Marcelo Valpeteris de Campos

Levantamento de proteínas candidatas a ativadoras do *splicing* do éxon 12 do gene *FMR1*

São Paulo

2014

Marcelo Valpeteris de Campos

Levantamento de proteínas candidatas a ativadoras do *splicing* do éxon 12 do gene *FMR1*

Dissertação apesentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

São Paulo

2014

VALPETERIS, MARCELO

Levantamento de proteínas candidatas a ativadoras do *splicing* do éxon 12 do gene *FMR1*

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Splicing* alternativo 2. *FMR1* 3. Regulação pós-transcricional 4. Elementos em *trans* 5. Precipitação por afinidade

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Orientadora

Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

Esse trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo à orientadora (FAPESP Proc. 2011/14329-9) e ao aluno (FAPESP Proc. 2011/03964-5) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ao aluno (CNPq Proc. 130154/2011-3).

Agradecimentos

À minha família, principalmente. À minha mãe, Marcia, por me mostrar que a vida é uma batalha que se vence com coragem, sabedoria e determinação. À minha irmã, Marília, por compartilhar comigo há 25 anos desse longo caminho que é tornar-se alguém. À minha avó, Cida, pelo amor incondicional. E aos que já se foram também, por terem me ajudado a ser quem sou.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad, por ter guiado minha transformação de graduando a cientista ao longo desses seis frutíferos anos.

Aos meus colegas do Laboratório de Genômica Funcional, Juliana, Fernando, Ana Carla, Gustavo, e também à Deborah, pelo convívio, pelos conselhos, pela ajuda em experimentos e na vida e pelo *brainstorming* ocasional, indispensável à nossa profissão.

Aos professores Dr. Luís Eduardo Soares Netto, Dra. Regina Célia Mingroni, Dra. Ângela Vianna-Morgante, Dr. Eduardo Gorab, Dr. Paulo Otto (Genética - IBUSP) e a seus alunos, pelo apoio e pelo uso das instalações de seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro e ao biólogo Waldir Caldeira (Genética - IBUSP), pela realização das análises de microscopia confocal.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys e à técnica Tatiana Corrêa (Botânica - IBUSP), pelo apoio e pelo uso dos equipamentos de seu laboratório.

Aos demais funcionários do Departamento de Genética. À Fátima, pela solicitude e eterno otimismo. À Helenice, por sempre estar disposta a me ajudar. E também à Mara, ao Paulo Rogério, à Maraisa e à Deisy.

À Profa. Dra. Paula Grabowski (University of Pittsburgh, Pittsburgh, Estados Unidos) pela colaboração por correio eletrônico e pela elucidação do protocolo para preparo de extrato nuclear.

Aos meus grandes amigos da graduação, Juliano, Diego, Yve, Laís, Carol, Ivan, Paulo, Fernanda, Dani e Marcela, cujo carinho nem o tempo nem a distância conseguiram erodir.

Aos meus amigos da HGF, Vitor, Gutto e André, pelas noites (e dias, e noites, e dias...) de pizza, videogame e alegria.

Aos muitos amigos do uXXXp, pelas risadas, pela descontração e principalmente pelas festas, que muitas vezes foram o clímax de semanas pesadas de trabalho.

Índice geral

Resumo.....10

Abstract.....11

I. Introdução.....12

Funções da FMRP.....14

A alça variável do domínio KH-2 da FMRP.....18

***Splicing* alternativo e sua regulação**.....20

Regulação do *splicing* alternativo do éxon 12 do *Fmr1*.....24

II. Objetivos.....26

III. Material e métodos.....27

Material.....27

Clones de DNA.....27

Oligonucleotídeos.....28

Anticorpos.....29

Métodos.....29

Sequenciamento de DNA plasmidial.....29

Subclonagem dos plasmídeos.....30

Extração de DNA de plasmídeos.....33

Linearização do vetor para transcrição in vitro.....33

Transcrição in vitro.....34

Seleção em celulose-oligo(dT).....34

Ligação a nucleotídeo biotinilado.....35

Dosagem por dot blotting.....35

Extrato nuclear.....36

Tratamento com azul de tripano.....37

Precipitação por ácido tricloroacético.....37

Western blotting.....38

Preparo de material para microscopia eletrônica.....38

Precipitação por afinidade com contas de sefarose-estreptavidina..39

Análise do perfil proteico por SDS-PAGE.....40

Análise por espectrometria de massas.....41

Análises comparativas.....41

IV. Resultados.....42

Produção de iscas de RNA biotinilado.....42

Extratos nucleares.....46

Análises por espectrometria de massas: oligorribonucleotídeos biotinilados.....48

Análises por espectrometria de massas: transcritos biotinilados.....51

V. Discussão.....54

Proteínas identificadas em ensaios com oligorribonucleotídeos.....57

Proteínas identificadas em ensaios com transcritos biotinilados.....59

Análise geral das 27 proteínas candidatas.....60

VI. Conclusões.....64

VII. Referências bibliográficas.....64

VIII. Lista de acrônimos.....73

Índice de figuras

Figura 1: FMRP na regulação traducional.....17

Figura 2: Estrutura genômica do gene *FMR1*.....19

Figura 3: Representação esquemática de componentes centrais do spliceossomo.....22

Figura 4: Representação gráfica dos três clones.....32

Figura 5: Representação gráfica do segmento deletado do íntron 12.....43

Figura 6: Gel de agarose de triagem de colônias contendo ou não poli(dA).....44

Figura 7: Gel de agarose com produtos de transcrição *in vitro* dos três clones.....45

Figura 8: *Dot blotting* para dosagem de RNA biotinilado.....46

Figura 9: Análise de integridade nuclear e composição proteica dos extratos.....47

Figura 10: Análise dos perfis de produtos dos ensaios de precipitação por afinidade..48

Figura 11: Diagrama de Venn para proteínas identificadas por espectrometria de massas em ensaios com oligorribonucleotídeos.....49

Figura 12: Ilustração do segmento do íntron 12 do *FMR1* e os candidatos a ISE identificados in silico com proteínas identificadas para cada oligorribonucleotídeo....52

Figura 13: Representação esquemática do protocolo para obtenção de extratos nucleares de córtex cerebral de rato.....56

Índice de tabelas

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos para formação de adaptador ou sequenciamento dos insertos.....28

Tabela 2: Lista de oligorribonucleotídeos para ensaios de precipitação por afinidade.....29

Tabela 3: Proteínas identificadas por espectrometria de massas para ensaios com oligorribonucleotídeos.....50

Tabela 4: Proteínas identificadas por espectrometria de massas para ensaios com transcritos biotinilados.....53

Tabela 5: Elementos em *cis* de proteínas ativadoras do *splicing* de pré-RNAm.....63

Resumo

O gene do *Retardo Mental do X Frágil* (*FMR1*) possui 17 éxons e seu transcrito primário pode sofrer *splicing* alternativo, havendo, entre outros eventos, possibilidade de exclusão ou inclusão do éxon 12. O produto da expressão do *FMR1*, a proteína do retardo mental do X frágil (FMRP), possui papéis importantes no sistema nervoso central, atuando como repressora da tradução de RNAm em espinhas dendríticas e controlando a síntese de proteínas envolvidas na função sináptica. Entre dois domínios centrais do tipo KH presentes na FMRP, o segundo (KH-2) é responsável pela interação da proteína aos polissomos. O domínio KH-2 é codificado pelos éxons 9 a 13 do *FMR1* e possui a alça variável mais longa já observada entre proteínas humanas, que é codificada pelos éxons 11 e 12. A inclusão do éxon 12 no RNAm do *FMR1* causa uma extensão em fase dessa alça variável do KH-2 da FMRP. Estas isoformas apresentam expressão significativa em neurônios cortico-cerebrais e cerebelares do rato, no primeiro mês pós-natal.

Este trabalho baseia-se em resultados prévios do grupo de pesquisa, em que se identificaram sequências curtas no íntron 12 do *FMR1*, com potencial para agir como acentuadores de *splicing*. Baseando-nos na hipótese de que essas sequências constituem elementos transcritos que se ligam a fatores proteicos do núcleo celular, potencialmente reguladores do *splicing* do pré-RNAm do *FMR1*, realizamos ensaios de precipitação por afinidade com extratos nucleares de córtex cerebral de rato e transcritos do loco, biotinilados. Análises por espectrometria de massas revelaram enriquecimento de proteínas nucleares, contendo domínios de ligação a RNA, principalmente aquelas relacionadas à regulação e processamento de pré-RNAm, sobretudo o *splicing*.

Abstract

Fragile X Mental Retardation 1 gene (*FMR1*) comprises 17 exons. Its primary transcript is subject to alternative splicing, allowing for the possibility of exon 12 inclusion or skipping, among other events. The product of *FMR1* gene expression, fragile X mental retardation protein (FMRP), has important roles in the central nervous system, acting as a translational repressor in dendritic spines, thus controlling the synthesis of proteins involved in synaptic function. FMRP has two central KH domains. One of them (KH-2) is responsible for its interaction with polysomes. The KH-2 domain is encoded by *FMR1* exons 9 to 13. It contains the longest variable loop ever observed among human KH-containing proteins, which is encoded by *FMR1* exons 11 and 12. Exon-12 inclusion in *FMR1* mRNA causes an in-frame extension of FMRP KH-2 domain variable loop. These isoforms appear significantly expressed in cortico-cerebral and cerebellar neurons of the rat in the first month after birth.

We have previously identified short sequences within *FMR1* intron 12 that may potentially act as splicing enhancers. Our study is based on the hypothesis that those sequences when transcribed should bind to nuclear protein factors that may function as *FMR1* exon 12 pre-mRNA splicing regulators. To initiate an experimental approach to test that hypothesis, we conducted affinity precipitation assays with rat cerebral cortex nuclear extracts and biotinylated transcripts. Mass spectrometry analyses disclosed proteins that have been described to be enriched in the cell nucleus, contain RNA-binding domains, and be functionally related to pre-mRNA processing, notably splicing.

I. Introdução

O *splicing* alternativo é um importante mecanismo gerador de diversidade do transcriptoma e do proteoma em eucariotos. Com a capacidade de originar variantes de RNAm a partir da expressão de um único gene, estima-se que o *splicing* alternativo possa atuar em pelo menos 80% dos transcritos expressos no cérebro humano (Yeo e col., 2004). Análises mais recentes por sequenciamento massivo do transcriptoma de tecidos humanos identificaram eventos de *splicing* alternativo em até 95% dos transcritos analisados, com pelo menos 100.000 eventos de abundância intermediária a elevada (Pan e col., 2008).

O gene do *Retardo Mental do X Frágil* (*FMR1*), localizado em Xq27.3, possui 17 éxons (Eichler e col., 1993). O produto de sua expressão, a proteína do retardo mental do X frágil (FMRP), tem papéis funcionais importantes no sistema nervoso central (SNC). O transcrito primário do *FMR1* pode sofrer *splicing* alternativo pela exclusão dos éxons 12 ou 14 ou escolha alternativa entre três e dois sítios receptores de *splicing*, respectivamente, nos éxons 15 e 17 (Verkerk e col., 1993). A isoforma mais longa da FMRP, expressa por RNAm com os 17 éxons em sua integridade, é denominada ISO 1 e possui 632 aminoácidos, totalizando uma massa molecular esperada de 71,1 kDa e observada após eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) de cerca de 80 kDa, diferença atribuída a modificações pós-traducionais (Ashley e col., 1993, Ceman e col., 2003).

O gene *FMR1* tem em seu primeiro éxon uma série de trinucleotídeos CGG que também fazem parte da região 5’ não-traduzida do seu RNAm. Essas trincas exibem polimorfismo de tamanho na população geral, com alelos contendo de 6 a 44 repetições. A expansão de trinucleotídeos CGG a mais de 200 repetições associa-se à hipermetilação de citosinas da ilha CpG em que se encontram, abolindo a expressão do

gene *FMR1* e levando à síndrome do X frágil (SXF), a causa mais comum de deficiência intelectual hereditária entre homens (Nussbaum e Ledbetter, 1986; Verkerk e col., 1991).

Expansões menores, não metiladas, denominadas pré-mutações (55-200 trincas), foram associadas à insuficiência ovariana primária associada ao X frágil (FXPOI) em cerca de 25% das mulheres portadoras e à síndrome de tremor e ataxia associada ao X frágil (FXTAS) em cerca de 30% dos homens portadores (Vianna-Morgante, 1999; Sherman, 2000; Hagerman e col., 2001; Oostra e Willemsen, 2009). FXTAS é um transtorno do movimento, caracterizado por início tardio, tremor de intenção progressivo, marcha atáxica, neuropatia periférica, além de declínio cognitivo e disfunção autônoma (Hagerman e Hagerman, 2001). Estudos *in vitro* revelaram que alelos pré-mutados estão associados a níveis aumentados de RNAm do *FMR1*, relativa redução da expressão da FMRP e formação de inclusões nucleares que contêm o RNAm do *FMR1* (Greco e col., 2006; Tassone e col., 2007). Inclusões nucleares neuronais foram também identificadas em cérebro *postmortem* de pacientes com FXTAS (Tassone e col., 2004). O modelo corrente sugere que o RNAm do *FMR1* contendo repetições CGG expandidas (pré-mutações) inicie *per se* um processo de agregação ribonucleoproteica no núcleo celular, causando disfunções em organelas onde essas proteínas devem ser necessárias (Sellier e col., 2010). Estresse oxidativo e morte neuronal sucedem aos eventos de maldobramento ribonucleoproteico (Tassone e col., 2007; Ross-Inta e col., 2010).

As disfunções clínicas observadas em pacientes com SXF ou FXTAS, bem como em seus modelos animais, têm auxiliado a elucidar as funções da FMRP e os papéis das expansões de trinucleotídeos sobre o RNAm do *FMR1* de alelos pré-mutados (revisto por Hagerman e Hagerman, 2013). A importância da proteína FMRP foi

demonstrada na sinaptogênese de córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, regiões de mais elevada expressão do gene *FMR1* no período pós-natal precoce de camundongo e rato (Abtibol e col., 1993; Devys e col., 1993; Khandjian e col., 1995; Irwin e col., 2000; Todd e Mack, 2000; Irwin e col., 2005). Os efeitos de expansões de trinucleotídeos sobre o RNAm em que residem foram estudados sobre as taxas de transcrição do gene (Tassone e col., 2007); a tradução desse RNAm (Ludwig e col., 2011; Todd e col., 2013; Ludwig e col., 2014); sua associação a proteínas reguladoras de *splicing* (Iwahashi e col., 2006; Jin e col., 2007; Sofola e col., 2007; Sellier e col., 2010); e seu transporte e distribuição (Muslimov e col., 2011).

Os níveis da expressão de transcritos alternativos do *FMR1* têm sido analisados (Eichler e col., 1993; Ashley e col., 1993; Verkerk e col., 1993; Huang e col., 1996; Brackett e col., 2013). Nas isoformas da FMRP, segmentos codificados por éxons alternativos do *FMR1* mostraram ter relevância funcional na metilação da proteína, influenciando sua interação com outras moléculas (Dolzhanskaya e col., 2006) e no endereçamento dela ao núcleo celular (Dury e col., 2013). O estudo de como o *splicing* alternativo do *FMR1* é regulado torna-se, portanto, importante para o entendimento da geração de isoformas da FMRP com funções diferencialmente reguladas, além de poder produzir informações para estudos futuros sobre alelos pré-mutados do *FMR1*.

Funções da FMRP

A FMRP tem três tipos distintos de domínios ligantes de RNA: um domínio N-terminal com dois motivos Tudor (Ramos e col., 2006), dois domínios centrais do tipo KH (KH-1 e KH-2, homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K, hnRNP K; Siomi e col., 1993) e uma caixa RGG (domínio rico em arginina, R, e glicina, G) C-terminal (Ramos e col., 2003). Apresenta papéis, sobretudo, repressores da tradução de

RNAm em espinhas dendríticas, controlando a síntese de proteínas envolvidas na função sináptica. Possui também um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de exportação nuclear (NES; Siomi e col., 1993; Eberhart e col., 1996).

Demonstrou-se que a FMRP possui afinidade por motivos específicos de estrutura secundária de RNA, como quartetos G e complexos em beijo (do inglês, *kissing complex*), podendo se ligar tanto a RNA codificador para proteínas (Brown e col., 2001; Darnell e col., 2001; Miyashiro e col., 2003) quanto não codificador como os microRNAs (miRNA, Jin e col., 2004) e o RNA estrutural BC1 (do inglês, *brain cytoplasmic RNA1*) e seu ortólogo em primatas, BC200 (Zalfa e col., 2005). Os RNAm conhecidos até então que interagem *in vivo* com a FMRP parecem reconhecer principalmente sua caixa RGG (Darnell e col., 2001; 2005; 2009). Por outro lado, o domínio KH-2 demonstrou-se importante para a associação da proteína aos polissomos (Siomi e col., 1996) e a RNAs sintéticos que apresentavam a estrutura de complexo em beijo (Darnell e col., 2005). A associação da FMRP aos polissomos revelou-se essencial à função da proteína, uma vez que uma mutação dentro do domínio KH-2 (p.I304N, substituição de uma isoleucina na posição 304 por uma asparagina) leva a seu desligamento dos polissomos e, por consequência, a um fenótipo grave da SXF em humanos e a disfunção em modelo de camundongo *knock-in* (Zang e col., 2009).

Propôs-se que a FMRP, uma vez sintetizada, entre no núcleo celular, onde se associa a complexos ribonucleoproteicos, que deixam o núcleo e são transportados aos dendritos, especificamente às suas espinhas. Estas são evaginações da membrana pós-sináptica de neurônios excitatórios, que contêm a densidade pós-sináptica responsável pelo recebimento e transdução do sinal proveniente do neurônio pré-sináptico (revisto por Penzes e col., 2011). É nessas estruturas que a FMRP atua preponderantemente, reprimindo RNAm que só deverá ter a síntese proteica ativada perante estímulo

sináptico (revisto por Bhakar e col., 2012). Cérebros de pacientes com a SXF e de camundongos nocautes do *Fmr1* apresentam espinhas dendríticas malformadas, sendo mais longas, finas e densas do que em indivíduos sadios ou do tipo-selvagem, sugerindo que a FMRP deva ter função na maturação sináptica (Comery e col., 1997; Nimchinsky e col., 2001).

Acredita-se que a interferência pelo RNA (RNAi) seja uma via importante para a atuação da FMRP na regulação pós-transcricional da expressão gênica, uma vez que, além de miRNAs, demonstrou-se que esta proteína interage com outros componentes do complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC), em *Drosophila* e mamíferos (Jin e col., 2004). Entre os miRNAs, encontra-se miR-125b, responsável pela regulação traducional da subunidade NR2A do receptor de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato), cuja composição afeta profundamente a plasticidade sináptica (Edbauer e col., 2010). Produtos proteicos de muitos RNAm descritos como alvos da regulação da FMRP estão também envolvidos na função sináptica, na sinalização celular e no desenvolvimento neuronal (Darnell e col., 2011). A Figura 1 apresenta uma representação gráfica da função da FMRP nos dendritos.

FMRP faz parte de uma família, que contém as parálogas FXRP1 e FXRP2, produtos da expressão dos genes *Relacionados ao X Frágil 1* (*FXR1*) e *2* (*FXR2*). As três proteínas têm capacidade de formar homo- e heterodímeros, que devem ser a configuração endógena natural para essas proteínas (Taminini e col., 1999). Diversos experimentos revelaram que a FMRP se liga a proteínas de complexos ribonucleoproteicos (Bardoni e col., 1999; Schenck e col., 2001; El Fatimy e col., 2012); proteínas motoras do citoesqueleto, como a miosina Va (Ohashi e col., 2002) e as cadeias pesadas da dineína e cinesinas 1 e 3 (Kanai e col., 2004; Ling e col., 2004; Davidovic e col., 2007), além de interagir, diretamente ou por intermédio de RNAm,

com proteínas envolvidas na exportação nuclear de RNAm, como a Tap/NXF1 (do inglês, *nuclear RNA export factor 1*; Kim e col., 2008) e a proteína ligante da pequena GTPase Ran (RANBP, Menon e col., 2004). Há certa sobreposição entre as associações proteicas, domínios e funções da FMRP e os das proteínas parálogas da família, citadas mais adiante (Bardoni e col., 2001).

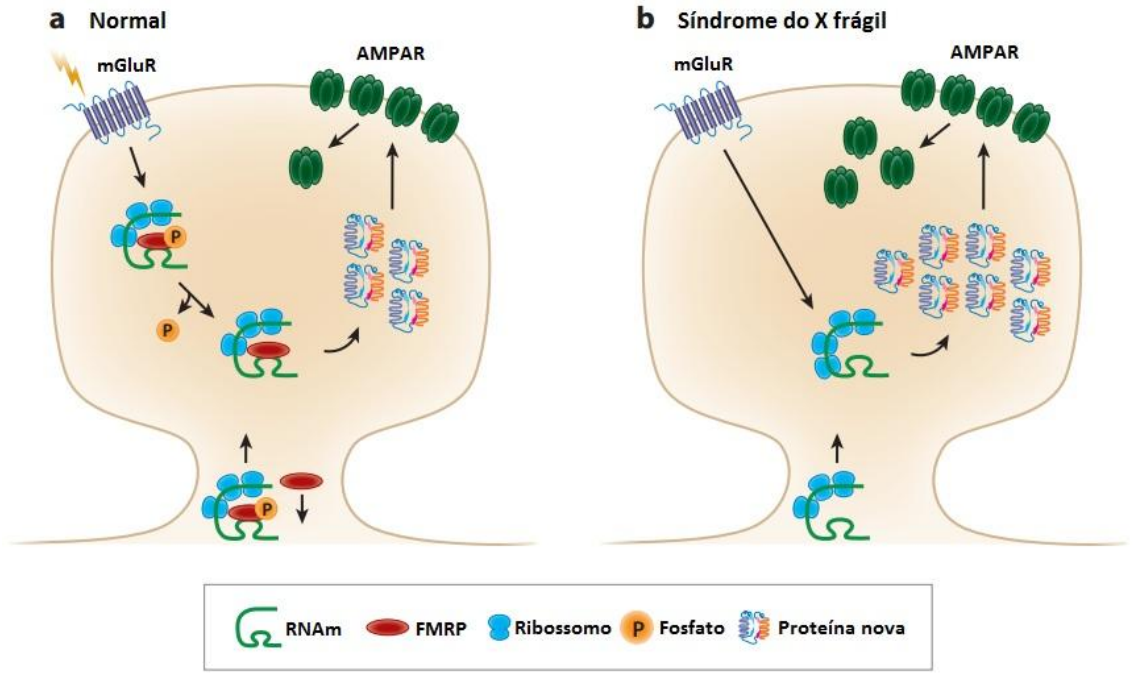

Figura 1: Modelo para a FMRP na regulação traducional em neurônios pós-sinápticos. (a) A FMRP se liga a um RNAm alvo no núcleo celular (não mostrado) e é cotransportada com ele aos dendritos, reprimindo sua tradução. Mediante ativação do receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) na espinha dendrítica (a), a FMRP é desfosforilada, permitindo que se prossiga a tradução de mensagens a ela associadas. Essa síntese proteica resulta na internalização do receptor de ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPAR) e em depressão de longa duração (LTD). (b) Em neurônios sem expressão da FMRP, um subgrupo de proteínas dendríticas é superexpresso constitutivamente mesmo na ausência de estimulação de mGluR, resultando em internalização excessiva de AMPAR e em LTD exacerbada. LTD e LTP (potenciação de longa duração) são mecanismos opostos, determinantes da força sináptica, estando diretamente relacionados à eliminação e fortalecimento sinápticos, respectivamente (revisto por Lüscher e Huber, 2010). (Figura adaptada de Santoro e col., 2012)

A alça variável do domínio KH-2 da FMRP

Domínios KH foram descritos como interfaces de interação a RNA ou dimerização proteica (Valverde e col., 2008). Eles são compostos por um motivo mínimo suficiente para ligação a RNA, que compreende uma folha-beta, seguido de duas hélices-alfa e uma segunda folha-beta. Uma alça constante de quatro resíduos conecta as duas hélices-alfa. Em eucariotos, uma alça variável liga o motivo mínimo a uma terceira folha-beta e outra hélice-alfa, formando o domínio KH canônico, que está presente em ambos os domínios KH da FMRP. O segundo domínio KH da FMRP (KH-2) é codificado pelos éxons invariáveis 9, 10, 11, 12 e 13 do *FMR1* (Fig. 2). Possui a alça variável mais longa já observada em humanos, que é codificada pelos éxons 11 e 12 do *FMR1*. Sabe-se que o éxon 12 do *Fmr1* está sujeito a *splicing* alternativo (Ashley e col., 1993; Eichler e col., 1993; Verheij e col., 1993; Verkerk e col., 1993) e que sua inclusão não altera o quadro de leitura para tradução, levando a uma extensão da alça variável do domínio KH-2 da FMRP de 44 para 65 resíduos, modulando, assim, seu comprimento. O segmento de sequência dos éxons 11 e 12 do *Fmr1* está ausente nos genes parálogos *FXR1* e *FXR2*, implicando-o em um papel diferencial e especializado, ainda desconhecido, para a FMRP.

Para analisar a distribuição do segmento gênico que codifica para a forma longa da alça variável do KH-2 da FMRP entre espécies animais, recuperamos sequências da FMRP de 51 espécies de vertebrados que possuíam genes ortólogos ao *Fmr1* na base de dados *EnsEMBL* (junho de 2012, *European Molecular Biology Laboratory*, http://www.ensembl.org). Sequências da FMRP provenientes de tradução *in silico* foram alinhadas (Clustalw2, http://www.ebi.ac.uk/clustalw). A alça variável estendida foi observada no domínio KH-2 da FMRP de todos os ortólogos de mamíferos que não possuíam sequências ambíguas. Nessas 31 espécies de mamíferos, a alça variável do

KH-2 da FMRP era codificada pelos éxons 11 e 12 do *Fmr1*. Em 30 espécies, o exon 12 do *Fmr1* codificava para 21 aminoácidos. Além disso, a sequência codificada pelo éxon 12 foi observada em um ortólogo de uma espécie de lagarto, *Anolis carolinensis*, embora não tenha sido possível concluir se isso representa um artefato do sequenciamento. De forma geral, o KH-2 da FMRP apresentou alguma variação de aminoácidos, que era aparentemente menor nas regiões codificadas pelos limites a 5' e 3' do éxon 12. O segmento codificado pela junção entre os éxons 11 e 12 apresentou 13 resíduos totalmente conservados entre 15. Sete dos dez últimos aminoácidos codificados pelo exon 12 do *Fmr1* estavam totalmente conservados entre as 31 espécies de mamíferos. Esses blocos de identidade mantêm aberta a possibilidade de interação molecular mediada pela alça variável do domínio KH-2 da FMRP em sua forma mais extensa.

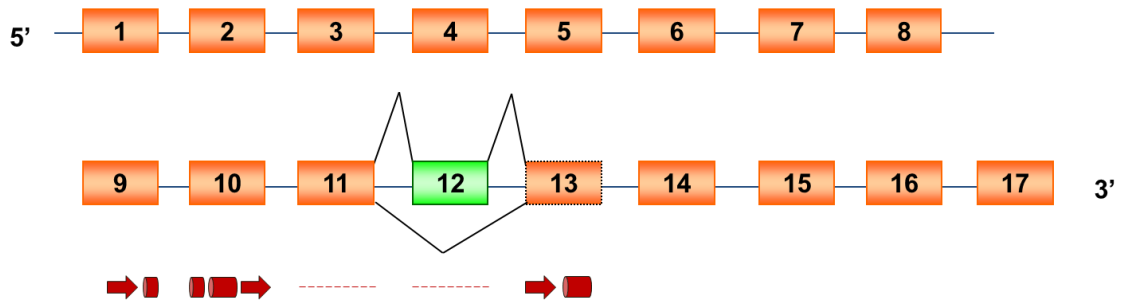

Figura 2: Diagrama representando a estrutura genômica do gene *FMR1* (fora de escala) em que os 17 éxons estão apresentados como retângulos numerados e os íntrons como linhas. O éxon 12 está evidenciado na cor verde e sua exclusão do transcrito do *FMR1* está indicada abaixo deste éxon. Abaixo da estrutura genômica, setas, cilindros e linhas tracejadas indicam respectivamente folhas-beta, hélices-alfa e a alça variável do domínio KH-2 da FMRP. A posição de cada elemento correlaciona-se com o éxon que o codifica.

Análises de etiquetas de sequências transcritas (EST) disponíveis na base de dados de EST (junho de 2012, dbEST, http://www.ncbi.nih.nlm.gov/dbEST) indicaram que a expressão do éxon 12 está sujeita a *splicing* alternativo em pelo menos sete

espécies (*Ornithorhynchus anatinus, Rattus norvegicus, Mus musculus, Sus scrofa, Bos taurus, Macaca fascicularis* e *Homo sapiens*).

Como visto, no SNC de mamíferos, a expressão do *FMR1* é especialmente elevada em neurônios do hipocampo, córtex cerebral e cerebelo (Abtibol e col., 1993). Nosso grupo demonstrou que há aumento significativo dos níveis do éxon 12 em transcritos do *Fmr1* de rato, em córtex cerebral e cerebelo, entre o décimo nono dia embrionário (E19) e o segundo dia pós-natal (P2; Velloso, 2008). Os dados foram corroborados por *Western blotting* e imunohistoquímica usando um anticorpo policlonal (3460) desenvolvido em nosso laboratório que detecta nas isoformas da FMRP o segmento codificado pelo éxon 12 do *Fmr1*, e sua análise estendida a períodos embrionários (E12-E18) e pós-natais (P2-P42). Além disso, os níveis das isoformas da FMRP que expressam o éxon 12 do *FMR1* mostraram-se baixos no embrião de rato e em células não diferenciadas *in vitro*. A diferenciação neuronal *in vitro* aumentou os níveis de expressão dessas isoformas. Ao *Western blotting*, as isoformas da FMRP que expressam o éxon 12 do *Fmr1* tiveram expressão observada ao longo da janela pós-natal avaliada em córtex cerebral e cerebelo, mas não no hipocampo (Velloso e col., em preparação).

Splicing alternativo e sua regulação

A flexibilidade no uso preferencial de um ou outro sítio de *splicing* é mediada por interações entre sequências específicas de nucleotídeos (elementos em *cis*, acentuadores ou silenciadores) e componentes proteicos diversos (elementos em *trans*, ativadores ou repressores), que interagem entre si e acabam por alterar a afinidade entre o spliceossomo e sítios de *splicing* específicos (Blencowe, 2006; Sun e col., 1993). Essas sequências acessórias de ribonucleotídeos - elementos em *cis* - com seus fatores

de regulação são essenciais ao *splicing* alternativo. Elementos em *cis* são sequências curtas, com menos de dez bases, frequentemente degeneradas, que podem estar localizadas em íntrons ou éxons e que são capazes de modular o *splicing* mesmo a grandes distâncias (até 1 kb). Essas sequências podem ser agrupadas em quatro classes: acentuadores intrônicos (*intronic splicing enhancers*, ISE), silenciadores intrônicos (*intronic splicing silencers*, ISS), acentuadores exônicos (*exonic splicing enhancers*, ESE) e silenciadores exônicos (*exonic splicing silencers*, ESS; Furdon e Kole, 1988; Wang e Burge, 2008).

Os elementos em *trans*, por outro lado, são proteínas de diversas famílias, com domínios de ligação a RNA e domínios de interação proteica, através dos quais se associam ao spliceossomo. Proteínas da família SR (ricas em serina e arginina), por exemplo, interagem com acentuadores exônicos, inclusive em éxons constitutivos. Estudos com essas proteínas revelaram que sua interação com sequências internas aos éxons serve como um sinalizador para a atuação do spliceossomo, mesmo no *splicing* convencional, levando à conclusão que a definição da sequência exônica pela maquinaria nuclear, a qual é importante para discriminar entre éxons e íntrons, não depende apenas da presença de sítios doadores ou receptores de *splicing*, mas também de marcadores exônicos e intrônicos auxiliando na determinação do produto final do *splicing* (Zheng, 2004).

Silenciadores exônicos, por sua vez, são comumente reconhecidos por ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs), dentre as quais a hnRNP A1, que age antagonicamente às proteínas SR, ou seja, sua interação predominante com um éxon pode levar à exclusão desse éxon do transcrito maduro (Mayeda e col., 1993). Além disso, a existência de silenciadores, tanto intrônicos quanto exônicos, parece estar associada à supressão da inclusão de pseudo-éxons em transcritos maduros, sugerindo

um papel central para essas sequências mesmo no *splicing* convencional (Pozzoli e Sironi, 2005). Uma representação da interação entre componentes do spliceossomo e elementos de regulação do *splicing* pode ser vista na Figura 3.

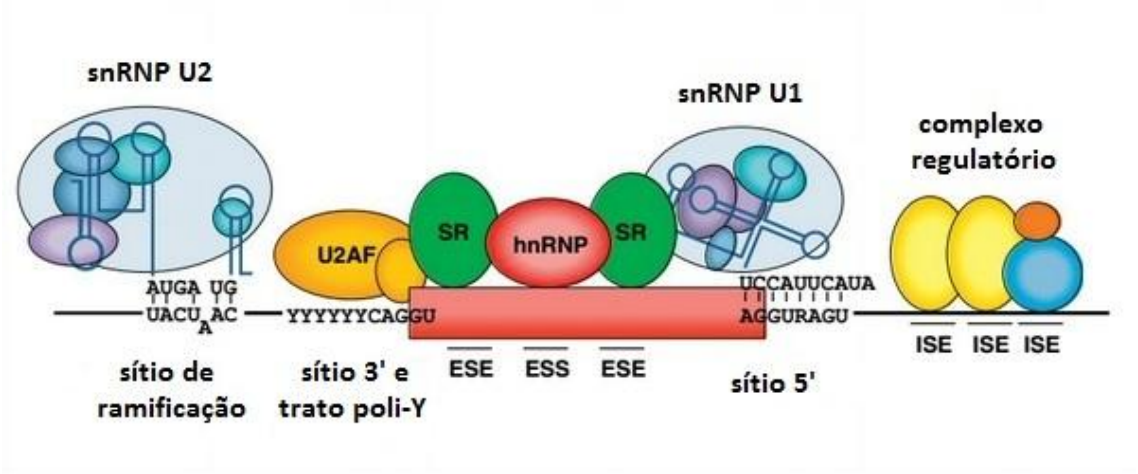

Figura 3: Representação esquemática de componentes centrais do spliceossomo nas definições exônica e intrônica. São apresentados um éxon (retângulo vermelho) e parte dos íntrons adjacentes. snRNPs U1 e U2 são os complexos ribonucleoproteicos dos RNAs pequenos nucleares snRNA U1 e U2. snRNP U1, através do snRNA U1, é responsável pela identificação do sítio doador de *splicing* (aqui, apresentado na região 5' do segundo íntron). U2AF é o fator auxiliar de snRNP U2, composto pelas subunidades de 65 kDa (elipse amarela) e 35 kDa (círculo amarelo associado), responsáveis pela identificação do sítio receptor de *splicing* do pré-RNAm (aqui apresentado no primeiro íntron) e do trato de polipirimidina (série de Ys). snRNP U2, através do snRNA U2, reconhece o ponto de ramificação (apresentado no primeiro íntron) para posterior formação do intermediário em laço (não representado na figura). Estes elementos descritos são canônicos. Elementos regulatórios em *cis* (ESE, acentuador exônico; ESS, silenciador exônico; ISE, acentuador intrônico) e em *trans* (SR, proteína rica em serina e arginina; hnRNP, ribonucleoproteína heterogênea nuclear) também estão representados. Apesar de o diagrama representar regulação positiva para proteínas SR e negativa para hnRNP, sua atuação local depende da posição do elemento em *cis* ao qual se ligam. (Adaptado de Irimia & Blencowe, 2012)

Assim como os éxons, os íntrons também são alvos de proteínas reguladoras do *splicing*. Acentuadores intrônicos, por exemplo, são reconhecidos por proteínas como TIA1 (do inglês, *TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein)* e CELF (do inglês, *CUG-binding protein and ETR-like factors)*, enquanto silenciadores localizados nos íntrons se associam tanto às proteínas SR quanto a hnRNP A1, levando à inibição

do *splicing*. Assim, observa-se que a atuação de fatores em *trans* depende também da localização dos fatores em *cis* com os quais eles interagem. É a combinação de todos esses fatores que determinará a forma madura dos transcritos provenientes do *splicing* alternativo, tendo sido denominado efeito combinatório, de forma análoga ao que ocorre na transcrição gênica de eucariotos (Black, 2003).

No cérebro de mamíferos, o *splicing* alternativo é responsável por grande parte da diversidade proteômica observada, estando envolvido na produção de diversidade de isoformas proteicas de diferentes receptores de neurotransmissores e proteínas de canal iônico. Podemos citar os exemplos seguintes: no RNAm para o receptor de ácido gama-amino-butírico ($GABA_)$, a inclusão ou exclusão de um éxon-cassete por *splicing* é capaz de mediar a afinidade de isoformas do receptor por agonistas benzodiazepínicos (Quinlan e col., 2000). O receptor D2, um receptor de dopamina associado à proteína G, tem sua expressão modulada por *splicing* de seus transcritos, resultando em diferenças na interação do receptor com a proteína G e na consequente atividade da adenilil ciclase (Guiramand e col., 1995). O receptor NMDA R1, um canal catiônico e receptor de glutamato, associado à plasticidade sináptica e desenvolvimento neuronal, tem sua presença na membrana plasmática dependente da inclusão por *splicing* de um éxon cassete, C1, no RNAm que codifica para essas isoformas (Ehlers e col., 1995; 1998).

A existência de uma gama de fatores em *cis* e em *trans* permite uma regulação fina dos níveis celulares dos transcritos sujeitos a esse processamento, possibilitando assim alterações na composição do transcriptoma de determinado tipo celular ao longo do desenvolvimento, como observado em nosso laboratório para o éxon 12 do *Fmr1*. Essa variação ao longo do tempo é observada em diversos transcritos de expressão cerebral, inclusive naqueles relacionados à sinaptogênese, como os que codificam para a glutamato descarboxilase (GAD), enzima responsável pela síntese do neurotransmissor

GABA (Popp e col., 2009), e à plasticidade sináptica, como os que codificam para o subtipo B da cadeia pesada da miosina não-muscular II (MHC-IIB), que atua na regulação da morfologia de espinhas dendríticas (Miyazaki e col, 2000).

Além do efeito combinatório entre elementos em *cis* e em *trans*, o *splicing* alternativo, assim como a definição exônica, pode ser modulado pelo tamanho de éxons e íntrons e por alterações locais na cromatina. Observações sugerem que nucleossomos se encontram enriquecidos sobre sequências exônicas, principalmente aqueles apresentando uma modificação específica, como a trimetilação da lisina 36 da histona 3 (H3K36me3; Schwartz & Ast, 2010). Nesse caso específico, a modificação é reconhecida por uma proteína adaptadora, MRG15, que, por sua vez, facilita o recrutamento da proteína repressora de *splicing* PTBP1 (Luco e col., 2010). Outra modificação na histona 3, a trimetilação da lisina 9 (H3K9me3), acarreta a redução da taxa de elongamento da polimerase II de RNA (Saint-André e col., 2011). Dado que o *splicing* é um evento co-transcricional (Beyer e Osheim, 1988), a taxa de elongamento pode afetar o processamento do pré-RNAm pelo spliceossomo, influenciando, por exemplo, a inclusão de determinados éxons, principalmente aqueles a 3' (Carrillo Oesterreich e col., 2010).

Regulação do splicing alternativo do éxon 12 do Fmr1

Como mencionado, nossos dados indicam que a manutenção do éxon 12 no RNAm maduro do *FMR1* é um evento funcionalmente relevante no córtex cerebral e cerebelo do rato pós-natal. Buscando verificar como o *splicing* do éxon 12 do *FMR1* é regulado, identificaram-se *in silico* alguns elementos candidatos a ISE no íntron 12 deste gene (Velloso, 2008). Um mini-gene foi produzido contendo a sequência genômica do éxon 11 ao éxon 13 do *Fmr1* em um vetor de expressão para células de

mamíferos. Em células C6 (linhagem imortalizada derivada de glioma de rato), o padrão de expressão do mini-gene foi a inclusão preferencial do éxon 12 do *Fmr1* nos transcritos expressos pelo minigene a partir do promotor do vetor recombinante. A deleção do segmento do íntron 12 contendo os elementos candidatos a ISE inverteu o padrão de *splicing* para exclusão preferencial do éxon 12, corroborando o potencial de que aquele segmento intrônico abrigue elementos acentuadores de *splicing* do éxon 12 do *Fmr1*.

Como explicado, as definições exônica e intrônica no transcrito primário são feitas pela interação entre elementos transcritos (em *cis*) e proteicos (em *trans*). A disponibilidade desses elementos em *trans* depende logicamente do padrão de expressão gênica da célula. Baseando-nos em resultados de *Western blotting* obtidos em nosso laboratório, temos a hipótese de que o córtex cerebral e o cerebelo, nos primeiros 42 dias de vida do rato, constituem-se tecidos e fase de desenvolvimento em que há expressão de proteínas reguladoras (ativadoras) de *splicing* do éxon 12 do pré-RNAm do *Fmr1*. Este trabalho apresenta resultados sobre a busca por proteínas do córtex cerebral de rato que se ligam a elementos do íntron 12 do *Fmr1*.

A estratégia experimental adotada foi a realização de ensaios de precipitação por afinidade entre RNA biotinilado, contas de estreptavidina e proteínas de extratos nucleares de córtex cerebral de rato, entre os dias pós-natais 21 (P21) e 28 (P28). Os resultados foram avaliados por espectrometria de massas. Neste contexto, os clones de minigene, tipo-selvagem e deletado, produzidos em nosso laboratório para avaliação do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1*, constituíram ferramentas importantes para a geração de transcritos-alvo, além do uso de oligorribonucleotídeos biotinilados.

II. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o levantamento de proteínas candidatas à ativação do *splicing* do éxon 12 do gene *Fmr1*. Para isso, foram nossos objetivos específicos:

1. a transcrição e biotinilação de RNA *in vitro* a partir de DNA de clones tipo-selvagem e deletado do mini-gene do éxon 12 do *Fmr1*;
2. a obtenção de extrato nuclear de córtex cerebral de ratos jovens (P21 a P28);
3. o desenvolvimento de ensaios de precipitação por afinidade entre proteínas do extrato nuclear de córtex cerebral e RNA biotinilado contendo elementos regulatórios em potencial da inclusão do éxon 12 em transcritos do *Fmr1*;
4. a análise comparativa dos resultados por espectrometria de massas.

III. Material e métodos

Material

Clones de DNA

Os três clones de DNA genômico utilizados estavam em vetor pcDNA3.1 (gentilmente cedido por Vijaya Ramesh, Massachusetts General Hospital, Boston MA), cuja transcrição é dirigida pelo promotor de citomegalovírus (CMV) a 5' do sítio de clonagem múltipla, se usado em células de mamíferos. Na mesma região, há também o promotor do bacteriófago T7 (T7) para expressão *in vitro* com a polimerase de RNA T7. O vetor contém um códon de iniciação da tradução, seguido da região codificadora para o marcador *FLAG*, o sítio de clonagem múltipla, códons de parada de tradução em várias molduras de leitura e sítios de poliadenilação. Os três clones utilizados foram:

- Clone pcDNA3 não-recombinante (NR): vetor sem inserto..
- Clone pcDNA3-FMR1 tipo-selvagem (WT), produzido por Velloso (2008): vetor com inserto de segmento genômico do *Fmr1* de rato abrangendo do começo do éxon 11 ao final do éxon 13. Os éxons 11, 12, e 13 contêm respectivamente 132, 63 e 87pb, enquanto os íntrons 11 e 12 apresentam 476 e 2.091pb. Isso contabiliza 2.849pb de inserto.
- Clone pcDNA3-FMR1 deletado (DEL), produzido por Velloso (2008): vetor com inserto de segmento genômico do *Fmr1* de rato abrangendo do começo do éxon 11 ao final do éxon 13, apresentando deleção de 160pb na porção 5' do íntron 12 (Fig. 5). Este segmento de 160 pb abrange os elementos candidatos a acentuadores de *splicing* identificados por Velloso (2008) com a ferramenta *AceScan2* (http://genes.mit.edu/acescan2).

Oligonucleotídeos

Oligodesoxirribonucleotídeos foram utilizados como adaptadores para clonagem ou sequenciamento de Sanger (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeos para confecção de adaptador*	
NotI-oligo(dA)-XhoI-1S	5’-Fosfato-GGCCGCAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC-3’
XhoI-oligo(dT)-NotI-1A	5’-Fosfato-TCGAGTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC-3’
Oligonucleotídeos para sequenciamento dos insertos	
FRAX-18S	5’-GCGTTCAGGCTTCTGTGTTT-3’
FRAX-19S	5’-TTCCTGCATTTGCCTTATCA-3’
FRAX-20S	5’-TGATGTTCTTCAAATTCAGCCTA-3’
FRAX-21S	5’-CTCCTACACCTTGCCAATCA-3’
FRAX-22S	5’-TTGAGTTTTTAGATTTGTATCCTTGG-3’
pcDNA-1S	5’-CACTATAGGGAGACCCATGGAC-3’
pcDNA-1A	5’-CTGATCAGCGAGCTCTAGCA-3’

* Os sítios de restrição encontram-se sublinhados.

Oligorribonucleotídeos biotinilados em 3’ foram usados como sondas para ensaios de precipitação por afinidade (Tabela 2). Os quatro oligorribonucleotídeos apresentavam alguma sobreposição de sequência e, em conjunto, cobriam a maior parte do segmento que estava deletado no clone mutado. Um oligorribonucleotídeo com sequência inespecífica (degenerado) foi também utilizado. Todos os oligodesoxirribonucleotídeos e oligorribonucleotídeos foram sintetizados pela IDT (Coralville IA, Estados Unidos).

Anticorpos

Os anticorpos primários utilizados em *Western blotting* foram adquiridos na Abcam (Reino Unido) e consistiram de anti-histona H2B (diluição de 5.000 vezes), anti-histona H4 (diluição de 5.000 vezes) e anti-Fox-3 (diluição de 2.500 vezes). O anticorpo secundário para *Western blotting* foi adquirido da GE Healthcare (Reino Unido) e consistiu de anti-IgG conjugado à peroxidase (diluição de 80.000 vezes).

Tabela 2: Sequências de oligorribonucleotídeos marcados com biotina.

FMR1I12-1	5'-Fosfato-AUUCCUUGAAAAAUACAUUUUAAGUUGAUAUUUUAAUGUUUAUUCCCCUU-Biotina-3'
FMR1I12-2	5'-Fosfato-UUUAAGUUGAUAUUUUAAUGUUUAUUCCCCUUGUUAAGAAAGACUAAAAA-Biotina-3'
FMR1I12-3	5'-Fosfato-UUGUUAAGAAAGACUAAAAAUGAGCCUCAUGGUUGGGGGCUGGUGGAGGA-Biotina-3'
FMR1I12-4	5'-Fosfato-UGGGGGCUGGUGGAGGAGUGUUUGUGGGUAUUUGAAUCCACAGCCCUGAG-Biotina-3'
FMR1DEG	5'-Fosfato-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-Biotina-3'

Métodos

Sequenciamento de DNA plasmidial

De cada estoque em glicerol contendo as bactérias recombinantes para os clones tipo-selvagem ou deletado, realizaram-se *streaks* em placas com LB-ágar e ampicilina. As colônias resultantes foram cultivadas em meio LB líquido. De cada colônia, 2µL foram utilizados em reação em cadeia da polimerase (PCR), cujos produtos foram sequenciados pelo método de Sanger, com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*

Kit (Applied Biosystems). Cada reação de sequenciamento continha 2μL de *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Ready Mix*, 1μL de *BigDye Terminator V3.1 5X Sequencing Buffer*, 1μL de oligonucleotídeo para sequenciamento a 5μM (Tabela 1) e 4μL de água deionizada, estéril. As reações foram submetidas, em termociclador, a um passo inicial a 96ºC por um minuto, seguido de 25 ciclos a 96ºC por 10 segundos, 50ºC por 5 segundos e 60ºC por 4 minutos. As amostras foram então aplicadas sobre placa contendo Sephadex previamente hidratado e coletadas em placa coletora após centrifugação por 8 minutos a 2100 X *g*. A placa coletora foi então incubada a 95ºC por 5 minutos para secagem e submetida a eletroforese capilar e leitura a laser pelo *ABI 3730 DNA Analyzer*. O programa *BioEdit* foi utilizado para análise das sequências.

Subclonagem dos plasmídeos

O DNA plasmidial dos clones apresentados na seção de Material (pcDNA3.1 não-recombinante, tipo-selvagem e deletado) serviriam de molde para transcrição *in vitro* após a linearização do vetor. Como o *kit* de transcrição *in vitro* com a polimerase T7 utilizado não realiza poliadenilação do transcrito, optamos por inserir um adaptador de poli(dA)/poli(dT) na extremidade 3' do sítio de clonagem múltipla do vetor pcDNA3.1 não recombinante e a 3' do inserto dos clones recombinantes para viabilizar a purificação dos transcritos que compreendem toda a extensão do inserto.

Cinco microgramas de DNA de cada plasmídeo recombinante e não recombinante foram digeridos pelas enzimas de restrição *Not*I e *Xho*I. A primeira reação foi realizada a 37ºC por 16 horas em volume total de 100μL, em tampão de reação a 10X e utilizando-se 2 μL da enzima de restrição *Not*I (aproximadamente 20U). Após precipitação em etanol, ressuspensão em água e checagem em gel de agarose, os plasmídeos foram então submetidos à digestão por *Xho*I a 37ºC por 16 horas, em

volume total de 100μL, na presença de tampão de reação a 10X e 2μL da enzima (aproximadamente 20U). O DNA foi precipitado em etanol absoluto, ressuspendido em água e uma alíquota foi submetida a eletroforese para verificação da qualidade do DNA.

O DNA dos plasmídeos proveniente da digestão dupla foi submetido a desfosforilação por 2U de fosfatase alcalina de intestino bovino (do inglês, *calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP, Invitrogen, Carlsbad, CA). Ao total de DNA ressuspendido, adicionou-se tampão de reação a 10X e a enzima (CIAP) diluída em tampão de diluição a 10X, em volume total de 100μL. As reações foram incubadas a 37ºC por 30 minutos e então a 55ºC por 45 minutos. A enzima foi inativada por adição de 1μL de EDTA a 0,5M e incubação a 65ºC por 15 minutos. O DNA plasmidial foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitado em etanol absoluto e ressuspendido em água.

Os oligonucleotídeos contendo dA_{40} e dT_{40} (Tabela 1) foram hibridados para a formação de um adaptador de fita dupla NotI(dA_{40}/dT_{40})XhoI, contendo *overhangs* a 5' nas suas extremidades opostas, resultantes da digestão dupla, a ser inserido nos plasmídeos. A reação contendo 100μL de cada oligonucleotídeo a 100nM foi aquecida a cerca de 100ºC e resfriada lentamente. O adaptador fita dupla obtido a 50nM foi estocado a -20ºC.

Os plasmídeos digeridos e desfosforilados foram submetidos a ligação ao adaptador NotI(dA_{40}/dT_{40})XhoI. As reações foram realizadas em volume total de 20μL, contendo tampão de ligação a 4X, 1μL de ligase de DNA de bacteriófago T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e, respectivamente, vetor e adaptador em proporção molar de 1:3, 1:6 e 1:9. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 16 horas.

A subclonagem foi realizada em *E. coli* DH5α, competentes por cloreto de cálcio. O volume total de uma reação de ligação foi adicionado a 100μL de células

competentes, em gelo. Após incubação de 30 minutos, as células foram submetidas a choque térmico a 37ºC por 5 minutos e devolvidas imediatamente ao gelo, e então plaqueadas em placas pré-aquecidas contendo meio LB-ágar e ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37ºC por 16 horas. O DNA das colônias obtidas foi testado por PCR para a presença do DNA plasmidial. Os plasmídeos recombinantes após a subclonagem do adaptador NotI(dA_{40}/dT_{40})XhoI foram denominados NR-poli(dA), WT-poli(dA) e DEL-poli(dA) (Fig. 4).

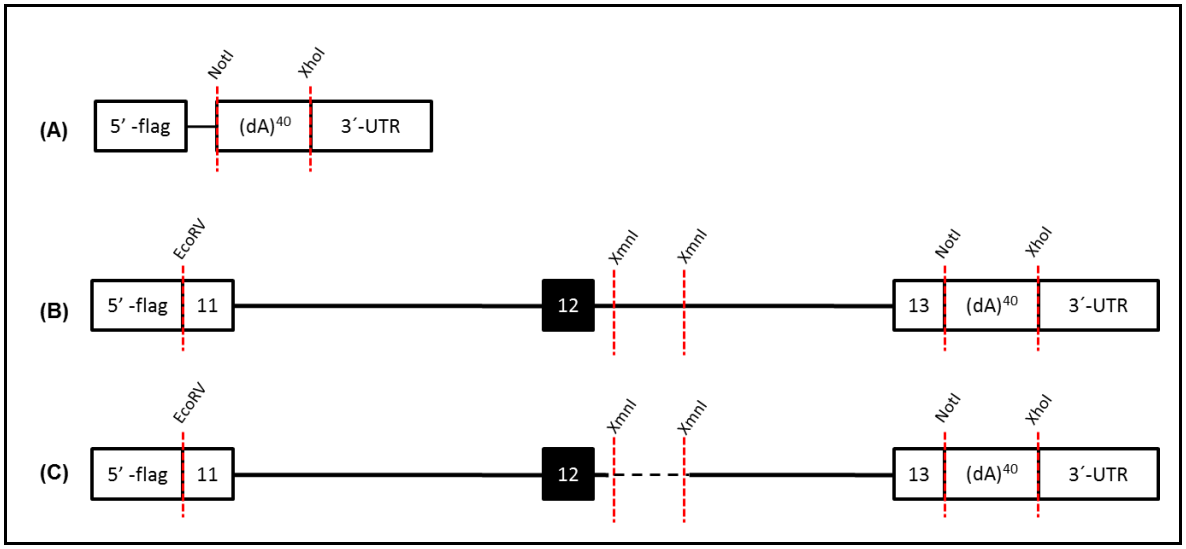

Figura 4: Representação gráfica (fora de escala) dos três clones, NR-poli(dA), WT-poli(dA) e DEL-poli(dA), em vetor plasmidial pcDNA3.1 cujo DNA serviu como molde para transcrição *in vitro*. Os éxons 11, 12 e 13 do *Fmr1* presentes no inserto (B e C) estão em caixas. Os segmentos lineares entre as caixas 11 e 12 ou entre as caixas 12 e 13 são respectivamente os íntrons 11 e 12 (B). No diagrama do vetor não-recombinante (A), está indicado o segmento para o 5' flag-tag (5'-flag) localizado a 3' do promotor T7 (não mostrado) e a 5' do sitio de clonagem múltipla (MCS, não indicado). O segmento indicado como 3'-UTR fica a 3' do MCS e não ficou no transcrito porque o vetor foi linearizado por *Xho*I, cujo único sítio de restrição encontra-se a 3' do sítio de *Not*I do MCS. O adaptador NotI(dA_{40}/dT_{40})XhoI contendo na fita código a sequência (dA_{40}) foi clonado entre os sítios de *Not*I e *Xho*I do MCS. O clone tipo-selvagem (B) apresenta a sequência genômica integral da primeira base do éxon 11 à última base do éxon 13 do gene *Fmr1* de rato. O clone com a deleção (C) apresenta a mesma sequência, porém com deleção de 160 pb no íntron 12, realizada previamente por digestão por *Xmn*I (os dois únicos sitios de restrição estão indicados). Os tamanhos dos éxons 11, 12 e 13 são respectivamente 132, 63 e 87 pb. Os tamanhos dos íntrons 11 e 12 do *Fmr1* são respectivamente 476 e 2.091 pb.

Extração de DNA de plasmídeos

As colônias obtidas foram crescidas sob agitação, a 37ºC, por 16 horas, em meio LB contendo ampicilina. Realizou-se a preparação em média escala (midiprep) de DNA dos plasmídeos (*GenElute Plasmid Midiprep Kit*, Sigma, St. Louis, MO). Cinquenta mililitros de cada cultura foram centrifugados a 5.000 X *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 4mL de solução de ressuspensão gelada. Adicionaram-se 4mL de solução de lise e as reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Seguiu-se adição de 4mL de solução de neutralização e 3mL de solução de ligação e as amostras foram transferidas para colunas e centrifugadas a 3.000 X *g* por 2 minutos. Adicionaram-se 4mL de solução de lavagem 1 e seguiu-se centrifugação a 3.000 X *g*, por 2 minutos, adição de 4mL de solução de lavagem 2 e nova centrifugação a 3.000 X *g*, por 5 minutos. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e centrifugadas a 3.000 X *g*, por 5 minutos após adição de 1mL de água ultrapura, obtendo-se a eluição do DNA plasmidial, que foi estocado a -20ºC.

Linearização do vetor para transcrição in vitro

Os plasmídeos extraídos por midiprep foram dosados em gel e 50μg do DNA de cada clone foram digeridos por enzima de restrição *Xho*I, que não apresenta sítio de restrição nos insertos e cujo único sítio de restrição no vetor localiza-se a 3’ dos adaptadores. A reação foi realizada em um volume total de 1mL, em tampão de reação a 10X e com 20μL de enzima de restrição *Xho*I (cerca de 200 U), por 16 horas a 37ºC. Os plasmídeos foram então precipitados em etanol, ressuspendidos em água e estocados a -20ºC.

Transcrição in vitro

O DNA plasmidial, linearizado por *Xho*I, foi dosado em gel e submetido a reação de transcrição *in vitro* pelo *SP6/T7 Transcription Kit* (Roche, Suíça). As reações foram realizadas em um volume total de 20μL, contendo tampão de reação a 10X, solução contendo ribonucleotídeos, NTPs (ATP, CTP, GTP, TTP), a 2,5mM cada, 2U de polimerase T7 de RNA e DNA plasmidial (cerca de 1μg). Após incubação por uma hora a 37ºC, adicionaram-se 2μL de EDTA a 0,2M, pH 8,0. Os volumes de reação foram estocados em etanol a -80ºC.

Para biotinilação do transcrito durante a transcrição *in vitro*, uma mistura de ribonucleotídeos concentrados 10X (*Biotin RNA Labeling Mix*, Roche, Suíça), composta por cada ribonucleotídeo ATP, CTP, GTP a 10 mM; UTP a 6.5 mM e Biotina-16-UTP a 3.5 mM, substituiu a mistura de ribonucleotídeos não biotinilados.

Seleção em celulose-oligo(dT)

Transcritos não biotinilados foram purificados por complementariedade entre o poli(dA) de sua extremidade 3' e oligonucleotídeos (dT) conjugados a celulose. Esta etapa visa capturar somente os transcritos sintetizados que cobrem toda a extensão do inserto do *Fmr1*. A celulose-oligo(dT) (tipo 7, GE Healthcare, Reino Unido) foi suspensa em tampão de eluição (Tris-HCl a 20mM e pH 7,5 e EDTA a 1mM) e lavada cinco vezes no mesmo tampão, com centrifugações a 14.000 X *g*, 60 segundos, entre cada lavagem. Outras três lavagens foram realizadas com tampão de lavagem (Tris-HCl a 20mM e pH 7,5, NaCl a 0,5M e EDTA a 1mM) no qual a celulose-oligo(dT) foi ressuspensa finalmente. A 450 μL de RNA ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, St. Louis, MO) foram adicionados 50 μL de NaCl a 5M e a solução foi aquecida a 65ºC por cinco minutos e resfriada rapidamente em gelo

por três minutos. O volume total de solução foi adicionado a 200μL de contas de celulose e agitado manualmente por 5 minutos a temperatura ambiente. Após uma curta centrifugação (14.000 X *g*, 30 segundos), o sobrenadante foi transferido para novo tubo e seguiu-se novo ciclo de ligação ao oligo(dT). Depois, a celulose foi lavada quatro vezes com 400μL de tampão de lavagem e uma vez com 400 μL de tampão *low-salt* (Tris-HCl a 10 mM, pH7,5, NaCl a 0,1 M e EDTA a 1 mM). O RNA foi eluído com tampão de eluição (200 μL) a 70ºC seguido de agitação por 2 minutos. A eluição foi repetida da mesma forma e os eluídos combinados. Adicionaram-se 44 μL de acetato de sódio a 3M e 1 mL de etanol a 95% gelado. Os volumes foram estocados a -20ºC.

Ligação a nucleotídeo biotinilado

O RNA não biotinilado, purificado por complementariedade com oligo(dT) foi submetido a ligação entre seu ribonucleotídeo 3'-terminal e citidina bisfosfato biotinilada (Jena Bioscience, Alemanha). A 50pmoles de RNA foram adicionados 3μL de tampão de reação a 10X, 1μL de RNasin, 1μL de citidina bisfosfato biotinilada, 3μL de água ultrapura DEPC, 15μL de polietilenoglicol 6.000 a 30% e 2μL de ligase de RNA T4 (Clontech, TaKaRa, Japão). A reação foi incubada por 16 horas a 16ºC, diluída pela adição de 70μL de água ultrapura e extraída com 100μL de clorofórmio:álcool isoamílico (1:1). Foram adicionados então 10μL de NaCl a 5M e 300 μL de etanol absoluto gelado. Após precipitação a -20ºC, o RNA foi ressuspendido em 20μL de água ultrapura.

Dosagem por dot blotting

A verificação da biotinilação foi realizada por *dot blotting* em membrana de nylon carregada positivamente *Hybond-N+* (GE Healthcare, Reino Unido) através do *Bio-Dot Microfiltration Apparatus* (Bio-Rad). À membrana previamente hidratada em

tampão SSC a 6X (NaCl a 3M, citrato de sódio a 0,3M) e imobilizada no aparato, foram adicionadas as amostras de RNA biotinilado em água tratada com DEPC em volume final de 100 μL por poço. A membrana foi reidratada em tampão SSC a 6X, removida do aparato, submetida a *crosslinking* por luz ultravioleta por 60 segundos, transferida à solução de bloqueio (TBS-T com BSA a 5%) e incubada com agitação por 60 minutos. Ela foi então incubada em TBS-T com estreptavidina conjugada à peroxidase de raiz forte (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) a 0,05μg/mL e BSA a 1%, por 60 minutos, sob agitação. Após duas lavagens com TBS-T e uma com TBS por 5 minutos cada, a membrana foi exposta por um minuto à solução *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, Reino Unido) e posteriormente exposta ao filme *Kodak Biomax XAR* (Sigma, St. Louis, MO).

Extrato nuclear

Para a obtenção de extrato nuclear de córtex cerebral de rato (de acordo com Grabowski, 2005), foi realizada extração de tecido cortical de 20 ratos Wistar jovens (entre P21 e P28). O tecido foi primeiramente acomodado em placas contendo PBS e então transferido para dois homogeneizadores de vidro do tipo Potter-Elvehjem (55mL, Thomas Scientific, Wedesboro, NJ) contendo 32,5mL de tampão de homogeneização (HEPES a 10mM e pH 7,6, KCl a 15mM, EDTA a 1mM, sacarose a 2,2M, glicerol a 5%, espermidina a 0,5mM, espermina a 0,15mM) gelado e homogeneizado três vezes em velocidade máxima (400 RPM) em um homogeneizador Con-torque (Eberbach, Ann Arbor MI). O tecido homogeneizado foi transferido para dois tubos de polipropileno para ultracentrífuga (36mL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e centrifugado em rotor AH-629 de centrífuga Sorvall Pro80 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 140.000 X *g* por uma hora a 4ºC. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados

lavados duas vezes com 0,5mL de tampão C (HEPES a 20mM, pH 7,6, KCl a 20mM, $MgCl_2$ a 1,5mM, glicerol a 25%, ditiotreitol a 0,5mM, EDTA a 0, 2mM) e ressuspendidos em 600µL de tampão C gelado com KCl ajustado para 0,25M. A suspensão foi reunida em um microtubo e centrifugada a 16.000 X *g* por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente ressuspendido em 1,2 mL de tampão C gelado com KCl ajustado para 0,25M. Essa suspensão foi transferida para um homogeneizador de vidro do tipo Douncer (15mL, Kimble Chase, Vineland, NJ), homogeneizada manualmente por 10 minutos em gelo e centrifugada a 16.000 X *g* por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante (cerca de 1mL) foi então estocado a -20ºC. Para controle da qualidade do extrato nuclear durante a padronização do protocolo, as alíquotas obtidas a cada passo do protocolo foram submetidas a coloração por azul de tripano, *Western blotting* com anticorpos anti-histona H2B, anti-histona H4 e anti-Fox-3 (Abcam, Reino Unido). Como alternativa, o extrato nuclear sem imunocoloração foi observado ao microscópio eletrônico.

Tratamento com azul de tripano

Uma alíquota de 100µL coletada dos núcleos em suspensão em tampão C foi corada com 100µL de solução de azul de tripano em PBS, imobilizada em lâmina de vidro e visualizada ao microscópio óptico (Axiovert 4C, Zeiss, Alemanha).

Precipitação por ácido tricloroacético

A cada fração (extrato nuclear e controles) adicionou-se 10% em volume de ácido tricloroacético (TCA) absoluto. As frações foram incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 4ºC por 10 minutos a 12.000 X *g*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com TCA a 10% e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e as frações foram lavadas duas

vezes com acetona a -20ºC e deixadas para secar por 20 minutos. Cada fração foi então ressuspendida em 20µL de tampão ureia (Tris a 45mM, pH 7,2, SDS a 0,9% e ureia a 32,4%) e estocada a -20ºC.

Western blotting

Às amostras precipitadas por ácido tricloroacético foram adicionados 10µL de tampão GSD a 3X (glicerol a 10%, SDS a 1% e ditiotreitol a 1mM, azul de bromofenol a 0,004%). As amostras foram fervidas a 95ºC por 5 minutos e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 14% com SDS (SDS-PAGE). As bandas proteicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada em solução de bloqueio (caseína a 1% em TBS-T) por uma hora, em peróxido de hidrogênio a 10 volumes por dez minutos, em solução contendo anticorpo primário anti-H2B, anti-H4 ou anti-Fox-3 (Abcam, Reino Unido) em TBS-T e BSA a 1% por uma hora, seguida de incubação em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase (GE Healthcare, Reino Unido) a 1:80.000 em TBS-T e BSA a 1% por uma hora. A membrana foi então incubada em solução *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, Reino Unido) e exposta ao filme *Kodak Biomax XAR* (Sigma, St. Louis MO).

Preparo de material para microscopia eletrônica

O *pellet* obtido após centrifugação da suspensão nuclear em tampão C foi incubado em solução de fixação 1 (glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M e sacarose a 3,77%) por 2 horas a 4ºC, lavado três vezes em solução de lavagem (tampão cacodilato a 0,1M e sacarose a 7,5%) por 10 minutos a 4ºC, incubado em solução de fixação 2 (ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M) por uma hora a 4ºC e lavado novamente três vezes com solução de lavagem. O material foi então desidratado em

temperatura ambiente por incubação em álcool 50% por 10 minutos, álcool 70% por 10 minutos, álcool 95% por 15 minutos e álcool 100% por duas vezes de 15 minutos, e então embebido em solução de álcool 100% e resina em proporção 2:1 por 30 minutos, em proporção 1:1 por 60 minutos e em proporção 1:2 por 30 minutos, seguido de embebição em resina pura três vezes por 90 minutos. O material foi emblocado por 72 horas a 58ºC e visualizado em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, Alemanha).

Precipitação por afinidade com contas de sefarose-estreptavidina

O ensaio de precipitação por afinidade foi baseado na afinidade entre a estreptavidina das contas de sefarose e a biotina conjugada a ribonucleotídeos do transcrito. Como transcritos biotinilados, foram usados oligorribonucleotídeos biotinilados em 3' na primeira análise ou transcritos obtidos pela transcrição *in vitro* dos três clones (não-recombinante, tipo-selvagem ou deletado). Os transcritos apresentavam-se biotinilados em 3' ou foram biotinilados durante a transcrição pela incorporação de biotina-16-UTP.

Para o ensaio de precipitação por afinidade, 50µL de contas de estreptavidina-sefarose (GE Healthcare, Reino Unido) foram lavadas três vezes com 200µL de tampão PBS gelado e uma vez com 200µL de tampão C gelado. Após breve centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados 200µL de extrato nuclear para pré-clareamento, sob agitação, por 60 minutos a temperatura ambiente, visando à remoção de moléculas endógenas com afinidade pela estreptavidina ou sefarose. O volume foi centrifugado a 800 X *g* por dois minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Paralelamente, em um microtubo contendo 50µL de contas lavadas em suspensão, foram adicionados 200µL de tampão C, 1µL de RNasin e RNA marcado

com biotina. Para oligorribonuleotídeos biotinilados, foram usados 1, 2 e 5 nmoles nos primeiros ensaios. Foram analisados os resultados obtidos com 5 nmoles de oligorribonucleotideo. Para os transcritos longos, biotinilados a 3' ou em sua extensão, foram utilizados entre 10 e 200 pmoles em cada reação. Os tubos foram agitados a 4ºC por 30 minutos e centrifugados a 2.000 X *g* por 5 minutos. As contas ligadas ao RNA marcado foram então lavadas três vezes com 200µL de PBS contendo RNasin. Após as lavagens, foram adicionados às contas 200µL de extrato nuclear pré-clareado, 1µL de RNasin e 5µg de RNAt. A reação foi incubada sob agitação, a 4ºC por 16 horas, e então centrifugada a 2.000 X *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20ºC para controle. As contas foram lavadas três vezes com 200µL de PBS contendo RNasin, ressuspendidas em 40µL de tampão GSD e estocadas a -20ºC.

Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

A ressuspensão final das contas de estreptavidina do ensaio de precipitação por afinidade foi submetida a SDS-PAGE (10%). O gel foi corado com azul de Coomassie coloidal (Coomassie G-250 a 0,1%, sulfato de amônio a 10%, ácido ortofosfórico a 3% e etanol a 20%, em água destilada) a temperatura ambiente por 16 horas e mantida em solução descorante (metanol a 20% e ácido acético glacial a 8,5%, em água destilada) a temperatura ambiente também por 16 horas. O gel correspondente a cada canaleta foi cortado em fatias para serem analisadas por espectrometria de massas Para as análises com oligorribonucleotídeos biotinilados, três regiões foram selecionadas e recortadas do gel: a região A, abrangendo bandas de massa estimada entre 144 e 174kDa; a região B, entre 56 e 70kDa; e a região C, entre 40 e 50kDa. Para transcritos obtidos in vitro a partir dos clones de DNA, cada danaleta foi inteiramente fatiada e teve todo seu conteúdo analisado por espectrometria de massas.

Análise por espectrometria de massas

A análise das proteínas por espectrometria de massas foi feita como prestação de serviço no *Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval* (Québec, Canadá). Fatias do gel em regiões de interesse foram cortadas e suspensas em água e, já no Canadá, digeridas com tripsina, como descrito previamente (Jeronimo e col., 2007). Os peptídeos trípticos resultantes foram purificados e identificados por espectrometria de massas (LC-MS/MS) com a seguinte configuração: microcapilares com colunas de fase reversa e sob alta pressão, acoplados a espectrômetro de massas com analisador do tipo íon quadrupolo DecaXP LCQ (ThermoFinnigan) ou LTQ-LTQ Orbitrap (ThermoElectron) e ionizador do tipo *nanospray*. Os resultados recebidos por correio eletrônico foram analisados com o *Scaffold 4 proteomic software*.

Análises comparativas

Foram consideradas interações positivas aquelas com pelo menos dois peptídeos com probabilidade de identidade proteica maior que 95% pelo *Scaffold 4 proteomic software* com base no *SwissProt.* Para os ensaios com oligorribonucleotídeos, foram consideradas as proteínas representadas mais significativamente associadas aos oligorribonucleotídeos em comparação ao controle negativo (degenerado). Para os resultados dos ensaios que empregaram transcritos dos clones, foram consideradas as proteínas presentes unicamente no grupo tipo-selvagem, i.e., ausentes ou representadas sem atingir os critérios acima nos grupos não-recombinante ou deleção. As proteínas restantes foram avaliadas quanto à distribuição nuclear,, à ontologia gênica, à presença de domínios de ligação a RNA (http://www.uniprot.org) e aos relatos na literatura científica de função ativadora de *splicing*.

IV. Resultados

Produção de iscas de RNA biotinilado

Este trabalho baseou-se em dois clones de DNA genômico, gerados em nosso laboratório, como reagentes para a análise de elementos transcritos e proteínas ativadoras do *splicing* do éxon 12 do gene *Fmr1*. O primeiro clone constitui o tipo-selvagem e contém a sequência genômica do *Fmr1* de rato desde a primeira base do éxon 11 até a última base do éxon 13, inserida em vetor plasmidial pcDNA3.1 .O segundo clone consiste na mesma sequência que o tipo-selvagem, no vetor pcDNA3.1, porém com uma deleção de 160pb na sequência do íntron 12 (bases 11 a 170), gerada a partir da digestão do clone original por *Xmn*I e exclusão de segmento disposto entre dois sítios de restrição para essa enzima (Fig. 4, Velloso, 2008). O segmento deletado contém elementos em *cis* identificados *in silico* como ISE em camundongo. Estas análises foram revistas e são apresentadas na Figura 5. Análise prévia de expressão do clone deletado em células C6 mostrou redução da inclusão do éxon 12 no RNAm em relação ao tipo-selvagem (Velloso, 2008), sugerindo que o segmento deletado contenha acentuador(es) em potencial do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1 in vivo*.

Os clones não-recombinante, tipo-selvagem e deletado, disponíveis em nosso laboratório, tiveram o DNA analisado por sequenciamento de Sanger para confirmação da integridade de suas sequências (dados não mostrados). Após o preparo do DNA plasmidial de cada clone por restrição e desfosforilação, eles foram submetidos à subclonagem com o adaptador NotI(dA_{40}/dT_{40})XhoI e os clones obtidos foram triados pela PCR para identificação das colônias recombinantes (Fig. 6A e B).

Sete, cinco e quatro colônias triadas foram identificadas como recombinantes respectivamente para os clones inicialmente não-recombinante, tipo-selvagem e

deletado, tendo sido denominados NR-poli(dA), WT-poli(dA) e DEL-poli(dA). Uma vez devidamente dosados, os clones recombinantes poli(dA) foram submetidos a digestão pela enzima de restrição *Xho*I para linearização, um passo necessário à transcrição *in vitro* (dados não mostrados).

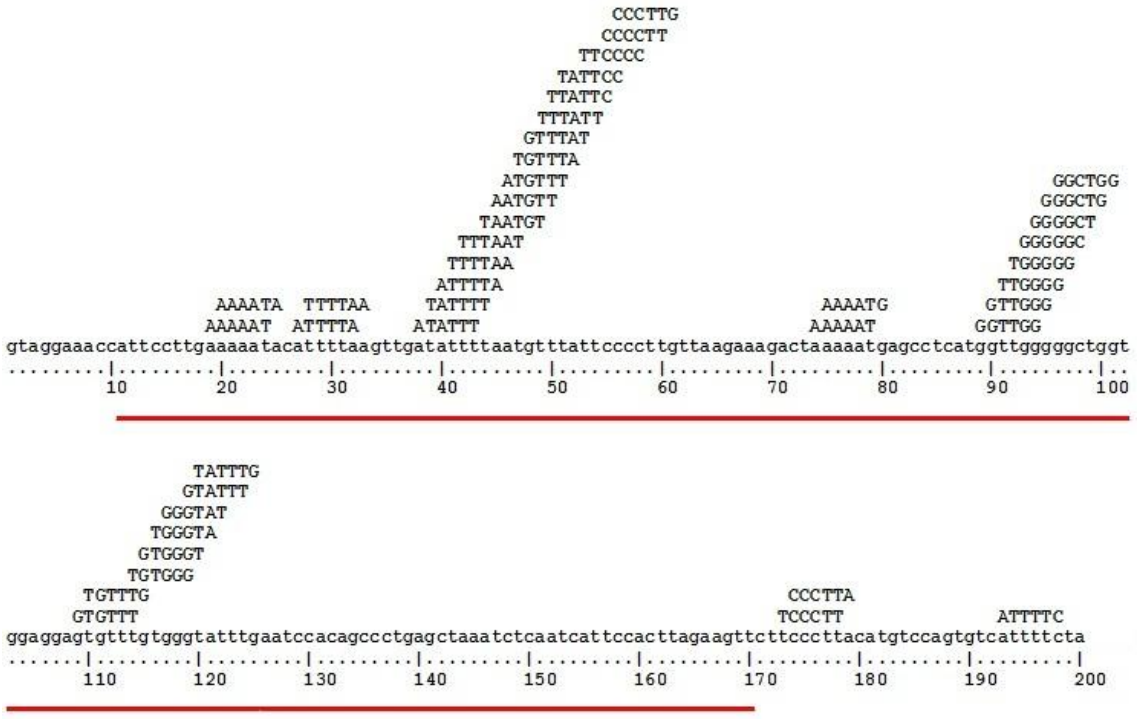

Figura 5: Representação gráfica do segmento deletado do íntron 12 (sublinhado) e dos elementos candidatos a acentuadores de *splicing* (ISE) contidos nele, identificados pela ferramenta *Acescan2* (*http://genes.mit.edu/acescan2/index.*html). Encontram-se representadas somente as 200 bases iniciais deste íntron.

Os produtos da transcrição *in vitro* sem biotina foram verificados em gel (Fig. 7) antes de serem capturados por contas de celulose-oligo(dT) por afinidade a poli(dA) e biotinilados em 3'.

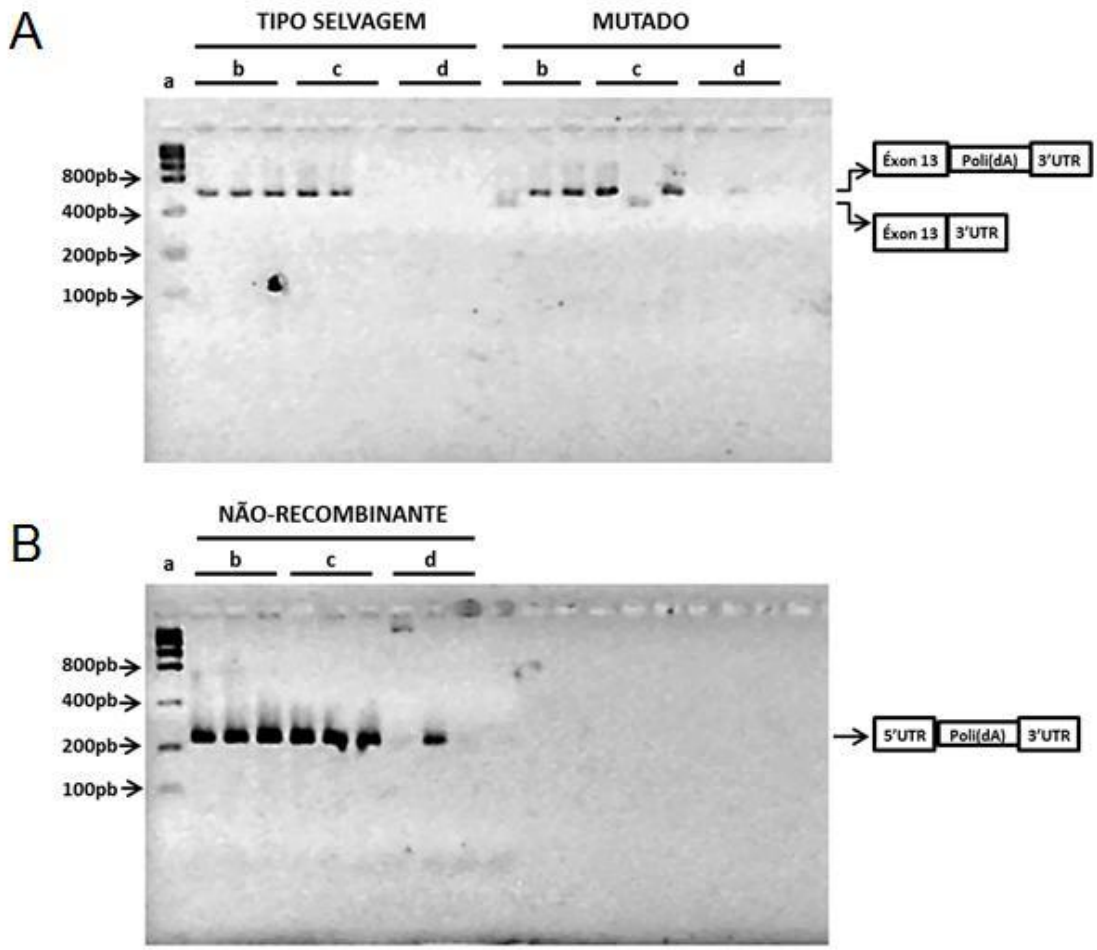

Figura 6: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio em que foram submetidas à eletroforese: (a) padrão de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* com bandas correspondentes a 100pb, 200pb, 400pb e 800pb indicadas, 2µL; (b) produtos amplificados por PCR a partir de DNA de colônias de *E. coli* transformadas com DNA ligado em proporção molar de 1:3 de vetor e inserto; (c) produtos amplificados por PCR a partir de DNA de colônias transformadas com DNA ligado em proporção molar de 1:6 de vetor e inserto; (d) produtos amplificados por PCR a partir de DNA de colônias transformadas com DNA ligado em proporção de 1:9 de vetor e inserto. Para os clones tipo-selvagem e deletado (A), utilizaram-se iniciador senso hibridando a 5' do éxon 13 do *Fmr1* do inserto (veja Figura 4) e iniciador anti-senso hibridando no vetor, com bandas de tamanho esperado de 565pb para colônias positivas. Para o vetor não-recombinante (B), utilizaram-se iniciadores senso e anti-senso hibridando no vetor, com bandas de tamanho esperado de 224pb para colônias positivas. A composição das bandas obtidas está indicada à direita de acordo com o diagrama dos clones representado na Figura 4 (seção de Material e Métodos). Algumas bandas obtidas na triagem do clone deletado, de tamanho menor que o esperado e também esquematizadas acima, provavelmente representam colônias portando vetor sem o inserto (tamanho aproximado de banda de 525pb).

Os transcritos produzidos pela transcrição *in vitro* com marcação interna por biotina e aqueles obtidos após passos consecutivos de transcrição, seleção em matriz de celulose-oligo(dT) e biotinilação terminal foram submetidos a *dot blotting*, com diluições seriadas, em membrana de nylon e detecção por estreptavidina conjugada a peroxidase. (Fig. 8).

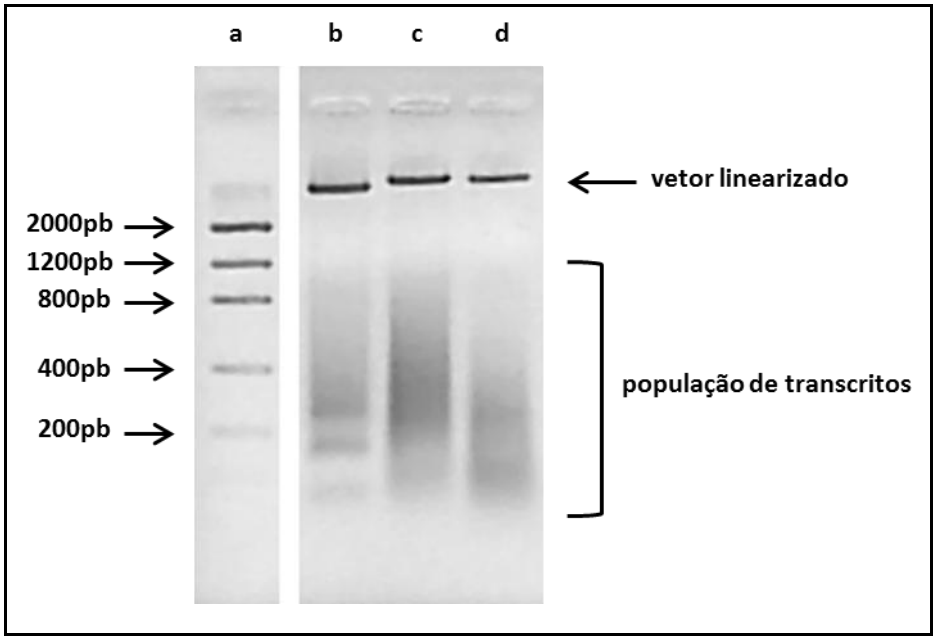

Figura 7: Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio em que foram submetidas à eletroforese: (a) padrão de peso molecular *Low Mass DNA Ladder*, com bandas correspondentes a 200pb, 400pb, 800pb, 1200pb e 2000pb indicadas; (b - d) produtos da reação de transcrição *in vitro* sem marcação com biotina, sendo (b) clone não-recombinante, (c) clone tipo-selvagem e (d) clone mutado. Embora a população de transcritos, marcada à direita, pareça ter extensões médias entre 200 a 800 bases, o padrão de tamanho de DNA é para fita dupla e não se adequa à estimativa de bases da fita simples do RNA neste gel não-desnaturante.

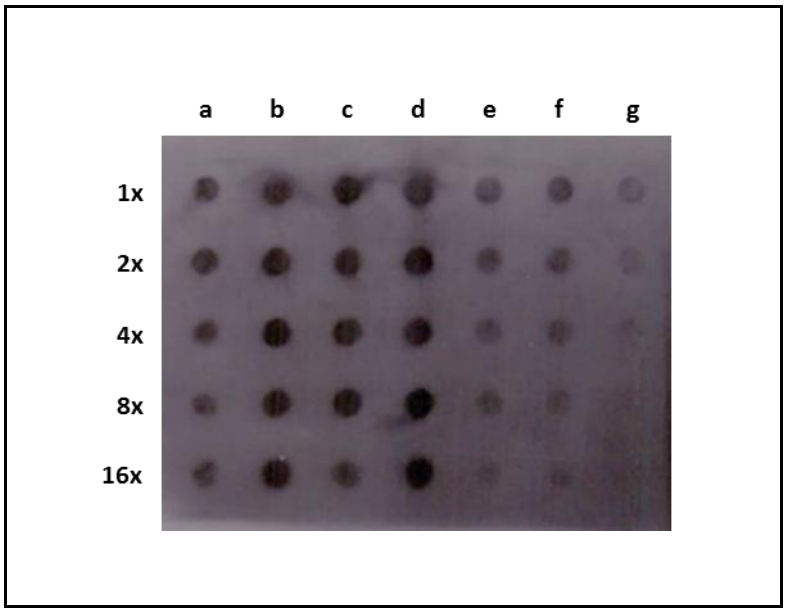

Figura 8: *Dot blotting* para dosagem de RNA biotinilado, com diluições seriadas marcadas à esquerda, inciadas a partir de 10μL de RNA não dosado. As amostras correspondem a: (a) transcrição *in vitro* com marcação interna do clone não-recombinante, (b) transcrição *in vitro* com marcação interna do clone tipo-selvagem, (c) transcrição *in vitro* com marcação interna do clone deletado, (d) controle positivo do *kit* de biotinilação em 3', (e) biotinilação terminal (3') de produtos de transcrição do clone não-recombinante, (f) biotinilação terminal (3') de produtos de transcrição do clone tipo-selvagem e (g) biotinilação terminal (3') de produtos de transcrição do clone deletado.

Extratos nucleares

Baseando-nos no protocolo estabelecido por Grabowski (2005), padronizamos o protocolo para obtenção de extratos nucleares. Os extratos, assim como os controles coletados durante o procedimento, foram submetidos a *Western blotting* com anticorpos para proteínas nucleares para análise de sua integridade e sua composição (Fig. 9). Uma vez que se verificou que o extrato continha núcleos íntegros, sem contaminação aparente por outras organelas, procedeu-se à lise mecânica dos núcleos através de homogeneizadores de vidro do tipo Douncer, liberando assim as proteínas nucleares ao extrato (dados não mostrados).

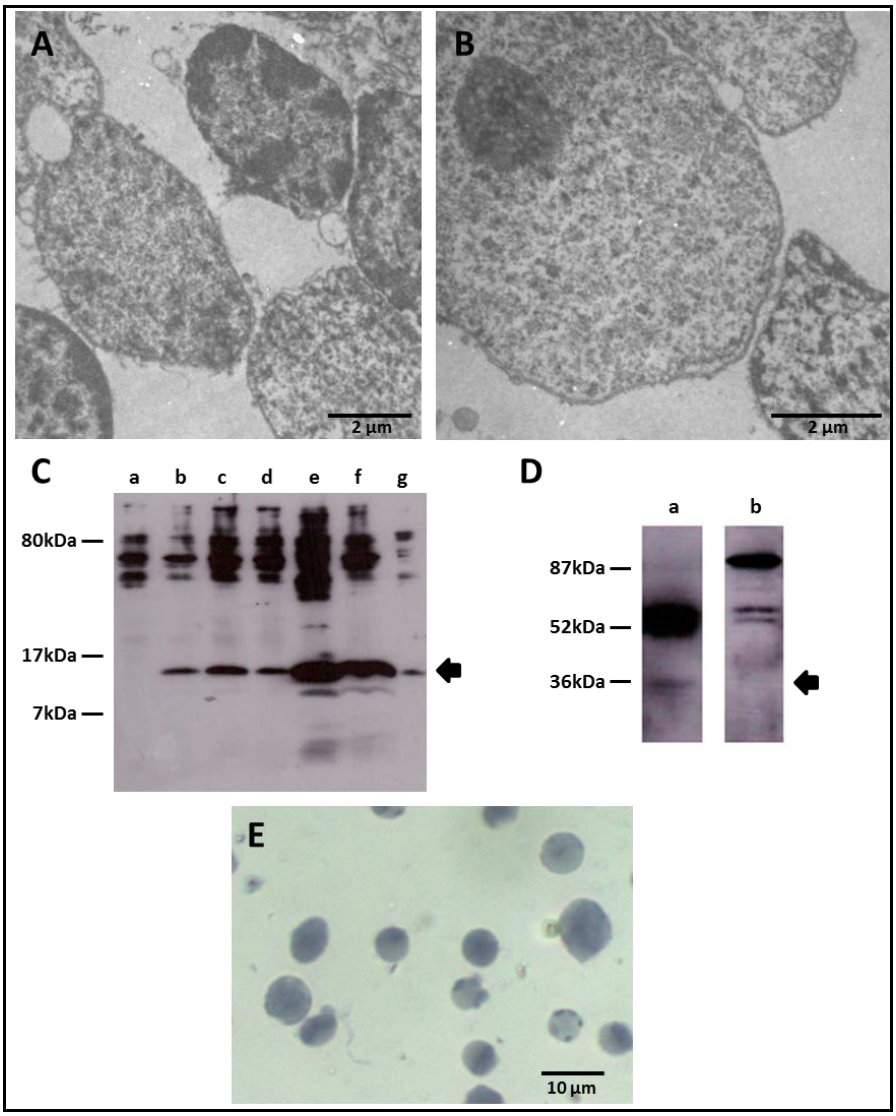

Figura 9: Análise de integridade nuclear e composição proteica de extratos nucleares de córtex cerebral de ratos Wistar em P21-P28. (A) e (B) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de núcleos íntegros obtidos dos extratos. (C) *Western blot* realizado com anticorpo policlonal de coelho específico para histona H4 (1:1.000). As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE a 14%, na seguinte ordem: (a) extrato nuclear, (b) tecido cortical não-homogeneizado, (c) tecido cortical homogeneizado, (d) sobrenadante após ultracentrifugação a 140.000 X *g*, (e) *pellet* após ultracentrifugação a 140.000 X *g*, (f) camada superior após ultracentrifugação a 140.000 X *g*, (g) *pellet* após centrifugação a 14.000 X *g*. Bandas de massas moleculares relevantes, indicadas pelo padrão (não mostrado), estão marcadas à esquerda da figura. A banda correspondente às histonas H4, de cerca de 14KDa, está indicada pela seta à direita da figura. (D) *Western blot* realizado com anticorpo policlonal de coelho específico para Fox-3 (1:2.500), com amostras aplicadas em gel SDS-PAGE a 14%: (a) pellet após centrifugação a 14.000 X *g*, (b) sobrenadante da mesma centrifugação. Bandas de massas moleculares relevantes, indicadas pelo padrão (não mostrado), estão marcadas à esquerda da figura. A banda correspondente à proteína Fox-3, de cerca de 36 kDa, está indicada pela seta à direita da figura. (E) Núcleos após ressuspensão em tampão C corados com azul de tripano.

Análises por espectrometria de massas: oligorribonucleotídeos biotinilados

Os resultados de espectrometria de massas dos géis de produtos de ensaios de precipitação por afinidade (Fig. 10) foram considerados significativos se houvesse pelo menos dois peptídeos com 95% de identidade à proteína.

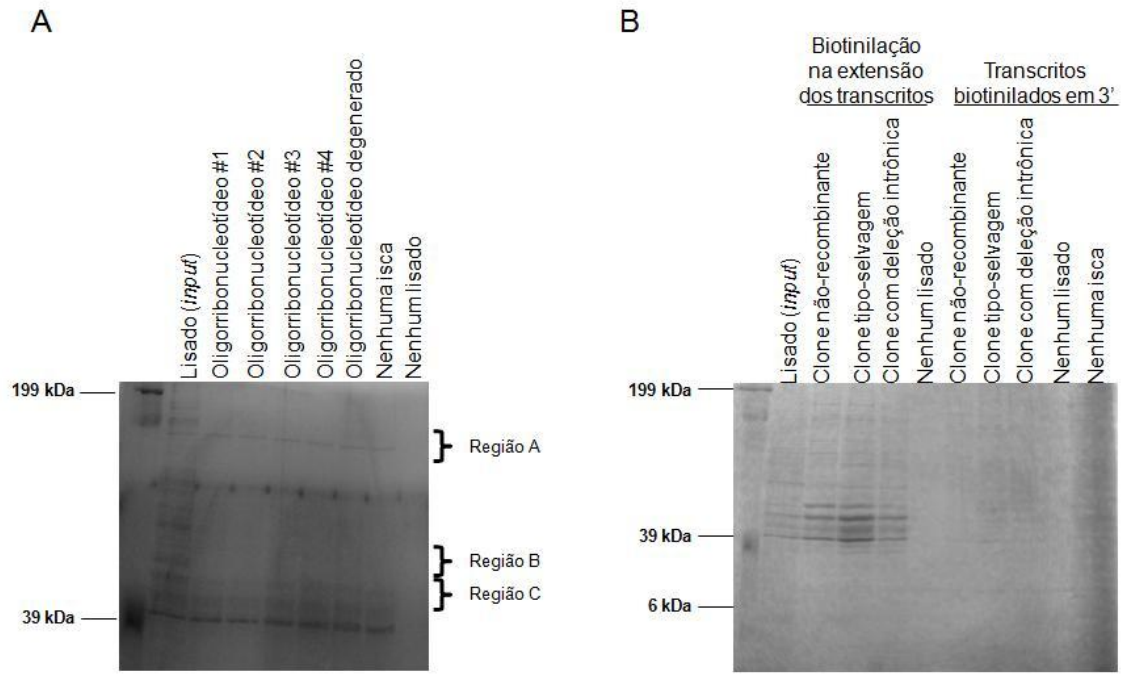

Figura 10: Análise dos perfis eletroforéticos (SDS-PAGE a 10%, corado com azul de Coomassie) dos produtos de ensaios de precipitação por afinidade entre extrato nuclear de córtex cerebral de rato e sondas de RNA, sendo (A) oligorribonucleotídeos biotinilados, como indicados; e (B) transcritos da expressão dos clones, como indicado. Em (B), há resultados de transcritos que foram biotinilados em sua extensão durante a transcrição in vitro e transcritos biotinilados em 3'. O padrão de massa molecular na primeira canaleta de cada gel corresponde ao Kaleidoscope (Bio-Rad). Os controles negativos em cada ensaio são a ausência de lisado (nenhum lisado) ou de isca (nenhuma isca). Em (A), regiões A, B e C do gel correspondem à localização das bandas que foram retiradas das canaletas de cada um dos cinco oligorribonucleotídeos. Em (B), cada canaleta de resultado de clones foi fatiada e teve todo seu conteúdo submetido à análise por espectrometria de massas.

Foram identificadas 40, 53 e 28 proteínas para respectivamente as regiões A, B e C do gel de produtos dos ensaios de precipitação por afinidade aos oligorribonucleotídeos biotinilados. Após descartarem-se os contaminantes conhecidos

para esse tipo de análise, como queratinas e componentes da reação de digestão das bandas (tripsina, albumina, inibidores de nucleases e proteases), o número de proteínas únicas ficou reduzido para 18, 23 e 11 para as respectivas regiões A, B e C. Estas, por sua vez, foram triadas e agrupadas de acordo com os critérios: (a) localização subcelular; (b) compatibilidade entre massa estimada e massa observada; (c) presença de domínios de ligação a RNA; e (d) ligação mais significativa às sondas específicas do que à do controle negativo (sonda degenerada). A Figura 11 ilustra as proteínas de acordo com sua distribuição subcelular entre o núcleo e/ou citoplasma.

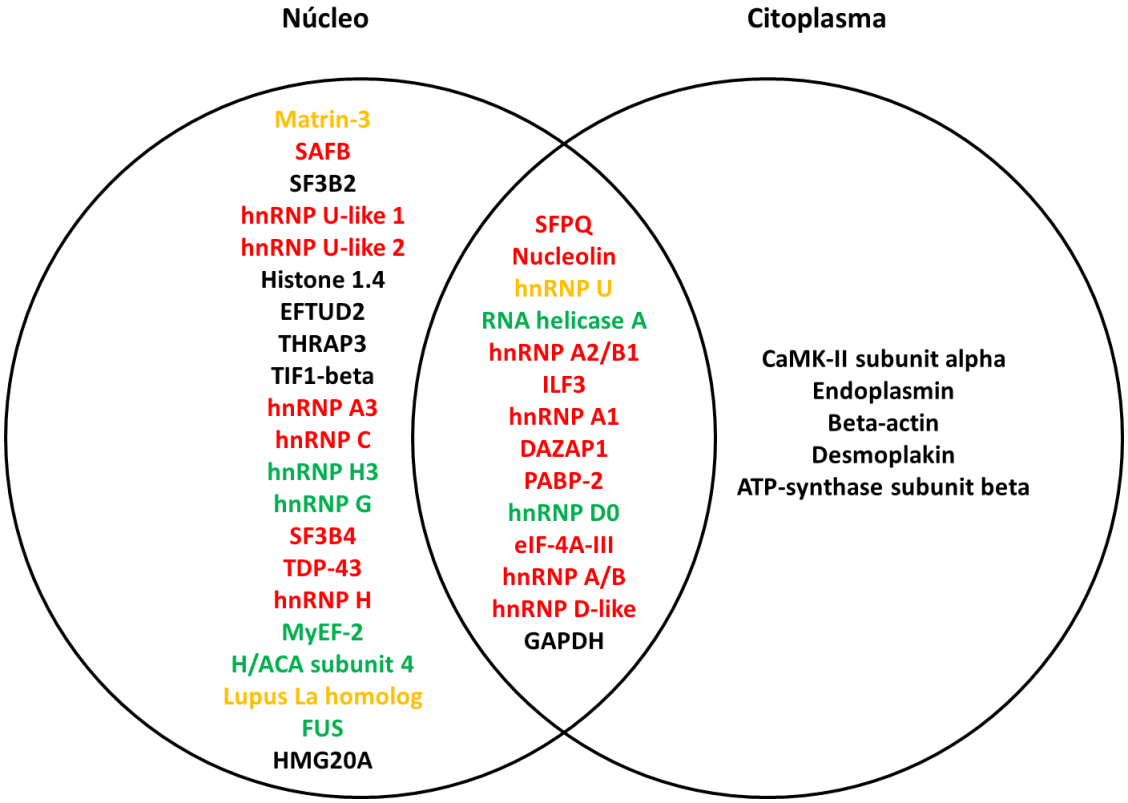

Figura 11: Diagrama de Venn mostrando a distribuição nuclear e/ou citoplasmática para as proteínas identificadas por espectrometria de massas para as reações de precipitação por afinidade entre extrato nuclear e oligorribonucleotídeos biotinilados em 3'. As cores representam sua classificação após triagem (verde: preenchem todos os critérios da análise; amarelo: massa observada difere ligeiramente da estimada; vermelho: massa observada difere significativamente da estimada ou ligação inespecífica às sondas; preto: localização exclusivamente citoplasmática, ou não possui domínio descrito de ligação a RNA.

Descartando-se as proteínas sem domínios descritos de ligação a RNA ou aquelas exclusivamente citoplasmáticas, obtivemos 28 proteínas candidatas a interagirem *in vivo* com a região do íntron 12 do *Fmr1* coberta pelos oligorribonucleotídeos (Tabela 3).

Tabela 3: Proteínas identificadas em ensaios com oligorribonucleotídeos e seus respectivos domínios de ligação a RNA.

Proteína*/Número de acesso	Tipo de domínio**	Ontologia gênica
ATP-dependent RNA helicase A/D4A9D6	DSRM	Processamento de RNAm
DAZ-associated protein 1/Q4KLZ3	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
Eukaryotic initiation factor 4A-III/Q3B8Q2	N.D.***	*Splicing* de pré-RNAm
H/ACA ribonucleoprotein subunit 4/P40615	RRM	Processamento de RNAr
hnRNP A1/P04256	RRM/RGG	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP A3/Q6URK4	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP A/B/Q9QX81	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP A2/B1/A7VJC2	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP C/P17132	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP D0/Q9JJ54	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP D-like/Q3SWU3	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP G/Q4V898	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP H/Q8VHV7	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP H3/D4ABK7	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP U/Q6IMY8	RGG	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP U-like 1/D4A962	SAP	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP U-like 2/D4ABT8	SAP	N.D.***
Interleukin enhancer-binding factor 3/Q9JIL3	DSRM	Regulação transcricional
Lupus La protein homolog/P38656	LA/RRM	Processamento de RNAm
Matrin-3/P43244	RRM	Matriz nuclear
Myelin expression factor 2/D4AEI5	RRM	Regulação transcricional
Nucleolin/P13383	RRM	Processamento de RNAr
Polyadenylate-binding protein 2/G3V7Z8	RRM	Processamento de RNAm
RNA-binding protein FUS/Q5PQK2	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
Scaffold attachment factor B1/O88453	RRM	Organização da cromatina
Splicing factor 3B subunit 4/Q6AYL5	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
Splicing factor proline-glutamine-rich/Q4KM71	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
TAR DNA-binding protein 43/I6L9G6	RRM	*Splicing* de pré-RNAm

*Proteínas listadas em inglês de acordo com a descrição no banco *UniProt* (http://www.uniprot.org). **Domínios: DSRM (*double-stranded RNA binding motif*); RRM (*RNA recognition motif*); RGG (*arginine and glicine rich*); SAP (*SAF-A/B, Acinus and PIAS DNA/RNA binding motif*); LA (*La RNA-binding protein domain*). ***N.D.: não determinado.

Das 28 proteínas listadas na Tabela 3, 18 possuem atuação descrita no *splicing* de pré-RNAm, três no processamento de RNAm e duas na regulação da transcrição gênica (Tabela 3). Entre essas 18 proteínas, sete mostraram-se negativas no controle com oligorribonucleotídeo degenerado, ao contrário das demais que apresentaram um peptídio identificado ou mais do que um peptídio por proteína embora com uma diferença grande para os grupos-teste. As sete proteínas ausentes no controle negativo são hnRNPs. Cinco delas, hnRNPU-like 1, hnRNP P2, hnRNP H3, hnRNP A1 e hnRNP U, foram detectadas somente por um dos quatro oligorribonucleotídeos-teste. Duas hnRNPs (D e A3) foram identificadas por três e dois oligorribonucleotídeos, respectivamente (Fig. 12).

Análises por espectrometria de massas: transcritos biotinilados

Considerando-se apenas os resultados com pelo menos dois peptídeos com 95% de identidade ou mais, foram identificadas 591 e 687 proteínas para os ensaios de precipitação por afinidade aos transcritos biotinilados em toda sua extensão e apenas a 3', respectivamente. Após descartarem-se os contaminantes e as proteínas com ligação inespecífica, i.e., aquelas que também interagiram com o controle negativo não-recombinante, esse número foi reduzido para 18 e 14, respectivamente. Assim como no caso dos ensaios com oligorribonucleotídeos, foi possível identificar enriquecimento de proteínas nucleares (dados não mostrados). A Tabela 4 enumera, entre as proteínas identificadas, as que possuem domínios descritos de ligação a RNA. Dessas 14 proteínas, dez estão descritas na literatura como atuando no *splicing* de pré-RNAm, três no processamento de RNAm e uma na regulação da transcrição gênica. Uma das proteínas com função de *splicing* de pré-RNAm (hnRNP U-like 1, Tabelas 3 e 4) havia

sido identificada pela estratégia de precipitação por afinidade com o oligorribonucleotídeo biotinilado.

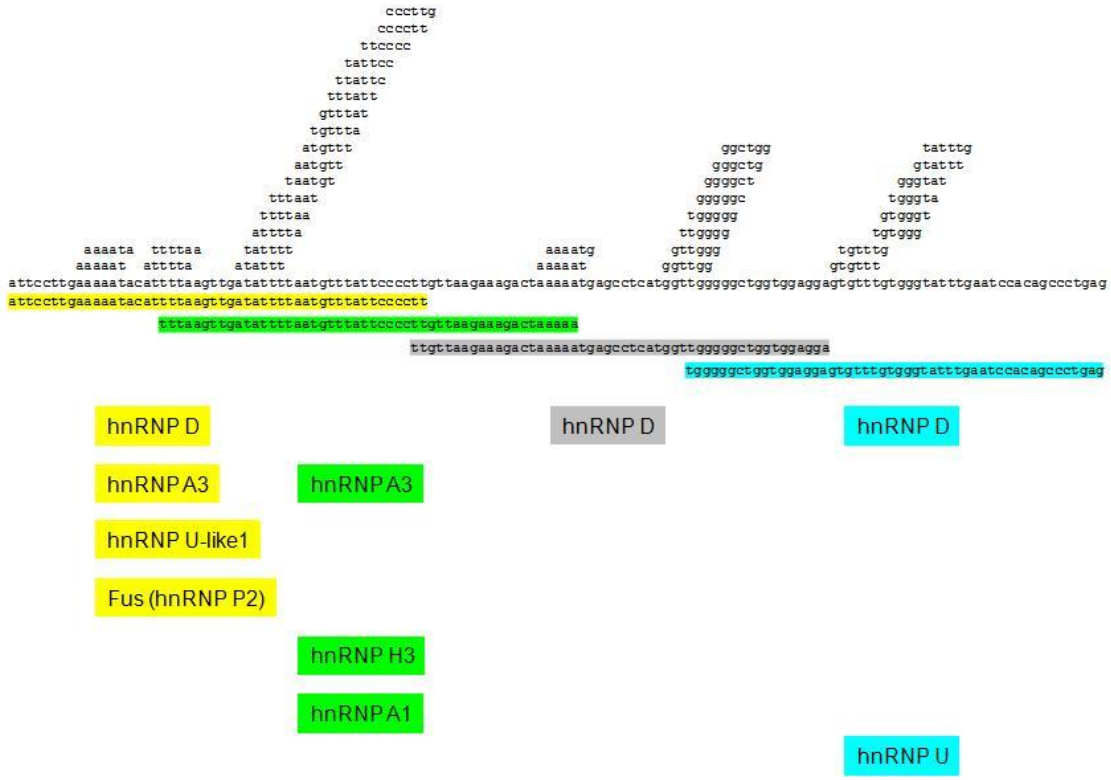

Figura 12: Ilustração do segmento do íntron 12 do *FMR1* e os candidatos a ISE previamente identificados *in silico* (painel superior). Abaixo desta sequência, encontram-se os quatro oligorribonucleotídeos (em amarelo, verde, cinza ou azul) cujas sequências se sobrepõem. Acrônimos isolados dispostos abaixo dos oligorribonucleotídeos identificam as proteínas nucleares, com domínios de ligação a RNA e função em potencial de regulação do *splicing* do pré-RNAm, que foram capturadas por cada um dos oligorribonucleotídeos identificados pela mesma cor e alinhados a elas. Acrônimos repetidos na mesma linha correspondem a proteínas identificadas por diferentes oligorribonucleotídeos. Estão representadas aqui somente aquelas proteínas cujo resultado foi negativo para o oligorribonucleotídeo degenerado.

Em resumo, em relação às três estratégias utilizadas para geração de transcritos biotinilados compreendendo parte ou todo íntron 12 do *Fmr1*, os resultados revelaram um total de 27 proteínas não-redundantes, contendo domínios de ligação a RNA,

distribuição nucear e função atribuída de regulação de *splicing* de pré-RNAm, que se tornaram candidatas a regulação do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1*.

Tabela 4: Proteínas identificadas em ensaios com transcritos biotinilados e seus respectivos domínios de ligação a RNA.

Proteína*/ Número de acesso	**Tipo de domínio****	**Ontologia gênica**
Biotinilação integral		
Far upstream element-binding protein 1/Q32PX7	KH	Regulação transcricional
Far upstream element-binding protein 2/Q99PF5	KH	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP A0/F1M3H8	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
hnRNP U-like 1/ D4A962	SAP	*Splicing* de pré-RNAm
RNA-binding protein 6/D4ACW0	RRM	Processamento de RNAm
RNA binding protein fox-1 homolog 2/A1A5R1	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
Serine/arginine-rich splicing factor 4/G3V798	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit/F2Z3T9	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
U1 small nuclear ribonucleoprotein A/Q5U214	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa/B2RZ74	RRM	*Splicing* de pré-RNAm
U2-associated SURP-containing protein/D3ZAI0	RRM	Processamento de RNAm
Biotinilação a 3'		
Cleavage stimulation factor subunit 3/F1M4W7	HAT	Processamento de RNAm
Sam68-like mammalian protein 1/Q920F3	KH	*Splicing* de pré-RNAm
Protein Son/F1MAQ7	G-patch	*Splicing* de pré-RNAm

*Proteínas listadas em inglês de acordo com a descrição no banco *UniProt* (http://www.uniprot.org).
**Domínios: KH (*hnRNP K-homology domain*); RRM (*RNA recognition motif*); SAP (*SAF-A/B, Acinus and PIAS DNA/RNA binding motif*); HAT (*Half a TPR*); G-patch (*glycine patch*).

V. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo o levantamento de proteínas candidatas à ativação do *splicing* do éxon 12 do gene *Fmr1*, tendo como alvo um segmento de 160 bases do íntron 12 do *Fmr1* (bases 11 – 170), o qual apresenta sequências curtas que, quando transcritas, constituem candidatas a acentuadoras de *splicing*. Este segmento alvo foi, desde o início, devido a seu tamanho, um impedimento para a síntese de um único oligorribonucleotídeo biotinilado. Por isso, optamos pela síntese de quatro oligorribonucleotídeos cobrindo quase toda a extensão do segmento deletado e apresentando certa sobreposição de sequência, além de um oligonucleotídeo degenerado como controle negativo (Fig. 12). Apesar de se tratar de uma estratégia com certo viés, uma vez que as sondas sintetizadas provavelmente não possuem a estrutura secundária da região intrônica *in vivo*, acreditamos que ainda seria factível analisar sua interação com elementos em *trans* de regulação do *splicing*, que podem ser guiados mais por reconhecimento de sequência do que de estrutura.

Como estratégia paralela, utilizamos produtos da transcrição *in vitro* de DNA de clones de segmento genômico do *Fmr1*. Esta estratégia, por sua vez, contava com a dificuldade de se tratar de um segmento genômico longo gerando um transcrito de cerca de 3kb, o que poderia levar a um baixo rendimento na reação de transcrição *in vitro*, assim como à produção de transcritos incompletos. A questão do rendimento foi razoavelmente resolvida pela transcrição em massa dos clones, chegando a quantidades finais de até 200 pmoles, a qual se revelou satisfatória, dada a alta sensibilidade das análises por espectrometria de massas. Tentou-se contornar a questão da produção de transcritos incompletos pela adição do adaptador poli(dA) nos vetores, aumentando a probabilidade de captura de apenas transcritos em sua integridade. Entretanto, o baixo

rendimento de RNA pós-captura permite concluir que havia elevada quantidade de transcritos parciais, obtidos *in vitro*. Esse rendimento não permitiu a observação dos produtos capturados em gel. Assim, não podemos excluir a possibilidade de captura de transcritos por afinidade com segmentos internos ricos em adenina. Ambas as estratégias de biotinilação dos transcritos - ao longo de sua extensão, durante a transcrição *in vitro* ou na extremidade 3', após transcrição *in vitro* - mostraram-se satisfatórias ao se verificar o sinal por *dot blotting* (Fig. 8).

O protocolo no qual nos baseamos para a obtenção de extratos nucleares, estabelecido pela Profa. Paula Grabowski (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA), consiste em um fluxo de trabalho relativamente simplificado se comparado a protocolos anteriores a este. A etapa de padronização deste protocolo (Fig. 13) constituiu um passo fundamental no projeto de pesquisa porque, além de propiciar um enriquecimento considerável de proteínas nucleares no extrato, as condições estabelecidas permitem a realização de *splicing in vitro* no futuro (Grabowski et al., 2005).

O sucesso na obtenção de um extrato enriquecido em proteínas nucleares pôde ser avaliado por microscopia ótica e eletrônica de transmissão e por *Western blotting* com anticorpo anti-Fox-3, uma proteína de expressão neuronal, localizada majoritariamente no núcleo celular e utilizada como marcador de neurônios pós-mitóticos (Kim e col., 2009; Fig. 9), além da análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas (Fig. 11 e Tabelas 3 e 4). A correspondência com a Profa Grabowski foi essencial ao entendimento da correta ressuspensão dos núcleos celulares presentes no precipitado após a centrifugação a 16.000 X *g* (Fig. 13, P16a), pela homogeneização manual com homogeneizador de vidro do tipo Douncer, permitindo a lise dos núcleos e a solubilização das proteínas do seu conteúdo, as quais então se apresentaram no sobrenadante (Fig. 13, S16b).

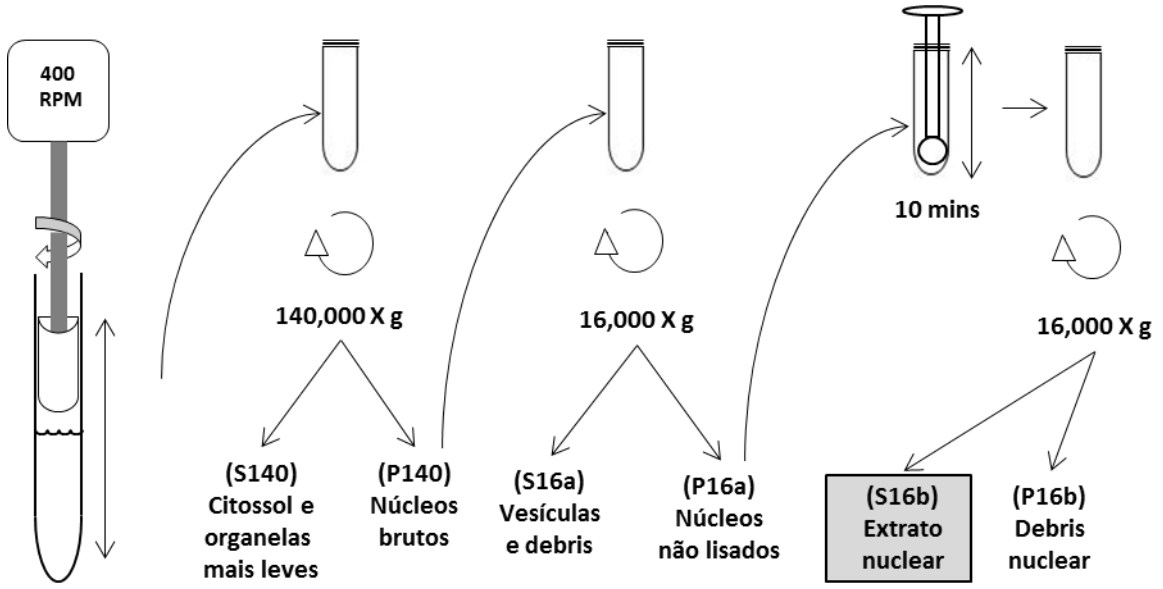

Figura 13: Esquematização do protocolo para obtenção de extrato nuclear de córtex cerebral de rato (P21-P28). A homogeneização do tecido em tampão de homogeneização, através de homogeneizador do tipo Con-torque, a 400 RPM, e frascos Potter-Elvehjem, com movimentos verticais do pistilo, é seguida por centrifugação a 140,000 X *g*. O precipitado obtido (P140) é ressuspendido em tampão C com KCl ajustado para 250mM e submetido a nova centrifugação a 16.000 X *g*. O precipitado obtido (P16a) é novamente ressuspendido em tampão C com KCl a 250mM e homogeneizado manualmente, com homogeneizador de vidro do tipo Douncer, por 10 minutos, e então centrifugado a 16.000 X *g*. O sobrenadante obtido (S16b) contém as protéinas nucleares em suspensão.

Os esforços do grupo da Profa Grabowski (Univ. Pittsburgh) em padronizar o protocolo de extrato nuclear de tecido cortico-cerebral de rato (P21-P28) foram muito importantes à área de estudo do *splicing* do pré-RNAm. Extratos realizados anteriormente eram baseados nos protocolos para análise de transcrição gênica, os quais rendiam produtos mais ricos em nucleases que impossibilitavam a realização de *splicing in vitro*. A diminuição da concentração de íons monovalentes reduziu a possibilidade de lise nuclear. Outro aspecto fundamental é a presença de substância branca em excesso, a qual prende os núcleos em sua trama, como o que se observou no material aplicado na canaleta *f* do gel da Figura 9C, que corresponde à coleta do que fica no topo do tubo

após centrifugação a 140.000 X *g*. Para minimizar a contaminação de substância branca nos extratos nucleares, não se utilizam ratos mais velhos, mas somente até o final do primeiro mês pós-natal. No nosso caso, essa observação foi conveniente porque se observa nessa idade (P21-P28) bons níveis de isoformas da FMRP que expressam o éxon 12 do *FMR1*. Por outro lado, ratos mais jovens não são recomendados porque apresentam um rendimento muito baixo, impondo-se o uso de um número excessivamente alto de animais (revisto por Grabowski, 2005).

Proteínas identificadas em ensaios com oligorribonucleotídeos

Para os ensaios com oligorribonucleotídeos biotinilados, o número de proteínas identificadas para cada região do gel foi relativamente baixo, ficando entre 20 e 50 por região do gel (A, B ou C). Após o descarte de proteínas contaminantes, obtivemos um total de 40 proteínas únicas com pelo menos 95% de similaridade com as sequências de referência e dois ou mais peptídeos identificados. Desse total, aquelas que estavam descritas como sendo exclusivamente citoplasmáticas, assim como aquelas sem domínios descritos de ligação a RNA, foram descartadas, resultando em uma lista de 28 proteínas com possibilidade de interação direta com RNAm *in vivo*. A triagem que se seguiu levou em consideração dois fatores: se a massa esperada para a proteína correspondia à região do gel na qual ela foi observada, e se essa proteína interagia mais significativamente com as sondas de RNA contendo sequências genômicas internas à deleção no íntron 12 do que com a sonda de RNA degenerado. Esses critérios, no entanto, são flexíveis. Primeiramente, a concentração do gel SDS-PAGE utilizada (10%) possui resolução satisfatória apenas em uma faixa definida; assim, pode haver distorção entre a marcação observada no padrão de peso molecular e a real massa de uma proteína da amostra.

Além disso, a utilização de uma sonda de RNA degenerado como controle negativo exige cautela. A opção por utilizar uma sonda degenerada se deu por receio de escolhermos, por exemplo, uma sequência anti-senso como controle negativo que acidentalmente tivesse sítios para interação com elementos regulatórios. Uma sonda degenerada, no entanto, é uma população de sondas com sequências possivelmente aleatórias. Ainda que dentro dessa população possa haver RNAs com sítios para interação com elementos em *trans*, eles estarão sub-representados em relação ao total, então a alternativa nos pareceu viável. Os vieses dessa opção de controle negativo seriam tanto discriminar entre o ruído basal de interações verdadeiramente positivas e específicas, quanto analisar a interação com proteínas que, por sua vez, também apresentam domínios de ligação a sequências degeneradas como os elementos em *cis* reguladores do *splicing* e seus fatores em *trans*.

Após triarmos as proteínas identificadas através desse ensaio, foi possível classificá-las qualitativamente em relação à sua probabilidade de interagir *in vivo* com a região do íntron 12 do *Fmr1* com potenciais acentuadores do *splicing* (Fig. 11). Das 28 proteínas consideradas, 18 possuem atuação descrita no *splicing* de pré-RNAm, três no processamento de RNAm e duas na regulação da transcrição. Das proteínas com envolvimento no *splicing*, três já foram descritas como ativadoras: DAZAP1 (Choudhury e col., 2014), hnRNP A/B (Martinez-Contreras e col., 2006) e hnRNP G (Nasim e col., 2003). Outras, inclusive algumas hnRNPs, não parecem ter sido estudadas extensivamente, deixando aberta a possibilidade de atuarem como ativadoras do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1*.

Proteínas identificadas em ensaios com transcritos biotinilados

No caso dos transcritos biotinilados, uma vez que as canaletas foram submetidas para análise em sua integridade, o número de proteínas identificadas foi bem maior: 591 para os transcritos com biotina em sua extensão e 687 para aqueles marcados com biotina na sua região 3'. Após descarte dos contaminantes, fez-se necessária uma triagem robusta, a fim de filtrar proteínas interagindo inespecificamente com os transcritos. A estratégia adotada foi subtrair aquelas proteínas que se encontravam interagindo com transcritos do clone não-recombinante em proporção igual ou maior do que em relação aos outros clones, e em seguida, analisar, entre as proteínas restantes, quais interagiam em maior proporção com transcritos do clone tipo-selvagem e do que em relação ao clone mutado, resultando em uma lista com 11 proteínas para transcritos com biotina em sua extensão e 3 proteínas para transcritos biotinilados a 3'.

Nas nossas análises, não foi realizado tratamento estatístico para proteínas que, nos ensaios com transcritos longos, apresentaram mais de dois peptídeos com sensibilidade maior que 95% nas três amostras (não recombinante, tipo-selvagem e deletado). Uma vez que os transcritos eram longos, a representação de proteínas que definam o éxon ou o íntron irá diferir ligeiramente entre as amostras, sobretudo entre o tipo-selvagem e o clone que sofreu deleção. É possível que o tratamento estatístico seja realizado futuramente como teste para alguma proteína antes de iniciarmos estudos experimentais para comprovação da interação ribonucleoproteica.

Das 14 proteínas identificadas na segunda etapa do estudo, dez possuem papéis no *splicing* de pré-RNAm, três são responsáveis pelo processamento de RNAm e uma está envolvida na regulação da transcrição. Observamos somente uma redundânica (hnRNP U-like 1) entre as duas listas de proteínas totalizando 27 proteínas não-

redundantes, ao invés de 28. Como a hnRNP U-like 1 foi detectada a partir de duas estratégias diferentes, é possível que ela seja uma forte candidata. Além desse critério, outro importante é a ausência na fração do controle negativo, como as sete proteínas hnRNPs (A1, A3, D, H3, P2, U, U-like 1) apresentadas na Figura 12. Com esse critério a proteína hnRNP U-like 1 está novamente presente.

Análise geral das 27 proteínas candidatas

A classificação por ontologia gênica das 27 proteínas com envolvimento funcional no *splicing* do pré-RNAm não significa necessariamente uma especificdade de função em relação a transcritos, tecido ou fase do desenvolvimento. É sabido que algumas das proteínas capturadas em nossos ensaios fazem parte de porções constantes e vitais do spliceossomo. São elas: U2AF (65 kDa), a subunidade 4 do fator de *splicing* 3B, as proteínas A e de 70 kDa de snRNP U1 e a proteína com domínio SURP de snRNP U2 (http://ncbi.nih.gov/gene). É possível que essas cinco proteínas tenham sido co-precipitadas com o RNA de modo indireto pela sua associação a fatores ligados diretamente ao transcrito. Por outro lado, funções reguladoras específicas têm sido atribuídas a proteínas tão centrais no processo de *splicing* quanto U2AF65. Desta forma, pode ser prematura a exclusão de proteínas como esta da lista de candidatas à regulação do *splicing* do *FMR1*. Uma situação, porém, é o caso de proteínas como eIF-4A-III, que é um fator de iniciação da tradução com função de helicase, devendo não ter uma função essencial na definição exônica ou intrônica para o *splicing* do pré-RNAm, mas na formação do complexo juncional de éxons (Zhang e Krainer, 2007). Com essa análise, eIF-4A-III deixa de ser boa candidata a regular o *splicing* do éxon 12 do *Fmr1* e a lista passa a ter 26 proteínas.

Proteínas da lista já foram descritas no mesmo complexo macromolecular. Embora não se possa excluir, por exemplo, a proteína 43 ligante de TAR (TDP-43) como candidata a interagir diretamente com o transcrito do *FMR1*, essa proteína foi relatada como ligante do grupo A e B de proteínas hnRNPs (Romano e col., 2014). Outra análise a coloca no mesmo complexo que várias proteínas capturadas em nossos ensaios: hnRNPs (A0, A1, A2/B1, A3, G, H, U, U-like 1), além da helicase A de RNA dependente de ATP (DHX9, Tabela 3, Freibaum e col., 2010). A proteína 3 ligante de acentuador de interleucina, um fator transcricional (Tabela 3), foi demonstrada no mesmo complexo que outras proteínas observadas aqui, como o fator de *splicing* rico em prolina e glutamina, também denominado PSF, fator de *splicing* associado a PTB (do inglês, *pyrimidine tract binding protein*), hnRNP D, fus (hnRNP P2), hnRNP A3, A2/B1 e A1 (Chaumet e col., 2013). É possível que os fatores transcricionais ou de processamento de cauda poli-A ou de RNAr tenham sido identificados nos ensaios de precipitação por afinidade por sua relação indireta com o transcrito.

Outra situação possível é a participação de duas ou mais proteínas na regulação do *splicing*, de forma direta ou indireta. A proteína hnRNP G interage diretamente com o fator de *splicing* 4 rico em serina e arginina, o qual neste heterodímero apresenta um efeito repressor sobre o *splicing* do éxon 10 de transcritos de *Tau* (Wang e col., 2011). Por outro lado, U2AF65 e hnRNP H foram demonstradas a agir sinergisticamente de forma direta a ativar o *splicing* de um éxon de RNAm para um fator transcricional (Ortuño-Pineda e col., 2012).

Outras proteínas listadas aqui (Tabelas 3 e 4) foram descritas como ativadoras da inclusão exônica em transcritos maduros: Fox-2 (Zhang e col., 2008; Welzel e col., 2012), Son (Sharma e col., 2011), DAZAP1 (Pastor e Pagani, 2011), PSF (Kim e col.,

2011; Cho e col., 2014), Sam68-like 1 (Stoss e col., 2004), hnRNP G (Heinrich e col., 2009) e hnRNP H (Chou e col., 1999), a maioria delas com expressão no sistema nervoso central de mamíferos.

Diante dessa situação em que é difícil identificar entre 26 proteínas aquela(s) que poderia(m) participar diretamente da interação com o transcrito do *Fmr1*, torna-se necessário avaliar na literatura científica os elementos em *cis* detectados por essas proteínas candidatas, sobretudo aquelas que foram demonstradas por ativar o *splicing* do pré-RNAm. Como observado na Tabela 5, alguns elementos em *cis* foram identificados em transcritos alvo da regulação pelas proteínas descritas como ativadoras do *splicing* do pré-RNAm. A atividade de Son parece ser indireta (Sharma et al., 2011). A análise na sequência do *FMR1* permite a identificação de elementos com potencial para o reconhecimento por quatro proteínas listadas na Tabela 5. Observa-se que os curtos elementos em *cis* podem ser identificados nas primeiras 200 bases do íntron 12 do *Fmr1* (Tabela 5) e para um deles (hnRNP H), as oito bases estão conservadas e fazem parte de um ISE identificado previamente por ferramenta computacional (Fig. 5). O ISE identificado para as proteínas FOX (FOX1, FOX2 e FOX3) foi detectado no segmento do íntron 12 analisado, com quatro ou cinco bases conservadas de um total de seis. Entre as seis sequências acentuadoras da Tabela 5, duas identificaram ISEs (FOX2 e hnRNP H). Os elementos com similariadade a esses no íntron 12 do Fmr1devem ser testados prioritariamente como alvo respectivamente para as proteínas FOX2 e hnRNP H.

Em relação ao envolvimento funcional com o sistema nervoso central, foi relatado recentemente que as proteínas FOX regulam o *splicing* alternativo de mensagens cujos produtos são funcionalmente relacionados à função sináptica e quando

deficientes associam-se ao autismo (Weyn-Vanhentenryck e col., 2014). As proteínas hnRNP A2/B1 e hnRNP G foram identificadas nas inclusões intracelulares de tecido cerebral ou cerebelar de pacientes com FXTAS (Iwahashi e col., 2006) ou associadas a longos tratos de repetições CGG do RNAm do *FMR1* (Sellier e col., 2010). Curiosamente, duas proteínas listadas aqui são produtos de genes, *FUS* e *TARDBP*, cujas mutações podem causar dois fenótipos – as patologias esclerose lateral amiotrófica ou demência frontotemporal (Sreedharan e col., 2008; Kwiatkowski e col., 2009).

Tabela 5: Elementos em *cis* de proteínas ativadoras do *splicing* de pré-RNAm

Proteína candidata/ Referência bibliográfica	**Elemento em *cis* descrito/ ISE ou ESE**	**Possibilidade de elemento em *cis* no íntron 12 do *Fmr1****
DAZAP1 Pastor e Pagani, 2011	ISE derivado de sequência Alu	Não identificado
FOX2 Kim e col., 2010	UGCAUG (**ISE**)	UGguUG** 88-93 UGuuUG** 110-115 UaCAUG*** 178-183
hnRNP G Heinrich e col., 2009	CCA/C (**ESE**)	CCA 129-131 158-160
hnRNP H Chou e col., 1999	GGGGGCUG (**ISE**)	GGGGGCUG** 93-100
PSF Cho e col., 2014	GGAGCA (**ESE**)	GGAGcA 113-118
Sam68-like 1 Stoss e col., 2004	ATGAAGAGGA (**ESE**)	Não identificado

*Em relação à numeração da Figura 5. Letras minúsculas não coincidem com o consenso proposto pelo artigo científico.
**Coincide com candidato a ISE previamente identificado *in silico*
***Imediatamente a 3' do segmento deletado

As 26 proteínas identificadas aqui como reguladoras em potencial do *splicing* do éxon 12 do *Fmr1*, sobretudo FOX2 e hnRNP H, apresentam-se como fortes candidatas a terem sua interação com o segmento do transcrito-alvo testada experimentalmente,

através de métodos bioquímicos, de forma específica, pelo emprego de anticorpos dirigidos a elas e análises mutacionais do elemento em *cis*.

VI. Conclusões

1) A partir de extratos nucleares de córtex cerebral de ratos entre P21 e P28 e transcritos de RNA biotinilados, contendo pelo menos parte da porção 5' do íntron 12 do *Fmr1*, foram identificadas em ensaios de precipitação por afinidade 26 proteínas candidatas a interagir com esse segmento de RNA.

2) As proteínas candidatas foram selecionadas por não se apresentarem de forma significativa no controle negativo do ensaio e porque suas análises em bancos de dados indicaram distribuição nuclear, presença de domínios de ligação a RNA e potencial para atuação como fatores de *splicing*.

VII. Referências bibliográficas

Abtibol M, Menini C, Delezoide AL, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J. 1993. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. Nat Genet. 4(2): 147-53.

Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST. 1993. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. Nat Genet. 4(3):244-51.

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. 1999. A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. Hum Mol Genet. 8(13):2557-66.

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. 2001. The Fragile X mental retardation protein. Brain Res Bull. 56(3-4):375-82.

Beyer AL, Osheim YN. 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. Genes Dev. 2(6):754-65.

Bhakar AL, Dölen G, Bear MF. 2012. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). Annu Rev Neurosci. 35:417-43.

Black DL. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. Annu Rev Biochem. 72: 291-336.

Blencowe BJ. 2006. Alternative splicing: new insights from global analyses. Cell. 126(1): 37-47.

Brackett DM, Qing F, Amieux PS, Sellers DL, Horner PJ, Morris DR. 2013. FMR1 transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. PLoS One. 8(3):e58296.

Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. Cell. 107(4):477-87.

Carrillo Oesterreich F, Preibisch S, Neugebauer KM. 2010. Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. Mol Cell. 40(4):571-81.

Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST. 2003. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. Hum Mol Genet. 12(24):3295-305.

Chaumet A, Castella S, Gasmi L, Fradin A, Clodic G, Bolbach G, Poulhe R, Denoulet P, Larcher JC. 2013. Proteomic analysis of interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) and nuclear factor 90 (NF90) interactome. Biochimie. 95(6):1146-57.

Cho S, Moon H, Loh TJ, Oh HK, Williams DR, Liao DJ, Zhou J, Green MR, Zheng X, Shen H. 2014. PSF contacts exon 7 of SMN2 pre-mRNA to promote exon 7 inclusion. Biochim Biophys Acta. Epub.

Chou MY, Rooke N, Turck CW, Black DL. 1999. hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. Mol Cell Biol. 19(1):69-77.

Choudhury R, Roy SG, Tsai YS, Tripathy A, Graves LM, Wang Z. 2014. The splicing activator DAZAP1 integrates splicing control into MEK/Erk-regulated cell proliferation and migration. Nat Commun. 5:3078.

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. Proc Natl Acad Sci. 94(10):5401-4.

Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. 2001. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. Cell. 107:489–99.

Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB. 2005. Kissing complex RNAs mediate interaction between the fragile X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. Genes Dev. 19:903-18.

Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell RB. 2009. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. Hum Mol Genet. 18(17):3164-77.

Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB. 2011. FMRP stalls

ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. Cell. 146(2):247-61.

Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel AM, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, Khandjian EW. 2007. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. Hum Mol Genet. 16(24):3047-58.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. 1993. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat Genet. 4(4):335-40.

Dolzhanskaya N, Merz G, Aletta JM, Denman RB. 2006. Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. J Cell Sci. 119(9):1933-46.

Dury AY, El Fatimy R, Tremblay S, Rose TM, Côté J, De Koninck P, Khandjian EW. 2013. Nuclear Fragile X Mental Retardation Protein is localized to Cajal bodies. PLoS Genet. 9(10):e1003890.

Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST. 1996. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. Hum Mol Genet. 5(8):1083-91.

Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M. 2010. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. Neuron. 65(3):373-84.

Ehlers MD, Tingley WG, Huganir RL. 1995. Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. Science. 269(5231):1734-7.

Ehlers MD, Fung ET, O'Brien RJ, Huganir RL. 1998. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. J Neurosci. 18(2):720-30.

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. 1993. Fine structure of the human FMR1 gene. Hum Mol Genet. 2(8):1147-53.

El Fatimy R, Tremblay S, Dury AY, Solomon S, De Koninck P, Schrader JW, Khandjian EW. 2012. Fragile X mental retardation protein interacts with the RNA-binding protein Caprin1 in neuronal RiboNucleoProtein complexes. PLoS One. 7(6):e39338.

Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. 2010. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. J Proteome Res. 9(2):1104-20.

Furdon PJ, Kole R. 1988. The length of the downstream exon and the substitution of specific sequences affect pre-mRNA splicing in vitro. Mol Cell Biol. 8(2):860-6.

Grabowski PJ. 2005. Splicing-active nuclear extracts from rat brain. Methods. 37(4):323-30.

Greco CM, Berman RF, Martin RM, Tassone F, Schwartz PH, Chang A, Trapp BD, Iwahashi C, Brunberg J, Grigsby J, Hessl D, Becker EJ, Papazian J, Leehey MA, Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2006. Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). Brain. 129(1):243-55.

Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhatia M, Borrelli E. 1995. Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. J Biol Chem. 270(13):7354-8.

Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ. 2001. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. Neurology. 57(1):127-30.

Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2001. Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behavior relationships. Mol Genet Metab. 74(1-2):89-97.

Hagerman R, Hagerman P. 2013. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. Lancet Neurol. 12(8):786-98.

Heinrich B, Zhang Z, Raitskin O, Hiller M, Benderska N, Hartmann AM, Bracco L, Elliott D, Ben-Ari S, Soreq H, Sperling J, Sperling R, Stamm S. 2009. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. J Biol Chem. 284(21):14303-15.

Huang T, Li LY, Shen Y, Qin XB, Pang ZL, Wu GY. 1996. Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons. Am J Med Genet. 64(2):252-5.

Irimia M, Blencowe BJ. 2012. Alternative splicing: decoding an expansive regulatory layer. Curr Opin Cell Biol. 24(3):323-32.

Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. 2000. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. Cereb Cortex. 10(10):1038-44.

Irwin SA, Christmon CA, Grossman AW, Galvez R, Kim SH, DeGrush BJ, Weiler IJ, Greenough WT. 2005. Fragile X mental retardation protein levels increase following complex environment exposure in rat brain regions undergoing active synaptogenesis. Neurobiol Learn Mem. 83(3):180-7.

Iwahashi CK, Yasui DH, An HJ, Greco CM, Tassone F, Nannen K, Babineau B, Lebrilla CB, Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2006. Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. Brain. 129(1):256-71.

Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, Therien C, Bergeron D, Bourassa S, Greenblatt J, Chabot B, Poirier G G, Hughes T R, Blanchette M, Price D H, Coulombe B. 2007. Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. Mol Cell. 27(2):262-74.

Jin P, Alisch RS, Warren ST. 2004. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. Nat Cell Biol. 6(11):1048-53.

Jin P, Duan R, Qurashi A, Qin Y, Tian D, Rosser TC, Liu H, Feng Y, Warren ST. 2007. Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome. Neuron. 55(4):556-64.

Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. Neuron. 43(4):513-25.

Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Côté F, Devys D, Mandel JL, Rousseau F. 1995. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. Hum Mol Genet. 4(5):783-9.

Kim M, Bellini M, Ceman S. 2008. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. Mol Cell Biol. 29(1):214-28.

Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. 2009. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. J Biol Chem. 284(45):31052-61.

Kim KK, Kim YC, Adelstein RS, Kawamoto S. 2011. Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing. Nucleic Acids Res. 39(8):3064-78.

Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science. 323(5918):1205-8.

Ling SC, Fahrner PS, Greenough WT, Gelfand VI. 2004. Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. Proc Natl Acad Sci USA. 101(50):17428-33.

Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. Science. 327(5968):996-1000.

Ludwig AL, Hershey JW, Hagerman PJ. 2011. Initiation of translation of the FMR1 mRNA Occurs predominantly through 5'-end-dependent ribosomal scanning. J Mol Biol. 407(1):21-34.

Ludwig AL, Espinal GM, Pretto DI, Jamal AL, Arque G, Tassone F, Berman RF, Hagerman PJ. 2014. CNS expression of murine fragile X protein (FMRP) as a function of CGG-repeat size. Hum Mol Genet. Epub.

Lüscher C, Huber KM. 2010. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. Neuron. 65(4):445-59.

Martinez-Contreras R, Fisette JF, Nasim FU, Madden R, Cordeau M, Chabot B. 2006. Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. PLoS Biol. 4(2):e21.

Mayeda A, Helfman DM, Krainer AR. 1993. Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. Mol Cell Biol. 13(5):2993-3001.

Menon RP, Gibson TJ, Pastore A. 2004. The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. J Mol Biol. 343(1):43-53.

Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J. 2003. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. Neuron. 37(3):417-31.

Miyazaki T, Watanabe M, Yamagishi A, Takahashi M. 2000. B2 exon splicing of nonmuscle myosin heavy chain IIB is differently regulated in developing and adult rat brain. Neurosci Res. 37(4):299-306.

Muslimov IA, Patel MV, Rose A, Tiedge H. 2011. Spatial code recognition in neuronal RNA targeting: role of RNA-hnRNP A2 interactions. J Cell Biol. 194(3):441-57.

Nasim MT, Chernova TK, Chowdhury HM, Yue BG, Eperon IC. 2003. HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding. Hum Mol Genet. 12(11):1337-48.

Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. 2001. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. J Neurosci. 21(14):5139-46.

Nussbaum RL, Ledbetter DH. 1986. Fragile X syndrome: a unique mutation in man. Annu Rev Genet. 20:109-45.

Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K. 2002. Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. J Biol Chem. 277(40):37804-10.

Oostra BA, Willemsen R. 2009. FMR1: a gene with three faces. Biochim Biophys Acta. 1790(6):467-77.

Ortuño-Pineda C, Galindo-Rosales JM, Calderón-Salinas JV, Villegas-Sepúlveda N, Saucedo-Cárdenas O, De Nova-Ocampo M, Valdés J. 2012. Binding of hnRNP H and U2AF65 to respective G-codes and a poly-uridine tract collaborate in the N50-5'ss selection of the REST N exon in H69 cells. PLoS One. 7(7):e40315.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nat Genet. 40(12):1413-5.

Pastor T, Pagani F. 2011. Interaction of hnRNPA1/A2 and DAZAP1 with an Alu-derived intronic splicing enhancer regulates ATM aberrant splicing. PLoS One. 6(8):e23349.

Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci. 14(3):285-93.

Popp A, Urbach A, Witte OW, Frahm C. 2009. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain. PLoS One. 4(2):e4371.

Pozzoli U, Sironi M. 2005. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. Cell Mol Life Sci. 62(14):1579-604.

Quinlan JJ, Firestone LL, Homanics GE. 2000. Mice lacking the long splice variant of the gamma subunit of the GABA(A) receptor are more sensitive to benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav. 66(2):371-4.

Ramos A, Hollingworth D, Pastore A. 2003. G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA. RNA. 9(10):1198-207.

Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel TA, Bardoni B, Pastore A. 2006. The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. Structure. 14(1):21-31.

Romano M, Buratti E, Romano G, Klima R, Del Bel Belluz L, Stuani C, Baralle F, Feiguin F. 2014. Evolutionarily-conserved hnRNP A/B proteins functionally interact

with human and Drosophila TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43). J Biol Chem. Epub.

Ross-Inta C, Omanska-Klusek A, Wong S, Barrow C, Garcia-Arocena D, Iwahashi C, Berry-Kravis E, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Giulivi C. 2010. Evidence of mitochondrial dysfunction in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. Biochem J. 429(3):545-52.

Saint-André V, Batsché E, Rachez C, Muchardt C. 2011. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1γ favor inclusion of alternative exons. Nat Struct Mol Biol. 18(3):337-44.

Santoro MR, Bray SM, Warren ST. 2012. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. Annu Rev Pathol. 7:219-45.

Schenck A, Bardoni B, Moro A, Bagni C, Mandel JL. 2001. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. Proc Natl Acad Sci USA. 98(15):8844-9.

Schwartz S, Ast G. 2010. Chromatin density and splicing destiny: on the cross-talk between chromatin structure and splicing. EMBO J. 29(10):1629-36.

Sellier C, Rau F, Liu Y, Tassone F, Hukema RK, Gattoni R, Schneider A, Richard S, Willemsen R, Elliott DJ, Hagerman PJ, Charlet-Berguerand N. 2010. Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. EMBO J. 29(7):1248-61.

Sharma A, Markey M, Torres-Muñoz K, Varia S, Kadakia M, Bubulya A, Bubulya PA. 2011. Son maintains accurate splicing for a subset of human pre-mRNAs. J Cell Sci. 124(24):4286-98.

Sherman SL. 2000. Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect? Am J Hum Genet. 67(1):11-3.

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1993. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. Cell. 74(2):291-8.

Siomi MC, Zhang Y, Siomi H, Dreyfuss G. 1996. Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. Mol Cell Biol. 16(7):3825-32.

Sofola OA, Jin P, Qin Y, Duan R, Liu H, de Haro M, Nelson DL, Botas J. 2007. RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a Drosophila model of FXTAS. Neuron. 55(4):565-71.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleroche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science. 319(5870):1668-72.

Stoss O, Novoyatleva T, Gencheva M, Olbrich M, Benderska N, Stamm S. 2004. p59(fyn)-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1. Mol Cell Neurosci. 27(1):8-21.

Sun Q, Mayeda A, Hampson RK, Krainer AR, Rottman FM. 1993. General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. Genes Dev. 7(12B):2598-608.

Tassone F, Hagerman RJ, Garcia-Arocena D, Khandjian EW, Greco CM, Hagerman PJ. 2004. Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. J Med Genet. 41(4):e43.

Tassone F, Beilina A, Carosi C, Albertosi S, Bagni C, Li L, Glover K, Bentley D, Hagerman PJ. 2007. Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. RNA. 13(4):555-62.

Todd PK, Mack KJ. 2000. Sensory stimulation increases cortical expression of the fragile X mental retardation protein in vivo. Brain Res Mol Brain Res. 80(1):17-25.

Todd PK, Oh SY, Krans A, He F, Sellier C, Frazer M, Renoux AJ, Chen KC, Scaglione KM, Basrur V, Elenitoba-Johnson K, Vonsattel JP, Louis ED, Sutton MA, Taylor JP, Mills RE, Charlet-Berguerand N, Paulson HL. 2013. CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. Neuron. 78(3):440-55.

Valverde R, Edwards L, Regan L. 2008. Structure and function of KH domains. FEBS J. 275(11):2712-26.

Velloso FJ. 2008. Expressão de isoformas da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP) e sua regulação. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia/Genética. Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA. 1993. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. Nature. 363(6431):722-4.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell. 65(5):905-14.

Verkerk AJ, de Graaff E, De Boulle K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL, Oostra BA. 1993. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. Hum Mol Genet. 2(8):1348.

Vianna-Morgante, A. M. 1999. Twinning and premature ovarian failure in permutation fragile X carriers. Am J Med Genet. 83(4):326.

Wang Z, Burge CB. 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. RNA. 14(5):802-13.

Wang Y, Wang J, Gao L, Stamm S, Andreadis A. 2011. An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia. Gene. 485(2):130-8.

Welzel F, Kaehler C, Isau M, Hallen L, Lehrach H, Krobitsch S. 2012. FOX-2 dependent splicing of ataxin-2 transcript is affected by ataxin-1 overexpression. PLoS One. 7(5):e37985.

Weyn-Vanhentenryck SM, Mele A, Yan Q, Sun S, Farny N, Zhang Z, Xue C, Herre M, Silver PA, Zhang MQ, Krainer AR, Darnell RB, Zhang C. 2014. HITS-CLIP and Integrative Modeling Define the Rbfox Splicing-Regulatory Network Linked to Brain Development and Autism. Cell Rep. 6(6):1139-52.

Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. 2004. Variation in alternative splicing across human tissues. Genome Biol. 5(10):R74.

Zalfa F, Adinolfi S, Napoli I, Kühn-Hölsken E, Urlaub H, Achsel T, Pastore A, Bagni C. 2005. Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. J Biol Chem. 280(39):33403-10.

Zang JB, Nosyreva ED, Spencer CM, Volk LJ, Musunuru K, Zhong R, Stone EF, Yuva-Paylor LA, Huber KM, Paylor R, Darnell JC, Darnell RB. 2009. A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. PLoS Genet. 5(12):e1000758.

Zhang Z, Krainer AR. 2007. Splicing remodels messenger ribonucleoprotein architecture via eIF4A3-dependent and -independent recruitment of exon junction complex components. Proc Natl Acad Sci USA. 104(28):11574-9.

Zhang C, Zhang Z, Castle J, Sun S, Johnson J, Krainer AR, Zhang MQ. 2008. Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. Genes Dev. 22(18):2550-63.

Zheng ZM. 2004. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. J Biomed Sci. 11(3):278-94.

VIII. Lista de acrônimos

μL - microlitro

μM - micromolar

AMPA - ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

BC1 - *brain cytoplasmic RNA1*

BSA - *bovine serum albumin*

C6 - linhagem cellular derivada de glioma de rato

CELF - *CUG-binding protein and ETR-like factors*

CIAP - *calf intestinal alkaline phosphatase*

CMV - promotor de citomegalovírus

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucleico

E(n) - dia de vida embrionária

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

ESE - *exonic splicing enhancer*

ESS - *exonic splicing silencer*

FMR1 - gene do Retardo Mental do X Frágil

FMRP - proteína do retardo mental do X frágil

FXPOI - insuficiência ovariana primária associada ao X frágil

FXR1/2 - genes relacionados ao X frágil

FXTAS - síndrome de tremor e ataxia associada ao X frágil

GABA - ácido gama-amino-butírico

GAD - glutamato descarboxilase

H2B - histona H2B

H4 - histona H4

hnRNP - ribonucleoproteína heterogênea nuclear

IgG - imunoglobulina G

ISE - *intronic splicing enhancer*

ISO - isoforma

ISS - *intronic splicing silencer*

kDa - kilodalton

KH - domínio homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K

LTD - depressão de longa duração

LTP - potenciação de longa duração

MCS - sítio de clonagem múltipla

mGluR - receptor de glutamato metabotrópico

miRNA - microRNA

NES - sinal de exportação nuclear

NLS - sinal de localização nuclear

NMDA - N-metil-D-aspartato

NR - não-recombinante

ºC - grau Celsius

P(n) - dia de vida pós-natal

pb - pares de base

pcDNA3.1 - vetor plasmidial de expressão em mamíferos

PCR - reação em cadeia da polimerase

pmol - picomol

PTBP1 - *polypyrimidine tract-binding protein 1*

RANBP - proteína ligante da pequena GTPase Ran

RGG - domínio rico em arginina e glicina

RISC - complexo de silenciamento induzido pelo RNA

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - interferência pelo RNA

RNAm - RNA mensageiro

RNasin - inibidor de ribonuclease

RPM - rotações por minuto

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*

SNC - sistema nervoso central

snRNP - ribonucleoproteína pequena nuclear

SR - proteínas ricas em serina e arginine

SXF - síndrome do X frágil

T7 - promotor do bacteriófago T7

Tap/NXF1 - *nuclear RNA export factor 1*

TCA - ácido tricloroacético

TIA1 - *TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein*

U - unidade de enzima

U2AF - fator auxiliar de snRNP U2

UTR - região não traduzida

WT - *wild-type*, tipo-selvagem