



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2014

**Ana Catarina Reis  
Vela Neves**

**Efeitos de erros de tradução no peixe zebra**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Ana Catarina Reis  
Vela Neves**

**Efeitos de erros de tradução no peixe zebra**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Raquel Santos Calhã Mano Soares, bolsreira de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Manuel António da Silva Santos, Professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio.

## **O júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria Helena Abreu Silva**  
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

vogais

**Doutora Ana Raquel Santos Calhã Mano Soares**  
Bolsista pós doutoramento, CESAM & Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Denisa Daud Mateus**  
Investigadora pós doutoramento, Centro de Estudos de Doenças Crónicas - campus, Instituto Gulbenkian de Ciência

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar queria agradecer à minha orientadora Doutora Ana Soares pela disponibilidade total, por todo o auxílio e conhecimento que me transmitiu e por ter acreditado em mim.

Ao Doutor Manuel Santos agradeço o conhecimento transmitido ao longo deste Mestrado, a oportunidade que me deu ao me integrar no laboratório de Biologia do RNA de Aveiro, assim como toda a disponibilidade e auxílio.

Um agradecimento especial a todos os elementos do laboratório de Biologia do RNA de Aveiro por me terem auxiliado em tudo o que precisei.

Aos meus pais, obrigada por tornarem esta etapa possível, por estarem sempre ao meu lado e pela força e garra que sempre me inculiram ao longo da vida.

Aos meus irmãos, obrigada pela vossa força, por toda a vossa disponibilidade, são um exemplo a seguir.

A todos os meus amigos, um especial obrigada por estarem presentes ao longo das várias etapas da minha vida. Sem vocês não seria a mesma coisa.

**Palavras-chave**

Danio rerio, síntese proteica, tRNAs mutantes, erros de tradução, stress proteotóxico, agregação proteica, degeneração celular.

**Resumo**

O stress proteotóxico é responsável pela degeneração celular frequentemente associada a doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento. No entanto não é ainda claro como é que o stress proteotóxico contribui para esta degeneração.

Para clarificar esta questão, foram utilizados peixes zebra transgênicos que expressam tRNA mutantes em todas as células e tecidos. Estes tRNAs introduzem erradamente serina devido a mutações no seu anticodão, contribuindo para a síntese de proteínas erróneas e indução de stress proteotóxico.

Neste trabalho, estudámos como os erros de tradução afetam o desenvolvimento e a síntese proteica ao longo do ciclo de vida do peixe zebra. Foi observado um aumento da morte celular nos peixes com o tRNA mutante, assim como anomalias fenotípicas severas. Observou-se também acumulação de proteínas insolúveis em diferentes tecidos, o que pode estar relacionado com a ativação da resposta celular às proteínas com enovelamento errado (RPEE). Estes resultados mostram que os erros de tradução afetam o normal desenvolvimento dos vertebrados com consequente ativação de mecanismos de proteção celular.

**Keywords**

Danio rerio, protein synthesis, mutant tRNAs, translation errors, proteotoxic stress, aggregation of proteins, cellular degeneration.

**Abstract**

Proteotoxic stress leads to cellular degeneration and is often found in neurodegenerative diseases and during aging. However, it is not known how proteotoxic stress affects cellular degeneration.

To study this question, we used a transgenic zebrafish model expressing a mutant tRNA in all cells and tissues. These tRNAs misinsert serine due to mutations in their anticodon, contributing to errors in protein synthesis which induces proteotoxic stress.

In this work, we studied how translation errors affect the development and protein synthesis during zebrafish lifecycle. There was an increase in cellular death in zebrafish expressing the mutant tRNA as well as severe phenotypic abnormalities. There was accumulation of insoluble proteins which can activate the unfolded protein response (UPR). These results show that mistranslation affects vertebrate development and triggers cellular protection mechanisms.



## Índice

Índice de Figuras .....	VII
Lista de tabelas .....	VII
Lista de abreviaturas .....	VIII
1. Introdução .....	1
1.1. Síntese proteica eucariota .....	2
1.1.1. Informação genética .....	2
1.1.2. Código genético .....	3
1.1.3. Tradução eucariota .....	5
1.1.4. Erros de tradução (mistranslation) .....	7
1.2. Agregação proteica e stress proteotóxico .....	9
1.2.1. Acumulação de proteínas com enovelamento errado (misfolded) - proteotoxicidade .....	9
1.2.2. Controlo da qualidade proteica .....	10
1.3. Estilo de vida e doenças .....	13
1.4. Peixe zebra, <i>Danio rerio</i> .....	14
1.4.1. Vantagens do <i>Danio rerio</i> como modelo vertebrado .....	14
1.4.2. Peixe zebra – modelo transgénico .....	16
1.5. Objetivos .....	18
2. Materiais e Métodos .....	19
2.1. Criação e manutenção do Peixe zebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	20
2.2. Morte celular .....	20
2.3. Coloração das cartilagens .....	20
2.4. SDS-PAGE das proteínas insolúveis (agregados proteicos) .....	21
2.5. Western blot .....	21
2.6. Análise estatística .....	22
3. Resultados .....	23
3.1. Efeito da incorporação de erros na síntese proteica no desenvolvimento do peixe zebra .....	24
3.1.1. Taxa de morte celular às 24 hpf .....	24
3.1.2. Alterações no desenvolvimento do peixe zebra .....	25
3.1.2.1. Alterações fenotípicas aos 5 dias pós fertilização .....	25
3.1.2.2. Anomalias nas cartilagens aos 5 dpf .....	27
3.1.2.3. Comprimento .....	29
3.1.2.4. Taxa de mortalidade .....	31
3.2. Fração proteica insolúvel – agregação proteica .....	33
3.2.1. Larvas – 5 dpf .....	33
3.2.2. Adultos – 6 mpf .....	34
3.2.3. Adultos – 1 ano pós fertilização (apf) .....	37
3.3. Os mecanismos de controlo da qualidade proteica ativados em resposta à acumulação de erros de tradução .....	39
3.3.1. Larvas – 5 dpf .....	39
3.3.1.1. Inibição da síntese proteica através da fosforilação do fator eIF2 $\alpha$ .....	40
3.3.1.2. Ativação da RPEE através da clivagem do ATF6 .....	41
3.3.1.3. Detecção de proteínas ubiquitinadas - marcadas para degradação .....	42
4. Discussão, Conclusão e Trabalhos futuros .....	45
4.1. Discussão .....	46
4.1.1. Consequências dos erros de tradução em vertebrados .....	46
4.1.2. Fração proteica insolúvel, com possível agregação, como consequência dos erros de tradução .....	49
4.1.3. Ativação dos mecanismos de controlo da síntese proteica em resposta à acumulação de erros de tradução .....	52

4.2. Conclusão e Trabalhos futuros .....	54
Bibliografia.....	55
Anexo .....	59

## **Índice de Figuras**

Figura 1 – O fluxo da informação genética desde o DNA até à síntese proteica .....	2
Figura 2 – O código genético .....	3
Figura 3 - Estrutura do tRNA.....	4
Figura 4 – As 3 fases da tradução: iniciação, elongação e terminação e os respetivos fatores envolvidos .....	6
Figura 5 – A origem dos erros nas diferentes etapas da síntese proteica eucariota.....	7
Figura 6 – As ações dos chaperones para manter a proteostase: re-enovelamento, sequestração e degradação proteica.....	11
Figura 7 – As fases do desenvolvimento do peixe zebra até às 72 horas pós fertilização .....	15
Figura 8 – A Matriz BLOSUM 62: os scores para as diferentes substituições dos aminoácidos ....	17
Figura 9 – A) Coloração dos peixes controlo, Ser-tRNA e Ser-tRNA <sup>CAG<sup>Leu</sup></sup> com laranja de acridina às 24 hpf. B) Percentagem de células em morte celular às 24 hpf. ....	25
Figura 10 - Alterações fenotípicas nas 3 linhagens de peixes transgênicos aos 5 dpf .....	26
Figura 11 - % de malformações fenotípicas nas 3 linhagens de peixes transgênicos aos 5 dpf. ...	27
Figura 12 – Coloração das cartilagens da cabeça do peixe zebra .....	28
Figura 13 – Anomalias no desenvolvimento das cartilagens nos peixes transgênicos aos 5 dpf ...	28
Figura 14 - % de peixes com deficiências nas cartilagens aos 5 dpf .....	29
Figura 15 – Comprimento das larvas aos 5 dpf .....	30
Figura 16 - Comprimento dos peixes aos 3 mpf, 5 mpf e com 1 ano e 4 meses pós fertilização. ...	31
Figura 17 - % de mortalidade dos peixes transgênicos ao longo do tempo (1).....	32
Figura 18 - % de mortalidade dos peixes transgênicos ao longo do tempo (2).....	32
Figura 19 - Perfil da fração insolúvel aos 5 dpf.....	33
Figura 20 – % da fração insolúvel em peixes transgênicos aos 5 dpf .....	34
Figura 21 – Perfil do extrato total e da fração insolúvel da cabeça dos peixes transgênicos com 6 mpf.....	35
Figura 22 - Perfil do extrato total e da fração insolúvel do corpo dos peixes transgênicos com 6 mpf .....	36
Figura 23 - Perfil do extrato total e da fração insolúvel da barbatana caudal dos peixes transgênicos com 6 mpf. ....	37
Figura 24 - Perfil do extrato total e da fração insolúvel do cérebro dos peixes com 1 apf. ....	38
Figura 25 - Perfil do extrato total e da fração insolúvel do músculo dos peixes com 1 apf.....	38
Figura 26 - Perfil do extrato total e da fração insolúvel da barbatana caudal dos peixes com 1 apf. ....	39
Figura 27 - % do fator eIF2 $\alpha$ nos peixes zebra com 5 dpf. ....	40
Figura 28 - % do fator eIF2 $\alpha$ fosforilado nos peixes zebra com 5 dpf. ....	41
Figura 29 - % do fator ATF6 clivado nos peixes zebra com 5 dpf. ....	42
Figura 30 - % de proteínas marcadas com ubiquitina nos peixes zebra com 5 dpf .....	43

## **Lista de tabelas**

Tabela 1 – Os anticorpos primários usados e os respetivos anticorpos secundários .....	22
--	----

## Lista de abreviaturas

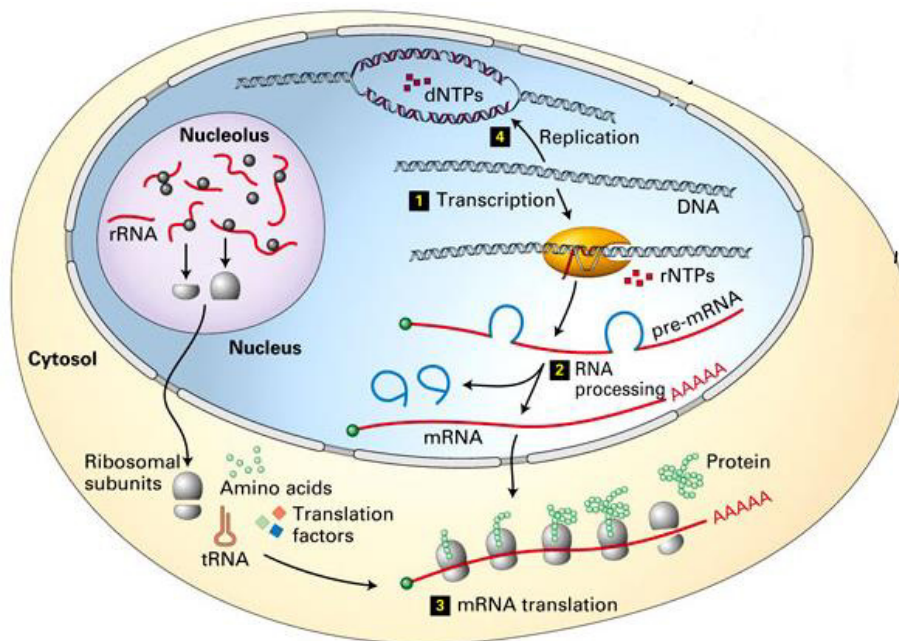
AA	Aminoácido
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetase
aa-tRNA	Aminoacil-tRNA (tRNA ligado ao aminoácido)
Apf	Ano(s) pós fertilização
ATF6	Fator de ativação da transcrição 6
BCA	Ácido bicinconínico
CLISP	Chaperone ligado à síntese proteica
CQP	Controlo da qualidade proteica
DARE	Degradação associada ao retículo endoplasmático
Dpf	Dia(s) pós fertilização
EDTA	Ácido etilenodiamina tretacético
eEF	Fator eucariota de alongação da tradução
eIF	Fator eucariota de iniciação da tradução
eRF	Fator eucariota de libertação
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
Hpf	Hora(s) pós fertilização
Local A	Local aminoacil
Local E	Local de saída do tRNA desacilado
Local P	Local peptidil
Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	tRNA do codão de iniciação acilado com o aa de metionina
mRNA	RNA mensageiro
PABP	Proteína de ligação à poly (A)
PCT	Proteínas de choque térmico
Peptidil-tRNA	tRNA ligado ao péptido em formação
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
pPCT	Pequenas proteínas de choque térmico
PSA	Persulfato de amónio
RE	Retículo endoplasmático
RPEE	Resposta às proteínas com enovelamento errado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
SerRS	Seril-tRNA sintetase
Ser-tRNA	tRNA de Serina
SUP	Sistema ubiquitina-proteossoma
TEMED	N,N,N,'N,'-tetrametiletlenodiamina
TFS	Tampão fosfato salino
tRNA	RNA de transferência
TTS	Tampão tris salino
UTR	Região não traduzida

# 1. Introdução

## 1.1. Síntese proteica eucariota

### 1.1.1. Informação genética

Todos os organismos dependem de um preciso processamento da informação genética ao nível celular para que possam crescer, desenvolver-se e garantir a homeostase <sup>1</sup>. Na síntese proteica eucariota a informação genética é transmitida do DNA para o pré-mRNA (RNA mensageiro), no núcleo da célula, através do processo de transcrição <sup>2,3</sup>. O pré-mRNA composto por intrões e exões é processado libertando os intrões dando origem ao mRNA composto pela sequência codificante, isto é, os exões. Este migra para o citoplasma onde ocorre a sua tradução, ou seja, a síntese proteica, respeitando o código genético onde cada codão do mRNA corresponde a um determinado aminoácido (aa) <sup>2,3</sup> (Figura 1).



**Figura 1** – O fluxo da informação genética desde o DNA até à síntese proteica (adaptado de The Design Matrix.” 2010. *Set the Stage*. <http://designmatrix.wordpress.com/2010/05/04/set-the-stage/>).

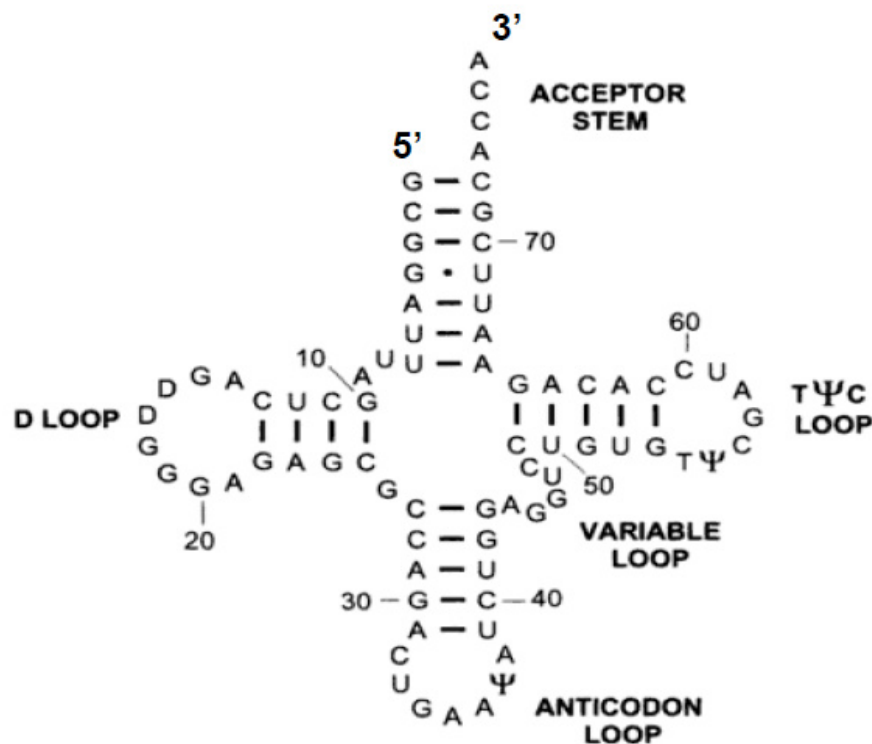
### 1.1.2. Código genético

A informação genética é transmitida do DNA para o mRNA para que este último, ao ser traduzido, possa dar origem ao péptido correspondente. O DNA está organizado em tripletos. Cada tripleto é formado por 3 nucleótidos que podem ser a adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). Após a transcrição do DNA, esses tripletos no mRNA denominam-se de codões. O mRNA é formado pelos nucleótidos: adenina, guanina, uracilo (U) (equivalente à timina no DNA) e citosina. Na tradução do mRNA cada codão é traduzido de acordo com o código genético. Existem um total de 64 combinações de codões que podem dar origem a um aminoácido ou podem representar um codão de iniciação ou de stop da síntese proteína. Os codões de iniciação e de stop são responsáveis pela iniciação e pela terminação da tradução, respetivamente. No entanto o código genético é degenerado, isto é, o mesmo aminoácido pode ser traduzido por vários codões <sup>2</sup> (Figura 2).

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G
						Third letter

**Figura 2** – O código genético (*Biology Pictures: Table of Genetic Code*. <http://biology-pictures.blogspot.pt/2013/10/table-of-genetic-code.html>)

Para que o péptido seja produzido a partir do mRNA, a atribuição de cada aminoácido a cada codão depende do RNA de transferência (tRNA). O tRNA é formado por 5 domínios: o braço aceitador, o D-loop, o TΨC-loop, o loop do anticodão e o loop variável. O braço aceitador termina em cadeia simples e corresponde ao local de ligação do aminoácido. O D-loop e o TΨC-loop contêm a base modificada diidrouridina e a pseudouridina, respetivamente. O loop do anticodão contém o anticodão, uma sequência de 3 nucleótidos nas posições 34, 35 e 36 correspondente aos codões do mRNA. O anticodão do tRNA emparelha com o codão do mRNA transferindo o aminoácido que se encontra no braço aceitador. O aminoácido do braço aceitador é específico para o codão correspondente ao anticodão do tRNA. Isto é, cada tRNA é específico para um único aa, aa esse que é codificado pelo codão correspondente ao anticodão, segundo o código genético <sup>4,5</sup>. O loop variável varia de tRNA para tRNA consoante o aa que este transfere, sendo este loop uma característica identificativa do tRNA <sup>6</sup> (Figura 3).



**Figura 3** - Estrutura do tRNA (Krawetz, S. A. Introduction to Bioinformatics: A Theoretical And Practical Approach, Volume 1. (2003). at <<http://www.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=oT3FP1pT5iQC&pgis=1>>).

### 1.1.3. Tradução eucariota

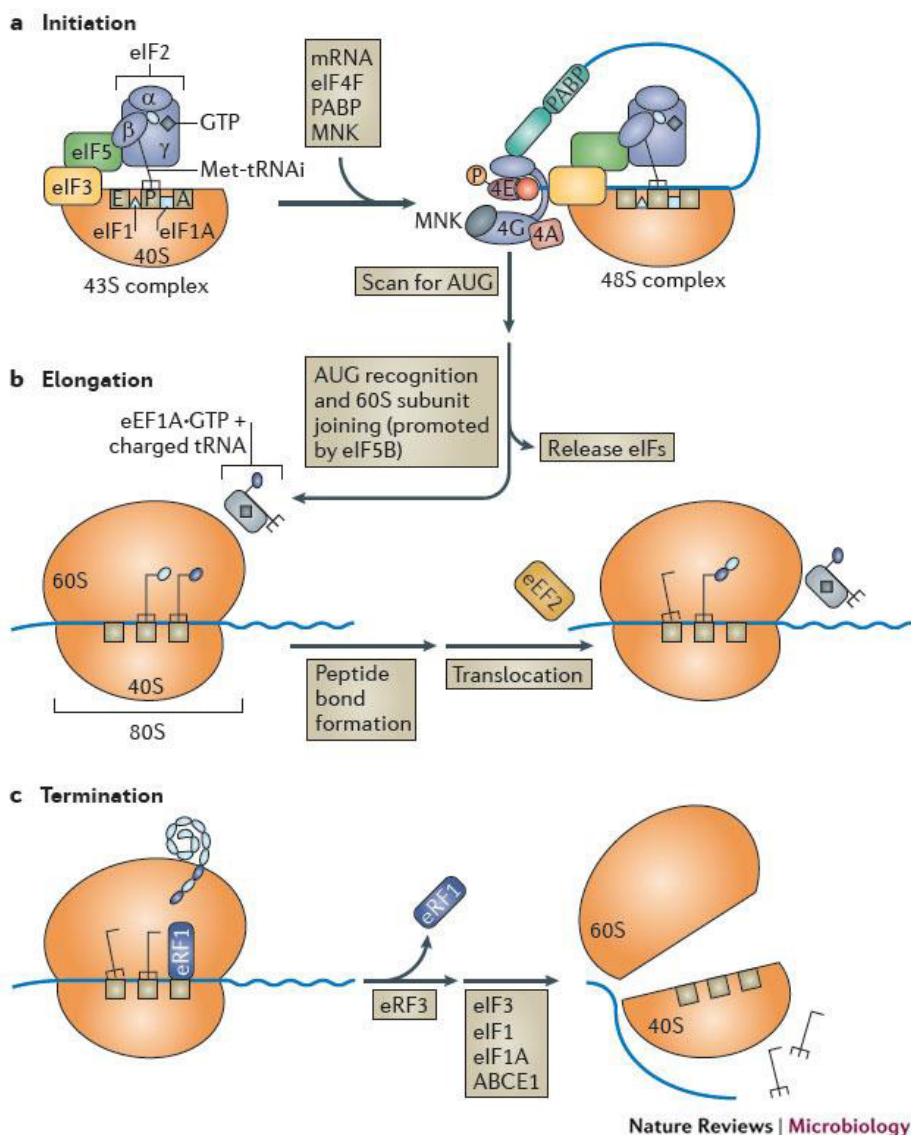
O processo de tradução é composto por 3 fases distintas: a iniciação, a elongação e a terminação com posterior reiniciação. Na primeira fase é formado o complexo de iniciação 48S que é constituído pela subunidade 40S do ribossoma, pelo mRNA e por diversos fatores eucariotas de iniciação da tradução (eIF), nomeadamente o eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5, eIF2, eIF4F e a PABP (proteína de ligação à poly(A)) <sup>7</sup>. O eIF1A estimula a ligação de eIF2-GTP-Met-tRNA<sup>Met</sup> (GTP - guanosina trifosfato; Met-tRNA<sup>Met</sup> - tRNA do codão de iniciação acilado com o aa de metionina) à subunidade menor 40S e coopera com o eIF1 promovendo o scan do ribossoma e o reconhecimento do codão de iniciação <sup>8</sup>. O eIF5 é uma proteína de ativação de GTPase que induz a hidrólise de eIF2-GTP aquando o reconhecimento do codão de iniciação <sup>8</sup>. O complexo eIF4F é responsável pela adesão do complexo 43S à extremidade 5' do mRNA <sup>7</sup>. A proteína de ligação à poly(A) liga-se à extremidade 3' do mRNA e à subunidade eIF4G assegurando a circularização do mRNA <sup>7</sup>. A circulação do mRNA ajuda na reciclagem da subunidade 40S do ribossoma após a tradução <sup>9</sup>. O eIF3, eIF1 e eIF1A são responsáveis pelo reconhecimento do codão de iniciação. O eIF5 e o eIF5B promovem a hidrólise de eIF2-GTP, a libertação dos fatores de iniciação e a ligação da subunidade maior 60S do ribossoma <sup>7,8</sup> (Figura 4).

A fase de elongação começa com a tradução do segundo codão com o auxílio de dois fatores: o eEF1A e o eEF2 <sup>10</sup>. O eEF1A-GTP (eEF - fator eucariota de elongação da tradução) é responsável pela entrega dos aa-tRNAs (aminoacil-tRNA) ao local A (local aminoacil onde se ligam os aa-tRNA) do ribossoma <sup>7</sup>. O reconhecimento do codão pelo tRNA induz a hidrólise de GTP pelo eEF1A, induzindo a libertação do fator e permitindo a ligação do aa-tRNA no local A <sup>10</sup>. Posteriormente o péptido em formação é transferido do local P (local peptidil) para o local A, dando-se assim a incorporação do novo aa <sup>10,11</sup>. Após o ribossoma catalisar a ligação do aminoácido ao péptido em formação, o eEF2 catalisa a translocação do ribossoma transferindo o tRNA desacilado do local P para o local E (local de saída do tRNA desacilado) e posicionando o peptidil-tRNA (tRNA ligado ao péptido em formação), que se encontrava no local A, no local P. O local A fica livre para o próximo codão a ser traduzido <sup>7</sup> (Figura 4).

A terminação da tradução ocorre quando é reconhecido um codão stop no local A do ribossoma através dos fatores eRF1 e eRF3. O eRF1 (fator eucariota de libertação) reconhece o codão stop no local A, impede a deslocação do ribossoma e é responsável pela libertação do péptido e posteriormente o eRF3 liberta o eRF1 do ribossoma. Os



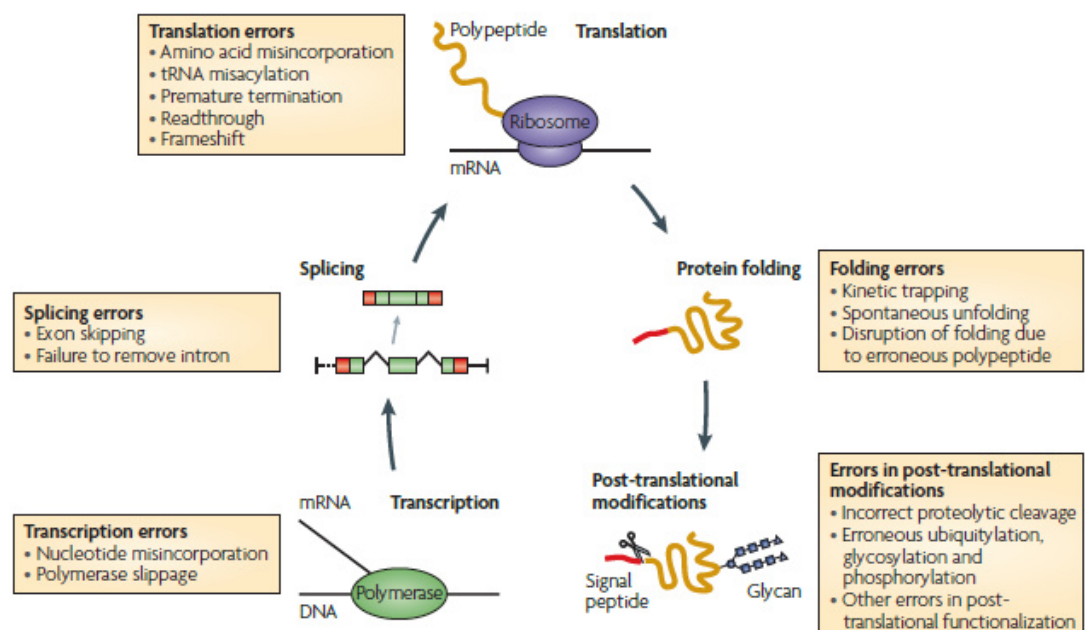
fatores de iniciação (eIF3, eIF1, eIF1A) juntamente com a multifuncional ABCE1 desmontam o complexo garantindo a reciclagem das subunidades do ribossoma <sup>7,10</sup>. Quando o ribossoma traduz 2 ou mais regiões codificantes num transcrito ou quando há um novo ciclo de tradução do mesmo mRNA ocorre a reciclagem incompleta, denominada reiniciação. No segundo caso, a subunidade 40S é transferida da extremidade 3' UTR (região não traduzida) para a extremidade 5'UTR através da circularização do mRNA <sup>10</sup> (Figura 4).



**Figura 4** – As 3 fases da tradução: iniciação, alongação e terminação e os respectivos fatores envolvidos (Walsh, D. & Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011). at [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v9/n12/fig\\_tab/nrmicro2655\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v9/n12/fig_tab/nrmicro2655_F1.html))

### 1.1.4. Erros de tradução (mistranslation)

A taxa de erro basal da síntese proteica é de 1 incorporação errada de aminoácidos por  $10^4$  códons traduzidos <sup>11</sup>. Ao longo dos vários processos que ocorrem desde o DNA até à síntese proteica, a ocorrência de erros está eminente <sup>12</sup>. A produção de proteínas não funcionais pode ser consequência de falhas ao nível da transcrição, splicing, tradução do mRNA, falhas no mecanismo de enovelamento das proteínas ou nas modificações pós tradução <sup>13,14</sup> (Figura 5).



**Figura 5** – A origem dos erros nas diferentes etapas da síntese proteica eucariota (Drummond, D. A. & Wilke, C. O. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nat. Rev.* (2009). at [http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n10/fig\\_tab/nrg2662\\_F1.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n10/fig_tab/nrg2662_F1.html))

Ao nível da tradução, a formação do complexo aminoacil-tRNA, pela aminoacil-tRNA sintetase (aaRS), é o primeiro passo onde os erros podem surgir <sup>11,15</sup>. A formação do complexo exige uma seleção precisa do aminoácido correspondente ao tRNA que irá ser acilado. Para prevenir uma incorreta acilação do tRNA, as aaRSs têm um papel fundamental selecionando rigorosamente o aa e o tRNA <sup>11,16</sup>. Para que a acilação do tRNA seja um processo fiável, existem mecanismos de editing que garantem a correção da misacilação. O mecanismo de editing denomina-se editing pré-transferência ou pós-

transferência caso a aaRS corrija a seleção errada do aa antes ou depois da formação de aa-tRNA, respetivamente <sup>16,17</sup>. No entanto há algumas aaRS que corrigem a acilação em ambos os mecanismos de editing <sup>16</sup>. Um segundo mecanismo de defesa da célula contra a misacilação do tRNA está presente na estabilidade termodinâmica do aminoacil-tRNA. Os tRNAs com os corretos aa têm a afinidade de ligação semelhante ao contrário dos que contêm um aa errado. Essa estabilidade é importante na sua ligação com o fator eEF1A <sup>11</sup>.

De seguida, ocorre outro mecanismo de proofreading aquando a ligação codão-anticodão no local A do ribossoma. Aqui o reconhecimento do codão pelo tRNA induz a hidrólise de GTP por eEF1A, induz a libertação do fator e permite a ligação do aa-tRNA no local A <sup>10,11</sup>. Posteriormente o ribossoma é responsável por verificar a correspondência da ligação codão-anticodão, apesar de não poder distinguir entre os tRNAs correta ou incorretamente acilados <sup>11</sup>.

As inúmeras modificações pós transcrição dos tRNAs influenciam também a interação codão-anticodão, a rapidez e a precisão da tradução <sup>11</sup>. As modificações são divididas em 3 categorias: as que se localizam próximas ou no loop do anticodão; as que se encontram no corpo principal do tRNA e na terceira categoria estão os casos específicos que se encontram em várias posições. As primeiras interferem com a tradução e o crescimento, que é o caso da inosina na posição 34 (I<sub>34</sub>). As estirpes de levedura sem a modificação I<sub>34</sub> são inviáveis. A segunda categoria encontra-se no corpo principal do tRNA, onde as modificações afetam o mecanismo de enovelamento ou a estabilidade do tRNA. É o caso da metilação da adenosina na posição 9 (m<sup>1</sup>A<sub>9</sub>). A falta desta modificação nos tRNAs de células humanas leva à formação de uma estrutura alternativa. E na terceira, encontram-se algumas modificações em várias posições que afetam especificamente a identidade do tRNA. É o que acontece com a Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)) na posição 64 que é um elemento identificativo do tRNA<sup>Met</sup> em levedura <sup>18</sup>.

Após o aminoacil-tRNA se ligar ao local A e após a adição do aa ao péptido, o peptidil-tRNA é movido para o local P. Nesta fase o ribossoma continua a verificar a interação codão-anticodão de modo a detetar possíveis erros que possam ter permanecido após a aminoacilação do tRNA e o proofreading no local A. Caso não haja uma correspondência do codão-anticodão no local P, há uma perda de especificidade no local A do ribossoma. Essa perda de especificidade resulta num aumento dos erros e na terminação prematura da elongação. É de salientar que o correto posicionamento da frame de leitura é fundamental para a correta interação codão-anticodão e para a correta

tradução <sup>11</sup>. A alteração da frame de leitura pode levar a erros missense, nonsense, frameshifting ou de processabilidade. Nos erros missense é incorporado um aminoácido incorreto dando origem a uma proteína mutante; nos nonsense a leitura do mRNA é feita para além do codão stop originando uma proteína maior; no frameshifting é alterada a frame de leitura do mRNA e os erros de processabilidade devem-se à terminação prematura da tradução obtendo-se uma proteína truncada. Estas alterações na síntese proteica podem levar a proteínas com conformação errada e não funcionais <sup>12,19</sup>.

Os erros de tradução, em casos excepcionais, podem levar a proteínas com novas e vantajosas funcionalidades <sup>20</sup>. Alguns estudos têm mostrado que os erros de tradução podem ser vantajosos, nomeadamente em células de mamíferos durante a resposta imune, na exposição das células de mamíferos a partículas virais. Aqui observa-se um aumento dos erros de tradução resultando num aumento de 10 vezes da incorporação errada de metionina. Este efeito é induzido quando há aumento de espécies reativas de oxigénio uma vez que a metionina protege as proteínas do stress oxidativo <sup>11</sup>. Estudos recentes mostram que a errada incorporação de metionina está presente em células dos vários domínios da vida e é mediada pela metionil-tRNA sintetase completamente funcional <sup>15</sup>.

## **1.2. Agregação proteica e stress proteotóxico**

### **1.2.1. Acumulação de proteínas com enovelamento errado (misfolded) - proteotoxicidade**

A falha dos mecanismos de controlo de qualidade resulta na síntese de péptidos não funcionais e na acumulação de proteínas com conformação errada. Estas proteínas podem originar agregados proteotóxicos <sup>11</sup>. Ao agregarem, as proteínas com má conformação conduzem à formação de 2 tipos de agregados: amorfos ou formados por fibrilhas amilóides. Relativamente aos agregados amorfos pouco se sabe para além de que são formados por proteínas amiloidogénicas que não deram origem às fibrilhas amilóides e que são acumulados em todas as células. Os agregados amilóides são em forma de emaranhados ou placas e estão associados a várias doenças como o alzheimer e a diabetes tipo II <sup>21,22</sup>.

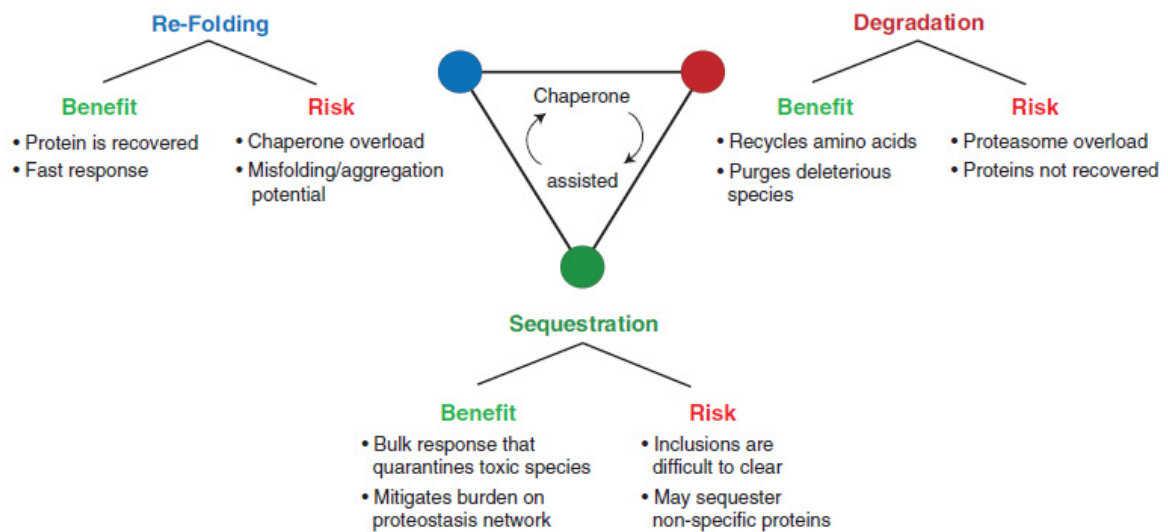
As fibrilhas amilóides são formadas por protofibrilhas que funcionam como um centro nuclear para a formação de protofilamentos maduros e são dinâmicas. Esse dinamismo permite que elas se juntem, se dissociem e se voltem a juntar com frequência dificultando a sua associação a determinadas doenças uma vez que se tornam difíceis de

detetar <sup>21</sup>. As fibrilhas amilóides são resistentes às proteases, por esta razão uma vez iniciada a sua formação esta não será revertida. A toxicidade das fibrilhas amilóides resulta numa resposta inflamatória que causa lesões ao nível local na célula assim como nos seus mecanismos. Essas alterações influenciam a homeostase do cálcio e causam lesões oxidativas provenientes dos radicais livres <sup>23</sup>.

### **1.2.2. Controlo da qualidade proteica**

As proteínas com conformação errada ocorrem na célula como uma consequência das mutações, de condições de stress e/ou de alterações metabólicas. Como proteção, a célula ativa os mecanismos de controlo de qualidade proteica (CQP) e sequestra as proteínas com má conformação e/ou agregadas <sup>24</sup>. O CQP assegura a proteostase através da capacidade de enovelamento dos chaperones e da degradação de proteínas com conformação errada por proteases, sistema ubiquitina-proteossoma e autofagia lisossomal <sup>21</sup>.

Os chaperones são moléculas que reconhecem as proteínas com conformação errada. Estes estão presentes no retículo endoplasmático (RE) e no citoplasma e são responsáveis por corrigir o enovelamento, degradar e sequestrar as proteínas com conformação errada de forma a proteger a célula. Corrigem o enovelamento quando é possível, e caso não o seja, as proteínas são degradadas via sistema ubiquitina-proteossoma (SUP) prevenindo a sua agregação. As proteínas com conformação errada que não são re-enoveladas ou degradadas são sequestradas em compartimentos. A sequestração previne a formação de agregados tóxicos e permite um controlo das proteínas aberrantes ou propícias a agregar <sup>24,25</sup> (Figura 6). Nas células eucariotas os chaperones podem estar ligados à síntese proteica (CLISP - chaperone ligado à síntese proteica) ou serem um mecanismo de defesa ao choque térmico (PCT – proteínas de choque térmico). Os CLISP estão associados à tradução e são responsáveis pelo enovelamento das proteínas recentemente formadas. As PCT são induzidas por fatores de choque térmico e protegem o proteoma do stress <sup>24</sup>. Os chaperones são geralmente classificados em classes consoante as suas massas moleculares <sup>24</sup>. As pequenas PCT (pPCT) são responsáveis por assegurar a solubilidade das proteínas com enovelamento parcialmente errado. Estes podem ligar-se a péptidos individuais ou entre oligómeros e agregados de proteínas com conformação errada <sup>21</sup>.



**Figura 6** – As ações dos chaperones para manter a proteostase: re-enovelamento, sequestração e degradação proteica (Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T. & Frydman, J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, (2011)).

A presença dos chaperones no RE equilibra a maturação/degradação das proteínas. Como resultado apenas as proteínas com conformação totalmente aberrante serão degradadas. Aquelas que se encontram parcialmente mal enoveladas são sujeitas a uma retenção no retículo até adquirirem a sua conformação tridimensional correta<sup>26</sup>. A resposta às proteínas do retículo endoplasmático com enovelamento errado (RPEE – resposta às proteínas com o enovelamento errado) é ativada quando há acumulação destas proteínas<sup>27,26</sup>. A resposta ocorre através da indução de chaperones do RE que induzem respostas como a fosforilação do eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P), que é um fator eucariota de iniciação da tradução, e a clivagem proteolítica do ATF6 (fator de ativação da transcrição 6) que é responsável por induzir a transcrição de genes específicos<sup>27</sup>. O eIF2 $\alpha$  quando fosforilado impede que a tradução de proteínas aberrantes continue<sup>28</sup>. Quando o eIF2-GDP (guanosina difosfato) é libertado do ribossoma é necessário que haja a reciclagem do fator para eIF2-GTP, pelo eIF2B, para que possa ocorrer nova iniciação da tradução. Se o eIF2 $\alpha$  for fosforilado inibe o eIF2B inibindo a iniciação da síntese proteica<sup>9,8,29</sup>. O ATF6 é sintetizado como uma proteína membranar do RE que está inativa enquanto ligada à membrana. Na presença de stress, o domínio citoplasmático, com capacidade de se ligar ao DNA e de ativar a transcrição, é clivado e migra até ao núcleo ativando a transcrição dos genes<sup>30,31</sup>. O ATF6 regula genes que codificam chaperones do retículo

endoplasmático e enzimas responsáveis pelo enovelamento proteico, nomeadamente a proteína dissulfeto-isomerase <sup>32,33</sup>.

O SUP é o maior sistema não lisossomal de degradação proteica na célula <sup>34</sup>. Este sistema é mediado por uma proteína, a ubiquitina. Esta ao ligar-se às proteínas marca-as para degradação controlando o nível da atividade através dos diferentes graus de ubiquitinação (mono ou poliubiquitinação) <sup>24</sup>. O SUP degrada seletivamente proteínas quer no citoplasma quer proteínas compartimentadas, como as do RE, devido à sua capacidade de exportar proteínas para o citoplasma. No entanto necessita que as proteínas com errada conformação estejam solúveis para facilitar a degradação, dependendo para tal da ação dos chaperones <sup>21</sup>. O SUP é um mecanismo proteolítico composto pelas enzimas E1 (ativação da ubiquitina), E2 (conjugação da ubiquitina) e E3 (ligação da ubiquitina) que são responsáveis pela ligação da ubiquitina às proteínas alvo, reconhecimento e degradação pelo proteossoma <sup>34</sup>. Inicialmente as moléculas de ubiquitina são ativadas pela enzima E1, transferidas posteriormente para a enzima E2 ocorrendo a sua conjugação ao substrato (proteína) e por fim E3 reconhece o substrato e catalisa o processo de ubiquitinação. Sucessivas conjugações de moléculas de ubiquitina à proteína resultam na formação de cadeias poliubiquitinadas <sup>34</sup>. A degradação das proteínas ubiquitinadas é feita pelo proteossoma. O proteossoma 26S é um mecanismo de degradação nas células eucariotas composto por um núcleo proteolítico 20S e um 19S cap regulador <sup>24</sup>. O complexo 19S reconhece os substratos poliubiquitinados e auxilia a translocação do substrato para o centro proteolítico 20S para degradação em pequenos péptidos. As cadeias de ubiquitina são removidas do substrato antes de este chegar ao centro proteolítico e são recicladas dando origem a ubiquitina livre <sup>34</sup>.

A autofagia lisossomal é outra linha de defesa da célula. Esta degrada porções citoplasmáticas onde os agregados são degradados por autofagia através do lisossoma. Grande parte das proteínas com conformação errada no RE são eliminadas por degradação associada ao RE (DARE – degradação associada ao retículo endoplasmático) que transporta as proteínas para o citoplasma para degradação via SUP. Caso a DARE seja ineficiente ou esteja comprometida, a autofagia lisossomal é ativada <sup>21,24,35</sup>. Assim como no SUP, a ação das enzimas E1, E2 e E3 desempenha um papel fundamental na autofagia. Estas enzimas intervêm na expansão da membrana e na captura das porções citoplasmáticas <sup>21</sup>.

Todos estes mecanismos protegem a célula de proteínas aberrantes que se tornam prejudiciais ao seu bom funcionamento. No entanto, a sobrecarga da ação dos chaperones, do SUP e da autofagia leva à agregação proteica. Por outro lado, a

saturação do RE com proteínas com errada conformação desencadeia a RPEE e a ativação de mecanismos pró-apoptóticos <sup>36</sup>.

### **1.3. Estilo de vida e doenças**

Os mecanismos que garantem a proteostase são influenciados por diversos fatores como os ambientais, o stress metabólico e o próprio genoma. Por exemplo, as mutações e os fatores ambientais, como os metais pesados, pesticidas, drogas e exposição a químicos, influenciam o enovelamento correto das proteínas. O stress metabólico, por outro lado, provoca uma desregulação da mitocôndria e uma produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio <sup>21,24</sup>.

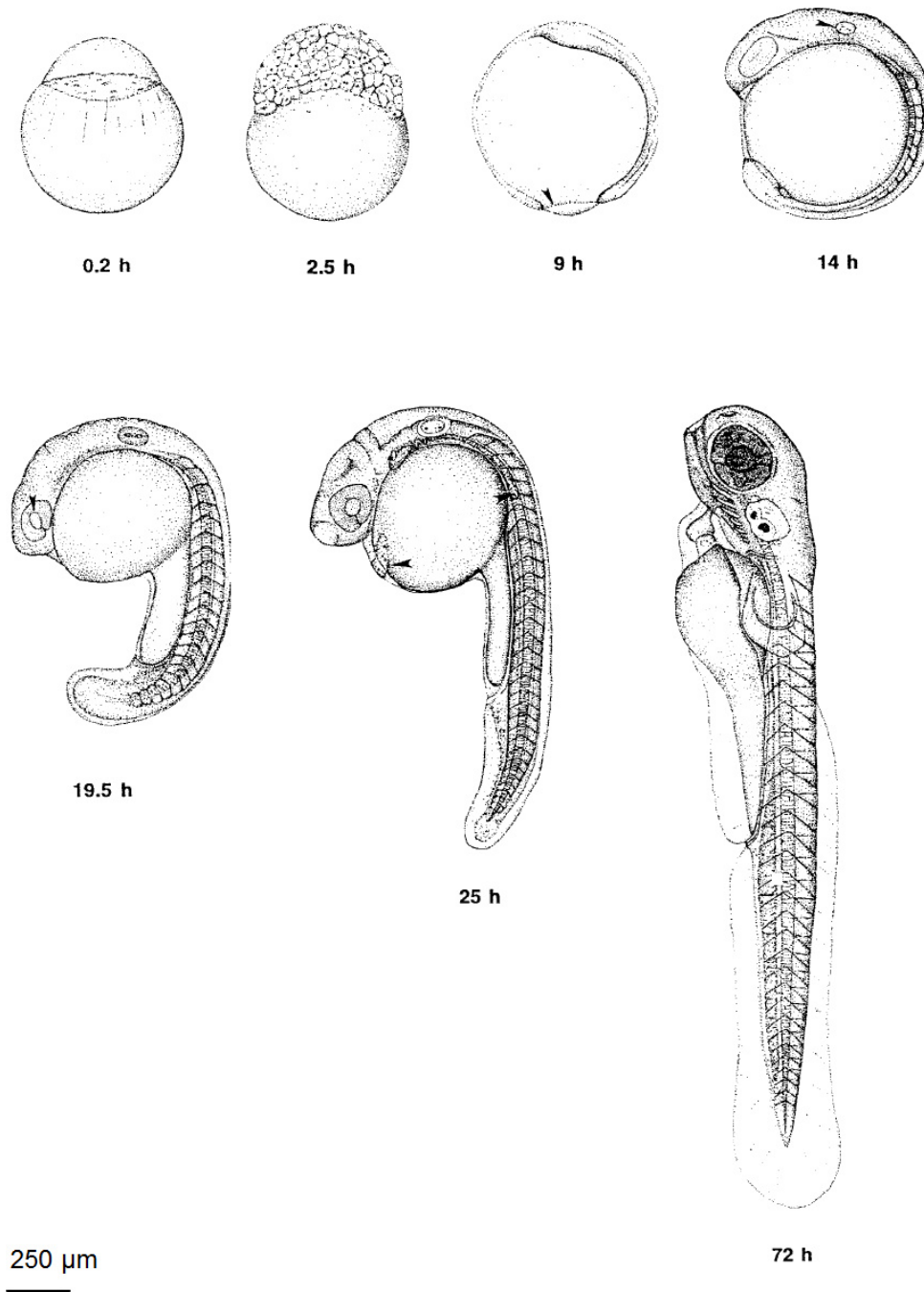
Os agregados formam-se devido à falha dos mecanismos de enovelamento e de degradação. Esses agregados, com o avançar da idade, acabam por ser responsáveis pelo aparecimento de doenças debilitantes <sup>24</sup>. Isso é explicado por um modelo que defende que, no início da vida a desagregação e a degradação eliminam os agregados eficientemente protegendo a célula e reciclando os aa. No entanto, o envelhecimento compromete estes mecanismos e os agregados proteicos acabam por se acumular na célula. Neste caso a célula ativa mecanismos secundários que levam à formação de mega-agregados de baixa toxicidade que se formam a partir de oligómeros altamente tóxicos. Os mega-agregados são posteriormente depositados e degradados. Neste caso, devido à baixa ação contra a proteotoxicidade, a neurodegeneração emerge em casos que estão associados a mutações, uma vez que acumulam muita agregação proteica (casos hereditários). Nos casos de baixa agregação, que não estão relacionados com mutações, as células conseguem ainda ultrapassar o stress evitando o aparecimento dos casos esporádicos. Todavia, com o envelhecimento, a eficiência de mega-agregação/deposição é diminuída, aumentando o stress proteotóxico com consequente aparecimento da doença <sup>25,37</sup>. A Charcot–Marie–Tooth e a Creutzfeldt–Jakob são exemplos de doenças associadas aos erros de tradução. A Charcot–Marie–Tooth é consequência de mutações em genes que codificam a glicil e tirosil-tRNA sintetase e a Creutzfeldt–Jakob resulta da acumulação e agregação amiloide de uma proteína aberrante (prião) <sup>38,21</sup>.



## **1.4. Peixe zebra, *Danio rerio***

### **1.4.1. Vantagens do *Danio rerio* como modelo vertebrado**

O peixe zebra é um vertebrado ovíparo, tropical de água doce com fertilização externa <sup>39,40</sup>. É um peixe pequeno (~5 cm), com um tempo de vida que pode atingir os 5 anos. É usado como animal modelo devido às inúmeras vantagens que apresenta, nomeadamente a relativa facilidade de criação/reprodução em cativeiro, elevada fecundidade (as fêmeas desovam cerca de 100-200 ovos por cruzamento), rápido desenvolvimento (Figura 7), curto período de geração (3-5 meses), fertilização externa, disponibilidade de métodos de manipulação genética bem instituídos, o facto do seu genoma se encontrar sequenciado com cerca de 70% dos seus genes com respetivo equivalente no genoma humano e a transparência dos embriões que permite não só o fácil acompanhamento do seu desenvolvimento como a seleção dos embriões que incorporam repórteres fluorescentes <sup>39,40</sup>.



**Figura 7** – As fases do desenvolvimento do peixe zebra até às 72 horas pós fertilização (adaptado de Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310 (1995)).

#### 1.4.2. Peixe zebra – modelo transgênico

Nesta tese foram utilizados, como modelos, peixes zebra transgênicos que expressam genes de tRNA mutantes. Foram utilizadas 3 linhagens de peixes transgênicos desenvolvidos em laboratório. Uma linhagem foi utilizada como controle que contém apenas o plasmídeo vazio, outra com peixes que apenas incorporam uma cópia extra do Ser-tRNA<sub>CGA</sub> (tRNA de Serina) endógeno e a terceira linhagem com o Ser-tRNA mutado no anticodão (Ser-tRNA<sup>Leu</sup>). Neste último, o anticodão CGA de Serina foi substituído pelo anticodão CAG de Leucina. Esta mutação leva o Ser-tRNA<sup>Leu</sup> a transferir erradamente serina ao reconhecer o codão CUG (Leucina) pelo anticodão mutado. A substituição do anticodão do Ser-tRNA (de Serina para Leucina) não interfere com a seril-tRNA sintetase (SerRS - responsável pela serilação dos tRNAs) uma vez que esta não interage com o anticodão dos Ser-tRNAs. No entanto, a substituição de Leucina por Serina altera a decodificação das proteínas na síntese proteica tornando-as aberrantes<sup>36</sup>. O Ser-tRNA<sup>Leu</sup> ao incorporar o aa errado simula as consequências, ao nível da célula, quer seja de uma incorreta acilação do tRNA (devido à incorreta atividade da aaRS e/ou falhas nos mecanismos de editing); de um incorreto emparelhamento entre codão-anticodão ou de mutações quer no codão do mRNA, quer no anticodão do tRNA. O uso destes tRNAs induz o stress no retículo endoplasmático e a ativação da resposta celular a este estímulo<sup>27</sup>.

Os tRNAs mutantes foram mutados ao nível do anticodão de maneira a transferirem Serina quando reconhecessem o codão da Leucina (CUG) - Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. O gene do Ser-tRNA endógeno foi clonado no vetor pT2AL200R150G produzindo o plasmídeo pT2tRNA<sup>Ser</sup>. A construção dos Ser-tRNA<sup>Leu</sup> mutantes foi produzida, usando o plasmídeo pT2tRNA<sup>Ser</sup>, por mutagênese dirigida dos 3 nucleótidos correspondentes ao anticodão do Ser-tRNA maduro. A mutagênese dirigida substituiu o anticodão CGA de Serina pelo anticodão CAG de Leucina. As mutações foram selecionadas de acordo com a similaridade das propriedades dos aminoácidos, com o codon usage e com o score da matriz BLOSUM 62. O plasmídeo vazio e os plasmídeos com tRNA (endógeno e de Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>) foram injetados nos embriões do peixe zebra com uma célula. Os peixes transgênicos foram produzidos usando o sistema Tol2, um transposição que se baseia na integração do DNA no DNA cromossomal e que já contém o gene eGFP. Este gene é vantajoso para acompanhar a integração do transgene. Os embriões obtidos foram mantidos em água do sistema e observados ao microscópio. Os peixes com

fluorescência proveniente da GFP foram mantidos e cruzados com os peixes selvagens para obter os peixes transgênicos F1 heterozigóticos. As gerações F2 com o plasmídeo vazio, com o Ser-tRNA endógeno e com o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> foram obtidas cruzando a população F1. A expressão da GFP serviu também para selecionar, em cada cruzamento efetuado, os embriões às 24 horas pós fertilização (hpf). Os peixes que incorporaram o plasmídeo expressam a GFP e por isso foram os usados em todas as experiências. Nesta tese, a geração usada foi a F3.

A substituição de Leucina por Serina na síntese proteica altera a descodificação das proteínas tornando-as aberrantes <sup>36</sup>. A Serina e a Leucina são 2 aminoácidos com características muito distintas. Enquanto a Serina é um aa polar e hidrofílico, a Leucina é apolar, hidrofóbico e alifático. Os aa hidrofóbicos estão frequentemente no centro das proteínas hidrofóbicas e os hidrofílicos encontram-se na superfície proteica <sup>36,41</sup>. A semelhança entre os aminoácidos é quantificada na matriz BLOSUM 62 (Figura 8). Para cada substituição entre o par de aa é calculado um score consoante as suas características físico-químicas, frequência e conservação. Os scores mais elevados dizem respeito às substituições mais similares e portanto às menos agressivas para a célula <sup>42,43</sup>. A substituição de Leucina por Serina tem um score negativo (-2), o que prevê um impacto negativo desta substituição na célula. A diferença entre a Leucina e a Serina origina a síntese de proteínas aberrantes aquando a errada incorporação, interferindo com a proteostase <sup>36</sup>.

C	9																			
S	-1	4																		
T	-1	1	5																	
P	-3	-1	-1	7																
A	0	1	0	-1	4															
G	-3	0	-2	-2	0	6														
N	-3	1	0	-2	-2	0	6													
D	-3	0	-1	-1	-2	-1	1	6												
E	-4	0	-1	-1	-1	-2	0	2	5											
Q	-3	0	-1	-1	-1	-2	0	0	2	5										
H	-3	-1	-2	-2	-2	-2	1	-1	0	0	8									
R	-3	-1	-1	-2	-1	-2	0	-2	0	1	0	5								
K	-3	0	-1	-1	-1	-2	0	-1	1	1	-1	2	5							
M	-1	-1	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	0	-2	-1	-1	5						
I	-1	-2	-1	-3	-1	-4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	1	4						
L	-1	-2	-1	-3	-1	-4	-3	-4	-3	-2	-3	-2	2	2	4					
V	-1	-2	0	-2	0	-3	-3	-3	-2	-2	-3	-3	1	3	1	4				
F	-2	-2	-2	-4	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-1	-3	0	0	0	-1	6			
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-3	-2	-3	-2	-1	2	-2	-2	-1	-1	-1	-1	3	7	
W	-2	-3	-2	-4	-3	-2	-4	-4	-3	-2	-2	-3	-3	-1	-3	-2	-3	1	2	11
C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	

**Figura 8** – A Matriz BLOSUM 62: os scores para as diferentes substituições dos aminoácidos (adaptado de Henikoff, S. & Henikoff, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10915–9 (1992)).

### 1.5. Objetivos

O objetivo deste estudo foi estudar de que forma os erros de tradução afetam um organismo vertebrado ao longo do seu ciclo de vida. Para tal usaram-se peixes zebra transgênicos como modelo vertebrado de acumulação de erros de tradução. Foram usadas 3 linhagens de peixes transgênicos já criadas no laboratório: uma utilizada como controlo que contém o plasmídeo vazio, outra com peixes que incorporam uma cópia extra do Ser-tRNA endógeno e a terceira linhagem com o Ser-tRNA mutante que insere Serina quando reconhece um codão de Leucina levando à síntese de proteínas aberrantes.

Verificou-se que, de facto, a acumulação de erros de tradução altera o desenvolvimento do peixe zebra. Nomeadamente, foram observadas alterações fenotípicas nos peixes que acumularam erros de tradução (Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>) assim como a ativação de mecanismos de proteção celular contra a acumulação de proteínas aberrantes. Esses resultados contribuíram para uma melhor compreensão dos efeitos nefastos dos erros de tradução na célula assim como no organismo e dos mecanismos que a célula ativa para se proteger desses mesmos erros.

## **2. Materiais e Métodos**

## **2.1. Criação e manutenção do Peixe zebra (*Danio rerio*)**

Os peixes zebra foram mantidos a 28°C com um ciclo de 14h de luz/ 10 horas de escuridão. A obtenção dos ovos seguiu os procedimentos usados na Facility e a criação como todos os procedimentos experimentais foram autorizados pela comissão local do bem-estar animal e respeitando a lei portuguesa para o uso de animais de laboratório (Portaria nº1005/92, 23 de Outubro, 1992).

## **2.2. Morte celular**

Para avaliar a morte celular foram utilizados 25 embriões transgênicos da geração F3 com 24 hpf. Estes embriões foram previamente descorionados com pronase 2 mg/mL (Sigma) <sup>44</sup>. Este processo liberta o embrião do córion, permitindo que o mesmo esteja acessível. Os embriões foram incubados com uma solução de laranja de acridina (Sigma) 5 µg/mL durante 30 minutos a 28°C. A solução de acridina penetra nas células mortas ligando-se à cromatina <sup>45</sup>. Quando a célula está intacta, a laranja de acridina é acumulada nos lisossomas e não penetra no núcleo. No entanto, nas células em morte celular, com a alteração do pH intracelular, a acridina é libertada para o citoplasma ligando-se aos ácidos nucleicos <sup>46</sup>. Após a incubação, os embriões sofreram lavagens sucessivas com água do sistema para eliminar o excesso de corante. Os embriões foram posteriormente anestesiados com 0,001% de tricaine (sal etil 3-aminobenzoato metanossulfonato, Fluka, sobredose: 0,03%) e observados ao microscópio de fluorescência (Zeiss Imager.Z1, ampliação: 50X). A contagem das células em morte celular foi restringida à região da cabeça devido à fácil observação desta região. A contagem foi efetuada no ImageJ.

## **2.3. Coloração das cartilagens**

Aos 5 dias de desenvolvimento 20 larvas transgênicas da geração F3 foram anestesiados com 0,001% de tricaine (sal etil 3-aminobenzoato metanossulfonato, Fluka, sobredose: 0,03%) e fixadas numa solução de paraformaldeído (Merck) a 4%, durante 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado uma solução de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0,5% KOH durante 30 minutos para remover o pigmento das larvas. Após a remoção do pigmento foi adicionado a solução de azul de alcian (Fluka) a 5% durante a noite para corar as cartilagens. No dia seguinte as larvas foram lavadas com soluções de HCl-Etanol e H<sub>2</sub>O miliQ (100%/0%, 75%/25%, 50%/50%, 25%/75% de HCl-etanol/H<sub>2</sub>O

miliQ e a última com 100% H<sub>2</sub>O miliQ) para remover a coloração inespecífica. De seguida foram imobilizados numa lâmina com metil celulose (Sigma) a 3% e observadas à lupa (Nikon SMZ800, ampliação: 30 X e 70 X).

#### **2.4. SDS-PAGE das proteínas insolúveis (agregados proteicos)**

Aos 100 peixes transgênicos da geração F3 já descorionados e sem o saco vitelino <sup>44</sup> foi adicionado o tampão de lise (em anexo). Posteriormente ocorreu a digestão dos peixes por sonicação (sonicador Branson Sonifier 250) e após a primeira centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C obteve-se o extrato total (sobrenadante). O extrato total foi quantificado através do Kit por BCA (ácido bicinconínico) (Thermo Scientific) seguindo as normas do fabricante e retirou-se uma fração igual para todas as amostras. Essa fração foi centrifugada a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C e obteve-se a fração solúvel (sobrenadante). O pellet foi lavado com 320 µL do tampão de lise e 80 µL de 10% triton-X 100 (PlusOne), para remover as membranas, e centrifugado 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O pellet obtido é a fração insolúvel que foi diluído em 20 µL de tampão de lise. Posteriormente, a fração insolúvel foi corrida em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio) (em anexo), os géis foram corados com Coomassie brilliant blue R (Sigma), digitalizados, analisados no Odyssey® IR scanner e as quantificações obtidas foram normalizadas com a proteína total. Na análise das proteínas insolúveis para os peixes adultos, foram usadas réplicas com 3 peixes cada. Os peixes foram anestesiados com 0,03% tricaine (sal etil 3-aminobenzoato metanossulfonato, Fluka, sobredose: 0,03%), os órgãos foram isolados e congelados imediatamente em azoto líquido e de seguida guardados a -80°C. As amostras foram lisadas e processadas como já descrito.

#### **2.5. Western blot**

Foi obtido o extrato total de 100 embriões transgênicos da geração F3 com 5 dias pós fertilização (dpf). Posteriormente quantificou-se o extrato total através do Kit por BCA (ácido bicinconínico) (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e correu-se por SDS-PAGE (em anexo) 30 µg de proteína total/poço. Os perfis proteicos foram posteriormente transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) pelo Trans-Blot Turbo Transfer System da BioRad. A membrana foi de seguida bloqueada em 5% de albumina de soro bovino (NZYTech) (diluído em em TTS-T (tampão tris salino com tween 20) (em anexo)) para evitar ligações inespecíficas. Para marcação dos fatores, a membrana foi incubada com os respetivos anticorpos primários diluídos em 5% de albumina de soro bovino (NZYTech) (diluido em TTS-T): anti-eIF2α (Abcam,



diluição 1:500), anti-eIF2 $\alpha$  fosforilado (Abcam, diluição 1:1000), anti-ubiquitina (Covance, diluição 1:1000) e anti-ATF6 (Enzo Life Sciences, diluição 1:400). Em seguida, para detetar a marcação, as membranas foram incubadas no escuro com os anticorpos secundários correspondentes (anti-rato (Odyssey LI-COR, diluição 1:10000) ou anti-coelho (Odyssey LI-COR, diluição 1:10000)) (Tabela 1). A normalização foi feita através da marcação da tubulina com o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma, diluição 1:1000). As membranas foram digitalizadas e analisadas através do Odyssey® IR scanner.

**Tabela 1** – Os anticorpos primários usados e os respetivos anticorpos secundários

<b><u>Anticorpo primário</u></b>	<b><u>Anticorpo secundário</u></b>	
	<b><u>Anticorpo</u></b>	<b><u>Hospedeiro</u></b>
Anti-ATF6	Anti - rato	Cabra
Anti-Ubiquitina		
Anti- $\alpha$ -tubulina		
Anti-eIF2 $\alpha$	Anti - coelho	Cabra
Anti-eIF2 $\alpha$ fosforilado		

## 2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados através do GraphPad Prism. As diferenças entre o controlo e os embriões com a condição Ser-tRNA e Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> foram avaliadas pelo Student's t-test. Todas as análises com p value < 0.05 foram consideradas estatisticamente significativas(\*).

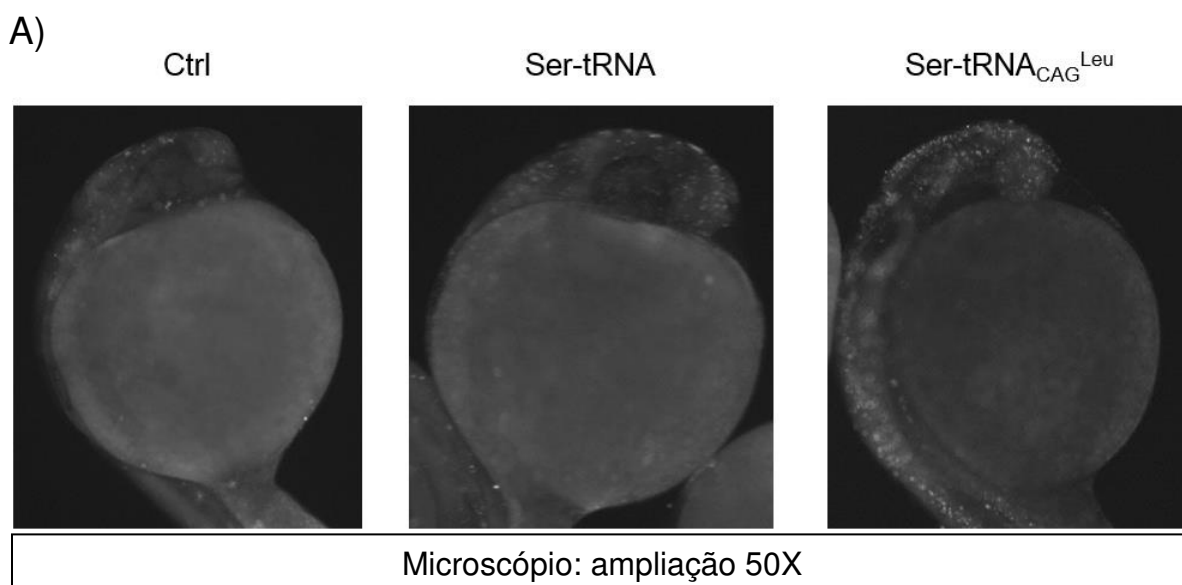
## **3. Resultados**

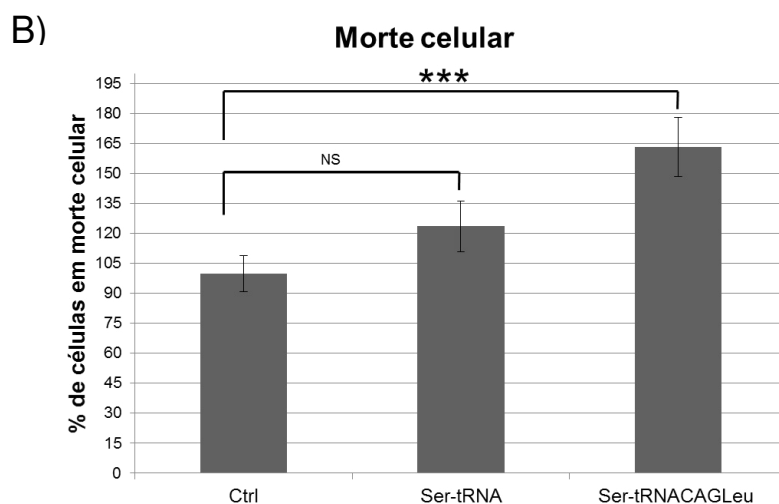
### 3.1. Efeito da incorporação de erros na síntese proteica no desenvolvimento do peixe zebra

#### 3.1.1. Taxa de morte celular às 24 hpf

A quantificação da morte celular é um indicador do nível de stress a que os peixes foram expostos devido à acumulação de erros de tradução. A morte celular pode ocorrer devido a apoptose ou necrose. A apoptose é descrita como um processo de morte celular ativo e programado que evita a inflamação. A necrose é caracterizada como sendo uma morte celular passiva e acidental que leva à libertação descontrolada do conteúdo celular com consequente resposta inflamatória <sup>47</sup>. Para quantificar a morte celular foi usado o reagente laranja de acridina que penetra nas células mortas ligando-se à cromatina, devido à alteração do pH intracelular. Marca tanto células em apoptose como em necrose. Este reagente foi usado para quantificar a morte celular em resposta à acumulação de erros de tradução, de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os peixes transgênicos foram selecionados às 24 hpf através da expressão da GFP. Após a coloração com laranja de acridina, foi feita a contagem das células mortas no ImageJ.

É notório um aumento do número de células mortas nos embriões que expressam o tRNA mutado Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. O aumento de morte celular neste caso foi de 63% em relação ao controlo. Há também um ligeiro aumento de morte celular nos embriões que expressam uma cópia extra do tRNA de serina (23,5%), mas que não é estatisticamente significativo (Figura 9).





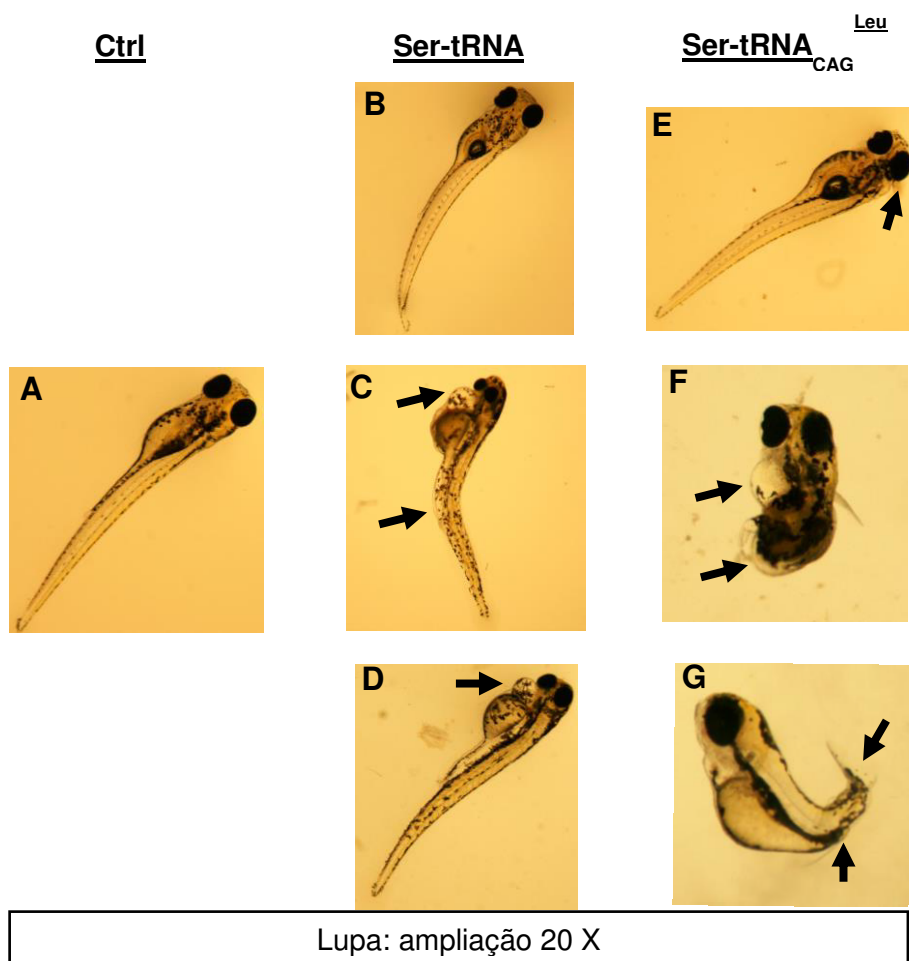
**Figura 9 –** A) Coloração dos peixes controlo, Ser-tRNA e Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> com laranja de acridina às 24 hpf. B) Percentagem de células em morte celular às 24 hpf. A morte celular no controlo corresponde aos 100%, na linhagem Ser-tRNA houve um aumento de 23,5% e na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> de 63%. (A análise dos dados foi feita através do Student's t-test; \*\*\* p<0.001, n=3 (NS – estatisticamente não significativo)).

### 3.1.2. Alterações no desenvolvimento do peixe zebra

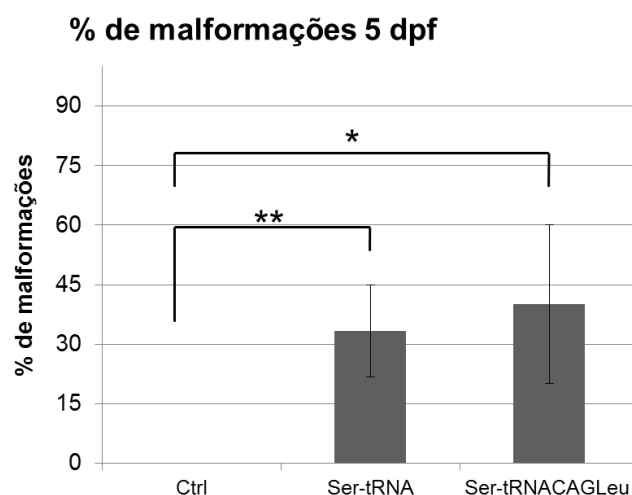
#### 3.1.2.1. Alterações fenotípicas aos 5 dias pós fertilização

A introdução de erros na síntese proteica pode levar à produção de proteínas aberrantes que podem afetar o desenvolvimento dos vertebrados <sup>36</sup>. Para estudar os efeitos da acumulação dos erros de tradução durante o desenvolvimento do peixe zebra, os embriões foram examinados aos 5 dpf. Os embriões foram observados aos 5 dpf visto que já se encontram completamente formados.

Comparativamente com os peixes controlo que não apresentaram malformações, tanto os peixes com o Ser-tRNA e com o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> apresentaram anomalias. Na linhagem Ser-tRNA os edemas na região pericardial e as caudas curvadas foram predominantes, representando cerca de 33% da totalidade dos peixes desta linhagem (Figura 10 e Figura 11). Na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> alguns peixes apresentaram cabeças não desenvolvidas relativamente ao controlo, havendo também deficiências no corpo da larva, nomeadamente encurtamento da cauda, edemas, perda da barbatana caudal, perda da simetria longitudinal e curvatura das caudas. Estes peixes representaram 40% do total desta linhagem (Figura 10 e Figura 11). Estes dados evidenciam que os peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> são os mais afetados, provavelmente devido à acumulação de erros de tradução durante o desenvolvimento.



**Figura 10** - Alterações fenotípicas nas 3 linhagens de peixes transgênicos aos 5 dpf com as alterações mais evidentes assinaladas com setas. Nos peixes controle não foram observadas anomalias fenotípicas (A). Na linhagem Ser-tRNA foram observados peixes com edemas na região pericardial assim como caudas curvadas (B, C e D). Nos peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> foram observadas larvas com cabeças não desenvolvidas (E), assim como anomalias que afetam todo o corpo da larva, nomeadamente encurtamento da cauda, edemas, perda da barbatana caudal, perda da simetria longitudinal e curvatura das caudas (F e G).



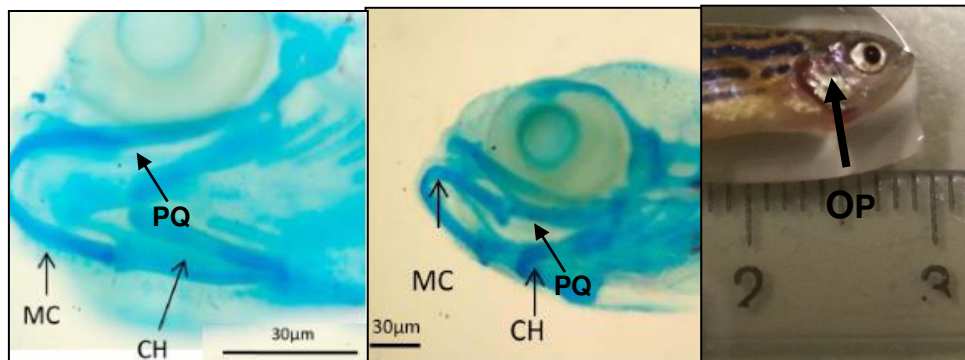
**Figura 11** - % de malformações fenotípicas nas 3 linhagens de peixes transgênicos aos 5 dpf. No controle não foi observada nenhuma anomalia enquanto a linhagem Ser-tRNA apresentou 33% e a Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> 40% de peixes alterados. (A análise dos dados foi feita através do Student's t-test; \*\* p<0.01, \* p<0.05, n=3).

A disparidade entre os fenótipos observados na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> mostra uma heterogeneidade da população, onde uns peixes são severamente afetados enquanto outros se encontram aparentemente normais. Esta heterogeneidade influenciou os estudos efetuados ao nível da sua significância estatística.

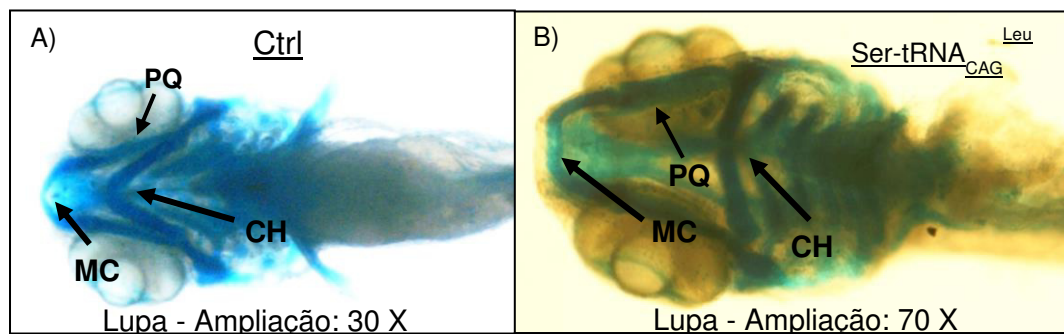
### 3.1.2.2. Anomalias nas cartilagens aos 5 dpf

As cartilagens foram coradas de modo a perceber que alterações os peixes sofrem no seu desenvolvimento/crescimento aquando da indução de erros de tradução. A coloração das cartilagens permite que se tornem visíveis possíveis malformações no desenvolvimento do esqueleto dos peixes.

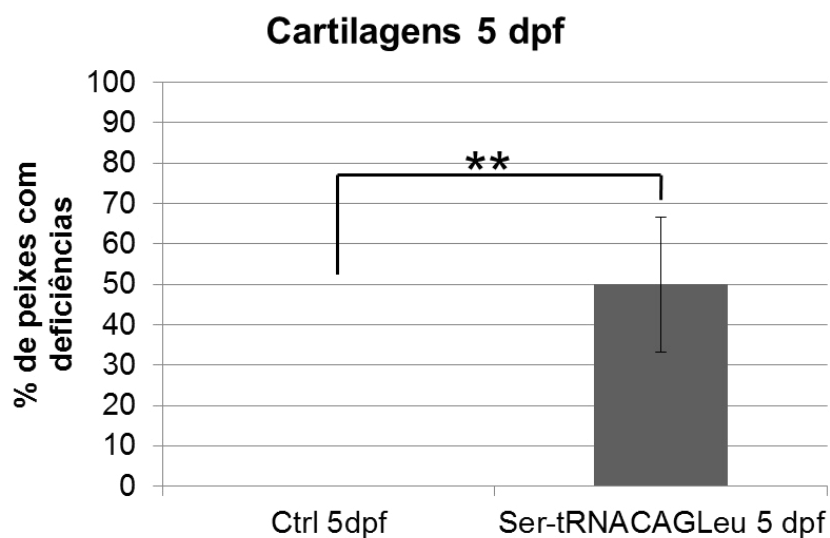
As anomalias observadas dizem respeito ao arco mandibular (cartilagem de Meckel (MC) e palatoquadrato (PQ)) e à cartilagem ceratohial (CH) que faz parte do arco hioide que irá dar origem aos opérculos <sup>48</sup> (Figura 12). Os resultados obtidos nesta experiência foram comparados com a Figura 12 que representa o desenvolvimento normal dos peixes. Foi observado que enquanto os peixes controlo apresentavam arcos com uma amplitude normal, os peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> apresentavam uma amplitude exagerada (Figura 13). Estes peixes, com anomalias nas cartilagens, representaram 50% da totalidade da linhagem observada (Figura 14). Estas anomalias provêm provavelmente do efeito prejudicial da acumulação dos erros de tradução nesta linhagem. Não se efetuou esta análise para os peixes Ser-tRNA devido ao número insuficiente de larvas.



**Figura 12** – Coloração das cartilagens da cabeça do peixe zebra. Cartilagem de Meckel (MC); palatoquadrate (PQ); ceratohial (CH) e opérculo (OP) (adaptado de Maradonna, F., Gioacchini, G., Falcinelli, S., Bertotto, D., Radaelli, G., Olivotto, I., & Carnevali, O. (2013, January). Probiotic supplementation promotes calcification in *Danio rerio* larvae: a molecular study. *PLoS One*, 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0083155).



**Figura 13** – Anomalias no desenvolvimento das cartilagens nos peixes transgênicos aos 5 dpf. Em comparação com a Figura 12 que representa o normal desenvolvimento dos peixes, foi observado uma amplitude normal dos arcos nos peixes controle (A), enquanto os peixes Ser-tRNA<sup>Leu</sup><sub>CAG</sub> apresentaram uma amplitude exagerada (B). (Cartilagem de Meckel (MC); palatoquadrate (PQ); ceratohial (CH)).



**Figura 14** - % de peixes com deficiências nas cartilagens aos 5 dpf. Observou-se que 50% dos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> apresentavam anomalias na formação dos arcos. (A análise dos dados foi feita através do Student's t-test; \*\* p<0.01, n=3).

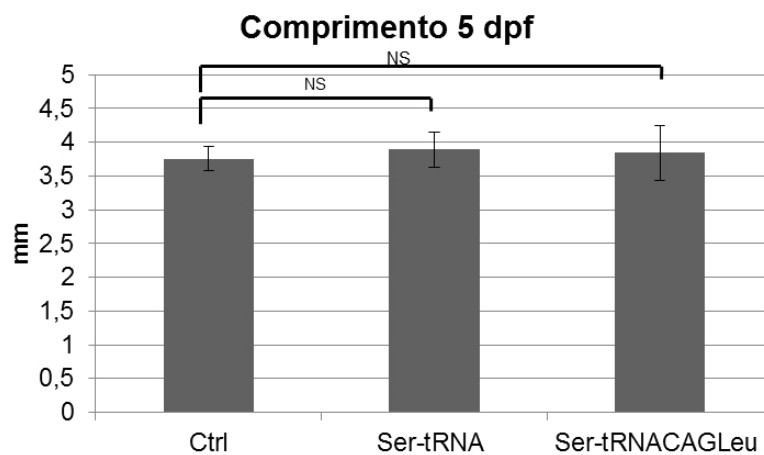
### 3.1.2.3. Comprimento

Um aspeto característico dos peixes zebra é o seu comprimento. Por isso, este foi medido para determinar se havia alguma alteração entre os peixes das várias linhagens em estudo e ao longo do tempo. O comprimento foi medido em peixes com 5 dpf, 3 meses pós fertilização (mpf), 5 mpf e 1 ano e 4 meses pós fertilização. As medições nos peixes com 5 dpf foram feitas com o auxílio da lupa na ampliação 10X e os restantes com o auxílio de uma régua.

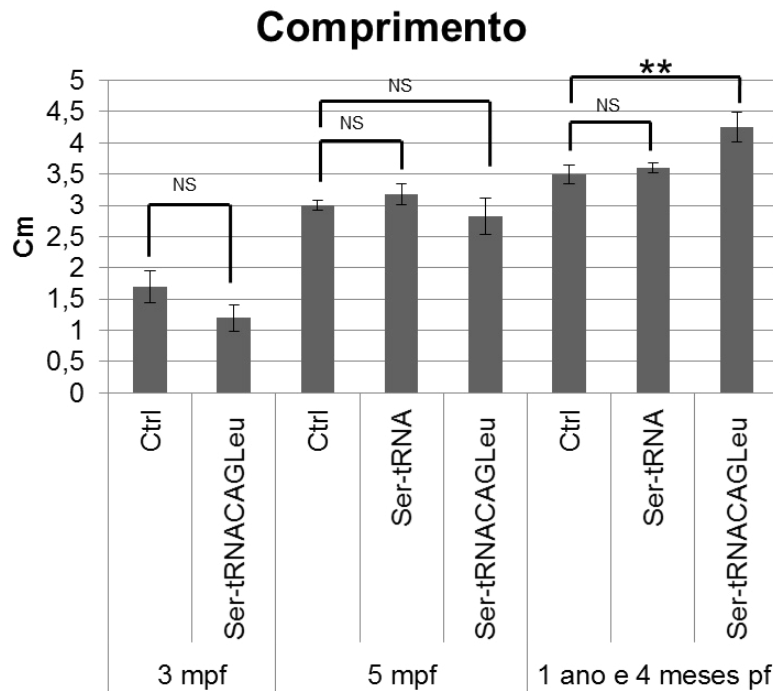
Nas larvas com 5 dpf não se observaram alterações no comprimento entre o controlo, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> (Figura 15). Aos 3 meses houve um decréscimo de 0,5 cm nos peixes de Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo. Nos peixes com 5 mpf o decréscimo do comprimento dos transgénicos que expressam Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> foi atenuado. Nos peixes com 1 ano e 4 meses na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> observou-se um aumento de comprimento (cerca de 0,7 cm) em relação ao controlo (Figura 16). Essa variação na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> mostra que estes peixes tinham uma desregulação no crescimento, apesar de tudo indicar que os peixes se adaptaram à acumulação dos erros de tradução, uma vez que sobreviveram vários meses. Entre os peixes que expressam o Ser-tRNA e o controlo não se observaram diferenças significativas no comprimento ao longo do tempo. Aos 3 meses



não foram observados peixes da linhagem Ser-tRNA por falta de animais com essa idade devido à sua mortalidade e à dificuldade em os manter.



**Figura 15** – Comprimento das larvas aos 5 dpf. Não se observaram alterações no comprimento entre o controle, os peixes Ser-tRNA e os Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. O comprimento das larvas foi de cerca 3.8 mm. (n=5) (NS – estatisticamente não significativo)

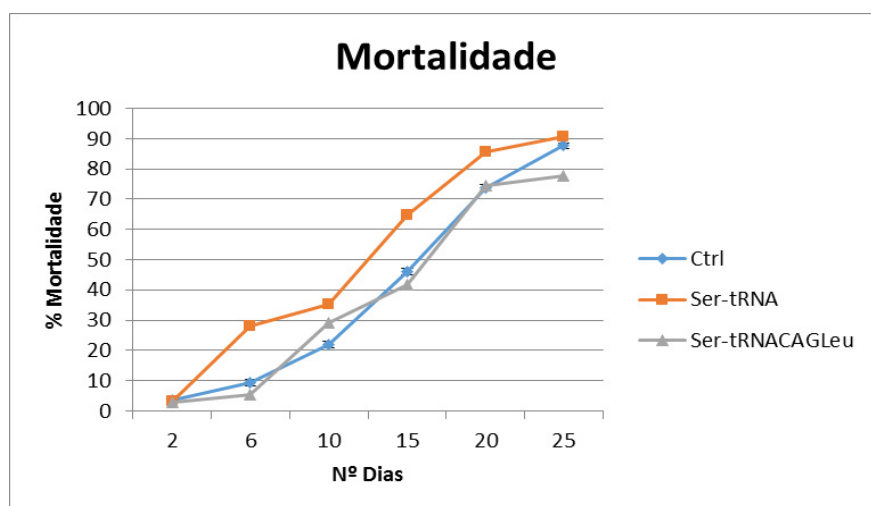


**Figura 16** - Comprimento dos peixes aos 3 mpf, 5 mpf e com 1 ano e 4 meses pós fertilização. Para os 3 meses, 5 meses e 1 ano e 4 meses observou-se um comprimento semelhante entre o controlo e a linhagem Ser-tRNA. Enquanto, relativamente ao controlo, na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG<sup>Leu</sup></sub> observou-se uma diminuição aos 3 mpf apesar de não estatisticamente significativa, uma recuperação aos 5 mpf e um aumento do comprimento ao 1 ano e 4 meses. (A análise dos dados foi feita através do Student's t-test; \*\*  $p < 0.01$ ,  $n=3$ , (NS – estatisticamente não significativo)).

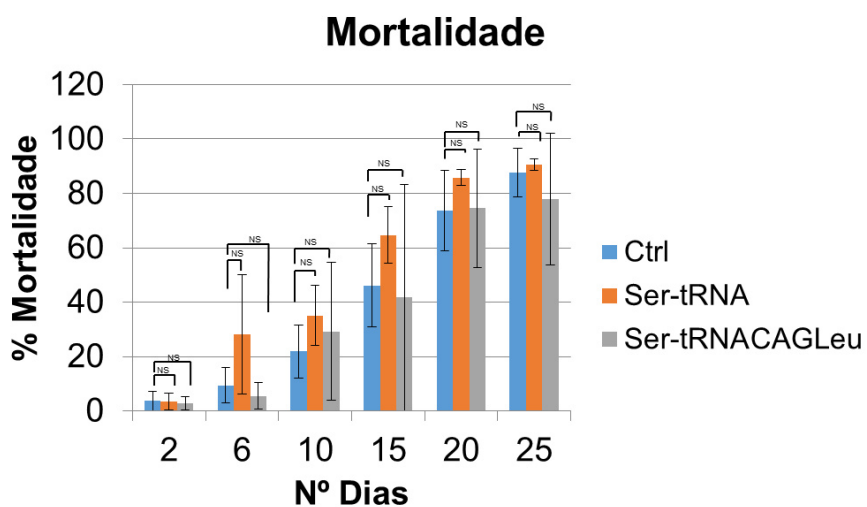
#### 3.1.2.4. Taxa de mortalidade

A taxa de mortalidade foi observada ao longo do tempo para aferir se os erros de tradução interferem com a viabilidade do organismo. Os peixes das 3 diferentes linhagens foram mantidos em diferentes aquários a 28°C.

Não foram observadas diferenças significativas de mortalidade entre o controlo e as diferentes linhas transgênicas testadas (Figura 17 e Figura 18).



**Figura 17** - % de mortalidade dos peixes transgênicos ao longo do tempo (1). Ao longo do tempo não se observaram alterações significativas na mortalidade entre o controlo, os peixes Ser-tRNA e os Ser-tRNA<sub>CAG<sup>Leu</sup></sub>. (n=3)



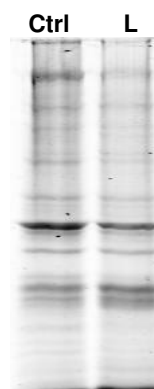
**Figura 18** - % de mortalidade dos peixes transgênicos ao longo do tempo (2). Ao longo do tempo não se observaram alterações significativas na mortalidade entre o controlo, os peixes Ser-tRNA e os Ser-tRNA<sub>CAG<sup>Leu</sup></sub>. (n=3) (NS – estatisticamente não significativo)

### 3.2. Fração proteica insolúvel – agregação proteica

De modo a estudar como a célula lidou com a acumulação dos erros de tradução foi observada a fração proteica insolúvel entre o controlo e os peixes que expressam o Ser-tRNA e o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. As proteínas insolúveis podem resultar em agregação proteica prejudicial à célula e por isso foram observadas em embriões com 5 dias, 6 mpf e 1 ano pós fertilização (apf). O seu total proteico foi extraído e quantificado com subsequente extração da fração insolúvel que foi corrida por SDS-PAGE e observada no Odyssey® IR scanner. A fração proteica insolúvel nos peixes adultos foi obtida de igual modo como para os embriões de 5 dpf.

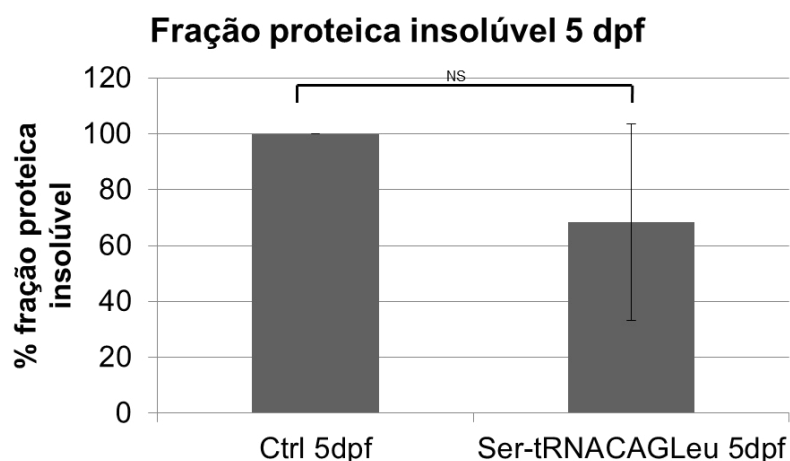
#### 3.2.1. Larvas – 5 dpf

Nos peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>, com 5 dpf, não foram observadas alterações estatisticamente significativas na fração insolúvel comparativamente ao controlo (Figura 19 e Figura 20). Este resultado não era esperado uma vez que estudos recentes mostram um aumento da fração insolúvel devido à acumulação de erros de tradução <sup>36</sup>. Não se efetuou este estudo para os peixes Ser-tRNA devido ao número insuficiente de larvas.



Ctrl – Plasmídeo vazio; L - Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>

**Figura 19** - Perfil da fração insolúvel aos 5 dpf. Não se observaram alterações da fração insolúvel nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo.

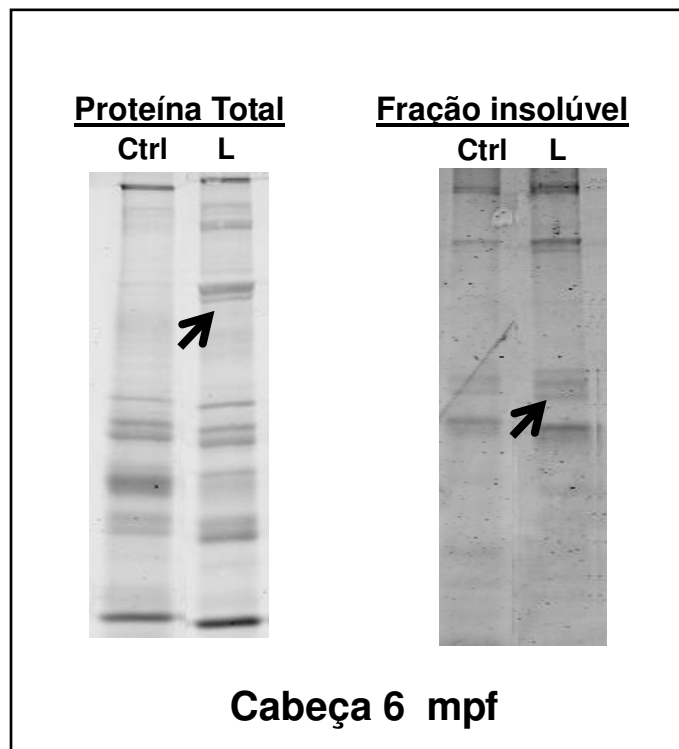


**Figura 20** – % da fração insolúvel em peixes transgênicos aos 5 dpf. Não se observaram alterações significativas na fração insolúvel dos peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo. (n=3) (NS – estatisticamente não significativo)

### 3.2.2. Adultos – 6 mpf

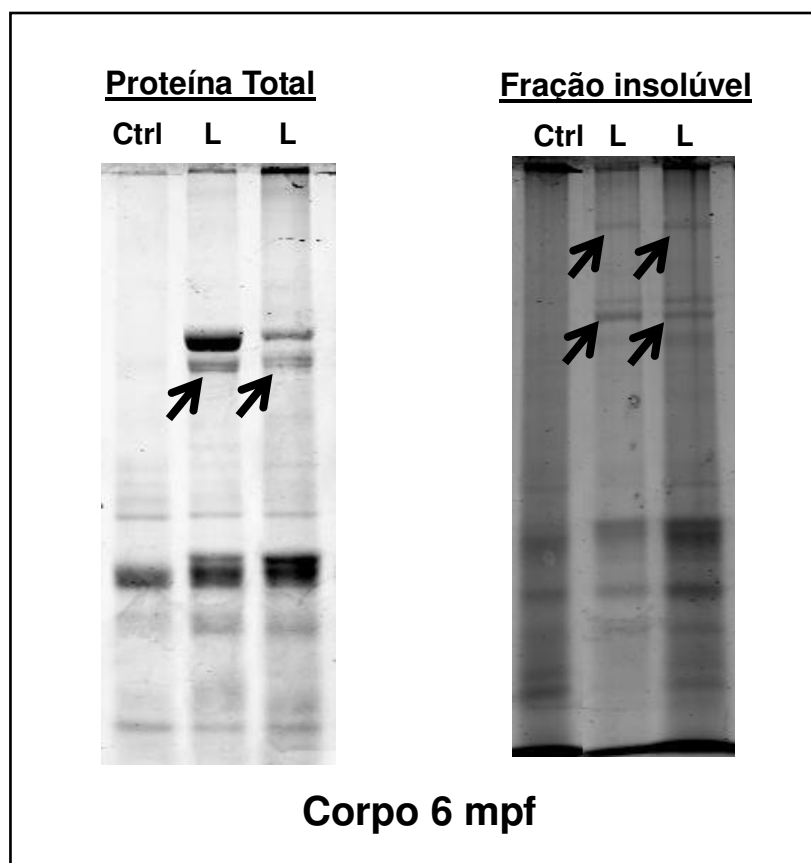
Nos peixes com 6 meses, devido ao seu reduzido tamanho não foi possível isolar o cérebro e músculo. Logo a fração insolúvel foi obtida a partir do total proteico da cabeça, do corpo e da barbatana caudal com 3 peixes para cada réplica. Não se efetuou esta experiência para os peixes Ser-tRNA por falta de animais com esta idade.

Nos extratos proteicos da cabeça dos peixes com 6 mpf verificou-se o aparecimento de bandas extra. Essas bandas foram observadas tanto no extrato das proteínas totais como na fração insolúvel nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo (Figura 21).



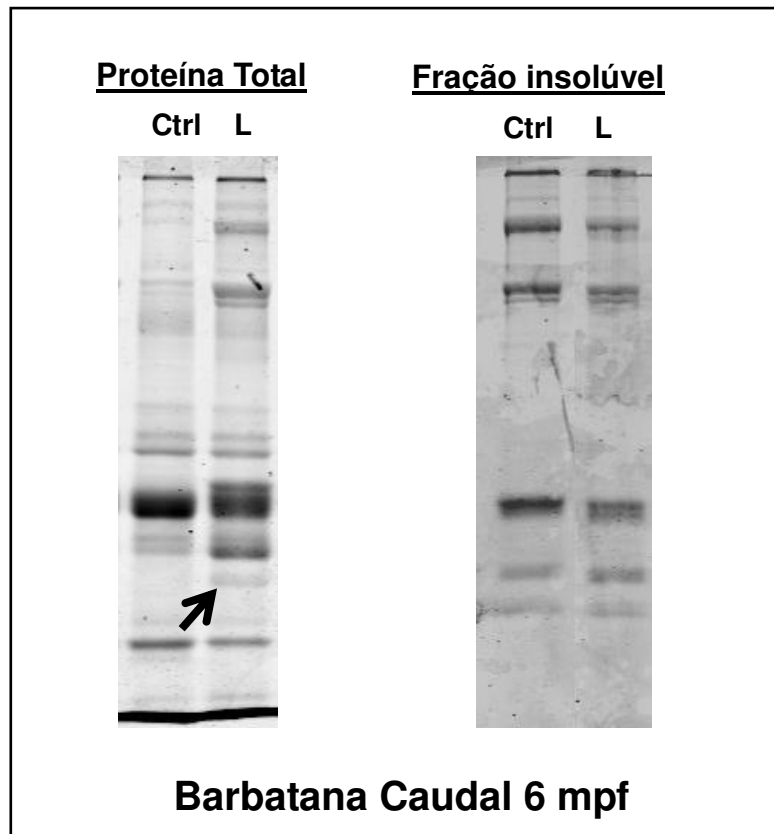
**Figura 21** – Perfil do extrato total e da fração insolúvel da cabeça dos peixes transgênicos com 6 mpf. Observaram-se bandas extra na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo em ambos os perfis proteicos. (n=3)

O mesmo foi observado relativamente às proteínas totais e à fração insolúvel extraídas do corpo do peixe. Foram obtidas bandas extra no extrato total como no extrato insolúvel nos peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> (Figura 22).



**Figura 22** - Perfil do extrato total e da fração insolúvel do corpo dos peixes transgênicos com 6 mpf. Observaram-se bandas extra na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo em ambos os perfis. (n=3)

Na região da cauda, observaram-se bandas extra no perfil do extrato total dos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo. No entanto, o perfil da fração insolúvel é semelhante, não se destacaram bandas sem correspondência entre o perfil dos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> e o perfil dos peixes controlo (Figura 23).



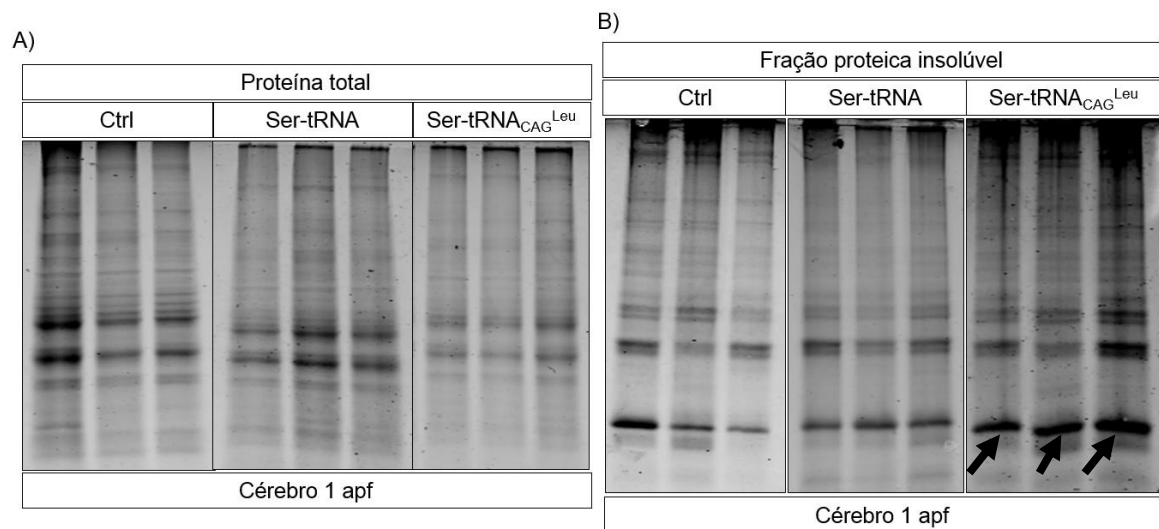
**Figura 23** - Perfil do extrato total e da fração insolúvel da barbatana caudal dos peixes transgênicos com 6 mpf. No perfil da proteína total observaram-se bandas extra na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo. O perfil da fração insolúvel apresentou-se semelhante entre o controlo e os peixes linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. (n=3)

### 3.2.3. Adultos – 1 ano pós fertilização (apf)

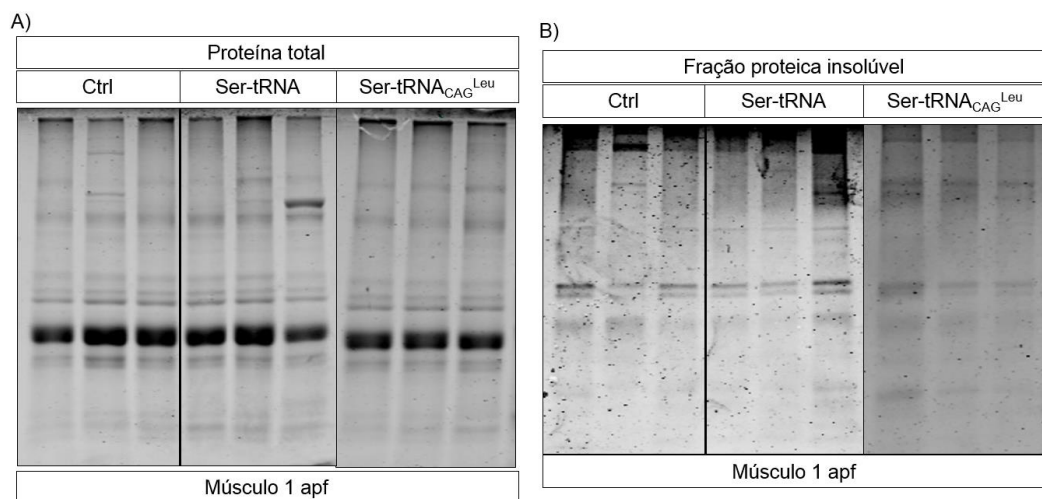
Nos peixes com um ano, o seu tamanho já permitiu isolar o cérebro, o músculo e a barbatana caudal. Foram usados 3 peixes para cada réplica.

O perfil do extrato total da região do cérebro, do músculo assim como da barbatana caudal apresentaram-se semelhantes entre o controlo, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Relativamente ao perfil da fração insolúvel, observaram-se bandas mais proeminentes destas proteínas no perfil do cérebro dos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. O perfil da fração insolúvel do músculo e da barbatana caudal apresentaram-se semelhantes entre o controlo, os peixes que expressam Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Nos peixes com 1 ano, ao contrário do observado nos de 6 mpf, não se observaram bandas extra em nenhum dos perfis obtidos, quer no extrato total quer na fração proteica insolúvel (Figura 24, Figura 25 e Figura 26).

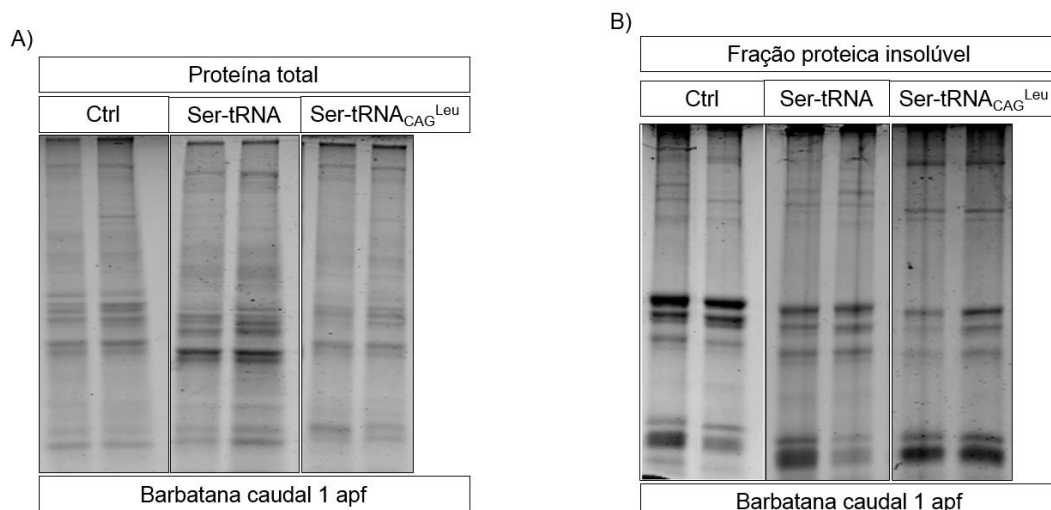




**Figura 24** - Perfil do extrato total e da fração insolúvel do cérebro dos peixes com 1 apf. A) Foi observado um perfil do extrato total semelhante entre o controle, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. B) Foram observadas bandas mais proeminentes da fração insolúvel nos peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. (n=3)



**Figura 25** - Perfil do extrato total e da fração insolúvel do músculo dos peixes com 1 apf. A) Foi observado um perfil do extrato total semelhante entre o controle, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. B) O perfil da fração insolúvel apresentou-se semelhante entre o controle, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. (n=3).



**Figura 26** - Perfil do extrato total e da fração insolúvel da barbatana caudal dos peixes com 1 apf. A) Foi observado um perfil do extrato total semelhante entre o controlo, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sup>CAG</sup>Leu. B) O perfil da fração insolúvel apresentou-se semelhante entre o controlo, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sup>CAG</sup>Leu. (n=2)

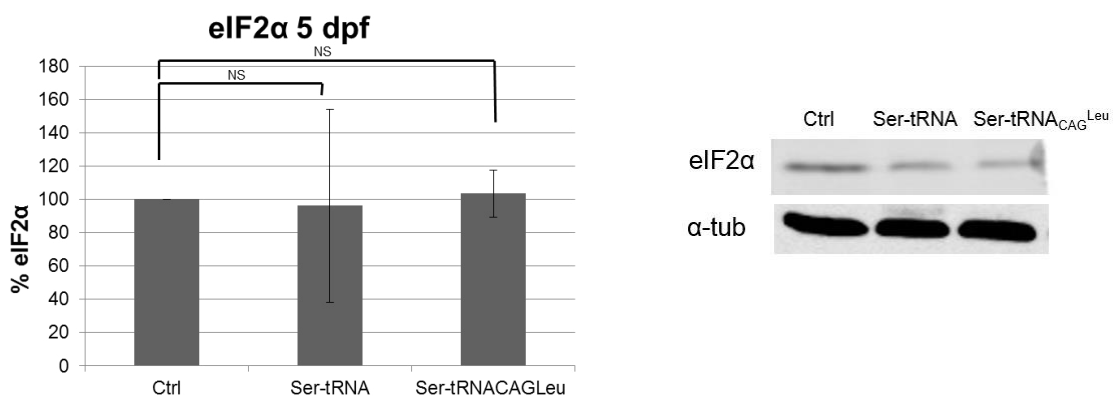
### 3.3. Os mecanismos de controlo da qualidade proteica ativados em resposta à acumulação de erros de tradução

#### 3.3.1. Larvas – 5 dpf

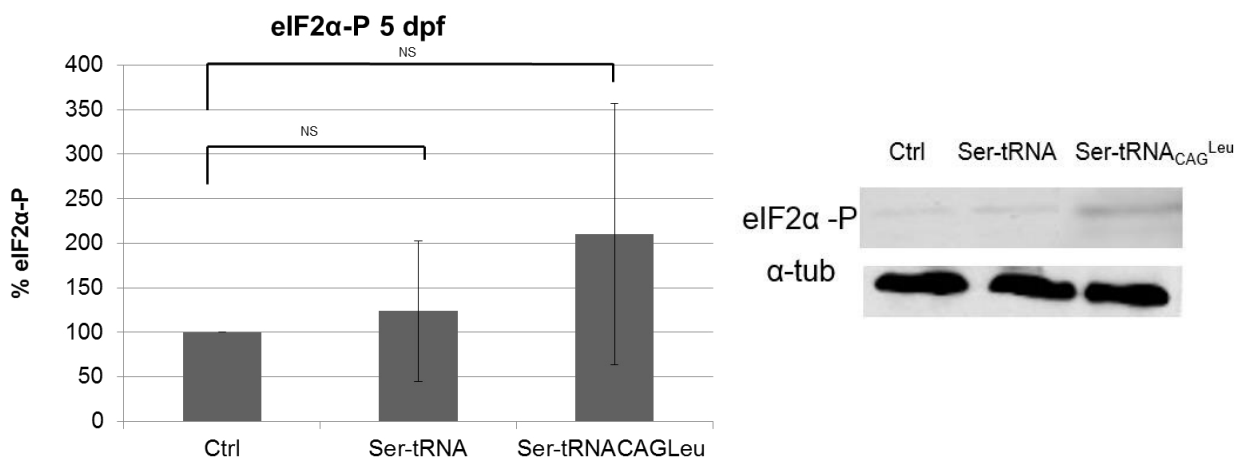
Para verificar se os erros de tradução induziam stress proteotóxico e se consequentemente ativavam os mecanismos de controlo da qualidade proteica, a expressão de algumas proteínas chave deste processo foi estudada por western blot. Essas proteínas foram a ubiquitina, o fator eIF2 $\alpha$  total e o eIF2 $\alpha$  fosforilado e o ATF6. Para isso foram feitos extratos proteicos totais de larvas com 5 dpf. Após a extração e a quantificação, 30  $\mu$ g de proteína total de cada amostra, nomeadamente de peixes controlo (plasmídeo vazio) e de peixes que expressam o Ser-tRNA e dos que expressam o Ser-tRNA<sup>CAG</sup>Leu, foram corridas por SDS-PAGE. De seguida, o perfil proteico foi transferido do gel para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada para evitar ligações inespecíficas e incubada com os anticorpos primários e secundários. Para determinar a variação das proteínas estudadas relativamente ao controlo, foi feita a normalização com a tubulina.

### 3.3.1.1. Inibição da síntese proteica através da fosforilação do fator eIF2 $\alpha$

O eIF2 $\alpha$  é um fator de iniciação da tradução que quando fosforilado inibe o processo de iniciação da síntese proteica. Relativamente ao fator eIF2 $\alpha$  total, este não variou entre as amostras testadas (rondou aproximadamente os 100%). Ou seja, a expressão do eIF2 $\alpha$  total manteve-se igual nas 3 linhagens (Figura 27). Relativamente ao fator fosforilado, observou-se um aumento deste fator nos peixes que acumulam erros de tradução (Ser-tRNA<sub>CAG<sup>Leu</sup></sub>) para o dobro, em relação ao controlo. No entanto o desvio padrão é considerável. Por essa razão este aumento não é estatisticamente significativo. Nos peixes que expressam o Ser-tRNA, o fator fosforilado não apresenta variações em relação ao controlo, sendo que a sua expressão ronda os 100% (Figura 28).



**Figura 27** - % do fator eIF2 $\alpha$  nos peixes zebra com 5 dpf. Não se observaram alterações estatisticamente significativas entre o controlo, os peixes Ser-tRNA e os peixes Ser-tRNA<sub>CAG<sup>Leu</sup></sub>. (n=3) (NS – estatisticamente não significativo)

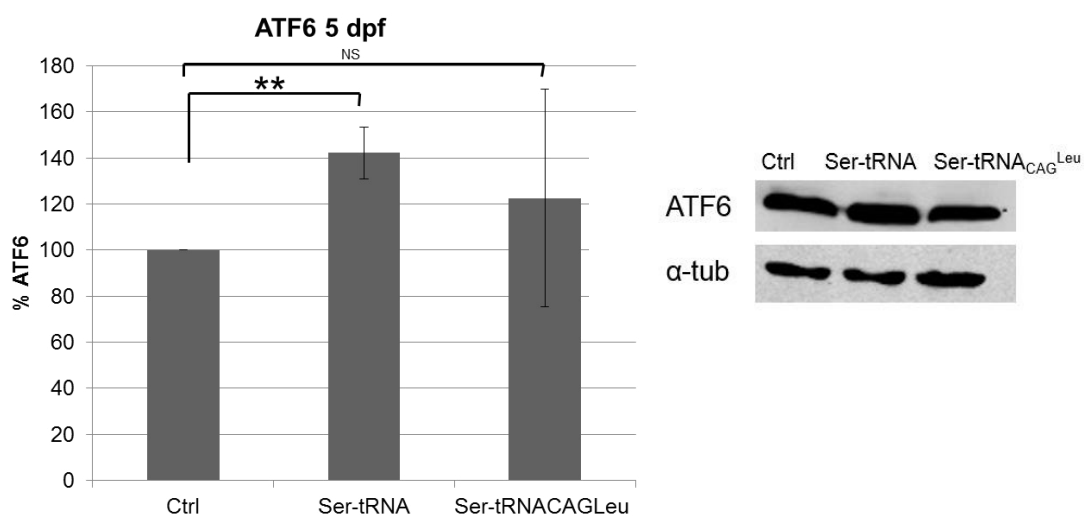


**Figura 28** - % do fator eIF2α fosforilado nos peixes zebra com 5 dpf. Na linhagem Ser-tRNA não se observou variações do fator eIF2α fosforilado em relação ao controlo. Na linhagem Ser-tRNA<sup>CAG</sup>Leu observou-se um aumento para o dobro do fator eIF2α fosforilado. (n=3) (NS – estatisticamente não significativo)

### 3.3.1.2. Ativação da RPEE através da clivagem do ATF6

O fator ATF6 é um fator de transcrição que é clivado quando a célula se encontra em stress proteotóxico. A fração clivada é responsável por induzir a transcrição de chaperones e de enzimas responsáveis pelo enovelamento de proteínas ajudando a célula a sobreviver à proteotoxicidade.

O anticorpo anti-ATF6 usado marcou a fração clivada tanto nos peixes que expressam o Ser-tRNA como nos que expressam o Ser-tRNA<sup>CAG</sup>Leu. Nos peixes com 5 dpf observou-se um aumento de 42,2% do fator ATF6 clivado na linhagem Ser-tRNA e de 22,6% na linhagem Ser-tRNA<sup>CAG</sup>Leu (Figura 29). O aumento da fração clivada nestas linhagens representou um aumento da ativação do ATF6.

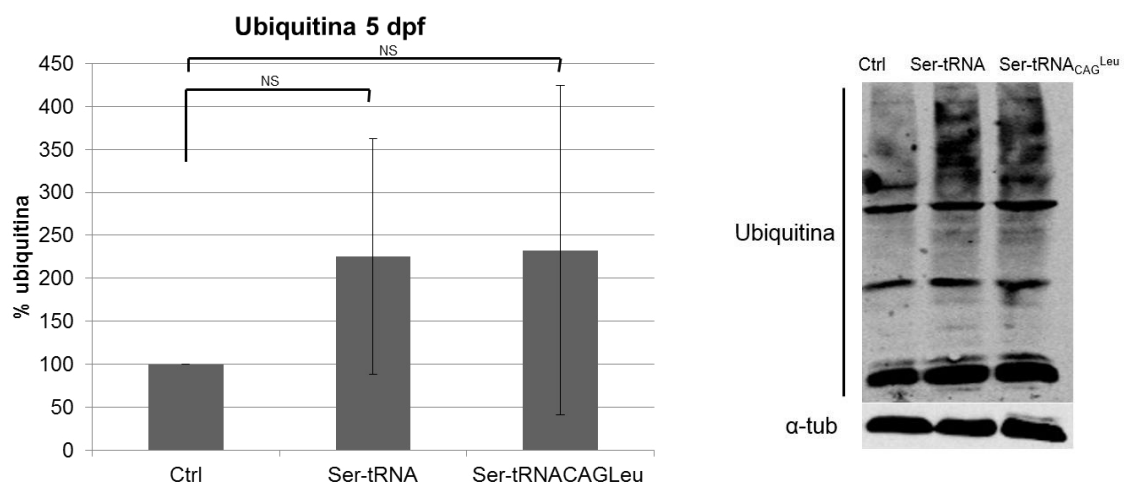


**Figura 29** - % do fator ATF6 clivado nos peixes zebra com 5 dpf. Observou-se um aumento do ATF6 clivado de 42,2% na linhagem Ser-tRNA e de 22,6% na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo. (A análise dos dados foi feita através do Student's t-test; \*\* p<0.01, n=3 (NS – estatisticamente não significativo)).

### 3.3.1.3. Detecção de proteínas ubiquitinadas - marcadas para degradação

A ubiquitina é uma proteína que reconhece as proteínas aberrantes e ao se ligar a estas marca-as para degradação. As proteínas ubiquitinadas são reconhecidas pelo proteossoma que é responsável por as degradar. As moléculas de ubiquitina são libertadas antes da degradação do substrato (proteína) e são recicladas.

O anticorpo anti-ubiquitina marcou várias proteínas ubiquitinadas no perfil do extrato total. Após a quantificação e a normalização observou-se um aumento de 125% nos peixes Ser-tRNA e de 132,5% nos Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> (Figura 30).



**Figura 30** - % de proteínas marcadas com ubiquitina nos peixes zebra com 5 dpf. Observou-se um aumento de 125% para a linhagem Ser-tRNA e de 132,5% na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. (n=3) (NS – estatisticamente não significativo)



## **4. Discussão, Conclusão e Trabalhos futuros**



## **4.1. Discussão**

### **4.1.1. Consequências dos erros de tradução em vertebrados**

A acumulação de erros de tradução leva à produção de proteínas aberrantes que resulta em stress celular proteotóxico <sup>36,11</sup>. Enquanto os peixes zebra transgênicos que incorporam uma cópia extra do Ser-tRNA endógeno apresentam um ligeiro aumento estatisticamente não significativo da morte celular em relação ao controle, os peixes que incorporam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> apresentam um aumento significativo. O resultado obtido nos peixes que expressam o Ser-tRNA indica que provavelmente a cópia extra do tRNA de Serina endógeno não induz stress à célula capaz de induzir a sua morte. No entanto, o aumento da morte celular nos peixes com o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> indica que estes peixes se encontram em stress após a indução de erros de tradução. É sabido que os erros na síntese proteica interferem no fitness das células, induzindo proteínas com conformação errada, agregação e morte celular <sup>13</sup>. É possível que a morte celular observada seja uma consequência da acumulação de proteínas com conformação errada no lúmen do RE. Essa acumulação leva a uma prolongada ativação do RPEE, que por sua vez leva ao stress oxidativo, devido à acumulação de espécies reativas de oxigênio, e consequente morte celular. As espécies reativas de oxigênio são provenientes da maquinaria responsável pelo envelhecimento proteico oxidativo no RE e da mitocôndria <sup>49</sup>.

As anomalias observadas, nomeadamente os edemas e as caudas curvadas nos peixes zebra transgênicos Ser-tRNA e as cabeças não desenvolvidas, encurtamento da cauda, edemas, perda da barbatana caudal, perda da simetria longitudinal e curvatura das caudas nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> são também um indicador do nível de stress a que os peixes foram expostos quer devido à cópias extra do Ser-tRNA endógeno, quer devido à acumulação dos erros de tradução respetivamente. Nos peixes Ser-tRNA as anomalias são menos severas que nos Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> porque enquanto os primeiros apenas têm uma cópia extra do tRNA endógeno, os segundos lidam com erros de tradução em todas as suas células. No que diz respeito às alterações nos peixes Ser-tRNA, apesar da cópia extra ser de um tRNA endógeno, diferentes estudos sugerem que o aumento do número de cópias interfere na estabilidade celular <sup>50</sup>. Alguns estudos têm mostrado uma adaptação entre o codon usage e a abundância dos tRNAs e que existe uma diferença da expressão dos genes dos tRNAs de tecido para tecido <sup>50</sup>. Tem também sido demonstrado que a rapidez da tradução é influenciada pela adaptação dos codões ao pool de tRNAs. Logo, o teor de codões no mRNA pode afetar o fitness do organismo. Por outro lado, o envelhecimento das proteínas ocorre parcialmente durante a elongação da tradução sendo

a velocidade da elongação um fator importante. Ou seja, o codon bias usage pode afetar o enovelamento co-tradução das proteínas já que pode interferir na velocidade de descodificação <sup>51</sup>. Posto isto, a alteração do número de cópias do Ser-tRNA pode influenciar o equilíbrio do codon usage/abundância do tRNA influenciando o enovelamento das proteínas e causando desregulação celular. No entanto, os erros de tradução nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> levam à acumulação de proteínas aberrantes e consequentemente ao stress proteotóxico <sup>52</sup>. Em estudos anteriores, em embriões de peixe zebra transgênicos com o mesmo modelo de acumulação de erros de tradução, foi observado uma redução da viabilidade às 24 hpf acompanhada por um aumento do desenvolvimento de malformações principalmente nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> <sup>36</sup>. O que indica que as consequências nefastas dos erros de tradução nos embriões se mantêm, das 24 hpf para os 5 dpf. Esses erros influenciam o seu desenvolvimento com o aparecimento das malformações o que pode levar à morte dos que se apresentam severamente lesados.

Outra anomalia observada foi ao nível das cartilagens. É evidente o desenvolvimento de malformações nas cartilagens, particularmente a amplitude exagerada dos arcos mandibular e hioide nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. As anomalias observadas no arco mandibular e no arco hioide podem dificultar tanto a captura do alimento como a respiração dos peixes causando a sua morte. Estudos têm mostrado a influência do stress do RE nos osteoblastos, como demonstra um estudo sobre o stress do RE nos osteoblastos de rato. Nesse estudo foi observado que o stress no RE induz os genes envolvidos na remodelação óssea no entanto a contínua exposição ao stress leva à apoptose dos osteoblastos <sup>53</sup>. Nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> a contínua acumulação dos erros de tradução, que leva ao stress proteotóxico, pode também desregular o desenvolvimento ósseo dos peixes levando às malformações observadas.

Na medição do comprimento dos peixes com 5 dpf, observou-se que o tamanho dos peixes das 3 linhagens é semelhante. Esta observação mostrou que nesta fase do desenvolvimento, a acumulação de erros de tradução não influenciou o seu crescimento. No entanto, apesar de nos peixes com 5 dpf não haver diferença aparente, tal torna-se evidente com o passar do tempo. A disparidade nos 3 mpf pode ser justificada pela Hormona de Crescimento que, apesar de não ter sido estudada para esta tese, deve ser explorado em estudos futuros. A hormona de crescimento é responsável pelo crescimento longitudinal <sup>54,55</sup>. Esta hormona pode ser influenciada por vários processos como a transcrição, a tradução e por fatores pós tradução influenciando a sua síntese e consequentemente a sua sensibilidade <sup>54,55</sup>. A sequência codificante da hormona de

crescimento do peixe zebra possui cerca de 70‰ de codões CUG (o codão CUG é o codão predominante). No modelo transgênico usado nesta tese, estes codões poderão ser traduzidos pelos tRNAs mutantes. Apesar de os peixes incorporarem o tRNA mutante, continuam a expressar o tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> endógeno que também poderá traduzir os codões CUG. No entanto, uma vez que a hormona de crescimento tem 70‰ de codões CUG, a probabilidade da incorporação de Serina num codão que codifica Leucina é considerável. Esta incorporação errada dos aa pode afetar o normal funcionamento da hormona o que influencia o crescimento dos peixes. Com a aberrante síntese proteica aos 3 meses, esta proteína pode ser afetada tornando os peixes de Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> mais pequenos. No entanto, os resultados obtidos para os peixes com mais de 1 ano podem ser justificados pela sua adaptação ao stress proteotóxico induzido. Uma vez que os peixes continuam a expressar os Leu-tRNAs não mutados podem ter começado a preferir estes aos Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Essa adaptação pode ter levado à recuperação da hormona de crescimento o que levou à recuperação do tamanho aos 5 mpf e ao aumento ao 1 ano e 4 meses. Os peixes com o Ser-tRNA apresentaram-se com tamanho semelhante ao controlo, não havendo alterações significativas. A semelhança desta linhagem com o controlo pode dever-se ao facto dos peixes Ser-tRNA não apresentarem acumulação de erros de tradução e sendo assim a hormona de crescimento não foi alterada.

Outro aspeto a ter em consideração é se facto a recuperação do crescimento dos peixes não se deveu aos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> terem deixado de expressar o tRNA mutante. Apesar de todos os peixes usados expressarem a GFP, que indica que à partida incorporaram o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>, o gene deste tRNA pode não estar a ser expresso já que a sua expressão e a expressão da GFP dependem de promotores diferentes. Modificações na cromatina, nomeadamente modificações das histonas, metilação do DNA e alterações de condensação da cromatina, podem levar ao silenciamento do tRNA mutante <sup>56</sup>. O seu silenciamento pode explicar também a heterogeneidade dos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> que levou aos resultados sem significância estatística. Uma possível solução para esta questão seria fazer Northern e Southern blot para confirmar a expressão dos tRNA mutantes. No entanto, para as experiências que usaram os peixes mais pequenos, devido à insuficiência de tecido, não seria possível fazer Northern e Southern blot. Uma outra possível solução, para tentar obter uma maior homogeneidade entre as réplicas, passaria por fazer subpopulações dividindo os peixes que se encontrassem severamente afetados daqueles que se encontrassem aparentemente normais.

A fim de avaliar até que ponto o stress causado pela acumulação de erros de tradução pode levar à morte do organismo, a taxa de mortalidade das 3 linhagens foi acompanhada ao longo do tempo. Através das contagens feitas ao longo das semanas, não foram observadas alterações de mortalidade entre o controlo, a linhagem que expressa o Ser-tRNA e a que expressa o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Tal é justificado pelas condições em que os peixes foram mantidos. Apesar de as 3 linhagens estarem num ambiente propício ao seu desenvolvimento (ambiente a 28°C com água do sistema, limpeza frequente da água e adição de azul metileno para combater os fungos) o desenvolvimento dos fungos era frequente o que influenciava o seu desenvolvimento e a sua taxa de sobrevivência.

#### **4.1.2. Fração proteica insolúvel, com possível agregação, como consequência dos erros de tradução**

Nos peixes com 5 dpf não foram observadas alterações na fração insolúvel da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> relativamente ao controlo. Este resultado está em discordância com os resultados esperados. Com a acumulação dos erros de tradução nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> era esperado um aumento da fração insolúvel, devido à agregação de proteínas com erros de tradução.

A síntese de proteínas aberrantes é prejudicial à célula levando à proteotoxicidade. Os erros nos polipéptidos podem induzir proteínas com conformação errada, agregação e morte celular<sup>13</sup>. Estudos recentes evidenciam que às 24 hpf os peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> apresentam um aumento de fração insolúvel em 70% relativamente ao controlo<sup>36</sup>. Esta não concordância dos dados obtidos com a bibliografia é justificada pela heterogeneidade da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Enquanto uns peixes apresentavam anomalias severas, outros apresentavam anomalias menos severas o que levou a uma discrepância entre as réplicas. Essa discrepância levou a um grande desvio padrão e conseqüentemente a uma análise sem significância estatística.

Aos 6 mpf também não se observou um aumento da totalidade da fração proteica insolúvel, quer na cabeça, no corpo ou na cauda dos peixes zebra com o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. No entanto é evidente que bandas extra aparecem nos extratos das proteínas totais como na fração insolúvel indicando que efetivamente o seu proteoma está afetado. As bandas extra visíveis indicam que os peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> produzem proteínas diferentes dos peixes controlo. Tem sido demonstrado que quando o stress no retículo endoplasmático é persistente, a adaptação ao stress é uma consequência da

atenuação da resposta às proteínas com erros de tradução acompanhada pela mudança da expressão proteica. Ou seja, a resposta adaptativa ao stress crónico é consequência da estabilidade proteica através de alterações na composição proteica das células adaptadas<sup>57</sup>. Logo, a existência de bandas extra nos peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>, pode indicar que realmente houve uma adaptação à contínua exposição dos erros de tradução.

No entanto não foram observadas bandas extra na fração insolúvel da barbatana caudal. Alguns estudos afirmam que para reduzir o prejuízo do custo que a célula teve ao produzir proteínas com erros, os organismos podem adotar 2 estratégias: a redução da frequência dos erros, aumentando a precisão; ou a redução dos custos na manutenção dos erros, aumentando a tolerância ou a robustez<sup>13</sup>. Em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) as proteínas normais difundem livremente entre as células mãe e o broto, no entanto as proteínas oxidadas são distribuídas assimetricamente<sup>24</sup>. O mesmo tem sido observado em células de mamíferos, onde as células em divisão têm uma divisão assimétrica das proteínas ubiquitinadas e dos agregados proteicos. Isto sugere que a distribuição assimétrica pode ajudar a eliminar as proteínas com conformação errada nas células filhas, protegendo-as<sup>24</sup>.

Por outro lado, devido à divisão assimétrica dos agregados proteicos e das proteínas ubiquitinadas, quanto maior for a taxa de regeneração de um tecido, maior será a redução dos efeitos prejudiciais dos erros de tradução. Relativamente aos tecidos aqui estudados, nomeadamente o cérebro, o músculo e a barbatana caudal, o peixe zebra apresenta diferentes taxas de regeneração. No que diz respeito ao cérebro, o peixe zebra pode produzir novos neurónios ao longo de todo o eixo cérebro rostro-caudal ao longo da sua vida. Tal depende da presença de células progenitoras/stem nos cérebros dos peixes adultos que proliferam continuamente. No entanto, parâmetros como a idade, o tipo, a extensão da lesão e a área do cérebro afetada podem influenciar o grau da regeneração nos cérebros dos teleósteos<sup>58</sup>.

Relativamente à regeneração muscular, em circunstâncias normais, o músculo-esquelético dos mamíferos adultos é um tecido estável. No entanto, quando lesionado, tem a capacidade de iniciar um rápido e extensivo processo de reparação prevenindo a perda da massa muscular<sup>59</sup>. Com semelhança ao que acontece nos mamíferos, a lesão nos músculos dos teleósteos resulta na migração de células progenitoras para o local da lesão e proliferação. O tecido danificado é temporariamente substituído por tecido conjuntivo e só posteriormente é que se torna miofibras<sup>60</sup>.

Nas barbatanas, o peixe zebra tem uma elevada capacidade de regeneração (quer em tamanho quer em forma) que rapidamente as regenerarem mesmo após a sua amputação. Tal deve-se ao facto de possuírem muitos raios de ossos dérmicos, que são segmentados e revestidos por osteoblastos. Um raio da barbatana amputado é revestido nas primeiras horas pela epiderme e entre 1-2 dias forma-se a regeneração pelo blastema. O blastema é uma massa proliferativa de células morfológicamente similares, formado pela migração de fibroblastos e osteoblastos para o local de amputação <sup>61</sup>.

Posto isto, a taxa de regeneração pode ser a causa para a diferença das bandas extra mais evidentes, no perfil dos extratos totais e da fração insolúvel, da cabeça e do corpo do peixe em relação à barbatana caudal. Estes tecidos têm uma taxa de regeneração menor que as caudas. Logo eliminam com menor eficácia as proteínas aberrantes e por consequência a alteração do proteoma é maior devido à acumulação dos erros de tradução. Na cauda não se observam bandas extra no perfil da fração insolúvel. Tal é justificado pela sua elevada capacidade regenerativa, onde as proteínas da fração insolúvel que podem levar à formação de agregados acabam por ser dissolvidas no processo de regeneração.

Nos peixes com 1 apf não se observaram bandas extra entre o controlo, os peixes que expressam o Ser-tRNA e os que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Os perfis apresentaram-se semelhantes, quer no extrato total quer na fração das proteínas insolúveis, no cérebro, no músculo e na barbatana caudal. Enquanto os peixes que conseguiram sobreviver até aos 6 meses apresentavam alterações no proteoma (bandas extra), os peixes com um ano apresentaram um perfil proteico igual ao controlo. O que pode indicar uma adaptação contínua ao longo do tempo resultando na não alteração do proteoma. Contudo, para uma melhor compreensão das alterações que a célula sofreu, é fundamental a identificação e o estudo da sequência das proteínas destes peixes assim como o estudo dos mecanismos de controlo da qualidade proteica. Por outro lado, foram observadas bandas mais proeminentes no perfil da fração insolúvel do cérebro dos peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Apesar de os peixes zebra regenerarem os neurónios, a sua velocidade de regeneração é menor que no músculo ou nas barbatanas caudais como já discutido. Logo, enquanto o músculo e a barbatana caudal conseguem reduzir as proteínas insolúveis, essa redução é menos observável no cérebro.

#### 4.1.3. Ativação dos mecanismos de controlo da síntese proteica em resposta à acumulação de erros de tradução

A fosforilação do fator eucariótico de iniciação da tradução eIF2 $\alpha$  inibe o eIF2B que é responsável por converter eIF2-GDP a eIF2-GTP. O eIF2-GTP é necessário à iniciação da síntese proteica. Logo, com o eIF2B inibido, a iniciação da tradução é também inibida. Este mecanismo de inibição atribuído ao eIF2 $\alpha$ -P um papel importante na regulação da síntese proteica desde as leveduras aos mamíferos <sup>62</sup>. Estudos anteriores mostraram um aumento do fator eIF2 $\alpha$  fosforilado em resposta ao aumento dos erros de tradução <sup>36</sup>. No estudo desenvolvido nesta tese o mesmo acontece já que há um aumento para o dobro da fosforilação do fator eIF2 $\alpha$  nos peixes que incorporam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Esse aumento pode ser devido à acumulação dos erros de tradução permitindo que a célula se proteja da síntese de proteínas aberrantes. Em contrapartida, na linhagem Ser-tRNA não se observaram variações do fator eIF2 $\alpha$  fosforilado em relação ao controlo. Isto provavelmente indica que nesta linhagem a cópia extra do Ser-tRNA não causou stress à célula ao ponto de esta inibir a síntese proteica. No entanto, nesta análise, os desvios padrão são consideráveis. Na linhagem Ser-tRNA era pertinente aumentar o número de réplicas de modo a corrigir esses desvios. Na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> a falta de homogeneidade nestes peixes levou à falta de similaridade entre as réplicas com consequências a nível da significância estatística. Relativamente ao eIF2 $\alpha$  total, este encontra-se em níveis estáveis, aproximadamente nos 100%, nas 3 linhagens. O que era esperado uma vez que o eIF2 $\alpha$  total engloba tanto o fator fosforilado como o não fosforilado. Ou seja, a expressão deste fator nas diferentes linhagens é semelhante permitindo comparar a sua fosforilação. Na linhagem Ser-tRNA para corrigir o desvio padrão exagerado seria igualmente importante fazer mais réplicas desta linhagem.

Outro mecanismo de defesa da célula depende da ação do ATF6. Alterações no RE que perturbam o enovelamento das proteínas levam ao stress deste organelo e desencadeiam uma resposta às proteínas com enovelamento errado. RPEE tem como objetivo aumentar a capacidade de processamento do RE e aliviar o stress celular <sup>63</sup>. Quando as proteínas mal enoveladas são acumuladas no RE, o ATF6 é clivado proteoliticamente. O fragmento clivado migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes que codificam chaperones e enzimas que restauram o enovelamento das proteínas <sup>64</sup>. Quando o RE está em stress a síntese do ATF6 é induzida para que haja ATF6 não clivado disponível para ser clivado/ativado <sup>63</sup>. Estudos têm demonstrado que o ATF6 contribui para o RPEE uma vez que inicia a indução de chaperones no retículo em resposta ao stress neste organelo <sup>65</sup>. Nos peixes com 5 dpf foi observado um aumento do

ATF6 clivado nos peixes Ser-tRNA (42,2%) e nos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> (22,6%). A ativação deste fator nos peixes com o Ser-tRNA indica que a cópia extra do tRNA de Serina, apesar de ser endógeno, pode estar a causar alterações proteicas que ativam este mecanismo. Nos peixes que expressam o Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> a ativação do ATF6 deve-se provavelmente à acumulação dos erros de tradução. No entanto, o baixo valor dos peixes Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> em relação aos Ser-tRNAs deve-se em parte à heterogeneidade que a linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> apresenta. Nesta linhagem, ao analisar peixes muito afetados pela acumulação dos erros de tradução como peixes ligeiramente afetados levou a discrepâncias nos dados obtidos entre as várias réplicas. Essa discrepância influenciou as médias das réplicas aumentando o desvio padrão e consequentemente afetou o cálculo da significância estatística.

Por último, foi observada a quantidade de proteínas ubiquitinadas. A qualidade da síntese proteica é monitorizada pelo sistema de controlo de qualidade do RE. Quando a eliminação de proteínas com errada conformação é ineficiente, a sua acumulação no lúmen do RE induz o stress do organelo. Tal ativa a respostas às proteínas mal enoveladas para restaurar a proteostase no retículo. A ubiquitina ao reconhecer as proteínas aberrantes, liga-se a estas marcando-as para degradação, no citoplasma, pelo proteossoma. O proteossoma degrada as proteínas e deixa as moléculas de ubiquitina livres de modo a que possam ser recicladas<sup>66</sup>. O aumento de proteínas ubiquitinadas em peixes zebra em stress proteotóxico, devido à acumulação dos erros de tradução, foi observado noutros estudos<sup>36</sup>. O que se encontra em concordância com o aumento de proteínas ubiquitinadas observado neste estudo. Foi observado um aumento de 125% nos peixes de Ser-tRNA e de 132,5% nos de Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Estes resultados indicam que, à partida, ambas as linhagens se encontram em stress proteico, mesmo aquela que contem apenas uma cópia extra do tRNA endógeno. Na linhagem Ser-tRNA o stress pode ser consequência da desregulação do equilíbrio codon usage/abundância do tRNA e na linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> o stress pode ser resultado da acumulação dos erros de tradução. Tal stress induz portanto a degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteossoma. Contudo, aqui também se verificam desvios padrão exagerados. Na linhagem Ser-tRNA o desvio padrão pode ser corrigido aumentando o número de réplicas. O desvio padrão da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> pode ser justificado pelas amostras heterogêneas como já discutido.



## **4.2. Conclusão e Trabalhos futuros**

Com o estudo efetuado nesta tese conclui-se que há alterações nos peixes que acumulam erros de tradução. Essas alterações são visíveis a nível fenotípico como ao nível da proteostase. Foram também observadas alterações nos peixes que expressam a cópia extra do Ser-tRNA endógeno, nomeadamente malformações e aumento do ATF6 e de proteínas ubiquitinadas. No entanto esta linhagem não foi analisada em todas as experiências realizadas devido ao número insuficiente de larvas que se obtiveram. A falta de significância estatística em algumas experiências foi outro problema inesperado e que deve ser ultrapassado em trabalhos futuros. Pode ser ultrapassado aumentando o número de réplicas, através da confirmação da expressão do tRNA mutado e/ou fazendo subgrupos da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> entre os peixes severa e ligeiramente afetados fenotipicamente.

Como trabalho futuro era interessante identificar, por espectrometria de massa, as proteínas que se encontram nas bandas extra nos perfis das proteínas totais e da fração insolúvel dos peixes de Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup>. Essas proteínas podem estar relacionadas com algumas doenças já descritas. Era igualmente relevante identificar e comparar as proteínas dos peixes com 1 apf entre as 3 linhagens, de modo a perceber o porque da não visualização de bandas extra como nos peixes com 6 mpf. Outro aspeto interessante que poderá vir a ser estudado é a determinação do local de agregação das proteínas por microscopia de fluorescência. Os diferentes locais de agregação, nomeadamente o controlo de qualidade justanuclear e o depósito de proteínas insolúveis, agregam proteínas solúveis e insolúveis respetivamente. O estudo do local de agregação permite completar o estudo da fração insolúvel assim como estudar as consequências dos erros de tradução na fração proteica solúvel. A expressão da hormona de crescimento, por western blot, assim como a sua sequenciação, por espectrometria de massa, é um trabalho futuro também pertinente. Este estudo podia justificar a variância observada no comprimento dos peixes da linhagem Ser-tRNA<sub>CAG</sub><sup>Leu</sup> e o controlo. Outra experiência interessante seria fazer Microarrays para se estudar a expressão genética. Por último, era interessante completar os estudos aqui efetuados com os peixes Ser-tRNA naquelas experiências que não foi possível devido ao número insuficiente de embriões/peixes obtidos, assim como estudar o ATF6, a ubiquitina e o eIF2 $\alpha$ -P nos peixes com 6 meses e 1 ano pós fertilização.

## **Bibliografia**

1. Nielsen, S. V, Poulsen, E. G., Rebula, C. a & Hartmann-Petersen, R. Protein quality control in the nucleus. *Biomolecules* **4**, 646–61 (2014).
2. Crick, F. H. C. The Origin of the Genetic Code. 367–379 (1968).
3. Dirk, G. & Kutay, U. TRANSPORT BETWEEN THE CELL NUCLEUS AND THE CYTOPLASM. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (1999).
4. Rich, A. & RajBhandary, U. L. Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 805–60 (1976).
5. Levitt, M. Detailed Molecular Model for Transfer Ribonucieic Acid. *Nature* **224**, (1969).
6. Fujishima, K. & Kanai, A. tRNA gene diversity in the three domains of life. *Front. Genet.* **5**, 142 (2014).
7. Kapp, L. D. & Lorsch, J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 657–704 (2004).
8. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 113–27 (2010).
9. Sonenberg, N. & Dever, T. E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 56–63 (2003).
10. Dever, T. E. & Green, R. The Elongation, Termination and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. **2662**, 1–19 (2013).
11. Reynolds, N. M., Lazazzera, B. a & Ibba, M. Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat. Rev. - Microbiol.* **8**, 849–56 (2010).
12. Moura, G. R., Carreto, L. C. & Santos, M. a S. Genetic code ambiguity: an unexpected source of proteome innovation and phenotypic diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, (2009).
13. Drummond, D. A. & Wilke, C. O. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nat. Rev.* (2009). at [http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n10/fig\\_tab/nrg2662\\_F1.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n10/fig_tab/nrg2662_F1.html)
14. Paredes, J. a *et al.* Low level genome mistranslations deregulate the transcriptome and translome and generate proteotoxic stress in yeast. *BMC Biol.* **10**, 55 (2012).
15. Pouplana, L. R. De, Santos, M. a. S., Zhu, J.-H., Farabaugh, P. J. & Javid, B. Protein mistranslation: friend or foe? *Cell Press* 1–8 (2014). doi:10.1016/j.tibs.2014.06.002
16. Jakubowski, H. Quality control in tRNA charging. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 295–310 (2011).
17. Yadavalli, S. S. & Ibba, M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis: its role in translational fidelity. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **86**, 1–43 (2012).
18. Phizicky, E. M. & Hopper, A. K. tRNA biology charges to the front. *GENES Dev.* 1832–1860 (2010). doi:10.1101/gad.1956510.Multiple
19. Farabaugh, P. J. & Bjo, G. R. How translational accuracy influences reading frame maintenance. *EMBO J.* **18**, 1427–1434 (1999).

20. Moghal, A., Mohler, K. & Ibbá, M. Mistranslation of the genetic code. *FEBS Lett.* (2014). doi:10.1016/j.febslet.2014.08.035
21. Lindner, A. B. & Demarez, A. Protein aggregation as a paradigm of aging. *Biochim. Biophys. Acta* 980–96 (2009). doi:10.1016/j.bbagen.2009.06.005
22. Yoshimura, Y. *et al.* Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. (2012). doi:10.1073/pnas.1208228109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1208228109
23. Squier, T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* **36**, 1539–50 (2001).
24. Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T. & Frydman, J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
25. Ben-Gedalya, T. & Cohen, E. Quality control compartments coming of age. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **13**, 635–42 (2012).
26. Zhao, L., Rosales, C., Seburn, K., Ron, D. & Ackerman, S. L. Alteration of the unfolded protein response modifies neurodegeneration in a mouse model of Marinesco-Sjögren syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 25–35 (2010).
27. Geslain, R. *et al.* Chimeric tRNAs as tools to induce proteome damage and identify components of stress responses. *Nucleic Acids Res.* **38**, (2010).
28. Moreno, J. A. *et al.* Sustained translational repression by eIF2  $\alpha$  – P mediates prion neurodegeneration. *Nature* **485**, 507–511 (2012).
29. Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* **110**, 1383–1388 (2002).
30. Patil, C. & Walter, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 349–56 (2001).
31. Cinaroglu, A., Gao, C., Imrie, D. & Sadler, K. C. Activating transcription factor 6 plays protective and pathological roles in steatosis due to endoplasmic reticulum stress in zebrafish. *Hepatology* **54**, 495–508 (2011).
32. Zhang, K. & Kaufman, R. J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**, 25935–8 (2004).
33. OKADA, T., YOSHIDA, H., AKAZAWA, R., NEGISHI, M. & MORI, K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. Soc.* **594**, 585–594 (2002).
34. Li, L. & Chin, L. Impairment of the ubiquitin-proteasome system: a common pathogenic mechanism in neurodegenerative disorders. 553–577 (2007).
35. Ross, C. a & Poirier, M. a. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **10 Suppl**, S10–7 (2004).
36. Reverendo, M. *et al.* Transfer RNA mutations that affect decoding fidelity deregulate development and the proteostasis network in zebrafish. *Rna Biol.* (2014).
37. David, D. C. *et al.* Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **8**, e1000450 (2010).

38. Park, S. G., Schimmel, P. & Kim, S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. **105**, 11043–11049 (2008).
39. Nasiadka, A. & Clark, M. D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR J.* **53**, 161–8 (2012).
40. Kishi, S. *et al.* The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp. Gerontol.* **38**, 777–786 (2003).
41. Betts, M. J. & Russell, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinforma. Genet.* **4**, (2003).
42. Henikoff, S. & Henikoff, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10915–9 (1992).
43. Berleant, D. *et al.* The genetic code-more than just a table. *Cell Biochem. Biophys.* **55**, 107–16 (2009).
44. Link, V., Shevchenko, A. & Heisenberg, C.-P. Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev. Biol.* **6**, 1 (2006).
45. Tucker, B. & Lardelli, M. A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish* **4**, 113–6 (2007).
46. Boya, P. & Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**, 6434–51 (2008).
47. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907–1916 (2005).
48. Schilling, T. F. & Kimmel, C. B. Musculoskeletal patterning in the pharyngeal segments of the zebrafish embryo. **2960**, 2945–2960 (1997).
49. Haynes, C. M., Titus, E. a & Cooper, A. a. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell* **15**, 767–76 (2004).
50. Novoa, E. M. & Ribas de Pouplana, L. Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Cell Press* **28**, 574–81 (2012).
51. Dana, A. & Tuller, T. The effect of tRNA levels on decoding times of mRNA codons. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9171–9181 (2014).
52. Bucciantini, M. *et al.* Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507–11 (2002).
53. Hamamura, K. & Yokota, H. Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling. *Elsevier* **581**, 1769–74 (2007).
54. De Azevedo Figueiredo, M., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V., Proietti, M. C. & Marins, L. F. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol.* **2**, 228–33 (2007).
55. Flores-Morales, A., Greenhalgh, C. J., Norstedt, G. & Rico-Bautista, E. Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol. Endocrinol.* **20**, 241–53 (2006).
56. Slotkin, R. K. & Martienssen, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature* **8**, 272–85 (2007).
57. Rutkowski, D. T. *et al.* Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* **4**, e374 (2006).

58. Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V. & Brand, M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* **72**, 429–61 (2011).
59. Rudnicki, M. A. & Charge, S. B. P. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Am. Physiol. Soc.* 209–238 (2004).
60. Rossi, G. & Messina, G. Comparative myogenesis in teleosts and mammals. *Cell. Mol. life Sci.* **71**, 3081–99 (2014).
61. Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R. & Poss, K. D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Elsevier* **29**, 611–20 (2013).
62. Proud, C. G. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 3–12 (2005).
63. Teske, B. F. *et al.* The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4390–405 (2011).
64. Ye, J. *et al.* ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355–1364 (2000).
65. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* **107**, 881–891 (2001).
66. Chen, Z. *et al.* The E3 ubiquitin ligase gp78 protects against ER stress in zebrafish liver. *J. Genet. genomics* **41**, 357–68 (2014).

## Anexo

### Tampão de lise para extração proteica

Para 2 extrações	
TFS 1X pH 7	1,25 mL
EDTA 0,5 M pH 8	5 µL
87% Glicerol	143,5 µL
H <sub>2</sub> O milliQ	1 mL
PMSF 100% Ezole	25 µL
Roche protéase inibidor 25X	50 µL

### Gel de poliacrilamida (2 géis)

Fração de corrida (10%)	
H <sub>2</sub> O milliQ	4,5 mL
Tris-HCl pH 8,8 1M	4,69 mL
40% Acrilamida (29:1)	3,125 mL
10% SDS	150 µL
10% PSA	200 µL
TEMED	20 µL

Fração dos poços (4%)	
H <sub>2</sub> O milliQ	3,464 mL
Tris-HCl pH 6,8 0,625M	1 mL
40% Acrilamida (29:1)	0,5 mL
10% SDS	50 µL
10% PSA	50 µL
TEMED	10 µL

### Tampão SDS-PAGE 10X (usado a 1X)

	1L
Glicina	144 g
Tris Base	30,2 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O destilada	Até 1L

### Solução de descoloração dos géis

	<b>10% Etanol</b>
	<b>7,5% Ácido acético</b>
	<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>

### Tampão tris salino 10X (usado a 1X)

	<b>1L</b>
<b>NaCl</b>	80 g
<b>KCl</b>	2 g
<b>Tris base</b>	30 g
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Até 1L
<b>pH 7,5</b>	

### Tampão tris salino com tween 20 1X

	<b>1L</b>
<b>TTS 1X</b>	1 L
<b>Tween 20</b>	1 mL

### Tampão fosfato salino 10X (usado a 1X)

	<b>1L</b>
<b>NaCl</b>	80 g
<b>KCl</b>	2 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	14,4 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2,4 g
<b>H<sub>2</sub>O milliQ</b>	Até 1L
<b>pH 7.4</b>	

### Solução stripping

	<b>50 mL</b>
<b>Glicina</b>	0,7 g
<b>SDS</b>	0,05 g
<b>Tween 20</b>	0,5 mL
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Até 50 mL