

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 apresentada 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 *FMRI*

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

1. *Splicing* alternativo 2. *FMRI* 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	8
Abstract	9
I. Introdução	10
Funções da FMRP	12
A alça variável do domínio KH-2 da FMRP	16
<i>Splicing</i> alternativo e sua regulação	18
Regulação do <i>splicing</i> alternativo do éxon 12 do <i>Fmr1</i>	22
II. Objetivos	24
VI. Conclusões	24
VII. Referências bibliográficas	25
VIII. Lista de acrônimos	34

Índice de figuras

Figura 1: FMRP na regulação traducional.....	15
Figura 2: Estrutura genômica do gene <i>FMR1</i>	17
Figura 3: Representação esquemática de componentes centrais do spliceossomo.....	20

Resumo

O gene do *Retardo Mental do X Frágil (FMRI)* 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 *FMRI*, 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 *FMRI* 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 *FMRI* 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 *FMRI*, 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 *FMRI*, 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 (*FMRI*) 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 *FMRI* 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 *FMRI* exons 9 to 13. It contains the longest variable loop ever observed among human KH-containing proteins, which is encoded by *FMRI* exons 11 and 12. Exon-12 inclusion in *FMRI* 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 *FMRI* 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 *FMRI* 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 *FMRI* 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 *FMRI*, relativa redução da expressão da FMRP e formação de inclusões nucleares que contêm o RNAm do *FMRI* (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 *FMRI* 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 *FMRI* 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 saudáveis 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 RNAs 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 RNAs,

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).

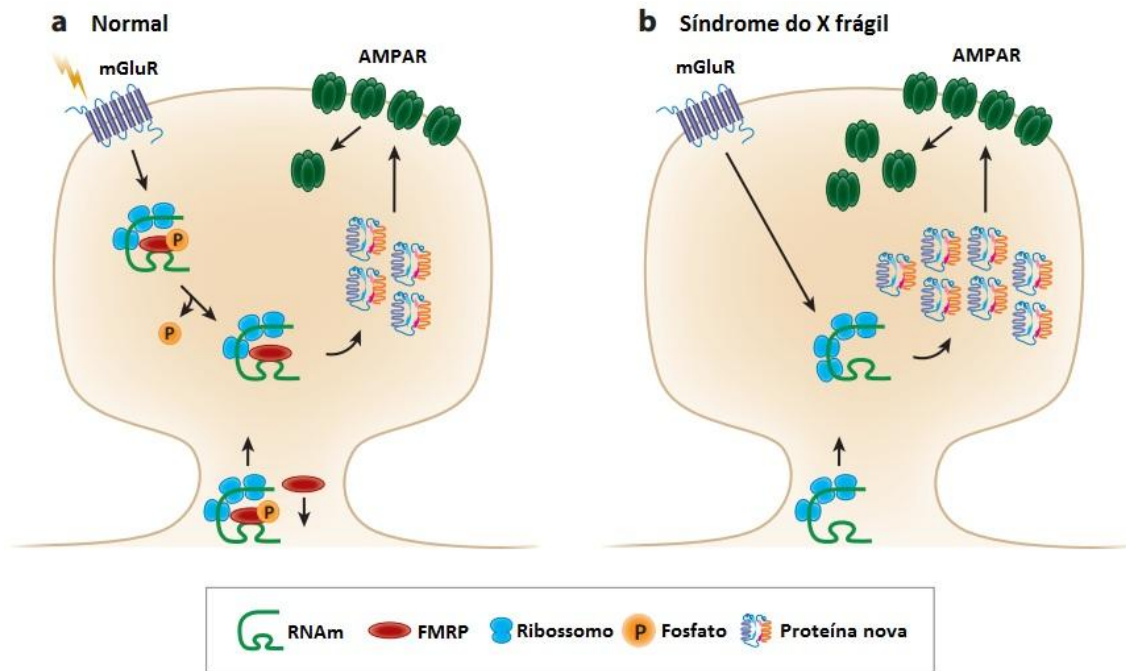


Figura 1: Modelo para a FMRP na regulação traducional em neurônios pós-sinápticos. (a) A FMRP se liga a um RNAm alvo no núcleo celular (não mostrado) e é cotransportada com ele aos dendritos, reprimindo sua tradução. Mediante ativação do receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) na espinha dendrítica (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 (AMPA) 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 *FMRI* (Fig. 2). Possui a alça variável mais longa já observada em humanos, que é codificada pelos éxons 11 e 12 do *FMRI*. 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 exon 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 exon 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.

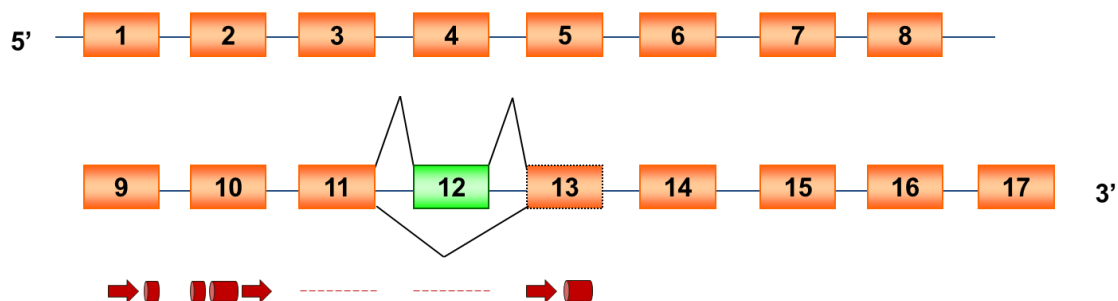


Figura 2: Diagrama representando a estrutura genômica do gene *FMRI* (fora de escala) em que os 17 éxons estão apresentados como retângulos numerados e os íntrons como linhas. O éxon 12 está evidenciado na cor verde e sua exclusão do transcrito do *FMRI* está indicada abaixo deste éxon. Abaixo da estrutura 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 *FMRI* 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 *FMRI* 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.

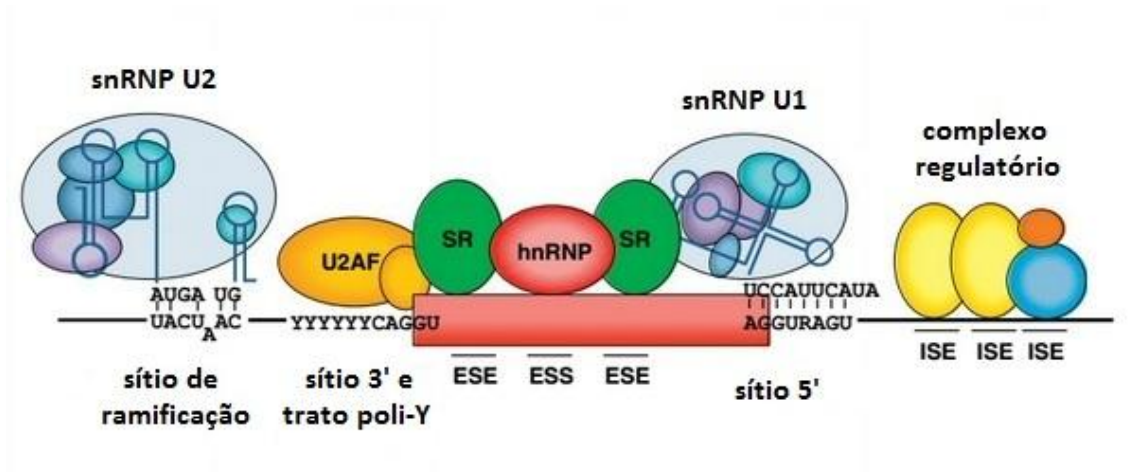


Figura 3: Representação esquemática de componentes centrais do spliceossomo nas definições exônica e intrônica. São apresentados um éxon (retângulo vermelho) e parte dos íntrons adjacentes. snRNPs U1 e U2 são os complexos ribonucleoproteicos dos RNAs pequenos nucleares snRNA U1 e U2. snRNP U1, através 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-RNA (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 alongamento 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 alongamento 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 *FMRI* é um evento funcionalmente relevante no córtex cerebral e cerebelo do rato pós-natal. Buscando verificar como o *splicing* do éxon 12 do *FMRI* 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-RNA 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 biotilado, 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 biotilados.

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 biotinição 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 biotilado 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. Conclusões

- 1) A partir de extratos nucleares de córtex cerebral de ratos entre P21 e P28 e transcritos de RNA biotilados, 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*.

IV. 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.
- Dolzanskaya 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, Hessel 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' splice 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 HP1 γ 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 Belleruche 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, Basur 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 Boule 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, Krobitch 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.

V. Lista de acrônimos

μL - microlitro

μM - micromolar

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

BC1 - *brain cytoplasmic RNAI*

BSA - *bovine serum albumin*

C6 - linhagem celular 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

°C - 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