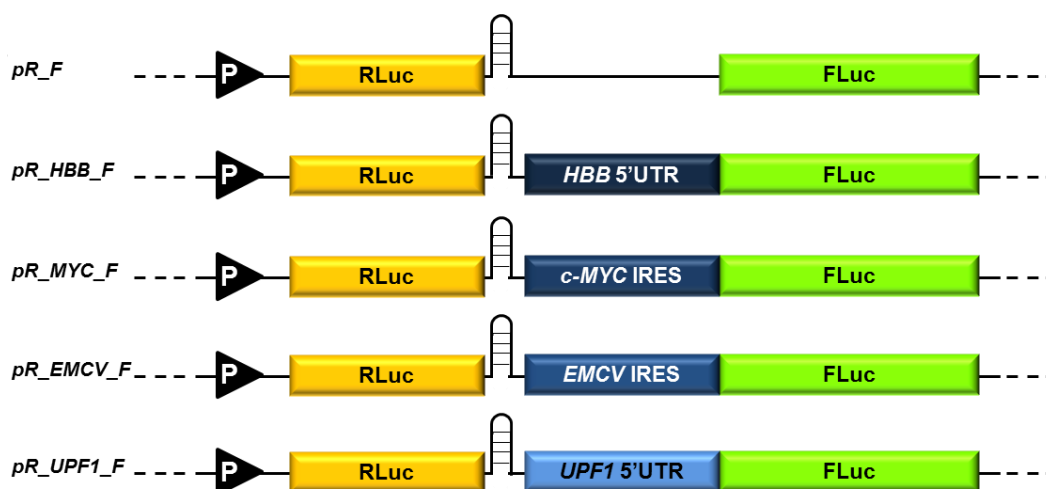
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste t de *Student* foi utilizado para estimativa da significância estatística. Para a análise estatística foi definida uma significância de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Resultados anteriores

#### 4.1.1 Capacidade da 5'UTR de *UPF1* de induzir a atividade de FLuc num contexto dicistrónico

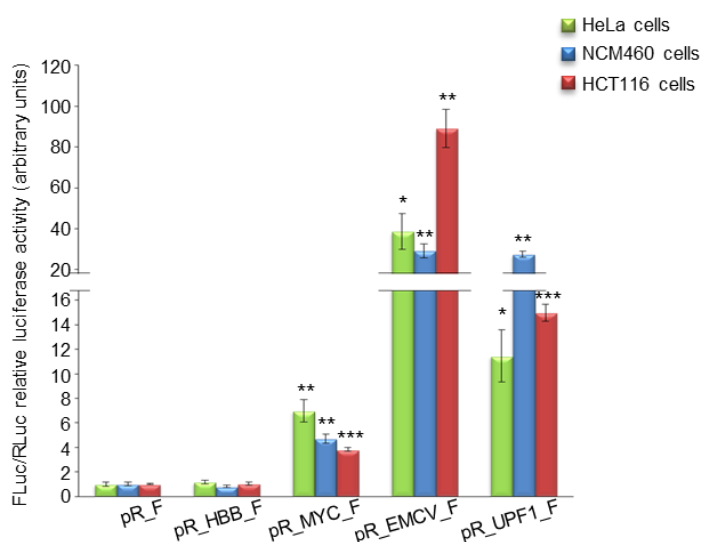
Foi estudado na tese de doutoramento da doutora Rafaela Lacerda, a capacidade da 5'UTR de *UPF1* para iniciar a tradução independente de *cap*. Para testar esta capacidade foram utilizadas as construções plasmídicas presentes na Figura 9. Nestes construtos, a tradução de *Renilla* luciferase (RLuc) é dependente de *cap* representando um controlo interno à atividade experimental, no entanto, a *Firefly* luciferase (FLuc) é traduzida de maneira independente de *cap*, apenas se a sequência clonada a montante desta o permitir. É de salientar que a transcrição do construto dicistrónico está sob o controlo do promotor e intensificador SV40 e que o *hairpin* clonado a jusante da ORF de *RLuc* impede eventos de reiniciação da tradução.



**Figura 9: Representação esquemática dos vetores utilizados para verificar se a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) é capaz de iniciar a tradução independente de *cap*.** RLuc (*Renilla* luciferase) é o cistron traduzido de forma dependente de *cap* - caixa amarela. FLuc (*Firefly* luciferase) é o cistron traduzido de forma independente de *cap* - caixa verde. Os triângulos pretos com "P" branco simbolizam o promotor de SV40. As caixas existentes em diferentes tons de azul representam as diferentes sequências clonadas a montante do codão de iniciação (ATG) de FLuc. pR\_F é o vetor vazio; pR\_HBB\_F, é o vetor contendo o 5'UTR da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), e é o controlo negativo da atividade independente de *cap*; pR\_MYC\_F é o vetor que contém o local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*) de c-MYC e o controlo positivo para a atividade independente de *cap*; pR\_EMCV\_F é o vetor que contém o IRES de EMCV e o controlo positivo da atividade de IRES viral; pR\_UPF1\_F, o vetor que contém a 5'UTR de UPF1, sequência em estudo. Todas as construções contêm um *hairpin* estável a jusante do cistron RLuc para impedir a reiniciação da tradução (Figura adaptada de 17).

Tendo por base o que foi escrito anteriormente foram utilizados 5 construtos diferentes, nomeadamente, o vetor vazio, pR\_F, controlo negativo para qualquer atividade não canónica, pois não contém nenhuma inserção entre as sequências das ORF de *RLuc* e *FLuc*. O vetor que contém a 5'UTR de *HBB*, pR\_HBB\_F, foi considerado o controlo negativo para o início da tradução não canónica, porque não pode mediar mecanismos alternativos de início da tradução. O controlo positivo para a atividade de tradução não canónica é o construto pR\_MYC\_F que contém uma sequência IRES na 5'UTR de *c-Myc*<sup>81</sup>. Como controlo positivo viral, foi utilizado o construto pR\_EMCV\_F onde a sequência IRES presente é um elemento muito forte<sup>82</sup>, fornecendo um controlo confiável de que o sistema está a funcionar corretamente. Por fim, o construto pR\_UPF1\_F representa o vetor que foi estudado.

Após estabelecidos todos os controlos positivos e negativos necessários para avaliar a capacidade da 5'UTR de *UPF1* iniciar a tradução independente de *cap*, foram transfetadas três linhas celulares - HeLa, linha celular derivada da mucosa intestinal normal (NCM460 do inglês *Human normal intestinal mucosa-derived cell line*) e linha celular derivada de carcinoma coloretal pré-metastático (HCT116 do inglês *Human pre-metastatic colorectal carcinoma-derived cell line*) - com os construtos presentes na Figura 9. Por ensaios de luminometria, foi comparada a atividade relativa de FLuc de cada uma das construções transfetadas com a expressão do vetor vazio. Em todas as linhas celulares testadas, houve um aumento significativo na atividade relativa (FLuc/RLuc) de pR\_UPF1\_F em comparação com a de pR\_F (Figura 10).



**Figura 10:** A expressão da proteína repórter FLuc (Firefly luciferase) é mediada pela região 5' transcrita não traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) num contexto dicistrónico. As células HeLa (barras verdes), NCM460 (barras azuis) e HCT116 (barras vermelhas) foram transfetadas com o plasmídeo contendo a 5'UTR de *UPF1* (pR\_UPF1\_F) ou com um dos controlos usados na experiência: pR\_F (plasmídeo vazio), pR\_HBB\_F

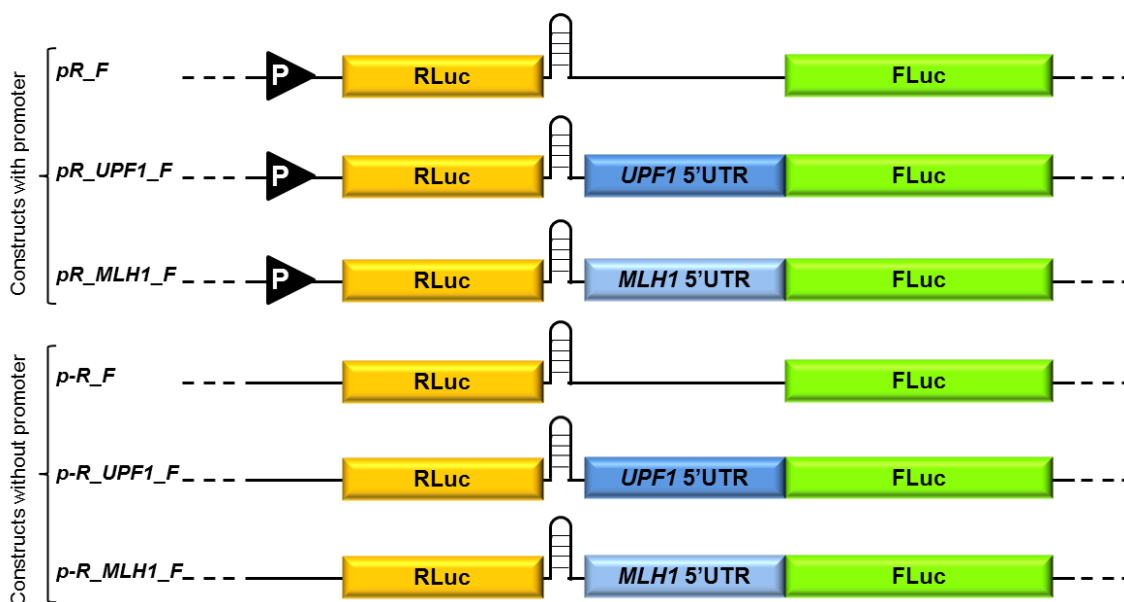
(plasmídeo contendo a 5'UTR de *HBB*), pR\_MYC\_F (plasmídeo contendo o IRES de c-Myc) ou pR\_EMCV\_F (plasmídeo contendo o IRES de EMCV). Os dados apresentados são o resultado de pelo menos três experiências independentes. Asteriscos (\*) indicam significância estatística em relação ao vetor vazio. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Figura adaptada de <sup>17</sup>).

Os resultados obtidos foram indicativos de que a 5'UTR de *UPF1* foi capaz de iniciar um mecanismo de tradução não canónico responsável pelo aumento da medição de atividade de FLuc. Além disso, este mecanismo parece ter sido mais forte nas células normais, NCM460, do que nas células cancerígenas (HeLa e HCT116), pois o aumento da atividade relativa de FLuc foi muito maior no primeiro tipo celular do que no último. Em relação às construções que contêm os controlos positivos e negativos escolhidos para a atividade independente de *cap*, foi observado um aumento significativo na atividade relativa de FLuc de construtos contendo as sequências IRES de c-MYC e EMCV, mas não da que contém a sequência 5'UTR de *HBB*. Assim, os resultados obtidos foram concordantes com os resultados esperados. A atividade relativa de FLuc de pR\_HBB\_F foi semelhante à de pR\_F em todas as linhas celulares confirmando que a sequência 5'UTR de *HBB* não é capaz de mediar a tradução não canónica. Nas três linhas celulares analisadas, a atividade relativa de FLuc de pR\_UPF1\_F foi maior que a de pR\_MYC\_F, mas menor que a de pR\_EMCV\_F. Resumindo, o resultado desta experiência permitiu identificar a capacidade que a 5'UTR de *UPF1* tem de induzir a expressão não canónica de FLuc tal como o IRES existente em c-Myc e EMCV.

#### 4.1.2 A existência de um promotor críptico na 5'UTR de *UPF1*

O sistema dicistrónico, quando utilizado, pode gerar resultados falso-positivos devido à existência de promotores crípticos. A existência de um promotor críptico na sequência que foi estudada poderia originar um transcrito monocistrónico que codificasse apenas FLuc, através do mecanismo de tradução dependente de *cap*. Isto aumentaria drasticamente os níveis de proteína FLuc medidos por ensaios de luminometria, pois seriam o resultado do início da tradução dependente de *cap* do transcrito monocistrónico juntamente com a possível expressão de FLuc resultante de um mecanismo de tradução independente de *cap*.

Para verificar se esta possibilidade existia, foi criada uma construção plasmídica sem promotor contendo a 5'UTR de *UPF1* para descartar a presença de falsos positivos. Como controlo positivo foi utilizado um construto contendo a 5'UTR de *homólogo mutL 1* (MLH1 do inglês *mutL Homolog 1*), estudado e descrito como contendo um promotor críptico <sup>83,84</sup> (Figura 11).

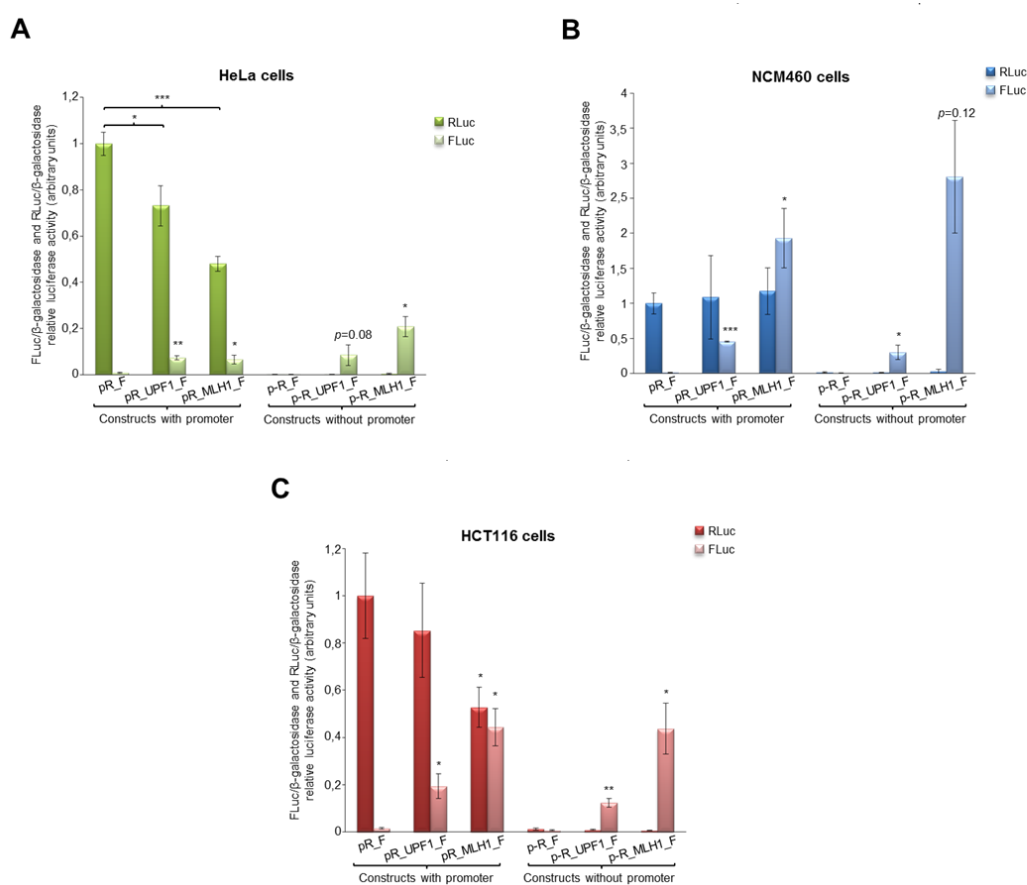


**Figura 11: Representação esquemática das construções usadas para verificar se a região 5' transcrita não traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) contém um promotor críptico.** RLuc (*Renilla* luciferase) é o cistrão traduzido dependente de *cap* - caixa amarela; FLuc (*Firefly* luciferase) é o cistrão traduzido de forma independente de *cap*. Os triângulos pretos com "P" branco simbolizam o promotor SV40. As caixas em diferentes tons de azul representam as diferentes sequências clonadas a montante do codão de iniciação, ATG de FLuc. pR\_F é o vetor vazio; pR\_UPF1\_F, o vetor que contém a 5'UTR de *UPF1* sendo a sequência em estudo; pR\_MLH1\_F, é o vetor que contém a 5'UTR de *MLH1*, e é o controlo positivo para a presença de promotor críptico. p-R\_F, p-R\_UPF1\_F e p-R\_MLH1\_F são os plasmídeos sem promotor. Todas as construções contêm um *hairpin* estável a jusante do cistrão RLuc para impedir a reiniciação da tradução (Figura adaptada de <sup>17</sup>).

Foram realizados ensaios laboratoriais nas três linhas celulares referidas na experiência anterior (HeLa, NCM460 e HCT116). As linhas celulares foram co-transfetadas com cada uma das construções dicistrónicas usadas para avaliar a presença de promotores crípticos e com o plasmídeo que codifica a  $\beta$ -galactosidase (pSV- $\beta$ -Galactosidase da Promega, para controlar a eficiência de transfeção celular). Foram medidos os níveis relativos de expressão de RLuc e FLuc em todas as linhas celulares usadas anteriormente (Figura 12). Foi verificado que FLuc é expressa a partir de construtos sem promotor contendo a 5'UTR de *UPF1*, o que indicou que esta sequência foi capaz de conduzir a transcrição e a produção concomitante de um transcrito monocistrónico que pode ser traduzido canonicamente (Figura 12). De facto, os níveis de atividade relativa de FLuc do construto contendo o 5'UTR de *MLH1* sem promotor foram significativamente maiores que os do pR\_F. Os níveis de atividade relativa de FLuc de pR\_MLH1\_F também foram significativamente maiores do que os do vetor vazio, como esperado, devido à presença do promotor críptico anteriormente descrito <sup>83,84</sup>. Curiosamente, o pR\_UPF1\_F sem promotor também teve uma atividade da proteína repórter FLuc em níveis significativamente maiores que os do p-R\_F, em todas as linhas celulares testadas. Este resultado sugeriu que a sequência 5'UTR de

*UPF1* contém uma região promotora críptica que originou um transcrito monocistrónico cuja tradução ocorre de maneira dependente de *cap*. A presença desse promotor críptico originou resultados falso-positivos do sistema dicistrónico, pois os níveis relativos de expressão de FLuc medidos a partir do transcrito monocistrónico que codifica a ORF de *FLuc* mascaram apenas os níveis de atividade relativos de FLuc derivados de um mecanismo putativo de iniciação da tradução mediado por 5'UTR de *UPF1* e o último não pode ser detetado.

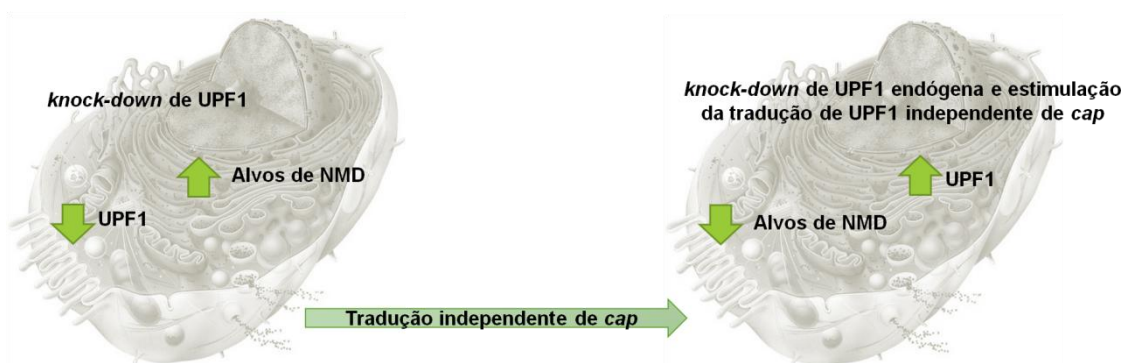
Para ultrapassar este problema, todas as experiências realizadas com a finalidade de avaliar a tradução independente de *cap* da 5'UTR de *UPF1* foram realizadas utilizando mRNA transcritos *in vitro*, para descartar a influência do promotor críptico.



**Figura 12: A região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) contém um promotor críptico ativo em todas as linhas celulares testadas.** As células HeLa (A), NCM460 (B) e HCT116 (C) foram transfetadas com construções contendo promotor (pR\_F, pR\_UPF1\_F e pR\_MLH1\_F) ou construções sem promotor (p-R\_F, p-R\_UPF1\_F e p-R\_MLH1\_F) e co-transfetadas com o plasmídeo que codifica a  $\beta$ -galactosidase (vetor de controlo pSV- $\beta$ -Galactosidase), um controlo interno para a eficiência da transfeção. Os níveis relativos de expressão de RLuc (*Renilla* luciferase, verde escuro, azul escuro e vermelho) e FLuc (*Firefly* luciferase, verde claro, azul claro e rosa) foram obtidos normalizando cada um deles ao de  $\beta$ -galactosidase, todos medidos por ensaios de luminometria. Os dados apresentados são o resultado de pelo menos três experiências independentes. Asteriscos (\*) indicam significância estatística em relação ao vetor vazio. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Figura adaptada de <sup>17</sup>).

## 4.2 Estabelecimento das condições experimentais

Com este trabalho pretendemos compreender a relevância biológica do IRES existente na 5'UTR de *UPF1*. Começamos por investigar a contribuição de UPF1 traduzida de forma não canónica na funcionalidade do mecanismo de NMD (Figura 13). Sabemos que a UPF1 é a proteína principal no processo de NMD, como tal se esta estiver silenciada, existe uma inibição de NMD e consequente aumento dos seus alvos naturais na célula. Contrariamente se UPF1 estiver a funcionar devidamente na célula o processo de NMD ocorre sem interferência levando a uma diminuição da concentração dos seus alvos naturais. Nesta experiência o que pretendemos é silenciar a proteína UPF1 endógena e promover a tradução de UPF1 de forma independente de *cap*. Tendo em conta o que foi referido, quando realizamos o KD de UPF1 endógena inibimos o processo de NMD e consequentemente os seus alvos naturais não são degradados. Ao promover a expressão de UPF1 de forma independente de *cap* esperamos que o processo de NMD seja restabelecido e consequentemente os níveis dos seus alvos naturais voltem a diminuir. Assim, conseguimos verificar se o IRES existente na 5'UTR de *UPF1* é eficaz no restabelecimento do mecanismo de NMD.



**Figura 13: Resumo do percurso experimental para verificar a eficiência do local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*) existente na região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*).** Ao realizar o silenciamento da tradução de UPF1 endógena é esperado que os níveis da proteína UPF1 baixem e haja uma inibição do processo de degradação do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) mediado por mutações *nonsense* (NMD do inglês *nonsense-mediated mRNA decay*), consequentemente os mRNA alvo naturais de NMD não são degradados. Para promover a tradução independente de *cap*, devemos silenciar a tradução da UPF1 endógena e promover a tradução não canónica desta proteína. Posteriormente, se UPF1 traduzida de forma independente de *cap* for funcional na célula, esperamos que os níveis dos alvo naturais de NMD baixem.

Para bloquear a expressão da UPF1 endógena, realizamos um KD do mRNA de *UPF1* utilizando siRNA. Para promover a tradução independente de *cap*, transfetamos as células com os mRNA transcritos *in vitro* a partir dos construtos da Figura 7, contendo

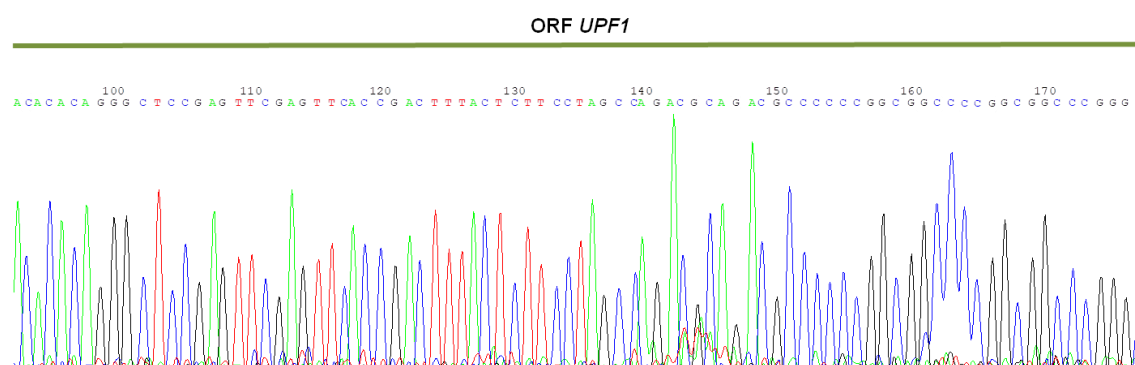
a ORF de *UPF1*, prontos a serem traduzidos pela maquinaria celular. O mRNA transfectado foi transcrito *in vitro* de forma a controlar falsos positivos, adicionando um análogo de *cap* não funcional, não identificado pela maquinaria celular.

Iniciámos o nosso trabalho laboratorial com o estabelecimento de todas as condições experimentais necessárias, nomeadamente, sequenciação das construções plasmídicas existentes, verificação do *tag* Flag e seleção do siRNA mais eficaz no KD de *UPF1* endógeno.

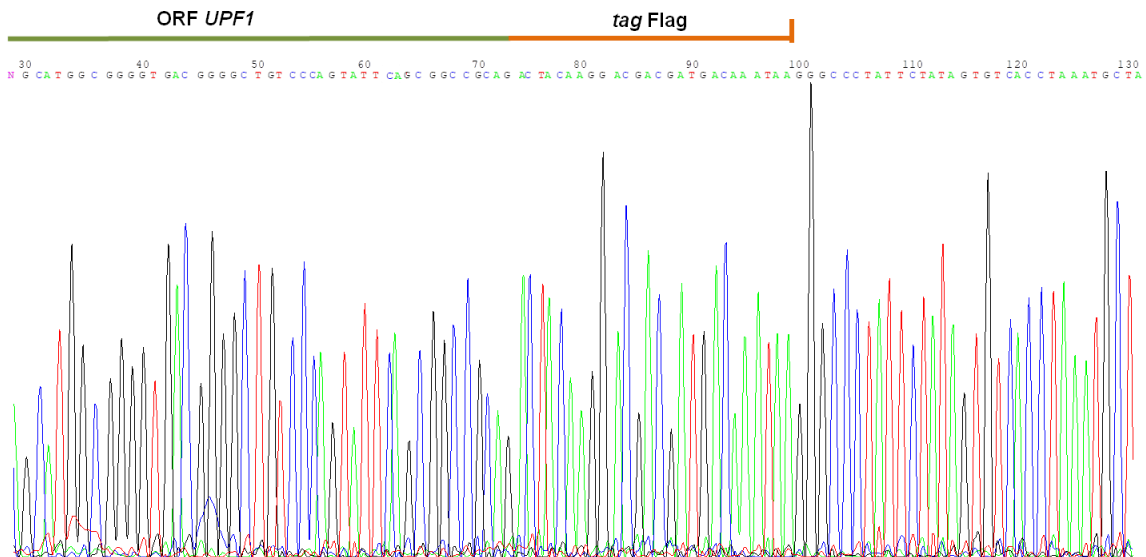
#### 4.2.1 Sequenciação das construções plasmídicas

Sequenciámos as construções plasmídicas, a utilizar *à posteriori*, pela metodologia de sequenciação de Sanger e verificámos a sua integridade.

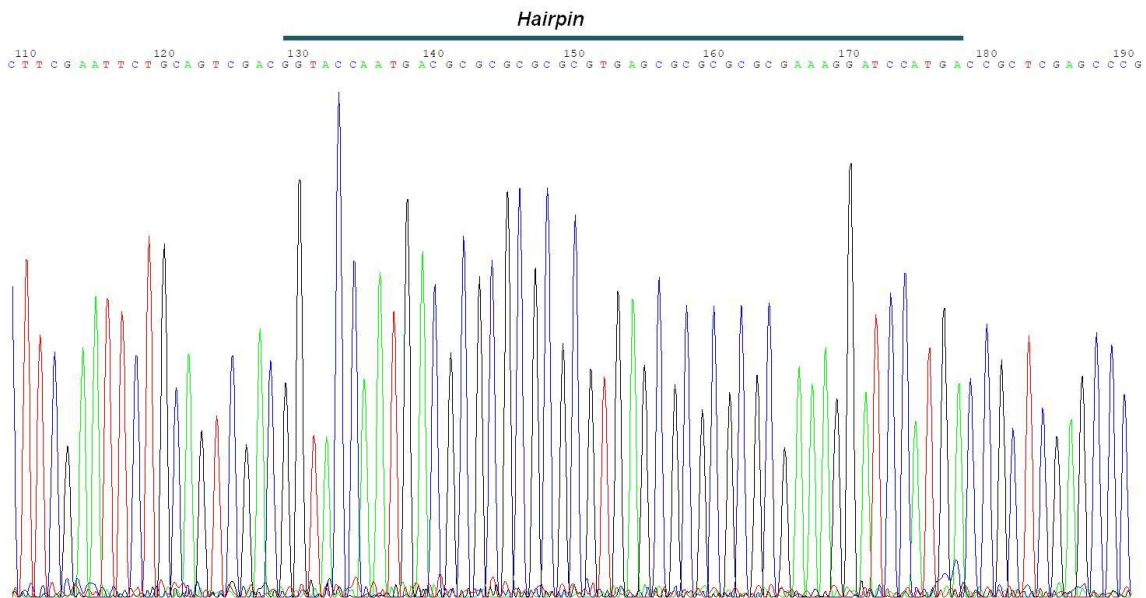
Na metodologia de sequenciação utilizámos os *primers* referidos na tabela 1 e verificámos a integridade e existência de *hairpin*, ORF de *UPF1*, 5'UTR *HBB*, 5'UTR *UPF1* e *tag* Flag, Figura 14 à Figura 21.



**Figura 14: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag com o *primer* #2.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag, representa o plasmídeo monocistrónico que contém a grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene de *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) e a jusante o marcador *tag* Flag clonado em fase com a ORF de *UPF1*. Verificação da integridade de parte da ORF de *UPF1*, representada pela linha verde.

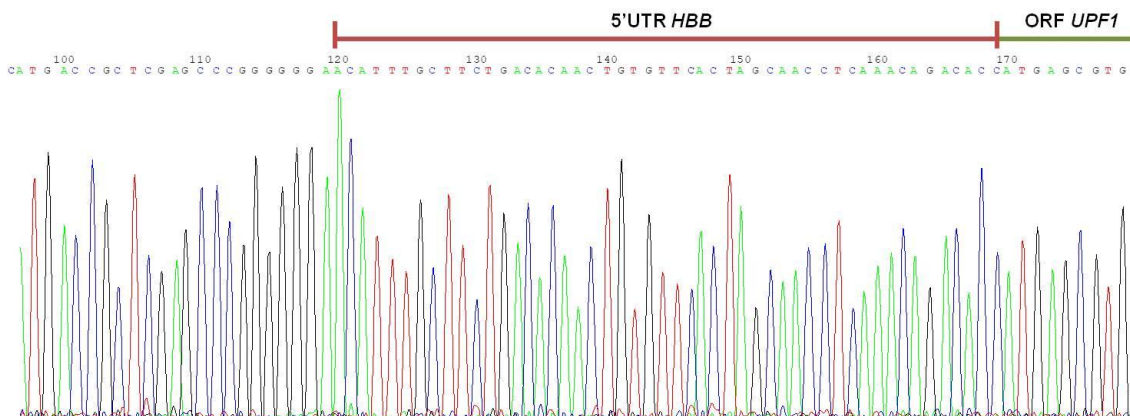


**Figura 15: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag com o *primer* #7.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pcDNA3-NG-UPF1-WT-Flag, representa o plasmídeo monocistrónico que contém a grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene de *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) e a jusante o marcador *tag Flag* clonado em fase com a ORF de *UPF1*. Verificação da transição entre a ORF de *UPF1* e o *tag Flag*. Visualização do *tag Flag* de forma íntegra. O *tag Flag* está representado pela linha cor de laranja terminando a sua sequência com o códon stop (TAA). A linha verde representa a parte final da ORF de *UPF1*.

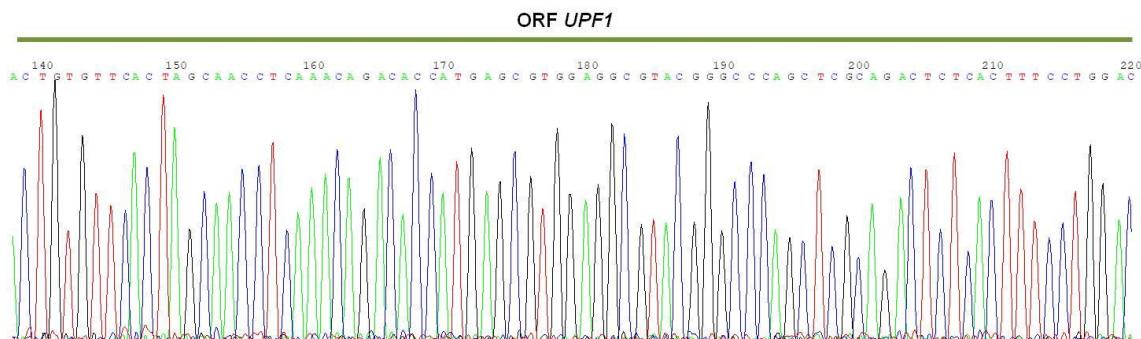


**Figura 16: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag com o *primer* #1.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pH3-HBB-UPF1-Flag, representa o plasmídeo monocistrónico com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene de *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*). O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5'UTR que impede a reiniciação da tradução. Este construto representa o controlo negativo para

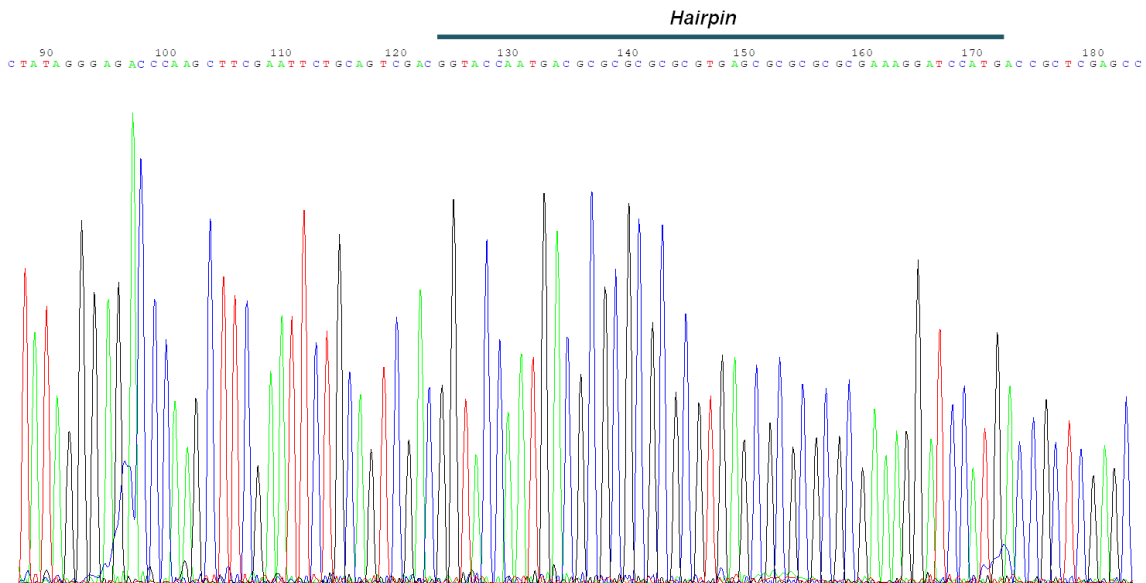
a tradução independente de *cap*. A linha azul na figura representa a estrutura *loop hairpin* formada em torno da sequência TGA visível na posição 152-154.



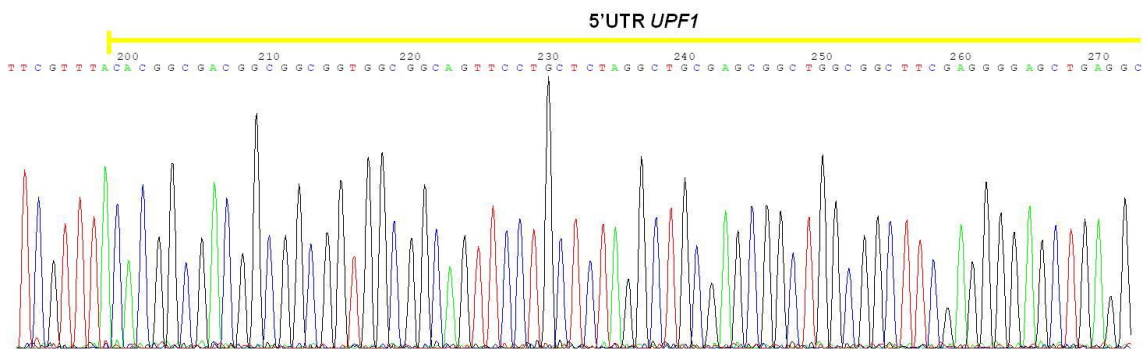
**Figura 17: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag com o *primer* #3.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pH3-HBB-UPF1-Flag, representa o plasmídeo monocistrónico com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene de *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*). O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5'UTR que impede a reiniciação da tradução. Este construto representa o controlo negativo para a tradução independente de *cap*. Verificação da sequência 5'UTR de *HBB*, representada pela linha vermelha (50 nucleótidos) e início da ORF de *UPF1* representada pela linha verde, justaposta à 5'UTR de *HBB*.



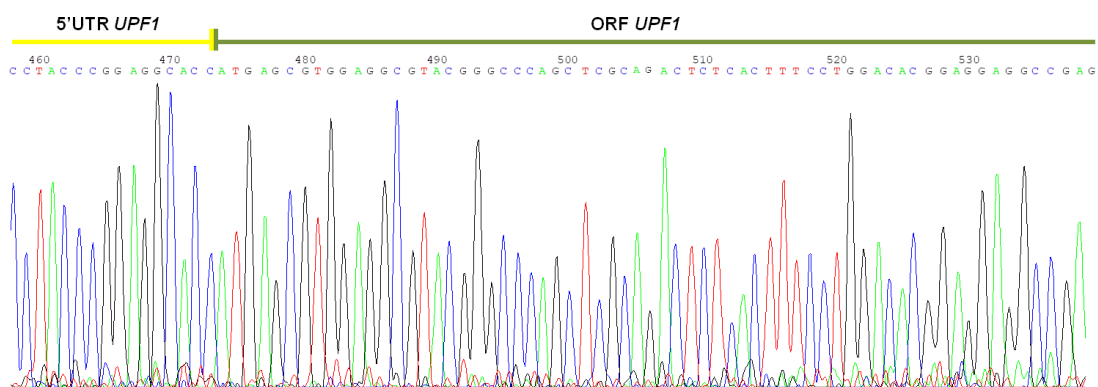
**Figura 18: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag com o *primer* #3.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pH3-HBB-UPF1-Flag, representa o plasmídeo monocistrónico com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene de *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*). O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5'UTR que impede a reiniciação da tradução. Este construto representa o controlo negativo para a tradução independente de *cap*. Verificação de parte da ORF de *UPF1*, representada pela linha verde.



**Figura 19: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag com o *primer* #1.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pH3-UPF1-UPF1-Flag, é um plasmídeo monocistrónico com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene *UPF1*. O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5'UTR que impede a reiniciação da tradução. Este construto é o plasmídeo em estudo para a tradução independente de *cap*. A linha azul na figura representa a estrutura *loop hairpin* formada em torno da sequência TGA visível na posição 147-149.



**Figura 20: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag com o *primer* #3.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pH3-UPF1-UPF1-Flag, é um plasmídeo monocistrónico com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene *UPF1*. O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5'UTR que impede a reiniciação da tradução. Este construto é o plasmídeo em estudo para a tradução independente de *cap*. Verificação do início da 5'UTR de *UPF1* representada pela linha amarela, esta estrutura tem cerca de 276 nucleótidos.



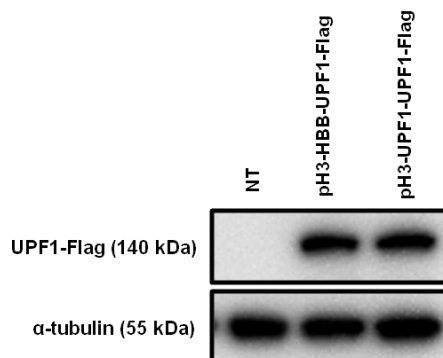
**Figura 21: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag com o *primer* #3.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pH3-UPF1-UPF1-Flag, é um plasmídeo monocistrónico com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene *UPF1*. O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5'UTR que impede a reiniciação da tradução. Este construto é o plasmídeo em estudo para a tradução independente de *cap*. Verificação do fim da 5'UTR de *UPF1* representada pela linha amarela que é seguida do início da ORF de *UPF1*, representada pela linha verde, iniciando a sua sequência com o códon ATG.

#### 4.2.2 Verificação do *tag* Flag por WB

Após verificarmos as sequências dos plasmídeos em estudo, procedemos à verificação da deteção do *tag* Flag pela técnica de WB. No plasmídeo original, o marcador Flag foi clonado em fase com a ORF de *UPF1*, justaposto ao final da mesma antes do seu códon stop. Um códon stop foi adicionado ao final do *tag* Flag, originando, assim, uma proteína de fusão UPF1-Flag. A deteção do *tag* Flag permite-nos detetar a nossa proteína de estudo, UPF1.

Para a realização desta experiência transfetámos 1,5 µg de DNA plasmídico pH3-HBB-UPF1-Flag ou pH3-UPF1-UPF1-Flag em células HeLa. As células foram colhidas 24 h após a transfeção e realizámos um WB, (Figura 22). Como controlo negativo da deteção do *tag* Flag, usámos células que não foram transfetadas, identificadas na Figura 22 com NT (não transfetadas). A verificação do *tag* Flag permite detetar a proteína de fusão UPF1-Flag transfetada nas células e traduzida independente de *cap*. Utilizámos a proteína α-tubulina como controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal.

Em ambos os plasmídeos transfetados, verificámos a existência da proteína de fusão UPF1-Flag através da deteção do *tag* Flag, estes resultados permitem-nos afirmar que, esta proteína está a ser produzida por ambos os plasmídeos transfetados.



**Figura 22: Avaliação da expressão da proteína de fusão *up-frameshift 1* – Flag (UPF1-Flag) em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês *human cervical cancer-derived cell line*).** Foram transfectados os dois plasmídeos em estudo, pH3-HBB-UPF1-Flag e pH3-UPF1-UPF1-Flag. pH3-HBB-UPF1-Flag representa o plasmídeo com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), representando o controlo negativo para a tradução independente de *cap* e pH3-UPF1-UPF1-Flag representa o plasmídeo clonado com 5'UTR de *UPF1*. Ambos os plasmídeos contêm a sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, que impede a reiniciação da tradução, clonada a montante da 5'UTR e contém a ORF de *UPF1* ligada à sequência Flag. O marcador Flag está clonado em fase com a ORF de *UPF1*, a jusante desta. Foram também avaliadas células não transfectadas, identificadas com NT. A deteção da proteína de fusão com 140 kDa foi observada especificamente nas células onde os plasmídeos foram transfectados. Não se observou a deteção da proteína nas células NT. A proteína  $\alpha$ -tubulina (55 kDa) foi detetada uniformemente no WB servindo como controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal.

Apenas o plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag deveria levar à expressão da proteína UPF1-Flag, no entanto a transfeção com o plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag também permitiu a deteção da mesma. Quando construímos o plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag a intenção era que este construto servisse como controlo negativo no nosso estudo, pois a presença do *hairpin* e da 5'UTR de *HBB* em conjunto, serviam como controlo negativo à tradução independente de *cap*.

As estruturas de *hairpin* são frequentemente utilizadas como uma ferramenta de inibição à tradução dependente de *cap* por dissociação das subunidades ribossomais. No entanto, a maquinaria celular conseguiu traduzir a proteína a partir do DNA plasmídico transfectado. A 5'UTR de *HBB* não tem capacidade de ser traduzida de maneira independente de *cap*, sendo traduzida apenas via canónica. A presença da proteína de fusão, UPF1-Flag, indicou-nos que o *hairpin* não estava a funcionar devidamente, permitindo a tradução dependente de *cap*.

Existe um intervalo entre o promotor T7 e a estrutura *hairpin* (47 nucleótidos), bem como entre a estrutura *hairpin* e a 5'UTR de *HBB*. Para que a estrutura *hairpin* seja funcionalmente eficaz é necessário que esta se encontre na extremidade 5' do mRNA, o que não acontece — o intervalo entre a estrutura *cap* e o codão de iniciação (AUG) é superior a 40 nucleótidos e, como tal, segundo a bibliografia estudada, o *hairpin* não

está a ser suficientemente forte para impedir que o ribossoma continue a leitura da 5'UTR permitindo a tradução canónica<sup>85</sup>.

Ao analisar os resultados de WB, verificámos a presença de proteína de fusão UPF1-Flag, quando as células são transfectadas com o construto, pH3-UPF1-UPF1-Flag.

A presença da proteína UPF1-Flag estava relacionada com três acontecimentos distintos: a) a estrutura *hairpin* não estava a funcionar, permitindo a reiniciação da tradução; b) o promotor críptico existente na 5'UTR de *UPF1* estava a originar transcritos com a capacidade de tradução canónica ou c) o IRES presente na 5'UTR de *UPF1* estava a permitir a tradução independente de *cap*<sup>17</sup>.

Tal como no plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag, no plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag existe um intervalo de nucleótidos entre o promotor T7 e a estrutura *hairpin* (47 nucleótidos), bem como entre a estrutura *hairpin* e a 5'UTR de *UPF1* (25 nucleótidos) (*hairpin* - ATG *UPF1* - 300 nucleótidos). A estrutura *hairpin* não está a ser suficientemente forte para impedir que o ribossoma continue a leitura da 5'UTR e consequentemente impedir a tradução canónica em nenhum dos plasmídeos estudados<sup>85</sup>. Para que a estrutura *hairpin* passasse a ser funcional era necessário eliminar o intervalo entre sequências nos plasmídeos.

A deteção da proteína de fusão pode também estar relacionada com o promotor críptico existente na 5'UTR de *UPF1* e com a capacidade deste originar transcritos com a capacidade de tradução canónica, este resultado já estava previsto em trabalhos anteriores desenvolvidos no laboratório. Para contornar esta situação pudemos transfectar as células com mRNA transcrito *in vitro*, eliminando a hipótese da tradução a partir do promotor críptico existente na 5'UTR de *UPF1*.

O ideal seria de facto apenas existir proteína de fusão UPF1-Flag devido à tradução independente de *cap* através do IRES presente na 5'UTR de *UPF1*.

Apesar de todos os resultados apresentados e discutidos, o objetivo da atividade experimental foi conseguido, pois foi possível detetar a nossa proteína em estudo, UPF1 através da deteção do Flag.

#### 4.2.3 Teste da eficiência dos siRNA no silenciamento de UPF1

Com o objetivo de silenciar a tradução de UPF1 endógena, decidiu-se utilizar a técnica de silenciamento com siRNA. A 3'UTR dos construtos transfectados é diferente da 3'UTR de *UPF1* endógeno, como tal, decidimos que este seria o local preferencial de

ancoragem do siRNA afetando apenas *UPF1* endógeno e deixando assim, o mRNA dos construtos transfectados imune ao KD e livres para uma tradução não canónica.

Uma das regras para desenhar siRNA é não atingir as UTR do transcrito, pois existe uma grande diminuição do KD causado pelo siRNA. No entanto, a única sequência que diferenciava o mRNA endógeno dos transcritos transfectados era a 3'UTR, como tal, foram então desenhados dois siRNA para a 3'UTR de *UPF1* endógeno, a fim de silenciar a tradução da proteína, siRNA UPF1 3'UTR 1 e siRNA UPF1 3'UTR 2. A eficácia destes dois siRNA foi testada comparativamente a um siRNA que tem a ORF da *UPF1* como local de ancoragem – siRNA UPF1 AAT.

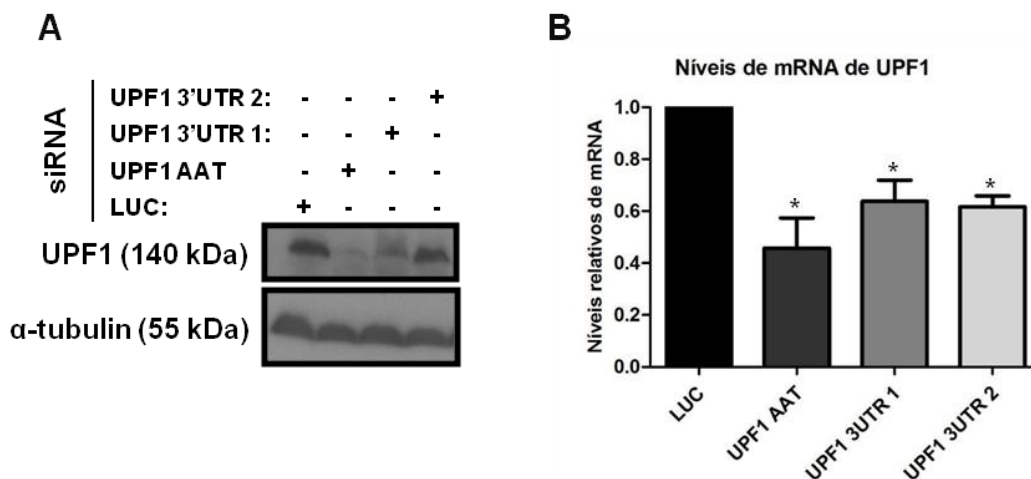
Para verificar a eficácia destes siRNA foi efetuado um ensaio experimental com transfeção de 200 pmol de cada siRNA mencionado anteriormente e, reforço de transfeção, 24 h depois com 50 pmol de cada siRNA. As células foram colhidas 24 h após a transfeção e foi realizado um WB (Figura 23A).

Como controlo negativo de silenciamento da proteína utilizámos as células que apenas foram transfectadas com o siRNA da luciferase, provocando o stress de transfeção mas sem resultado esperado no silenciamento da tradução da proteína em estudo, (siRNA LUC). Como controlo positivo para o silenciamento da tradução proteica de UPF1 temos o siRNA dirigido à ORF da proteína, (siRNA UPF1 AAT). Como controlo do WB utilizámos a deteção da proteína  $\alpha$ -tubulina, sendo considerada um controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal. Foram realizadas três experiências independentes em células HeLa.

Através da análise do WB conseguimos verificar que dos siRNA desenhados para a 3'UTR de *UPF1*, o que apresenta um silenciamento mais eficaz, ou seja mais concordante com o silenciamento da proteína pelo siRNA UPF1 AAT é o siRNA UPF1 3'UTR 1. Em contrapartida, o siRNA UPF1 3'UTR 2 apresenta resultados mais concordantes com o nosso controlo negativo, siRNA LUC, existindo um silenciamento menos eficiente. A deteção da proteína  $\alpha$ -tubulina indica-nos a quantidade de proteína aplicada no gel, e serve também como controlo interno à técnica de deteção.

Para confirmar a eficácia e a especificidade dos siRNA, procedemos à análise do mRNA de *UPF1* por RT-qPCR. Para tal, extraímos RNA total do restante das amostras utilizadas na experiência da Figura 23A, sintetizámos cDNA e procedemos ao RT-qPCR utilizando *primers* específicos para *UPF1* e *GAPDH* (controlo interno). Os níveis de mRNA de *UPF1* foram normalizados aos níveis de *GAPDH* e posteriormente comparados com os níveis em que não houve silenciamento de *UPF1*

(LUC, controlo), representado com níveis relativos de mRNA igual a 1. Como observado no gráfico da Figura 23B, os níveis relativos de mRNA de *UPF1* com o silenciamento de siRNA *UPF1* AAT tiveram uma redução de 60%, enquanto que os siRNA para a 3'UTR 1 e 2, tiveram uma redução de aproximadamente 40% nos níveis de mRNA detetados.



**Figura 23: Avaliação da expressão da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), e dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) de *UPF1* após silenciamento com ácido ribonucleico de interferência (siRNA do inglês *small interfering RNA*) em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês *human cervical cancer-derived cell line*). **A** - Avaliação da expressão da proteína UPF1 endógena, após silenciamento com siRNA em células HeLa por Western blot (WB) para deteção da proteína UPF1 (140 kDa) após silenciamento da mesma com siRNA dirigidos à 3'UTR ou à ORF de *UPF1*. Para silenciamento de UPF1 foram utilizados 3 siRNA: dois siRNAs dirigidos à 3'UTR, designados de siRNA UPF1 3'UTR 1 e siRNA UPF1 3'UTR 2 (siRNA a testar) e um siRNA dirigido à ORF, designado por siRNA AAT, servindo como controlo positivo ao silenciamento de UPF1. Foi utilizado um siRNA da LUC servindo como controlo negativo. A deteção da proteína  $\alpha$ -tubulina (55 kDa) no WB serve como controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal na técnica de WB. A presença ou ausência do siRNA transfectedado é identificada na figura pelos sinais + (presença) e - (ausência). **B** - Análise dos níveis de mRNA de *UPF1* endógena após silenciamento com siRNA em células HeLa através da técnica de PCR em tempo real utilizando a transcriptase reversa (RT-qPCR). Analise os níveis de mRNA de *UPF1* existentes após o silenciamento da proteína com o siRNA correspondente. No eixo das abcissas temos representados os diferentes siRNA utilizados: siRNA LUC (controlo negativo), siRNA UPF1 AAT (siRNA dirigido à ORF de *UPF1*, serve como controlo positivo ao silenciamento de *UPF1*), siRNA UPF1 3UTR 1 e siRNA UPF1 3UTR 2 (siRNA dirigidos à 3'UTR de *UPF1*). No eixo das coordenadas temos representado os níveis relativos de mRNA de *UPF1*, onde o máximo está representado por 1.0. O \* representa os resultados estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$ .**

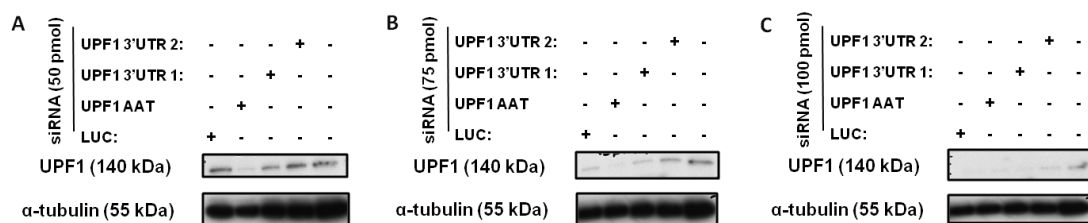
Como esperávamos, os siRNA desenhados para o mRNA de *UPF1* fizeram diminuir o nível de mRNA de *UPF1*. Os níveis de mRNA de *UPF1* após KD com o siRNA dirigido à região codificante de *UPF1* são menores, ou seja o siRNA é mais eficaz, do que com o KD com siRNA dirigido à 3'UTR, tal como esperávamos<sup>86</sup>. Em relação aos siRNA dirigidos à 3'UTR, estes apresentaram uma eficiência de KD semelhante quando observamos os níveis de mRNA de *UPF1*. Tendo em conta o que referimos

anteriormente e os níveis proteicos de UPF1 apresentados por WB, decidimos utilizar o siRNA UPF1 3'UTR 1.

Após escolha do siRNA mais adequado, verificámos qual o reforço de siRNA mais eficaz no silenciamento de *UPF1*, tendo em conta que o pretendíamos era o máximo de silenciamento possível de *UPF1* endógeno e o mínimo de morte celular.

Nos mesmos termos da atividade experimental anterior, transfetámos células HeLa e realizamos uma experiência onde testámos 3 reforços diferentes de siRNA: 50 pmol, 75 pmol e 100 pmol.

Ao observarmos os resultados da técnica de WB representados na Figura 24, verificámos, que tendo em conta a morte celular provocada pelo stress induzido nas células com a transfeção, visível através dos níveis de proteína existentes com o silenciamento de siRNA LUC, o siRNA UPF1 3'UTR 1 com o reforço de 75 pmol é a condição de silenciamento que apresenta melhores resultados de KD.



**Figura 24: Avaliação da expressão da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*) endógena, após silenciamento com ácido ribonucleico de interferência (siRNA do inglês *small interfering RNA*) com diferentes reforços em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês *human cervical cancer-derived cell line*). A – reforço com 50 pmol de siRNA, B – reforço com 75 pmol de siRNA; C - reforço com 100 pmol de siRNA. Western blot para deteção da proteína UPF1 (140 kDa) após silenciamento da mesma com siRNA dirigidos à 3'UTR e à ORF de *UPF1*. Para silenciamento de UPF1 foram utilizados 3 siRNA: dois siRNA dirigidos à 3'UTR de *UPF1*, designados de siRNA UPF1 3'UTR 1 e siRNA UPF1 3'UTR 2 e um siRNA dirigido à ORF, designado por siRNA AAT, servindo como controlo positivo ao silenciamento de *UPF1*. Foi utilizado um siRNA da LUC servindo como controlo negativo. A transfeção celular foi realizada com 200 pmol de siRNA e o reforço de silenciamento com 50 pmol, 75 pmol ou 100 pmol do correspondente siRNA. A deteção da proteína  $\alpha$ -tubulina (55 kDa) no WB serve como controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal. A presença ou ausência do siRNA transfectado é identificada na figura pelos sinais + (presença) e – (ausência).**

A transfeção celular de siRNA requer a utilização de um reagente de transfeção, neste caso, utilizámos, Lipofectamine 2000. A administração destes componentes nas células pode causar morte celular, tendo em conta a concentração de ambos e o tempo de exposição das células aos mesmos <sup>87</sup>.

Nas células transfetadas com o siRNA LUC, nos reforços de 50 pmol e 75 pmol, o stress provocado nas células com a transfeção não é significativo relativamente à morte celular, no entanto, quando as células são transfetadas com o reforço de 100

pmol de siRNA, a morte celular já é evidente, sendo comprovada pelos baixos níveis de expressão de  $\alpha$ -tubulina. Como esperávamos o silenciamento com o siRNA UPF1 AAT é bastante eficaz com todos os reforços utilizados. Comparando este silenciamento com o silenciamento do siRNA UPF1 3'UTR 1, este último apresenta melhores resultados com o reforço de 75 pmol tendo em conta o silenciamento da proteína.

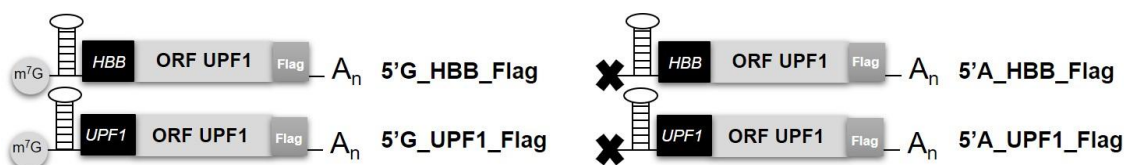
Após analisarmos tudo o que foi descrito anteriormente, resolvemos utilizar siRNA UPF1 3'UTR 1 com reforço de 75 pmol. Este siRNA apresenta os melhores resultados tendo em conta a eficácia do silenciamento da proteína endógena e reduzida morte celular provocada pelo stress de transfeção.

### **4.3 Relevância biológica do IRES presente na 5'UTR de *UPF1* no processo de NMD**

Após estabelecer as condições experimentais, iniciámos as experiências para perceber o papel da tradução independente de *cap* de UPF1 no processo de NMD. Para realizar esta experiência, procedemos ao KD de UPF1 endógena, como descrito no subcapítulo 4.2.3 Teste da eficiência dos siRNA no silenciamento de *UPF1*, sobre-expressámos o mRNA de *UPF1* utilizando os transcritos da Figura 25 e detetámos os níveis de *GADD45A*, alvo natural do NMD<sup>88</sup>, por RT-qPCR. Os resultados podem ser observados na Figura 26.

Como referimos inicialmente, foi descrito que existe um promotor críptico na 5'UTR de *UPF1*<sup>17</sup>, como tal, para realizarmos a atividade experimental que permite verificar a funcionalidade de UPF1 traduzida de forma independente de *cap* no processo de NMD, utilizámos mRNA traduzidos *in vitro* com dois *cap* diferentes. O *cap* m<sup>7</sup>G (5')ppp(5')G, estrutura funcional análoga ao *cap* celular, naturalmente reconhecida pela maquinaria celular, nomeadamente maquinaria de tradução eucariótica e o *cap* G(5')ppp(5')A, estrutura não funcional, que não é reconhecida pela maquinaria celular, para existir proteína como produto final é necessário que ocorra uma tradução independente de *cap*.

Após obtenção dos transcritos a utilizar nas experiências (Figura 25) e com as condições de silenciamento de UPF1 endógena definidas, procedemos à atividade experimental realizando três experiências independentes em células HeLa.



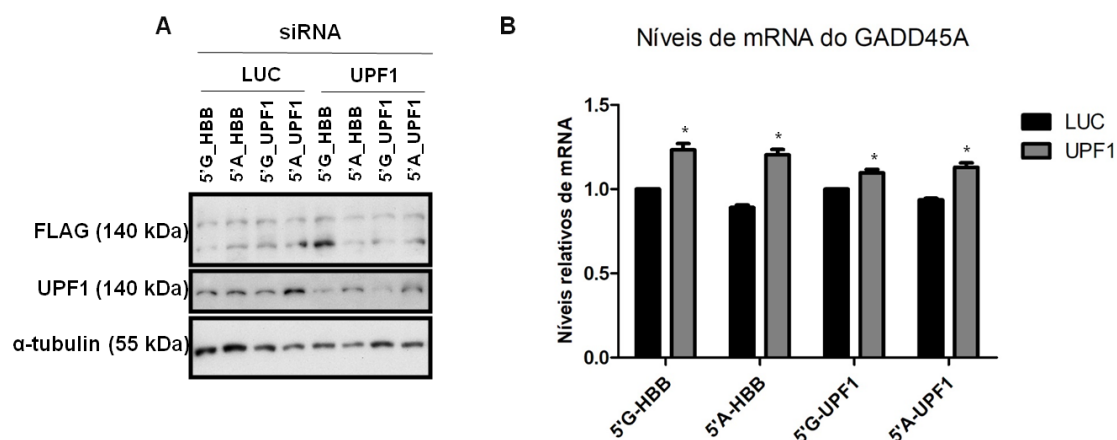
**Figura 25: Transcritos obtidos *in vitro* a partir dos plasmídeos pH3-UPF1-UPF1-Flag e pH3-HBB-UPF1-Flag.** De cada plasmídeo obtivemos dois transcritos que diferem no *cap*, ou seja do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag, obtivemos o transcritos 5'G\_HBB\_Flag e o 5'A\_HBB\_Flag; do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag, obtivemos o transcritos 5'G\_UPF1\_Flag e o 5'A\_UPF1\_Flag. Os ácidos ribonucleicos mensageiro (mRNA do inglês *messenger ribonucleic acid*) 5'G\_HBB\_Flag e 5'G\_UPF1\_Flag, apresentam no início do transcrito o *cap* canônico representado pela estrutura circular a cinzento claro (m<sup>7</sup>G do inglês *7-methylguanosine*). Os mRNA 5'A\_HBB\_Flag e o 5'A\_UPF1\_Flag apresentam no início do transcrito um *cap* análogo não funcional ao *cap* canônico, estando representado por um X a preto e impedindo a tradução canônica. Todos os transcritos apresentam a grelha de leitura aberta (ORF inglês *open reading frame*) da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), representada por uma caixa cinzenta clara com "ORF UPF1" a preto; A ORF de *UPF1* está ligada à sequência Flag, está representado com uma caixa cinzenta com "Flag" branco. O marcador Flag está clonado em fase com a ORF da *UPF1*, a jusante desta. Os quatro mRNA apresentam um *hairpin*, a montante da respetiva região 5'transcrita não traduzida (UTR do inglês *untranslated region*), esta estrutura estável visa impedir a reiniciação da tradução. A caixa negra representa as 5'UTR clonadas nos plasmídeos a montante da ORF de *UPF1*. Estão representadas, duas 5'UTR diferentes, os construtos com a 5'UTR da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*) funcionam como controlos negativos, visto esta estrutura não ter a capacidade de promover a tradução não canónica, em contrapartida os transcritos com a 5'UTR de *UPF1* têm a capacidade de promover a tradução independente de *cap*, pois esta região apresenta um local interno de entrada de ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*).

Realizámos um WB para avaliar a eficiência do KD de UPF1 endógena e a expressão de UPF1 traduzida de forma independente de *cap*, (Figura 26A).

Por WB avaliámos a eficiência do KD de UPF1 e a sobre expressão da proteína traduzida de forma não canónica, através da deteção da proteína de fusão UPF1-Flag com o anticorpo anti-Flag. Detetámos a proteína de fusão UPF1-Flag em todas as amostras analisadas, inclusive nos controlos negativos, ou seja, em células transfetadas com mRNA que tinham a 5'UTR de *HBB* (traduzido apenas de forma canónica) quer com *cap* G, quer com *cap* A. O KD de UPF1 funcionou de maneira eficiente, uma vez que vemos uma maior expressão da proteína UPF1 (quatro primeiras colunas) nas amostras em que usámos o siRNA contra a LUC quando comparado com as amostras seguintes tratadas com o siRNA UPF1 3'UTR 1, Figura 26A.

Posteriormente, verificámos o impacto do IRES presente na 5'UTR de *UPF1* no processo de NMD através da avaliação dos níveis de expressão do mRNA de *GADD45A*, que é um alvo natural do NMD<sup>88</sup>. Os níveis relativos de expressão do mRNA de *GADD45A* foram menores com o KD da LUC quando comparados com os observados em condições de KD de UPF1, como era esperado, uma vez que este é um alvo natural do NMD<sup>88,89</sup>. No entanto, quando comparamos as amostras que

tiveram o KD de UPF1 entre si, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre as que foram transfectadas com mRNA com a 5'UTR de *HBB* e com a 5'UTR de *UPF1*, Figura 26B.



**Figura 26: Avaliação da proteína *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), traduzida através do local interno de entrada do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry site*).** Todos os transcritos apresentam a grelha de leitura aberta (ORF inglês *open reading frame*) da proteína UPF1 ligada à sequência Flag clonada em fase e a jusante desta. Os quatro mRNA apresentam um *hairpin* a montante da respetiva região 5' transcrita não traduzida (UTR do inglês *untranslated region*), esta estrutura estável visa impedir a reiniciação da tradução. Os transcritos apresentam duas 5'UTR diferentes, clonadas nos plasmídeos a montante da ORF de UPF1. Os transcritos 5'A\_HBB\_Flag e 5'G\_HBB\_Flag apresentam a 5'UTR da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), que funciona como controlo negativo, visto esta estrutura não ter a capacidade de promover a tradução não canónica. Em contrapartida os transcritos 5'G\_UPF1\_Flag e 5'A\_UPF1\_Flag apresentam a 5'UTR de UPF1 e têm a capacidade de promover a tradução independente de *cap*, devido ao IRES existente nesta região. Os transcritos 5'G apresentam um *cap* funcional na extremidade 5' reconhecido pela maquinaria celular. Os transcritos 5'A apresentam um análogo ao *cap* funcional na extremidade 5' não reconhecido pela maquinaria celular, impedindo a tradução canónica. As experiências foram realizadas em células derivadas de uma linha celular de cancro cervical humano (HeLa do inglês *human cervical cancer-derived cell line*). **A** - Western blot (WB) para avaliação da expressão da proteína UPF1 (140 kDa) após silenciamento com ácido ribonucleico de interferência (siRNA do inglês *small interfering RNA*) UPF1 3'UTR 1 (200 pmol +75 pmol de reforço) e deteção da proteína de fusão UPF1-Flag (140 kDa). Foram transfectados os quatro transcritos de mRNA realizados *in vitro*: 5'G\_UPF1\_Flag, 5'A\_UPF1\_Flag, 5'G\_HBB\_Flag, 5'A\_HBB\_Flag. Os transcritos estão representados pelo tipo de *cap* e pela 5'UTR utilizada. Para além do siRNA mencionado anteriormente, foi também utilizado o siRNA LUC, nas mesmas condições que o siRNA UPF1 3'UTR 1, servindo como controlo negativo ao silenciamento de UPF1. A deteção da proteína  $\alpha$ -tubulina (55 kDa) no WB serve como controlo interno da quantidade de proteína analisada em cada canal. **B** - Análise dos níveis de mRNA de GADD45A, alvo natural de NMD após silenciamento com siRNA UPF1 3'UTR 1 ou siRNA LUC (200 pmol +75 pmol de reforço) e transfeção com um dos transcritos referidos na Figura 25. No eixo das abcissas estão representados os transcritos transfectados: 5'G-HBB, 5'A-HBB, ambos controlos negativos; 5'G-UPF1 e 5'A-UPF1. No eixo das coordenadas estão representados os níveis relativos de mRNA de GADD45A. As barras pretas representam o silenciamento realizado com o siRNA LUC e as cinzentas o silenciamento com o siRNA UPF1 3'UTR 1. O \* representa os resultados que não são estatisticamente significativos com  $p < 0,05$ .

Estes resultados podem ser explicados pela possibilidade dos mRNA transfectados estarem degradados quando transfectados. Outra possibilidade é o facto do *hairpin* e/ou *cap* A não serem suficientes para impedir a tradução pela via canónica<sup>90-92</sup>.

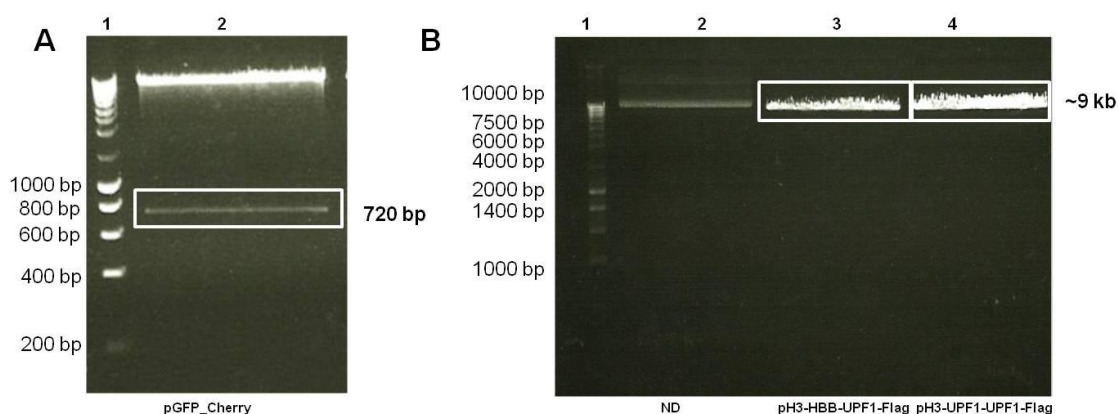
## 4.4 Construção do plasmídeo dicistrónico

Com o intuito de ultrapassar os problemas com a tradução dependente de *cap* descritos no subcapítulo anterior, decidimos construir um plasmídeo dicistrónico, em que o primeiro cistão (*GFP*) é traduzido de forma canónica (dependente de *cap*) e a ORF de *UPF1* é traduzida de forma não canónica (independente de *cap*). A 5'UTR de *HBB* foi usada como controlo negativo, estando localizada a montante da ORF de *UPF1*, Figura 8.

Digerimos os plasmídeos com a enzima de restrição *HindIII* e verificámos o resultado desta digestão enzimática através da corrida de um gel de agarose 1,5%, Figura 27. Após purificação e quantificação das bandas obtidas, os fragmentos foram ligados numa proporção de 7:1 (inserto:vetor) com a enzima T4 ligase. As células competentes *E. coli* NZY5 $\alpha$  (NZYTech) foram transformadas com as ligações acima mencionadas e foram cultivadas em placas de ágar LB, posteriormente foram selecionadas 4 colónias de cada placa e o DNA plasmídico foi extraído. Através de uma nova digestão enzimática com a enzima *HindIII* e corrida em gel de agarose de 1,5%, foi possível verificar quais as colónias que possuíam o cistão *GFP* (banda com ~720bp), Figura 28. As colónias HBB #4, UPF1 #1 e UPF1 #4, após digestão enzimática, apresentavam o cistão *GFP*. O DNA plasmídico dessas colónias foi sequenciado,

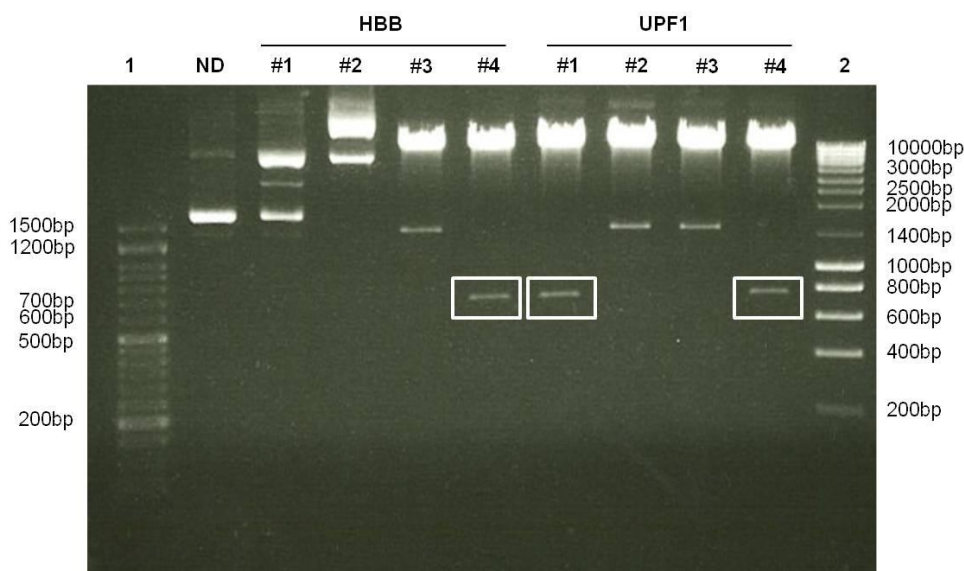
Figura 29), e os plasmídeos resultantes da clonagem foram designados pGFP-H3-HBB-UPF1-Flag e pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag.

C



**Figura 27: Verificação dos produtos resultantes da digestão enzimática com a enzima *HindIII*.** A – Verificação da digestão enzimática do plasmídeo pGFP\_Cherry, que contém a grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) da proteína verde fluorescente (GFP do inglês *green fluorescent protein*) com a enzima *HindIII*. Corrida em gel de agarose 1,5%, em que o canal 1 apresenta o marcador de peso molecular de DNA VI, NZYLadder VI (NZYTech). O marcador de peso molecular permite verificar o tamanho da banda apresentada em par de bases (bp do inglês *base pair*). O canal 2 representa o

produto linear da digestão enzimática do plasmídeo pGFP\_Cherry com a enzima *HindIII*, em que a banda assinalada com 720 bp, com uma caixa branca, representa o cistrão *GFP*. **B** – Linearização dos plasmídeos pH3-HBB-UPF1-Flag e pH3-UPF1-UPF1-Flag com a enzima *HindIII*. pH3-HBB-UPF1-Flag representa o plasmídeo com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), representando o controlo negativo para a tradução independente de *cap* e pH3-UPF1-UPF1-Flag representa o plasmídeo clonado com 5'UTR de *UPF1*. A ORF de *UPF1* é comum aos dois plasmídeos ligada à sequência Flag. O marcador Flag está clonado em fase com a ORF da *UPF1*, a jusante desta. Ambos os plasmídeos contêm a sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, que impede a reiniciação da tradução, clonada a montante da respetiva 5'UTR. Corrida em gel de agarose 1.5% em que o canal 1 apresenta o marcador de peso molecular de DNA III, NZYLadderIII (NZYTech). O marcador de peso molecular permite verificar o tamanho da banda apresentada em bp; O canal 2, apresenta um plasmídeo não digerido (ND), funcionando como controlo à digestão enzimática; o canal 3 apresenta a digestão enzimática por *HindIII* do plasmídeo pH3-HBB-UPF1-Flag, verificando a existência de uma banda com aproximadamente 9 kb, indicativa da linearização do mesmo e o canal 4 representa a digestão enzimática por *HindIII* do plasmídeo pH3-UPF1-UPF1-Flag, verificando a linearização do mesmo pela presença de uma banda com aproximadamente 9kb.



**Figura 28: Verificação da presença da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) da proteína verde fluorescente (GFP do inglês *green fluorescent protein*) nas colónias de bactérias *E. coli* transformadas com a ligação dos plasmídeos pH3-HBB-UPF1-Flag + GFP ou pH3-UPF1-UPF1-Flag + GFP.** pH3-HBB-UPF1-Flag representa o plasmídeo com a região 5' transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da beta-globina humana (HBB do inglês *human beta-globin*), representando o controlo negativo para a tradução independente de *cap* e pH3-UPF1-UPF1-Flag representa o plasmídeo clonado com 5'UTR de *UPF1*. A ORF de *UPF1* é comum aos dois plasmídeos ligada à sequência Flag. O marcador Flag está clonado em fase com a ORF da *UPF1*, a jusante desta. Ambos os plasmídeos contêm a sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, que impede a reiniciação da tradução, clonada a montante da respetiva 5'UTR. Verificação dos produtos resultantes da digestão enzimática com a enzima *HindIII*, através da corrida em gel de agarose de 1,5% em que o canal 1 apresenta o marcador de peso molecular de DNA VI, NZYLadderVI (NZYTech) e o canal 2 representa o marcador de peso molecular de DNA III, NZYLadderIII (NZYTech). Ambos os marcadores de peso molecular permitem verificar o tamanho da banda apresentada em par de bases (bp do inglês *base pair*). O canal identificado com ND apresenta um plasmídeo não digerido funcionando como controlo negativo à técnica utilizada. Foram analisadas 4 colónias da ligação pH3-HBB-UPF1-Flag + GFP, representadas por HBB (#1,#2, #3 e #4) e 4 colónias da ligação pH3-UPF1-UPF1-Flag + GFP, representadas por UPF1 ((#1,#2, #3 e #4). Das 8 colónias analisadas apenas três apresentam a banda do cistrão de *GFP*, com aproximadamente 720 pb a colónia #4 HBB, a #1 UPF1 e a #4 UPF1, identificadas com uma caixa branca.



**Figura 29: Cromatograma da sequenciação do plasmídeo pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag com o *primer* #3.** Cada pico colorido do cromatograma representa um nucleótido diferente, verde representa adenina (A), azul representa citosina (C), vermelho representa timidina (T) e preto representa guanina (G). A letra “N” rosa representa os nucleótidos que a técnica não teve capacidade de definir. A numeração existente na figura representa a posição dos nucleótidos na sequenciação. pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag, é um plasmídeo dicistrónico com a região 5’ transcrita não-traduzida (UTR do inglês *untranslated region*) da *up-frameshift 1* (UPF1 do inglês *up-frameshift 1*), clonada a montante da grelha de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) do gene *UPF1*. O plasmídeo contém um marcador Flag, clonado em fase e a jusante da ORF de *UPF1* e uma sequência de um *hairpin* (estrutura secundária formada no mRNA) estável, clonada a montante da respetiva 5’UTR que impede a reiniciação da tradução. A montante da estrutura *hairpin* foi clonado a ORF da proteína fluorescente verde (GFP do inglês *green fluorescent protein*), traduzido de forma dependente da estrutura *cap*. A linha azul na figura representa a estrutura *loop hairpin* formada em torno da sequência TGA visível na posição 331-333. A linha roxa representa o fim da sequência da ORF de *GFP*.

Estes construtos dicistrónicos serão utilizados para repetir a experiência referida no capítulo 4.3 desta dissertação, procedendo ao KD de UPF1 endógena (com o siRNA UPF1 3’UTR 1) e sobre expressando o mRNA de *UPF1* utilizando os transcritos obtidos a partir dos construtos dicistrónicos da Figura 8, com a finalidade de detetar os níveis de *GADD45A*, por RT-qPCR.

No caso da tradução independente de *cap* possuir um papel no mecanismo de NMD, esperaríamos que os níveis de mRNA do *GADD45A* fossem menores nas células transfetadas com mRNA transcrito *in vitro* a partir do plasmídeo pGFP-H3-UPF1-UPF1-Flag comparado com os níveis de mRNA do *GADD45A* em células transfetadas com pGFP-H3-HBB-UPF1-Flag, ambas tratadas com o siRNA UPF1 3’UTR 1.

## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras

---

Através do desenvolvimento deste trabalho laboratorial, conseguimos estabelecer todas as condições experimentais necessárias para o sucesso da atividade experimental major, onde se pretende verificar a importância biológica do IRES existente na 5'UTR de *UPF1*.

A integridade dos plasmídeos necessários ao estudo foi avaliada através da sequenciação de *Sanger*, onde foi verificada a existência e integridade de todos os plasmídeos utilizados.

Foi verificado que o *Flag-tag* dos plasmídeos, estaria a funcionar devidamente pois a proteína de fusão UPF1-Flag foi facilmente detetada por WB quando os plasmídeos foram transfectados em células HeLa.

Para o sucesso deste projeto foi fundamental conseguir um KD de *UPF1* endógeno. Este KD foi conseguido através da utilização de siRNA. Após o teste de 2 siRNA, foi escolhido o que conseguia um KD mais eficaz – siRNA UPF1 3'UTR 1. Os silenciamentos provocados pelos siRNA em estudo foram comparados com o silenciamento de um siRNA dirigido à ORF de *UPF1* (siRNA UPF1 AAT) e o siRNA escolhido foi o que apresentava resultados mais semelhantes com o último. O reforço do silenciamento de *UPF1* com o siRNA também foi testado, encontrando a melhor relação entre KD e morte celular quando se realizou o reforço do KD com 75 pmol de siRNA.

Com o silenciamento de *UPF1* endógeno conseguido e utilizando os mRNA transcritos *in vitro* a partir dos plasmídeos pH3-HBB-UPF1-Flag e pH3-UPF1-UPF1-Flag, transfectados em células HeLa, testámos qual a funcionalidade da proteína UPF1 traduzida de forma independente de *cap* no processo de NMD. UPF1 é a proteína principal no funcionamento deste processo de degradação de mRNA<sup>30,33,42</sup>. Foram analisados os resultados obtidos por WB e por RT-qPCR. No WB foram detetadas as proteínas UPF1 e a proteína de fusão UPF1-Flag e por RT-qPCR, foram detetados os níveis de mRNA do gene *GADD45A*, alvo natural de NMD. Verificámos com esta experiência que o KD de UPF1 foi eficaz, no entanto, infelizmente, não conseguimos obter os resultados esperados no RT-qPCR, pois não existiram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão do mRNA de *GADD45A* em células que expressam UPF1 sob o 5'UTR de *HBB* (controlo negativo para tradução não canónica) *versus* os níveis de expressão de *GADD45A* em células que expressam

UPF1 sob o efeito do seu próprio 5'UTR. Assim sendo, e tentando ultrapassar esta dificuldade, decidimos realizar um plasmídeo dicistrónico, onde o cistrão adicionado aos plasmídeos já existentes foi o *GFP*. A utilização deste plasmídeo vai permitir obter níveis de proteína UPF1 traduzida de forma não canónica e consequentemente analisar qual a sua função no NMD.

Apesar dos objetivos propostos inicialmente não terem sido cumpridos, estão reunidas as condições laboratoriais para conseguir atingir o objetivo major da tese de mestrado.

Como perspetivas futuras, será importante repetir a experiência onde foi testada qual a funcionalidade da proteína UPF1 traduzida de forma independente de *cap* em NMD, utilizando os plasmídeos dicistrónicos e planear uma nova experiência para verificar o impacto de UPF1 traduzida via não canónica no ciclo celular.

Sabemos que UPF1 é considerada um potencial supressor de tumor, pois regula negativamente a proliferação de células malignas <sup>29,74</sup> encontrando-se em défice em vários tipos de cancro <sup>29,33,76</sup>. A tradução mediada por IRES é preferencial em condições de stress onde o ambiente celular é desfavorável como é o caso de patologias isquémicas e cancro <sup>78</sup>.

Concluindo, tendo em conta a importância de UPF1 na regulação da expressão génica e sabendo que existe um IRES na sua 5'UTR, a estimulação controlada do início da tradução não canónica da mesma deve ser estudada pois, este mecanismo, pode ser bastante útil para desenvolver novas terapias no combate ao cancro <sup>17</sup>.

## 6. Bibliografia

---

1. Martins, E. & Maciel Filho, P. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. *Rev. da Biol.* **4**, 1–5 (2010).
2. Orphanides, G. & Reinberg, D. A Unified Theory of Gene Expression. *Cell* **108**, 439–451 (2002).
3. Marques-Ramos, A. *et al.* Cap-independent translation ensures mTOR expression and function upon protein synthesis inhibition. *Rna* **23**, 1712–1728 (2017).
4. Silvera, D. *et al.* Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 254–66 (2010).
5. Regateiro, F. Manual de Genética Médica. *Imprensa da Universidade de Coimbra* **1ª Edição** (2003).
6. Luna, R. & Gaillard, H. Biogenesis of mRNPs : integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma* **117**, 319–331 (2008).
7. Fickett, J. W. & Hatzigeorgiou, A. G. Eukaryotic Promoter Recognition. *Genome Reserch* **7**, 861–878 (1997).
8. Richard, P. & Manley, J. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & Development* **23**, 1247–1269 (2009).
9. Proudfoot, N. *et al.* Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* **108**, 501–512 (2002).
10. Hocine, S. *et al.* RNA Processing and Export. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, 1–20 (2010).
11. Shi, Y. & Manley, J. The end of the message : multiple protein – RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes & Development* **29**, 889–897 (2015).
12. Iglesias, N. & Stutz, F. Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Letters* **582**, 1987–1996 (2008).
13. Kapur, M. *et al.* Regulation of mRNA Translation in Neurons—A Matter of Life and Death. *Neuron* **96**, 616–637 (2018).

14. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**, 731–745 (2009).
15. Preiss, T. & Hentze, M. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays* **25**, 1201–1211 (2003).
16. Ramakrishnan, V. *et al.* Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* **108**, 557–572 (2002).
17. Lacerda, R. Non-canonical translation initiation of proteins with potential relevance in colorectal cancer. (Universidade Nova de Lisboa, 2016).
18. Gebauer, F. & Hentze, M. W. Molecular mechanisms of translation control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 827-835 (2004).
19. Haimov, O. *et al.* Cap-dependent, scanning-free translation initiation mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 1313-1318 (2015).
20. Aitken, C. & Lorsch, J. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & Molecular biology* **19**, 568-576 (2012).
21. Kapp, L. & Lorsch, J. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**, 657–704 (2004).
22. Andreou, A. *et al.* eIF4B stimulates eIF4A ATPase and unwinding activities by direct interaction through its 7- repeats region. *RNA biology* **14**, 113-123, (2017).
23. Korostelev, A. A Deeper Look into Translation Initiation. *Cell* **159**, 475–476 (2014).
24. Browning, K. & Bailey-Serres, J. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *Arab. B.* **13**, 1-39 (2015).
25. Dever, T. & Green, R. Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**, 1–16 (2012).
26. Salas-marco, J. & Bedwell, D. GTP Hydrolysis by eRF3 Facilitates Stop Codon Decoding during Eukaryotic Translation Termination. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 7769–7778 (2004).
27. Raimondeau, E. *et al.* New insights into the interplay between the translation machinery and nonsense-mediated mRNA decay factors. *Biochemical Society Transactions* **46**, 503–512 (2018).
28. Isken, O. & Maquat, L. The multiple lives of NMD factors: Balancing roles in

- gene and genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 699–712 (2008).
29. Chang, L. *et al.* The human RNA surveillance factor UPF1 regulates tumorigenesis by targeting Smad7 in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 1–12 (2016).
  30. Ghosh, S. *et al.* Translational competence of ribosomes released from a premature termination codon is modulated by NMD factors. *RNA* **16**, 1832–1847 (2010).
  31. Keeling, K. & Bedwell, D. Suppression of Nonsense Mutations As A Therapeutic Approach To Treat Genetic Diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 837–852 (2012).
  32. Costa, N. The mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. (Universidade Nova de Lisboa, 2015).
  33. Li, L. *et al.* The Human RNA Surveillance Factor UPF1 Modulates Gastric Cancer Progression by Targeting Long Non-Coding RNA MALAT1. *Cell. Physiol. Biochem.* **42**, 2194–2206 (2017).
  34. Celik, A. *et al.* NMD: at the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie* **114**, 2–9 (2016).
  35. Kuroha, K. *et al.* Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *EMBO Rep.* **10**, 1265–1271 (2009).
  36. Kurosaki, T. & Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *Journal of Cell Science* **129**, 461–467 (2016).
  37. Kashima, I. *et al.* Binding of a novel SMG-1 – Upf1 – eRF1 – eRF3 complex ( SURF ) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* **20**, 355–367 (2006).
  38. Cho, H. *et al.* Article Human Proline-Rich Nuclear Receptor Coregulatory Protein 2 Mediates an Interaction between mRNA Surveillance Machinery and Decapping Complex. *Molecular Cell* **33**, 75–86 (2009).
  39. Lykke-andersen, J. & Muhlemann, O. How and where are nonsense mRNAs degraded in mammalian cells ? *RNA Biology* **7**, 28–32 (2010).
  40. Okada-katsuhata, Y. *et al.* N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5: SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids*

- Research* **40**, 1251–1266 (2012).
41. Franks, T. *et al.* Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **143**, 938–950 (2012).
  42. Fiorini, F. *et al.* Human Upf1 is a highly processive RNA helicase and translocase with RNP remodelling activities. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
  43. Yamamoto, H. *et al.* Ribosomal Chamber Music : Toward an Understanding of IRES Mechanisms. *Trends Biochem. Science* **42**, 655–668 (2017).
  44. Shatsky, I. N. *et al.* Cap-Independent Translation : What ' s in a Name ? *Trends Biochem. Science* **43**, 882–895 (2018).
  45. Lacerda, R. *et al.* More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1659–1680 (2017).
  46. Komar, A. A. & Hatzoglou, M. The war of ITAFs in pathophysiological states Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle* **15**, 229–240 (2011).
  47. Baird, S. *et al.* Searching for IRES. *RNA* **12**, 1755–1785 (2006).
  48. Filbin, M. & Kieft, J. Towards a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 267–276 (2010).
  49. Liu, B. & Qian, S.-B. Translational reprogramming in stress response. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 301–305 (2015).
  50. Showkat, M. *et al.* mTOR Signaling in Protein Translation Regulation : Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Molecular Biology International* **2014**, 1-14 (2014).
  51. Nandagopal, N. & Roux, P. P. Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation* **3**, 1–8 (2015).
  52. Pinkstaff, J. *et al.* Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2770-2775 (2000).
  53. Stoneley, M. & Willis, A. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**, 3200–3207 (2004).
  54. Walters, B. & Thompson, S. R. Cap-independent Translational Control of Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology* **6**, 1–8 (2016).

55. Ramakrishnan, S. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Hypoxia and Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* **9**, 142–160 (2014).
56. Holcík, M. Targeting Translation for Treatment of Cancer - A Novel Role for IRES ? *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 299–311 (2004).
57. Riley, A. *et al.* Distinct 5'UTRs regulate XIAP expression under normal growth conditions and during cellular stress. *Nucleic Acids Research* **38**, 4665–4674 (2010).
58. Lubing, G. *et al.* Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer Cell* **15**, 363–375 (2010).
59. Holc, M. *et al.* The Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Protein XIAP Is Modulated by the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1 and C2. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 280–288 (2003).
60. Daro, M. & Holcik, M. The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *BBA - Gene Regul. Mech.* **1849**, 887-897 (2014).
61. Imamachi, N. *et al.* Up-frameshift protein 1 (UPF1): Multitalented entertainer in RNA decay. *Drug Discov. Ther.* **6**, 55–61 (2012).
62. Schoenberg, D. & Maquat, L. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet.* **13**, 246–259 (2012).
63. Kim, Y. *et al.* Mammalian Staufen1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3'UTRs so as to Elicit mRNA Decay. *Cell* **120**, 195–208 (2005).
64. Gong, C. *et al.* SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis : effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & Development* **23**, 54–66 (2009).
65. Kim, Y. & Maquat, L. UPFront and center in RNA decay : UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA* **25**, 407–422 (2019).
66. Amiard, S. *et al.* Distinct Roles of the ATR Kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex in the Maintenance of Chromosomal Stability in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 3020–3033 (2010).
67. Dehghani-tafti, S. *et al.* DNA substrate recognition and processing by the full-length human UPF1 helicase. *Nucleic Acids Research* **45**, 7354-7366 (2017).

68. Chawla, R. *et al.* Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. *EMBO Journal* **30**, 4047-4058 (2011).
69. Azzalin, C. *et al.* Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* **318**, 798-801 (2007).
70. Lacerda, R. *et al.* More than just scanning : the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell Mol Life Sci* **74**, 1659-1680 (2017).
71. Azzalin, C. & Lingner, J. The Human RNA Surveillance Factor UPF1 Is Required for S Phase Progression and Genome Stability. *Current Biology* **16**, 433-439 (2006).
72. Langie, S. *et al.* Causes of genome instability : the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis* **36**, 61-88 (2015).
73. Robey, R. *et al.* Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* **36**, 203-231 (2015).
74. Deforges, J. *et al.* Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic Acids Research* **39**, 3350-3362 (2011).
75. Zhang, J. *et al.* Cancer Specific Long Noncoding RNAs Show Differential Expression Patterns and Competing Endogenous RNA Potential in Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE* **10**, 1-12 (2015).
76. Liu, C. *et al.* The UPF1 RNA Surveillance Gene is Commonly Mutated in Pancreatic Adenosquamous Carcinoma Chen. *Nat Med* **20**, 596-598 (2014).
77. Komar, A. & Hatzoglou, M. Exploring internal ribosome entry sites as therapeutic targets. *Frontiers Oncology* **5**, 1-10 (2015).
78. Renaud-Gabardos, E. *et al.* Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J Exp Med* **5**, 11-20 (2015).
79. Rayssac, A. *et al.* IRES-based Vector Coexpressing FGF2 and Cyr61 Provides Synergistic and Safe Therapeutics of Lower Limb Ischemia. *Mol. Ther.* **17**, 2010–2019 (2009).
80. Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 16–21 (2001).

81. Stoneley, M. *et al.* C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* **16**, 423-428 (1998).
82. Bochkov, Y. & Palmenberg, A. Short Technical Reports Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques* **41**, 283-292 (2006).
83. Arita, M. *et al.* Multiple sites required for expression in 5'-flanking region of the hMLH1 gene. *Gene* **306**, 57-65 (2003).
84. Ito, E. *et al.* A Core Promoter and a Frequent Single-Nucleotide Polymorphism of the Mismatch Repair Gene hMLH1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 488–494 (1999).
85. Candeias, M. M. *et al.* Expression of p53 and p53 / 47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene* **25**, 6936–6947 (2006).
86. Reynolds, A. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-330 (2004).
87. Mo, R. *et al.* Effects of Lipofectamine 2000/siRNA Complexes on Autophagy in Hepatoma Cells. *Mol Biotechnol* **51**, 1-8 (2017).
88. Tani, H. *et al.* Identification of hundreds of novel UPF1 target transcripts by direct determination of whole transcriptome stability. *RNA Biology* **9**, 1370-1379 (2012).
89. Chang, H. *et al.* Resource of Poly ( A ) Tail Length and 3' End Modifications. *Mol. Cell* **53**, 1044–1052 (2014).
90. Banerjee, A. 5'-Terminal Cap Structure in Eucaryotic Messenger Ribonucleic Acids. *Microbiol Rev* **44**, 175–205 (1980).
91. Uyeda, I. & Shikata, E. Characterization of RNAs synthesized by the transcriptase of rice dwarf virus in vitro. *Nucleic Acids Res* **1**, 0-5 (1984).
92. Chiariotti, L. *et al.* Structure of the Rat Insulin-Like Growth Factor II Transcriptional Unit: Heterogeneous Transcripts are Generated from Two Promoters by Use of Multiple Polyadenylation Sites and Differential Ribonucleic Acid Splicing. *Mol Endocrinol* **2**, 1115–1126 (1988).