UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA MARIA MARTINS MARQUES DA CRUZ

Estudo das interações de Utp25 com outros componentes do complexo SSU processomo.

Versão corrigida da Dissertação.

São Paulo

Data do Depósito na SPG: **05/05/2016**

ANA MARIA MARTINS MARQUES DA CRUZ

Estudo das interações de Utp25 com outros componentes do complexo SSU processomo.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira.

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Marques da Cruz, Ana Maria Martins
M357e Estudo das interações de Utp25 com outros componentes do complexo SSU processomo / Ana Maria Martins Marques da Cruz. -- São Paulo, 2016.
46p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Oliveira, Carla Columbano de

1. Biologia molecular 2. RNA ribossômico : Processamento 3. Proteínas I. T. II. Oliveira, Carla Columbano de, orientador.

574.88 CDD

Aos meus pais, Gilberto e Regina.

Aos meus avós, Renato e Margarida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por minha saúde física e mental.

Agradeço ao meu pai, Gilberto, por todos os ensinamentos, orientações, apoio e por muitas vezes entender tudo que eu falei, de uma maneira muito além do que qualquer outra pessoa.

Agradeço à minha mãe, Regina, e aos meus avós, Renato e Margarida, pelo incentivo, apoio, admiração, amor, paciência e por estarem sempre do meu lado.

Agradeço à minha professora orientadora Carla, por ter me aceitado como aluna, pela orientação e pela vaga em seu laboratório.

Agradeço ao meu colega de laboratório e amigo, Fernando, por toda a ajuda, orientação, ensinamentos e, também, pelo apoio, amizade e risadas.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Griselda e Paola, pelas conversas, desabafos, ajuda e bons momentos ao longo desses anos.

Agradeço também aos meus demais colegas, Felipe Bagatelli, Felipe Oller, Bruna, Walter, Alessandra, Glaucia, Juliana, Marcela e Rogério, por tudo de bom que passamos juntos, conversas e aprendizados.

Agradeço aos colegas de bloco Bisson e Diorge, por todas as conversas sobre ciência, conselhos e ensinamentos.

Agradeço aos demais amigos que fiz no Instituto de Química (IQ): Amanda Salviatto, Ed, Larissa Magalhães, Cícero, Valdir, Carlos Gomes, Carlos DeOcesano, Túlio, Paty Kossugue, Juliana Branco, Fabi Lauretti, Faby Weiss, Erika Molina, Luciana Coutinho, Matheus Bonatto e a todos os outros (desculpem se esqueci alguém), pelas conversas, conselhos, festas, risadas!

Agradeço aos demais professores do IQ com quem tive contato: Profs. Alicia, Fredy, Flávia, Daniela, Pio, Sandro, Suely, Sérgio, Maria Teresa e Nadja.

Agradeço à cidade de São Paulo, que me acolheu tão bem e que, na qual, amo morar.

Agradeço aos meus amigos de fora da USP, mais antigos ou que fiz durante o mestrado, pelo apoio, incentivo e carinho de sempre.

Agradeço a todos os funcionários do IQ que de alguma forma contribuiram para que tudo desse certo e que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudos.

Agradeço à majestosa Universidade de São Paulo.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Marques da Cruz, A. M. M. **Estudo das interações de Utp25 com outros componentes do complexo SSU processomo.** 2016 (42p). Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A síntese de ribossomos é um dos principais processos celulares e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* são necessários 75 snoRNAs e mais de 200 proteínas não-ribossomais para que o ribossomo seja corretamente formado. Para o processamento do precursor dos RNAs ribossomais, chamado pré-rRNA 35S, ocorre o pareamento deste com o U3 snoRNA e outros snoRNAs e diversas proteínas se associam de maneira orquestrada e transitória, formando o complexo SSU processomo. Tal complexo é necessário para o processamento da região 5' do pré-rRNA 35S e para a correta montagem e maturação da subunidade menor ribossomal. Estudos anteriores do nosso laboratório identificaram a proteína nucleolar Utp25, essencial em S. *cerevisiae*, como integrante do complexo SSU processomo. Foi demonstrado que a depleção de Utp25 afeta a formação da subunidade menor ribossomal e que Utp25 interage com as proteínas Sas10 e Mpp10, componentes do SSU processomo, além de Utp25 co-imunoprecipitar o snoRNA U3. A partir desses dados, este trabalho teve como objetivo identificar interações da proteína Utp25 com outros componentes do complexo SSU processomo e investigar o papel de tais interações na formação e funcionamento do mesmo. Para purificação do complexo SSU processomo nós utilizamos o método *Tandem Affinity Purification-tag* (TAP-tag) utilizando TAP-Utp25 como isca. Após análise do purificado resultante por espectrometria de massas, obtivemos como resultado as proteínas Rrp5, Snu13 e Nop56, sendo as duas últimas pertencentes ao subcomplexo U3 snoRNP.

Palavras-chave: Utp25, U3 snoRNA, SSU processomo, síntese de ribossomos, rRNA, processamento de pré-rRNA.

ABSTRACT

Marques da Cruz, A. M. M. **Study of the interactions between Utp25 and other proteins of the SSU processome complex.** 2016 (42p). Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The ribosome synthesis is one of the main cellular processes and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 75 snoRNAs and more than 200 non-ribosomal proteins are involved in ribosome maturation. During processing, the pre-rRNA 35S base pairs with the U3 snoRNA and other snoRNAs and several proteins associate, forming the SSU processome complex. This complex is required for the processing of the pre-rRNA 35S 5' region and for the correct assembly and maturation of the ribosome small subunit. Previous studies from our laboratory identified the nucleolar protein Utp25, essential in S. *cerevisiae*, as a member of the SSU processome complex. Utp25 depletion affects small ribosomal subunit formation. Utp25 interacts with proteins Sas10 and Mpp10, components of the SSU processome, and Utp25 co-immunoprecipitates U3 snoRNA. From these data, this study aimed to identify Utp25 interactions with other components of the SSU processome complex and to investigate the role of these interactions in this complex formation and function. For the SSU processome complex purification we used the Tandem Affinity Purification-tag method (TAP-tag) and TAP-Utp25 as the bait. After the resulting purified analysis by mass spectrometry, we obtained as results the Rrp5, Snu13 and Nop56 proteins, the last two being U3 snoRNP subcomplex components.

Keywords: Utp25, U3 snoRNA, SSU processome, ribosome synthesis, rRNA, pre-rRNA processing.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.....20

Tabela 2. Cepa de E. *coli* utilizada.....20

Tabela 3. Tampões utilizados para purificação do complexo contendo Utp25 através de TAP–Utp25.....21

Tabela 4. Meios de cultura utilizados.....21

Tabela 5. Lista de plasmídeos utilizados.....22

Tabela 6. Proteínas do SSU processomo co-purificadas através de TAP-Utp25 e identificadas por Espectrometria de Massas.....38

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Esquema do processamento do pré-rRNA 35S, em *Saccharomyces cerevisiae*.....14

Figura 02. Ilustração esquemática das etapas sofridas pelas partículas pré-ribossomais, mostrando a participação transitória dos *trans acting factors*.....15

Figura 03. Modelo para a montagem do SSU processsomo, em *Saccharomyces cerevisiae*.....17

Figura 04. Desenho esquemático que explica o método de duplo–híbrido.....26

Figura 05. Mapa do vetor pGAD-C2 com o gene da proteína Not1 clonado.....27

Figura 06. Mapa do vetor pGAD-C2 com o gene da proteína Ccr4 clonado.....28

Figura 07. Desenho esquemático da proteína de fusão TAP–Utp25.....31

Figura 08. Gráfico do crescimento em relação ao tempo, da cepa de S. *cerevisiae* que expressa TAP-Utp25.....32

Figura 09. Western Blot realizado para verificar a expressão de TAP–Utp25.....33

Figura 10. Foto do gel de poliacrilamida do qual foram extraídas as bandas para análise por espectrometria de massas.....34

Figura 11. Foto do gel de poliacrilamida com amostras obtidas durante a co–purificação através de TAP–Utp25.....36

Figura 12. *Western Blot* realizado para confirmar presença de TAP–Utp25 na eluição analisada por espectrometria de massas.....37

Figura 13. Foto da placa utilizada como controle para o ensaio de duplo–híbrido, realizado para confirmar a interação da proteína Utp25 com as proteínas Not1 e Ccr4.....41

Figura 14. Foto da placa utilizada para o ensaio de duplo–híbrido, realizado para confirmar a interação da proteína Utp25 com as proteínas Not1 e Ccr4.....42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....11

2. OBJETIVO.....19

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....20

3.1. Co–imunopurificação através de TAP–Utp25.....23

3.2. Espectrometria de Massas.....24

3.3. Duplo Híbrido e clonagens 25

3.4. Western Blot.....30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 31

4.1 Co–purificação através de TAP–Utp25 e Espectrometria de Massas.....31

4.2 Duplo–Híbrido.....40

5. CONCLUSÃO.....43

6. REFERÊNCIAS.....44

1. INTRODUÇÃO

Ribossomos são as maquinarias celulares responsáveis pela tradução da informação genética presente nos mRNAs (RNAs mensageiros) e a catálise da síntese de proteínas em todos os organismos. Os ribossomos são formados por duas subunidades ribonucleoproteicas. Em leveduras, a subunidade menor, chamada 40S contém um rRNA (RNA ribossomal), 18S, e 33 proteínas ribossomais (r-proteínas), enquanto a subunidade maior, chamada 60S é formada por 3 rRNAs, 5S, 5.8S e 25S, e por 46 r-proteínas. A subunidade menor possui o centro decodificador, mediando as corretas interações entre os anticódons dos tRNAs (RNAs transportadores) e os códons dos mRNAs que estão sendo traduzidos, a fim de determinar a sequência correta de aminoácidos na proteína sintetizada. Já a subunidade maior contém o centro peptidil transferase, que catalisa a formação das ligações peptídicas no polipeptídio crescente (Steitz, 2008; Woolford Jr. e Baserga, 2013).

Um número cada vez maior de fatores envolvidos na síntese de ribossomos vem sendo associado a doenças humanas. Conhecidas como “ribossomopatias”, essas doenças incluem diversos defeitos no desenvolvimento, desordens hematológicas, síndromes e câncer (Charette e Baserga, 2010).

Evidências experimentais sugerem que o perfil básico da síntese de ribossomos é totalmente conservado em eucariotos. Entretanto, a maioria do conhecimento sobre este assunto vem da combinação de técnicas de biologia molecular e bioquímica aplicadas em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Kressler *et al*., 1999). Devido à sua fácil acessibilidade experimental através de métodos de genética, bioquímica e biologia molecular, *S. cerevisiae* representa um modelo eucariótico adequado para estudar a montagem do ribossomo e a função dos fatores não ribossomais envolvidos neste processo (Kressler *et al*., 2010). Com isso, um completo entendimento da montagem e da síntese ribossomal em levedura irá contribuir fortemente para as bases moleculares das ribossomopatias em humanos serem mais rapidamente compreendidas (Woolford Jr. e Baserga, 2013).

A síntese de ribossomos é uma das principais atividades celulares, e em eucariotos, ela ocorre primeiramente, mas não exclusivamente, no nucléolo, um compartimento nuclear. No nucléolo, os genes dos rRNAs são transcritos em precursores, chamados pré-rRNAs, os quais são

submetidos à várias etapas de processamento e modificações covalentes. A maturação dos pré-rRNAs está intimamente ligada ao seu acoplamento com proteínas ribossomais (Kressler *et al*., 1999).

Inicialmente, no nucléolo, três dos rRNAs (18S, 5.8S e 25S) são produzidos como um longo transcrito primário, uma molécula policistrônica chamada pré-rRNA 35S, a partir de repetições de rDNA (DNA ribossômico, aproximadamente 150 cópias por genoma haplóide na levedura *Saccharomyces cerevisiae*). O pré–rRNA 35S é transcrito pela RNA polimerase I. Em S. *cerevisiae* as repetições de rDNA também codificam o rRNA 5S, que é transcrito separadamente pela RNA polimerase III (Charette e Baserga, 2010; Henras *et al*., 2014).

Nesta levedura, 75 snoRNPs (*Small Nucleolar Ribonucleoproteins*) e mais de 200 proteínas não ribossomais participam diretamente da síntese de ribossomos. Esses fatores, chamados de *trans acting factors*, provavelmente permitem que o processo de maturação dos ribossomos ocorra com a velocidade, precisão e direção necessárias (Garcia–Gómez *et al*., 2011). Grupos desses fatores pré–ribossomais foram isolados através de *Tandem Affinity Purification* (TAP) e suas análises revelaram que tais proteínas possuem atividades bioquímicas diversas, incluindo RNA helicases, múltiplas GTPases, ATPases e proteínas que se ligam a RNAs (*RNA binding proteins*). Algumas dessas proteínas aparentemente agem sozinhas na biossíntese ribossomal, enquanto outras atuam em complexos protéicos funcionais (Ebersberger *et al*., 2014).

O processamento do pré–rRNA 35S envolve uma série de clivagens, catalisadas por endonucleases e exonucleases, para eliminar espaçadores externos (5’ ETS e 3’ ETS, *external transcribed spacers*) e espaçadores internos (ITS1 e ITS2, *internal transcribed spacers*), presentes no pré–rRNA, e, assim, liberar os rRNAs maduros. Além disso, aproximadamente 100 nucleotídeos dos rRNAs sofrem modificações químicas, a maioria delas catalisadas por snoRNPs (Choque *et al*., 2011). As principais modificações químicas que ocorrem no pré-rRNA nascente são metilações na posição 2'-OH realizadas por snoRNPs do box C/D e pseudouridilação efetuadas por snoRNPs do box H/ACA. Cada um desses RNPs usam um snoRNA distinto, contendo as sequências conservadas denominadas de *boxes* H/ACA ou C/D para selecionar o alvo de modificação (Kiss, 2001).

Durante o processamento, o pré-rRNA 35S é sucessivamente clivado no sítio A_0 do 5’ETS (gerando o pré-rRNA 33S), no sítio A_1 (gerando o pré-rRNA 32S) e no sítio A_2 do ITS1

(gerando os pré-rRNAs 20S e $27SA_2$), resultando na separação dos pré-rRNAs destinados a formar as subunidades ribossomais pequena e grande (Figura 1). Posteriores passos do processamento do rRNA 20S ocorrem no citoplasma através da clivagem no sítio D, gerando o rRNA 18S, enquanto o processamento do pré-rRNA $27SA_2$ continua no nucléolo. O $27SA_2$ é processado e dá origem aos rRNAs 5.8S e 25S através de duas vias alternativas. O processamento do pré-rRNA 5S é feito independentemente, gerando o rRNA 5S maduro (Figura 1; Fromont-Racine *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2013).

À medida que o processamento ocorre, os pré-rRNAs são reconhecidos por proteínas ribossomais, que se ligam a eles ao mesmo tempo que proteínas não-ribossomais e snoRNPs. As proteínas não-ribossomais e os snoRNPs correspondem aos *trans-acting factors* necessários para as modificações e processamento do pré-rRNA, e alguns estão envolvidos na montagem do pré-rRNA com as proteínas ribossomais (Kressler *et al*., 1999).

A montagem, no nucléolo, dos precursores iniciais dos rRNAs 5.8S, 18S e 25S com as proteínas ribossomais e não-ribossomais e com os snoRNPs originam a partícula pré-ribossomal 90S (Figura 2). Esta é então dividida nas partículas pré-60S e pré-40S (devido à clivagem no sítio A2). Os seguintes passos do processamento do pré–rRNA, assim como o recrutamento do rRNA 5S, ocorrem no núcleo. As partículas pré-40S e pré-60S resultantes são então exportadas para o citoplasma onde o processamento final dos rRNAs ocorre e as subunidades ribossomais se tornam maduras e funcionais para a tradução (Figura 2; Henras *et al*., 2008; Ebersberger *et al*., 2014).

Os snoRNPs são classificados como membros de duas famílias principais, box C/D e box H/ACA, além da endonuclease MRP (responsável pela clivagem no sítio A_3, no ITS1). Embora a grande maioria de snoRNPs de box C/D ou H/ACA estejam envolvidos em metilação ou pseudoridilação de nucleotídeos, respectivamente, os snoRNPs U3 e U14, do box C/D; e snR10 e snR30, do box H/ACA estão envolvidos em reações de clivagem endonucleolítica do pré-rRNA, nos sítios A_0, A_1 e A_2 (Tollervey, 1987; Beltrame e Tollervey, 1995).

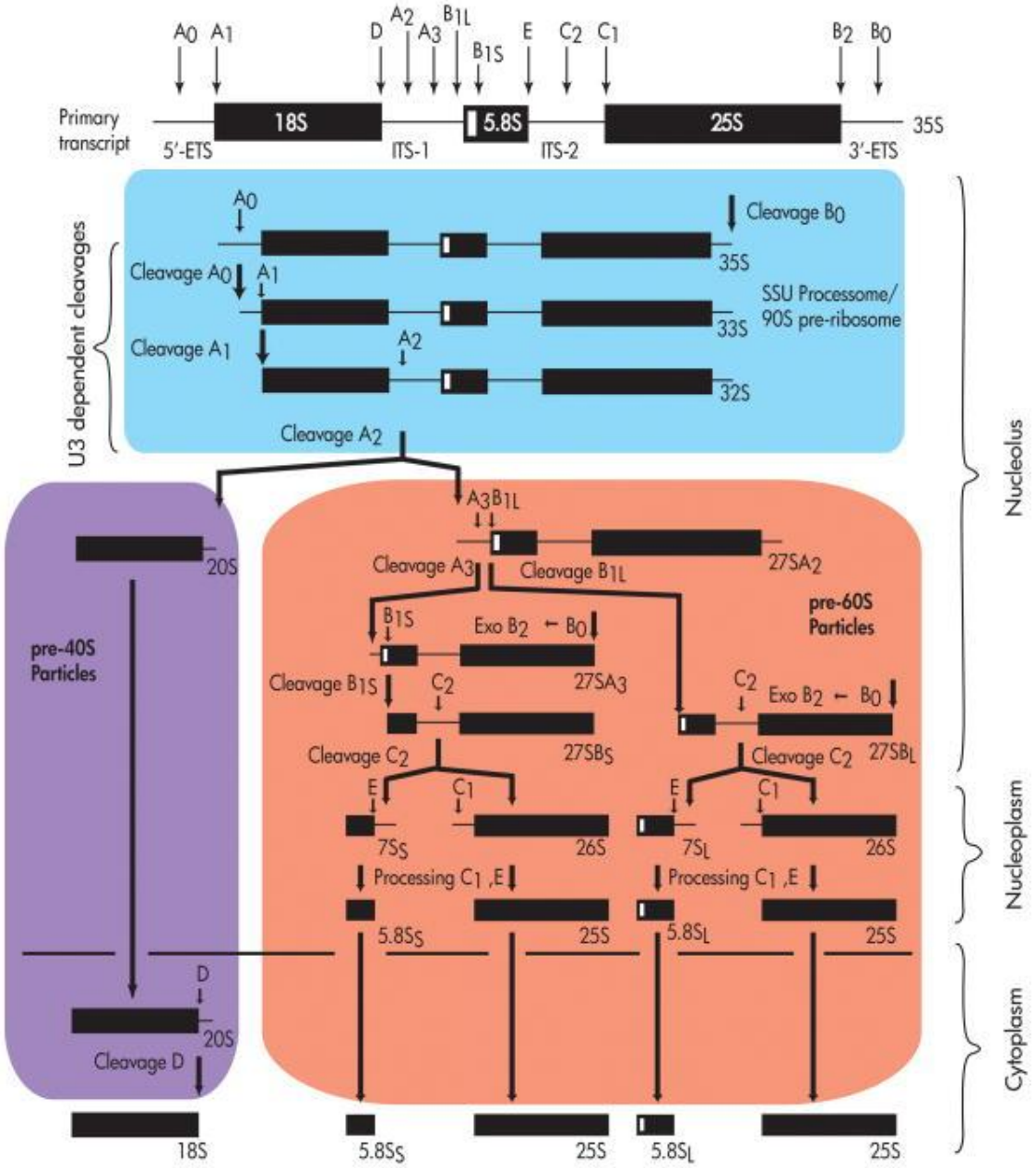


Figura 1. Esquema do processamento do pré-rRNA 35S, em *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando as etapas de clivagens e de processamento, assim como as localizações celulares que tais ocorrem, até obtenção dos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S. Extraído de Phipps *et al*., 2011.

Tais snoRNPs e os diversos *trans acting factors* se associam de maneira hierárquica e organizada no pré-rRNA nascente. Mutação ou depleção de qualquer dessas subunidades normalmente atrasa ou inibe a clivagem dos sítios citados e resulta no acúmulo dos pré-rRNAs aberrantes 23S, 22S ou 21S (Fernández-Pevida *et al*., 2015). Dentre os snoRNPs necessários para

formar o rRNA 18S em eucariotos, o mais abundante é o U3 (Borovjagin e Gerbi, 2005). O U3 snoRNP é formado pelo U3 snoRNA (*Small Nucleolar* RNAs) fortemente associado às proteínas Nop1, Nop58, Nop56 e Snu13 e Rrp9, além de outras proteínas que também se associam (Henras *et al*., 2008; Lim *et al.*, 2011).

As clivagens nos sítios A_0, A_1 e A_2 são dependentes da presença do U3 snoRNA, que usa três curtos trechos da sua região 5' para realizar pareamento de base com três diferentes sequências na região 5'ETS do pré-rRNA, (Woolford Jr. e Baserga, 2013). Devido às suas múltiplas interações de pares de base com o pré-rRNA, U3 snoRNA exerce atividade no dobramento co-transcricional e nos rearranjos necessários para o dobramento adequado do rRNA 18S e na sua montagem com proteínas ribossomais, formando a subunidade ribossomal menor madura (Charette e Baserga, 2010; Dutca *et al*., 2011).

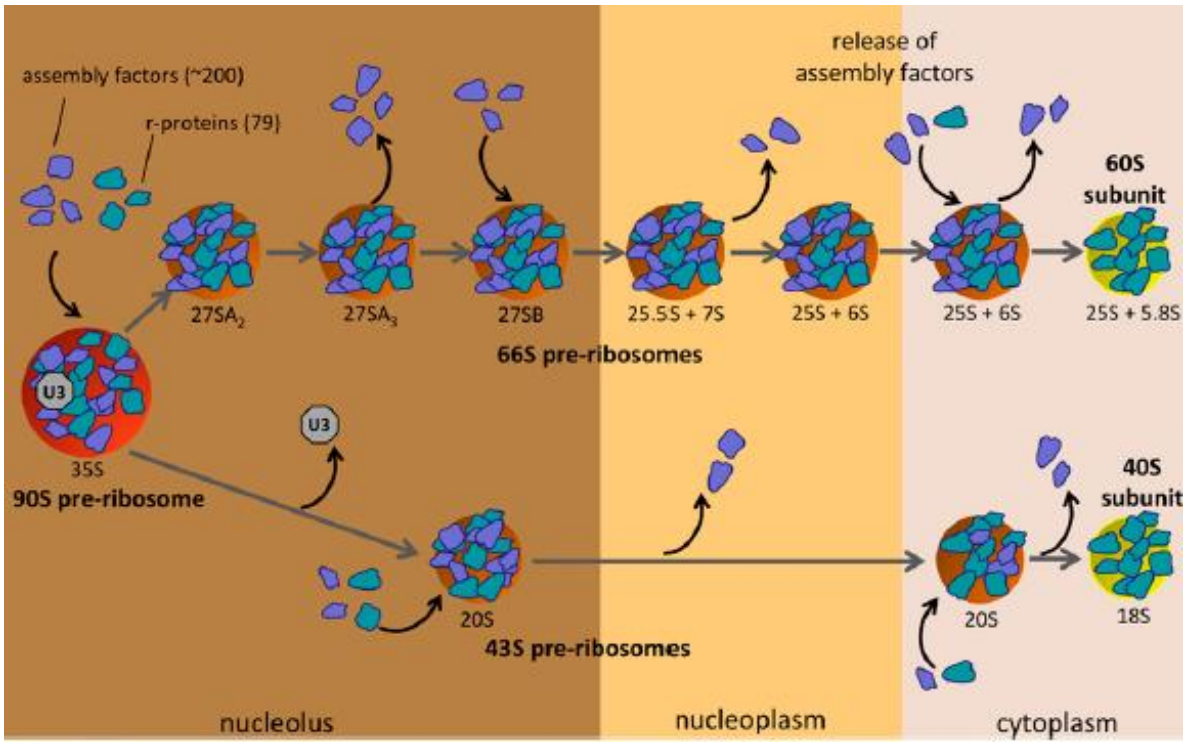


Figura 2. Ilustração esquemática das etapas sofridas pelas partículas pré-ribossomais, desde a formação da partícula 90S até obtenção das subunidades ribossomais 60S e 40S maduras, mostrando a participação transitória dos *trans acting factors* ou fatores de montagem (*assembly factors*) neste processo. Extraído de Woolford Jr. e Baserga, 2013.

As clivagens nos sítios A_0, A_1 e A_2 podem ocorrer durante a transcrição do nascente pré-rRNA ou pós-transcricionalmente, no pré-rRNA 35S já liberado. As nucleases responsáveis pelas clivagens em tais sítios ainda não foram claramente identificadas. Candidatas incluem a proteína Rcl1, que foi proposta como responsável pela clivagem no sítio A_2, e as proteínas Utp23 e Utp24, que são estruturalmente relacionadas à endonucleases e foram propostas como as responsáveis pelas clivagens nos sítios A_1 e A_2 (Turowski e Tollervey, 2014). Nenhuma endonuclease candidata a clivar o sítio A_0 foi até agora identificada e é possível que diferentes snoRNAs, como o U3, possam ajudar em uma reação de clivagem autocatalítica neste sítio (Fernández-Pevida *et al*., 2015).

O U3 snoRNA pareia com o pré-rRNA, montando uma grande ribonucleoproteína chamada SSU processomo ou partícula 90S. Tal complexo é uma macromolécula dinâmica que se forma em torno da pré-SSU (precursor da subunidade menor ribossomal), à medida que esta vai sendo transcrita pela RNA polimerase I (Dragon *et al*., 2002). Além do U3 snoRNP e de outros snoRNPs, diversos fatores necessários para a biogênese do ribossomo se associam transitoriamente com o pré-SSU, formando o SSU processomo (Woolford Jr. e Baserga, 2013).

O U3 snoRNA é essencial nas células e a sua depleção impede o processamento do pré-rRNA nos sítios A_0, A_1 e A_2, resultando no acúmulo do pré-rRNA 35S não processado, perda do SSU 18S maduro e concomitante morte celular (Phipps *et al*., 2011) e o U3 snoRNA é necessário no processamento do pré-18S rRNA em todos os organismos em que foi testado (Dragon *et al*., 2002).

Para a montagem do SSU processomo, o U3 snoRNP e os outros complexos que interagem com o pré-rRNA 35S em leveduras formam módulos separados que seqüencialmente se juntam ao pré-rRNA nascente. O primeiro complexo protéico que interage com o pré-rRNA nascente é o complexo chamado ‘t-UTP’ (“U Three Protein complex”), ou UTP-A, formado por sete proteínas. Sua associação ao pré-rRNA 35S é necessária para a associação do U3 snoRNP, do complexo Pwp2/UTP-B e do complexo UTP-C com o pré-rRNA 35S. Os dois últimos complexos, formados por seis proteínas cada, podem se associar ao pré-rRNA 35S independentemente um do outro. A proteína Rrp5 é necessária para a incorporação do complexo UTP-C na partícula pré-ribossomal. O complexo Mpp10 (composto pelas proteínas Mpp10, Imp3 e Imp4) também se associa (Figura 3; Henras *et al*., 2008).

Muitos componentes dos pré-ribossomos já foram identificados. Entretanto, a maioria deles foi apenas parcialmente caracterizada. Os desafios atuais nesta área são estabelecer quais são esses componentes e entender suas funções precisas nos processos de montagem e maturação das partículas pré-ribossomais (Choque *et al*., 2011).

Estudos realizados anteriormente no nosso laboratório identificaram a proteína Utp25 (YIL091C), essencial em S. *cerevisiae*, como uma proteína nucleolar necessária para a clivagem eficiente dos sítios A0, A1 e A2 do pré-rRNA 35S. Tais estudos mostraram que depleção da proteína Utp25 causa o acúmulo do pré-rRNA 35S e do rRNA aberrante 23S, levando a uma conseqüente diminuição dos níveis do rRNA 18S maduro e a uma forte depleção da subunidade menor ribossomal, 40S. Em concordância com sua localização nucleolar e seus efeitos no processamento do pré-rRNA mostrou-se também que Utp25 interage com as proteínas Sas10/Utp3 e Mpp10 do SSU processomo e que Utp25 co-imunoprecipita U3 snoRNA. Tais resultados indicaram fortemente que Utp25 é um componente do SSU processomo (Goldfeder e Oliveira, 2010).

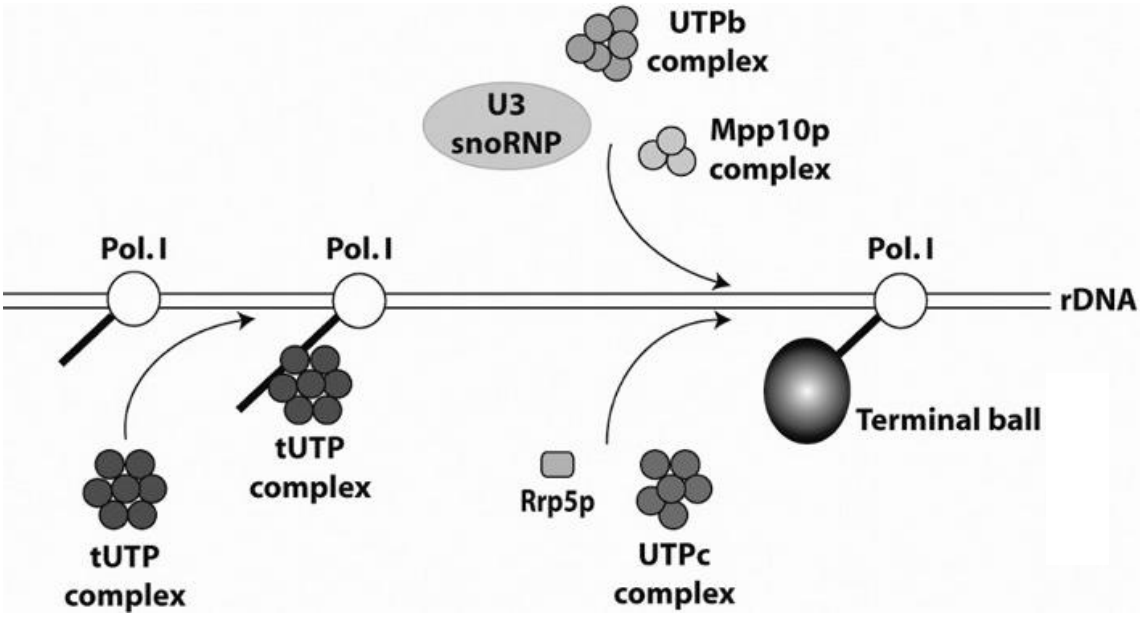


Figura 3. Modelo para a montagem do SSU processsomo, em *Saccharomyces cerevisiae*. Na figura, a enzima RNA Pol. I está transcrevendo o pré-rRNA 35S e em sua região 5' é montada a partícula 90S ou SSU processomo (chamada aqui de "Terminall Ball"), a medida que os subcomplexos que a formam vão se ligando. As proteínas e snoRNPs ainda não associados a nenhum subcomplexo, mas que fazem parte do SSU processomo, não estão representados nesta figura. Extraído de Henras *et al*., 2008.

Além disso, na seqüência de sua região codificadora foi identificado um domínio com baixa homologia com RNA helicases e comprovou-se que Utp25 foi conservada através da evolução, sendo homólogos desta proteína encontrados em muitos organismos, incluindo humanos (Goldfeder e Oliveira, 2010).

Esses dados foram confirmados em outro trabalho, no qual o efeito da deleção do gene *UTP25* no processamento do rRNA 18S foi também estudado. Foram analisadas também em um ensaio de duplo-híbrido as interações de Utp25 com outras proteínas dos diferentes subcomplexos do SSU processomo e mostrou-se que a proteína Utp25, juntamente com a proteína Sas10, fornece uma conexão entre Utp21 (componente do subcomplexo UTP-B) e Mpp10 (componente do subcomplexo Mpp10) (Charette e Baserga, 2010).

Outros estudos realizados sugeriram que Utp25 pode agir juntamente com Nop19 para ligar os subcomplexos Mpp10 e UTP-B, podendo contribuir para o correto posicionamento destes subcomplexos em relação um ao outro (Choque et al., 2011). Este tipo de interação entre as subunidades do SSU processomo podem promover a correta associação espacial e temporal dos vários subcomplexos durante a biogênese ribossomal (Choque *et al*., 2011).

Identificar as interações proteína-proteína que ocorrem no SSU processomo é um passo importante e necessário para elucidar sua montagem, mecanismo, função e regulação no processamento de pré-rRNA (Lim *et al.*, 2011).

2. OBJETIVO

Com base nos dados descritos acima, mostrando que Utp25 faz parte do complexo SSU processomo, este trabalho teve como objetivo identificar novas interações dessa proteína com outras proteínas desse complexo e investigar o papel de tais interações na formação e funcionamento do SSU processomo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas encontram–se na tabela 1.

A cepa de *Escherichia coli* utilizada encontra–se na tabela 2.

Os tampões utilizados na co–purificação através de TAP-Utp25 encontram–se na tabela 3.

Os meios de culturas utilizados e suas composições estão na tabela 4.

Os plasmídeos utilizados encontram-se na tabela 5.

Tabela 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.

Cepa	**Genótipo**	**Fonte**
TAP–Utp25	*MATa ade2 arg4 leu2-3,112; trp 1-289; ura 3-52; YIL091C::TAP-K.I.URA3*	Euroscarf
L40	*MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAop-LacZ)GAL4;* His^-, Trp^-, Leu^-, Ade^-	James *et al*., 1996.

Tabela 2. Cepa de E. *coli* utilizada.

Cepa	**Genótipo**	**Fonte**
DH5α	*sup*E44 Δ*lac*U169 (Φ80*lac*ZΔM15) *hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*1 *rel*A1	Estratagene.

Tabela 3. Tampões utilizados para purificação do complexo contendo Utp25 através de TAP–Utp25.

Tampão	**Composição**
1	50 mM Tris–Cl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 10% glicerol.
2	20 mM Tris–Cl, pH 8.0; 5 mM MgAc; 150 mM KAc.
3	20 mM Tris–Cl, pH 8.0; 5 mM MgAc; 200 mM KCl; 1 mM DTT.
4	20 mM Tris–Cl, pH 8.0; 5 mM MgAc; 200 mM KCl; 1 mM DTT; 10% glicerol.

Tabela 4. Meios de cultura utilizados.

Meio de Cultura	**Composição (g/L)**
LB	Triptona 10 Extrato de levedura 5 NaCl 10
YPD	Extrato de levedura 10 Peptona 20 Glicose 20
YNB Glicose	YNB 7 Glicose 20

Tabela 5. Lista de plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	**Características**	**Referência**
pBTM116	lexA, domínio de ligação	Chien *et al*., 1991.
pBTM-Utp25	lexA::UTP25, TRP1	Goldfeder e Oliveira, 2010.
pGAD-C2	GAL4, domínio de ativação	James *et al*., 1996.
pGAD-C2-Not1	GAL4::NOT1, LEU2	Este estudo.
pGAD-C2-Ccr4	GAL4::CCR4, LEU2	Este estudo.

3.1 Co–imunopurificação através de TAP–Utp25

Em 6 ou 8 litros de meio de cultura para levedura YPD (Tabela 4)cresceu–se a cepa de S. *cerevisiae* expressando a proteína de fusão TAP–Utp25, a 30°C, até OD = 1,2. As células foram então coletadas e após lavagens das mesmas com água e tampão apropriado (podendo ser utilizado algum dos tampões listados na tabela 3), e centrifugações, as células obtidas foram submetidas à lise mecânica utilizando o equipamento Ball Mill. Após ultra–centrifugação das células lisadas é obtido o extrato protéico total, sendo suas proteínas quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e comparadas com uma curva de calibração, que utiliza BSA (*Bovine Serum Albumin*), no mesmo tampão, como padrão. Então tal extrato protéico é incubado por 2 horas, a 16°C, com a resina IgG Sepharose, que se liga a proteína A, presente no TAP (para cada 1mg de proteína usa-se 1ul de IgG). Nova centrifugação é realizada e, então, o precipitado obtido é lavado por duas ou três vezes com o mesmo tampão já utilizado, sendo tais lavagens seguidas de novas centrifugações. É adicionada a protease TEV (para cada 100ul de IgG, usa-se 25ul de TEV), para clivar Utp25–CBP (*Calmodulin binding peptide*, presente no TAP), agindo *overnight* a 16°C, e então, após centrifugação, é obtida a eluição final. Esta foi enviada para análise por Espectrometria de Massas, tanto como amostra total (em solução), como após SDS–PAGE (gel de poliacrilamida 16%), sendo, neste caso, as bandas obtidas cortadas e enviadas para análise.

Durante o experimento foram coletadas as seguintes amostras: extrato proteico total (ET); sobrenadante não ligado a resina ou *flow–through* (FT); sobrenadante após lavagens com tampão (L1 e L2) e eluição final (EL).

3.2. Espectrometria de Massas

A identificação das proteínas co–imunoprecipitadas através de TAP–Utp25, e, por isso, presentes nas eluições finais, foi realizada por espectrometria de massas em diferentes laboratórios.

Para análise no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), as proteínas presentes nas bandas obtidas do gel de poliacrilamida corrido, foram digeridas de acordo com o protocolo de digestão *in* gel, do laboratório de espectrometria de massas do LNBio (Anal.Chem., 1996 68:850-858, modificado) e dessalinizadas utilizando *Zip Tip*. Já a amostra em solução foi digerida de acordo com o protocolo de digestão em solução, do laboratório de espectrometria de massas do LNBio (*Nature Protocols*, vol. 3 / no10/ 2008, modificado) e dessalinizadas na coluna *SepPack*. O equipamento utilizado para realizar a espectrometria de massas foi o Q-TOF Premier mass spectrometer.

Para análises na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e no Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP–USP) as eluições finais foram apenas secas em nosso laboratório, utilizando o equipamento Speed Vac, e enviadas somente como amostra total (em solução). O equipamento utilizado para realizar a espectrometria de massas na Central Analítica foi o Q-TOF Maxis 3G; já no CEFAP utilizou-se o equipamento LTQ-Orbitrap Velos ETD.

3.3 Duplo Híbrido e clonagens

O método do duplo–híbrido foi desenvolvido para estudar interações entre proteínas, usando as propriedades da proteína GAL4 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tal proteína é um ativador transcricional necessário para expressão de genes que codificam enzimas da via de degradação da galactose e é formada por dois domínios essenciais para sua funcionalidade, que se separam: um domínio N–terminal que se liga a seqüências específicas no DNA e um domínio C–terminal necessário para ativar a transcrição (Fields e Song, 1989).

O sistema de duplo–híbrido utiliza dois plasmídeos contendo os genes das proteínas a serem analisadas, que são introduzidos dentro de uma cepa que contém genes repórteres induzíveis. O gene da proteína de interesse, ou "isca", é clonado em um dos plasmídeos fusionado ao domínio de ligação ao DNA. O gene de uma segunda proteína é clonado no segundo plasmídeo, fusionado ao domínio ativador da transcrição. A interação entre essas duas proteínas resulta na aproximação entre os dois domínios (domínio de ligação ao DNA e domínio ativador da transcrição), ativando a transcrição de genes repórteres adjacentes e gerando um sinal fenotípico (Figura 4; James *et al*., 1996).

Foi realizado o ensaio de duplo–híbrido para confirmar a interação da proteína Utp25 com a proteína Not1, resultado prévio obtido em nosso laboratório ao realizar–se co–purificação através de TAP–Utp25 aliada à espectrometria de massas, realizada no Instituto Butantã. Da mesma maneira, foi também testada a interação da proteína Utp25 com Ccr4, proteína presente no mesmo complexo que Not1 (CCR4–NOT *complex*).

Para tanto, utilizamos a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* L40, específica para duplo-híbrido. L40 possui marcas de auxotrofia Ade, His, Leu e Trp (não sintetiza adenina, histidina, leucina e triptofano) e gene repórter *HIS3* (codifica enzima necessária para a síntese de histidina). Assim, L40 só cresce em meio de cultura que não contenha histidina se o seu gene repórter for ativado. Foram utilizados o vetor pBTM116, que possui marca de Trp e o domínio de ligação ao DNA *Lex*A e o vetor pGAD–C2, que possui marca de Leu e o domínio de ativação da transcrição GAL4 (Tabela 5).

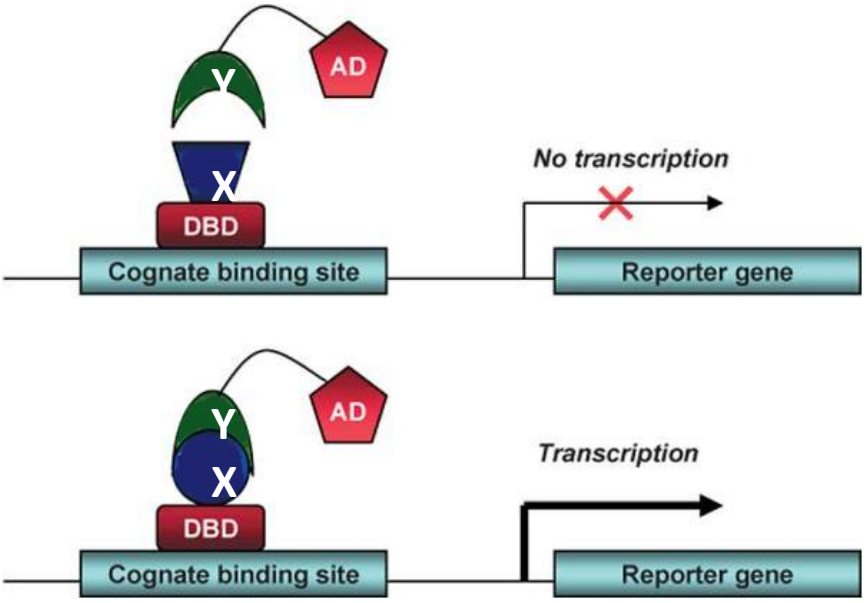


Figura 4. Desenho esquemático que explica o método de duplo–híbrido. Uma proteína usada como "isca" (chamada no desenho de "x") é expressa fusionada ao domínio de ligação ao DNA (DBD) e outra proteína (chamada no desenho de "y") é expressa fusionada ao domínio ativador da transcrição (AD) da proteína GAL4. Se tais proteínas interagirem entre si é ativada a transcrição do gene repórter. (Referência: Fields e Song, 1989).

Para realização das clonagens necessárias, primeiramente, as regiões codificadoras das proteínas Not1 e Ccr4 foram amplificadas por PCR a partir de DNA total de levedura, utilizando a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase*. Após purificação do DNA utilizando acetato de amônio 7.5 M e etanol absoluto gelado, este foi ligado ao vetor pGEM–T, utilizando a enzima *T4 DNA ligase*, a 4°C.

Foram utilizados os sítios de restrição das enzimas EcoRI e SalI para os genes de ambas as proteínas, nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

A cepa de E. *coli* competente DH5α foi então transformada com o vetor pGEM–T, supostamente contendo o inserto de DNA, utilizando tampão de transformação que contém Ca^{2+} e choque térmico. Após transformação, esta foi inoculada em meio de cultura para bactéria LB, ficando a 37°C, por 16 horas. No meio LB havia ampicilina, já que o vetor utilizado contém marca de resistência para tal antibiótico.

Algumas das colônias que cresceram no meio com ampicilina sofreram extração de plasmídeos em pequena escala (Mini Prep), e, após checagem em gel de agarose, alíquotas dos plasmídeos que foram realmente clonados foram seqüenciadas pelo Serviço de Seqüenciamento de DNA do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Após obtenção de clones perfeitos, as regiões codificadoras de ambas as proteínas foram clivadas do vetor pGEM–T, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e SalI, purificadas de acordo com o *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol* e, então, ligadas no vetor pGAD–C2, utilizando a enzima *T4 DNA ligase*, a 4°C. Utilizamos os mesmos sítios de restrição usados anteriormente.

Células competentes DH5α foram então transformadas com a nova reação de ligação e o mesmo processo realizado anteriormente foi repetido, até obtenção do vetor pGAD–C2 contendo o gene perfeito da proteína Not1 e o da proteína Ccr4, separadamente (Figuras 5 e 6).

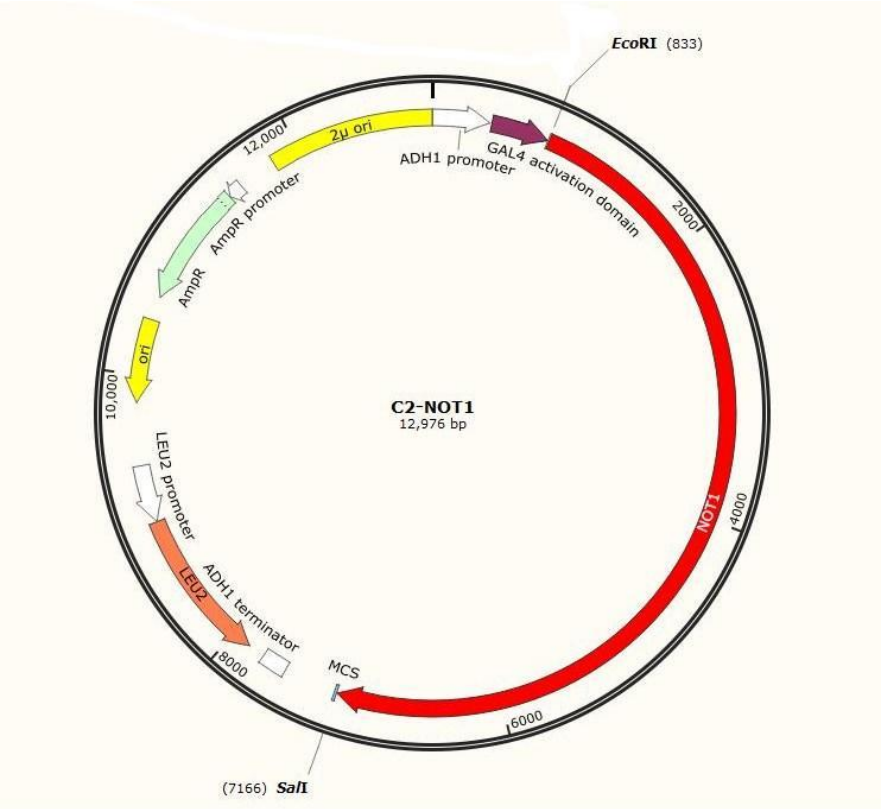


Figura 5. Mapa do vetor pGAD-C2 com o gene da proteína Not1 clonado.

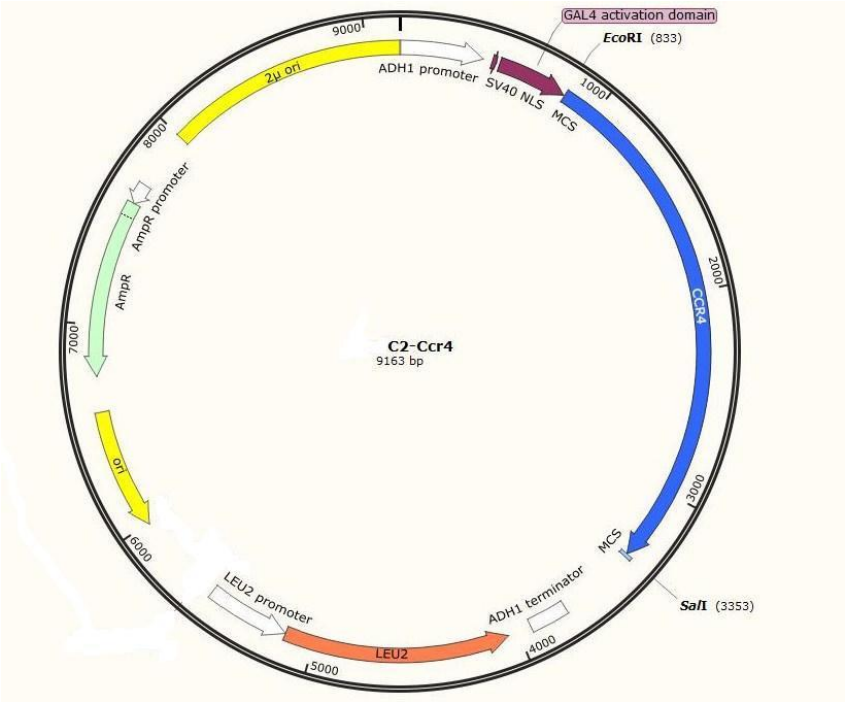


Figura 6. Mapa do vetor pGAD-C2 com o gene da proteína Ccr4 clonado.

A cepa L40 foi então transformada com o vetor pBTM116 contendo o gene da proteína Utp25, proveniente de estudos anteriores (Goldfeder e Oliveira, 2010; Tabela 5), utilizando tampão com LiOAc 1 M, polietilenoglicol (PEG) 50% e DTT 1 M, e inoculada em meio para levedura YNB, contendo glicose e os aminoácidos adenina, histidina e leucina, já que o vetor pBTM116 tem marca de seleção para triptofano e que a cepa de S. *cerevisiae* L40 não biosintetiza os aminoácidos citados. Após crescimento a 30°C, a cepa foi então transformada da mesma maneira com o vetor pGAD–C2, contendo o gene da proteína Not1 (Figura 5; Tabela 5) ou da proteína Ccr4 (Figura 6; Tabela 5), e inoculada em meio YNB com glicose e os aminoácidos adenina e histidina, já que o vetor pGAD–C2 contém marca de seleção de leucina.

Para uso como controle negativo transformamos a cepa L40 com pBTM–Utp25 e com o vetor pGAD–C2 sem nenhum gene ligado, ou seja, “vazio”. Como controles positivos foram utilizadas cepas L40 já transformadas com os vetores: (+) pBTM–Nip7 e pGAD–C2-Rrp43 e (++) pBTM–Nip7 e pGAD–C2-Nop8 (Zanchin e Goldfarb, 1999). Estas foram inoculadas em placas com meio YNB com glicose, adenina e histidina.

Em todos os casos a cepa L40 levou cerca de três dias para crescer, a 30°C.

Finalmente, colônias de L40 transformadas com os vetores pBTM116 e pGAD–C2, em todos os casos (controle +; controle ++; controle -; pBTM116–Utp25 e pGAD–C2–Not1; pBTM116–Utp25 e pGAD–C2–Ccr4) que cresceram em meio YNB com adenina e histidina foram inoculadas em meio YNB com glicose e todos os aminoácidos, com exceção de leucina e triptofano (marcas de seleção dos plasmídeos utilizados; Placa 1) e em meio YNB com todos os aminoácidos com exceção de leucina, triptofano e histidina (Placa 2), sendo esse último meio, sem histidina, o ensaio de duplo–híbrido. As placas ficaram a 30°C por três dias.

3.4 Western Blot

Para realização de Western Blot (Towbin *et al*., 1979) é realizada a transferência eletroforética, por 2 horas, das proteínas presentes em gel de poliacrilamida 12% (SDS PAGE) para membrana PVDF, previamente ativada com metanol. Após transferência, a membrana é imersa em solução com 5% de leite desnatado, para ser bloqueada, por 40 minutos. Após lavagens da membrana com tampão PBS–T (137mM Nacl; 2,7mM KCl; 10mM $Na_2HPO_4^-$; 2mM $KH_2PO_4^-$; 0,5% tween; pH=7,4) é adicionado o anticorpo primário, agindo por 16 horas a 4°C. Então a membrana é lavada novamente com tampão PBS–T e é adicionado o anticorpo secundário, agindo por 1 hora. Após novas lavagens com tampão é adicionada solução de ECL (ECL *Western Blotting Detection System*) à membrana, que é revelada na câmara escura, utilizando filme apropriado.

Em todos os casos, o anticorpo primário utilizado foi anti-CBP (coelho, diluição 1:5000) e o anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de coelho (conjugação com peroxidase *horseradish*, diluição 1:12000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Co–purificação através de TAP–Utp25 e Espectrometria de Massas

Para purificação do complexo SSU processomo através da proteína Utp25, nós utilizamos o método TAP–tag (*tandem affinity purification–tag*). Tal método permite a purificação de complexos protéicos na sua forma nativa, e, quando associado à espectrometria de massas permite a identificação de interações proteína–proteína (Puig *et al*., 2001).

Foi utilizada a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que expressa a proteína de fusão TAP-Utp25 (Tabela 1). O TAP–tag consiste em dois domínios da Proteína A de *Staphylococcus aureus* (que é reconhecida por IgG), fusionada a um peptídeo que se liga à proteína calmodulina (CBP, *calmodulin binding peptide*). Estas porções de Proteína A e CBP são separadas por um sítio de clivagem da protease TEV (Figura 7).

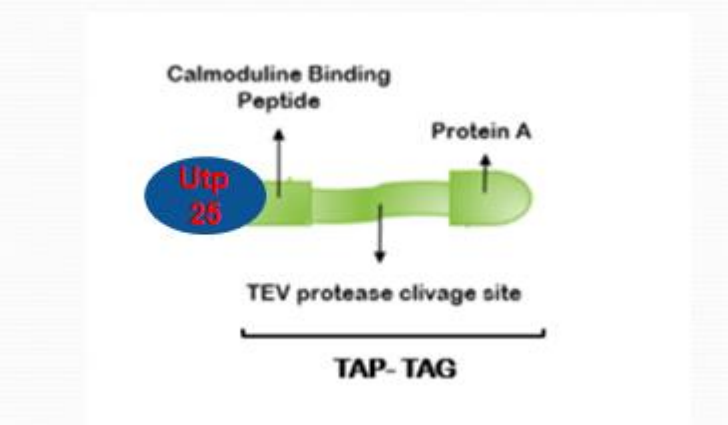


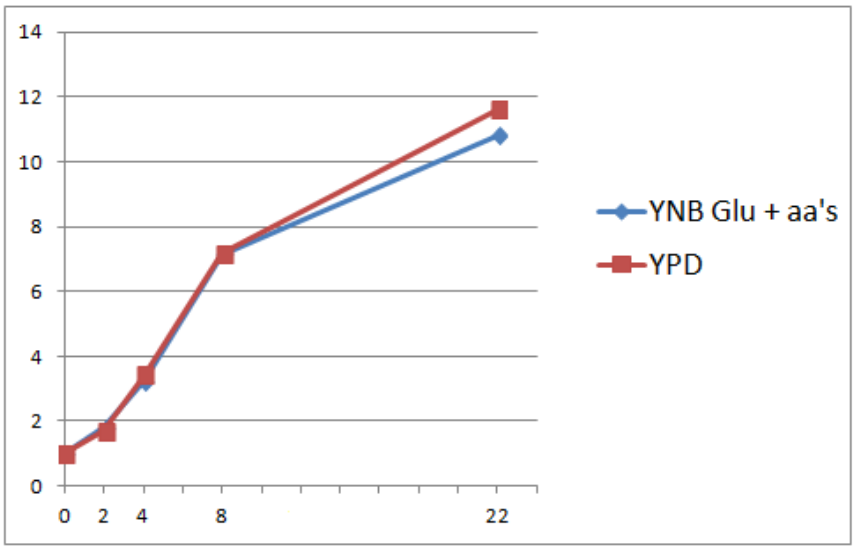
Figura 7. Desenho esquemático da proteína de fusão TAP–Utp25, utilizada para co–purificação das proteínas do complexo SSU processomo que interagem com Utp25 (Modificado a partir de Puig *et al*., 2001).

Primeiramente, nós analisamos em qual meio de cultura para levedura a cepa de S. *cerevisiae* cresce e expressa melhor a fusão TAP–Utp25, comparando o meio rico YPD com o meio YNB com glicose e todos os aminoácidos (Tabela 4). Apesar do meio YPD ser um meio rico, ou seja, com todos os nutrientes necessários para a levedura crescer, ao adicionar todos os aminoácidos de forma abundante e equilibrada no meio mínimo YNB estes poderiam favorecer o crescimento da cepa.

Para analisar o crescimento, partindo de um pré–inóculo, a cepa foi inoculada em 500 ml de ambos os meios e seu crescimento foi analisado após 2, 4, 8 e 22 horas, a partir da densidade óptica (O.D.) das culturas medida no espectrofotômetro. Calculamos qual volume do pré-inóculo deveria ser adicionado aos meios, para que no tempo inicial (0) as densidades ópticas de ambas as culturas fossem iguais à 0.1.

Para montar o gráfico de crescimento da cepa em relação ao tempo (Figura 8) dividimos todos os valores de OD obtidos pelo valor da OD no tempo inicial (0.1); com isso, o valor de OD no tempo inicial no gráfico é 1.

OD_{600}



Tempo (h)

Figura 8. Gráfico comparando o crescimento, medido no espectrofotômetro, em relação ao tempo, da cepa de S. *cerevisiae* que expressa TAP-Utp25, nos meios de cultura YNB com glicose e aminoácidos e YPD.

Pode–se verificar que a cepa de S. *cerevisiae* que expressa TAP–Utp25 cresce de forma semelhante em ambos os meios analisados (Figura 8).

Para comparar a expressão da proteína de fusão TAP–Utp25, quando a cepa em questão cresce em ambos os meios analisados, realizamos Western Blot (conforme item 3.4) com as mesmas amostras utilizadas para analisar o crescimento, utilizando o anticorpo anti–CBP (*calmodulin binding peptide*). Para isso, foram aliquotados volumes iguais dos inóculos nos

meios YDP e YNB com glicose e com todos os aminoácidos 4, 8 e 22 horas após inoculação inicial da cepa (Figura 9).

De acordo com as bandas obtidas no Western Blot realizado, concluímos que a proteína TAP-Utp25 é bem expressa no meio YPD; portanto, este foi o meio de cultura escolhido para realizarmos a co-purificação. A proteína de fusão TAP-Utp25 possui aproximadamente 104 kDa.

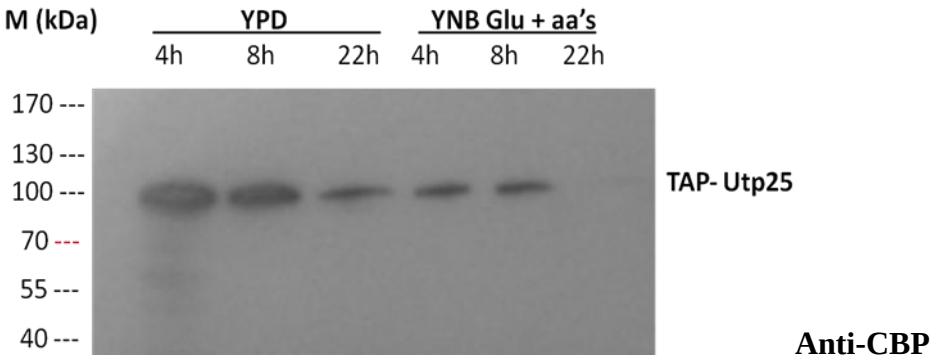


Figura 9. Western Blot, utilizando anticorpo anti–CBP, para verificar a expressão de TAP–Utp25 nos meios YPD e YNB com glicose e aminoácidos, 4, 8 e 22 horas após realização do inóculo inicial (O.D. = 0.1). (M, marcador; kDa, kilodaltons).

A co–purificação de proteínas do complexo SSU processomo que interagem com Utp25, através de TAP–Utp25, foi realizada em diferentes condições, até que encontrássemos o tampão que o complexo SSU processomo melhor se estabiliza.

Começamos utilizando o tampão composto por 20 mM Tris–Cl, pH 8.0; 150 mM KAc; 5 mM MgAc (chamado de Tampão 2, na tabela 3). Cresceu–se a cepa TAP–Utp25 em 6 litros de YPD e a co–purificação foi realizada conforme descrito no item 3.1.

As proteínas presentes na eluição foram precipitadas com acetona e utilizamos SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 16%) para separá-las. As bandas obtidas foram então cortadas para serem analisadas por espectrometria de massas, no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

No total obteve–se 47 bandas (Figura 10). Estas foram digeridas de acordo com o protocolo de digestão *in* gel, do laboratório de espectrometria de massas do LNBio (Anal.Chem., 1996 68:850-858, modificado) e dessalinizadas utilizando *Zip Tip*.

Parte da eluição final obtida foi tratada como amostra em solução e também analisada por espectrometria de massas no LNBio. Esta foi digerida seguindo o protocolo de digestão em solução, do laboratório de espectrometria de massas do LNBio (*Nature Protocols*, vol. 3 / no10/ 2008, modificado) e dessalinizada na coluna *SepPack*.

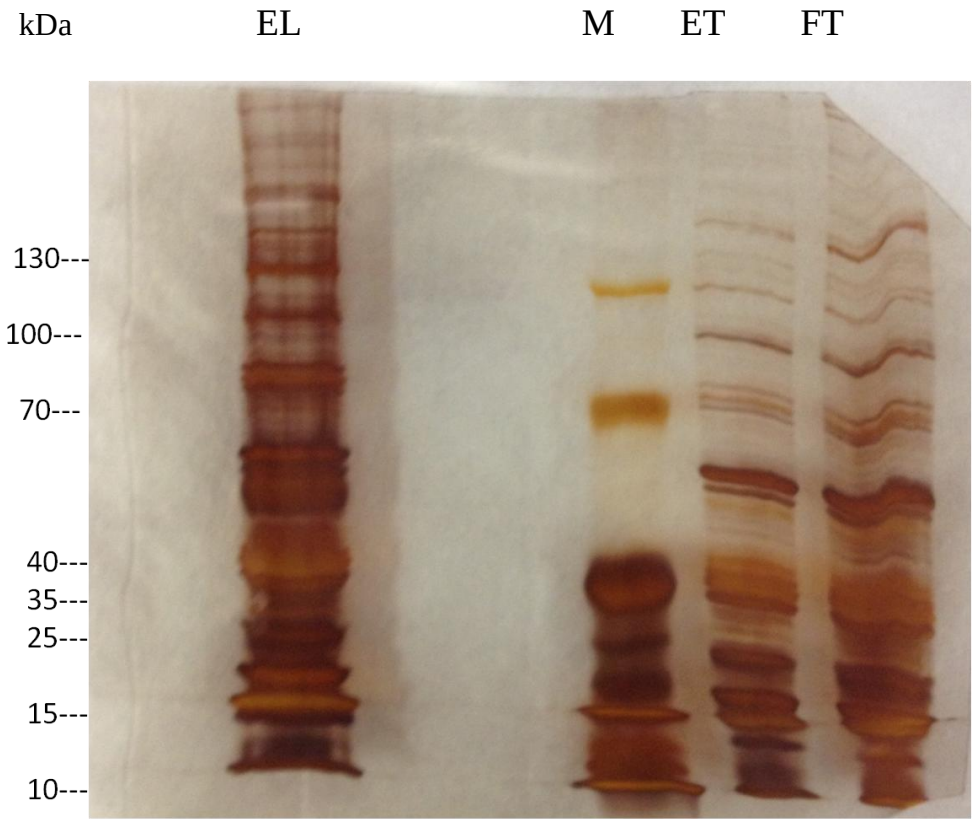


Figura 10. Foto do gel de poliacrilamida 16% do qual foram extraídas as bandas da eluição, para digestão com tripsina e análise por espectrometria de massas. EL: eluição; M: marcador; ET: extrato protéico total; FT: sobrenadante não ligado a resina ou *flow–through*.

De acordo com os resultados obtidos, não conseguimos co–imunoprecipitar proteínas do SSU processomo utilizando o Tampão 2; foram identificadas apenas proteínas abundantes na célula de S. *cerevisiae*, que participam de vias metabólicas e/ou estão envolvidas com outros processos celulares. Isto pode ter ocorrido devido ao fato das interações entre a proteína Utp25 com outras proteínas do SSU processomo terem sido perdidas durante algum estágio do experimento, como centrifugação ou lavagens com tampão, ou então a tais interações serem transitórias e, por isso, mais difíceis de serem detectadas.

Resolvemos então testar em qual tampão o complexo SSU processomo demonstra ser mais estável, a fim de conseguirmos detectar novas interações proteína–proteína utilizando TAP–Utp25 como isca. Para isso, crescemos em 8 litros de YPD a cepa TAP–Utp25 e dividimos essa cultura em quatro frações de 2 litros. As co–purificações foram realizadas como descrito em 3.1, e para cada uma dessas quatro frações usamos um tampão diferente, sendo estes chamados aqui de "Tampão 1 a 4", listados na tabela 3. Os tampões testados variam na sua composição e/ou na concentração de seus sais mais abundantes e já haviam sido previamente utilizados no nosso laboratório ou por outros grupos em situações semelhantes.

As quatro eluições obtidas foram secas no equipamento Speed Vac e enviadas para serem analisadas como amostra em solução por espectrometria de massas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Não obtivemos resultados satisfatórios novamente. Isto provavelmente deve-se ao fato de nas eluições obtidas a partir de apenas 2 litros de cultura não haver material suficiente para a identificação de proteínas do SSU processomo por espectrometria de massas. Porém, após a análise da fração na qual utilizamos o Tampão 3, composto por 20 mM Tris–Cl, pH 8.0, 5 mM MgAc, 200 mM KCl e 1 mM DTT, pode-se perceber que nesta amostra tinha maior número de proteínas; por isso tal tampão foi selecionado para ser utilizado novamente, em um volume maior de células.

A cepa TAP–Utp25 foi inoculada em 8 litros de meio de cultura YDP e a co–imunopurificação foi realizada conforme descrito no item 3.1, utilizando o tampão selecionado (Tampão 3).

Realizamos SDS–PAGE (gel de poliacrilamida 12%) com as amostras coletadas durante o experimento para visualizarmos o padrão de bandas e termos certeza de que haviam proteínas eluídas na amostra a ser analisada por espectrometria de massas.

Ao analisarmos a foto do gel em questão (Figura 11) pode–se ver que a eluição foi eficiente, o que justifica a análise da amostra por espectrometria de massas.

Realizamos também Western Blot (conforme item 3.4), utilizando anti–CBP, com as mesmas amostras usadas para o gel de checagem (Figura 11) para termos certeza de que TAP–Utp25 estava presente na eluição a ser analisada (Figura 12).

Ao analisarmos o filme resultante constata–se que, apesar de ter ocorrido perda de TAP-Utp25 na segunda lavagem, pode-se observar presença de TAP–Utp25 na eluição (Figura 12).

A eluição obtida foi então seca no Speed Vac e enviada como amostra em solução para ser analisada por espectrometria de massas no Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP–USP).

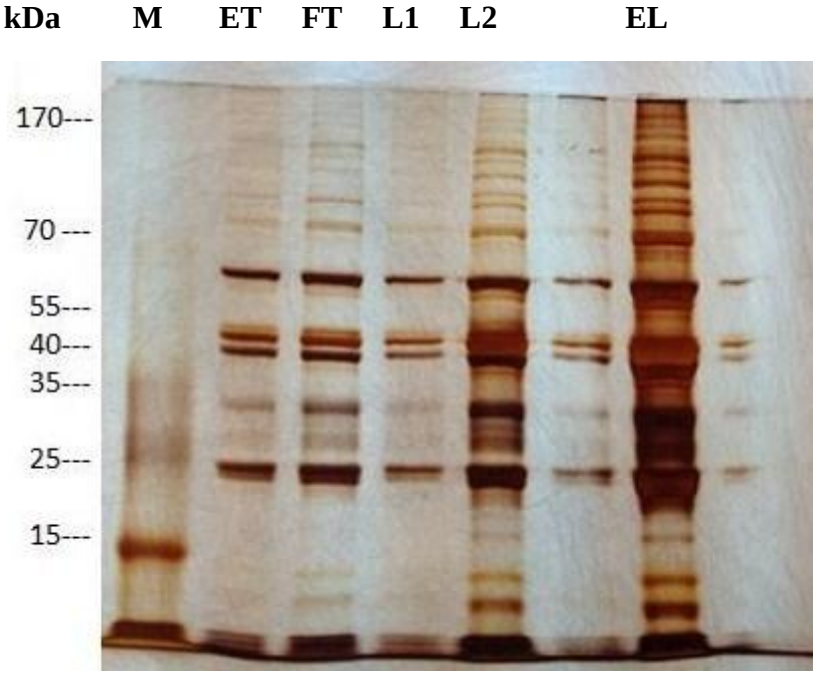


Figura 11. Foto do gel de poliacrilamida 12% com amostras obtidas durante a co–purificação através de TAP–Utp25, utilizando tampão composto por 20 mM Tris–Cl, pH 8.0, 5 mM MgAc, 200 mM KCl e 1 mM DTT (tampão 3). M: marcador; ET: extrato total; FT: *flow–through* ou sobrenadante não ligado a resina; L1 e L2: sobrenadantes após uma e duas lavagens com tampão; EL: eluição final.

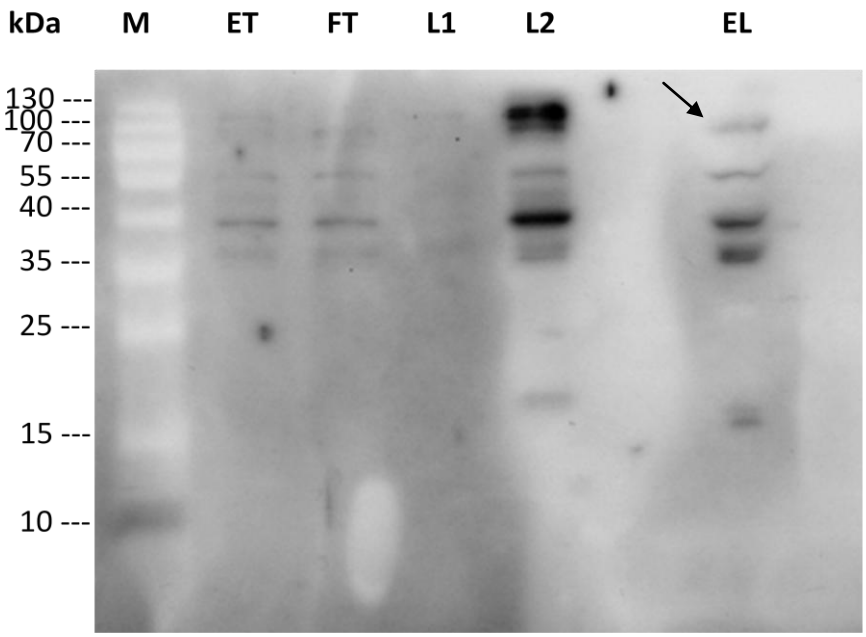


Figura 12. *Western Blot*, utilizando anti–CBP, para confirmar presença de TAP–Utp25 na eluição obtida na co-purificação utilizando tampão composto por 20 mM Tris–Cl, pH 8.0, 5 mM MgAc, 200 mM KCl e 1 mM DTT (tampão 3). M: marcador; ET: extrato total; FT: *flow–through* ou sobrenadante não ligado a resina; L1 e L2: sobrenadantes após uma e duas lavagens com tampão; EL: eluição. Banda correspondente à TAP-Utp25 está indicada com uma seta.

De acordo com os resultados obtidos, co–purificamos através de TAP–Utp25 as seguintes proteínas que fazem parte do complexo SSU processomo: Snu13, Nop56 e Rrp5 (Tabela 6).

As proteínas Snu13 e Nop56 fazem parte do subcomplexo U3 snoRNP e a proteína Rrp5 é necessária para a incorporação do subcomplexo UTP-C, o último subcomplexo a se ligar no SSU processomo (Henras *et al*., 2008).

De acordo com estudos anteriormente realizados em nosso laboratório (Goldfeder e Oliveira, 2010), Utp25 interage com as proteínas Sas10 e Mpp10, sendo a última parte do subcomplexo Mpp10. Este estudo também revelou que Utp25 co–imunoprecipita U3 snoRNA e que esta proteína está concentrada nas mesmas frações que também contém o U3 snoRNA, de acordo com análise do seu perfil de sedimentação. Tais resultados fizeram consistente a idéia de que Utp25 faz parte do complexo U3 snoRNP, do qual fazem parte o U3 snoRNA e as proteínas Nop1, Nop58, Nop56 e Snu13, entre outras.

Tabela 6. Proteínas do SSU processomo co-purificadas através de TAP-Utp25 e identificadas por Espectrometria de Massas.

Proteína	**Score**	**Peptídeos Encontrados na Amostra**
Snu13	16,30	AFPLADAALTQQILDVVQQAANLR
		GISEFIIMAADCEPIEILLHLPLLCEDK
		GISEFIIMAADCEPIEILLHLPLLCEDKNVPYVFVPSR
Rrp5	6,55	VGEIENSENLSSR
		ISLLDLADNDSNFSENIESVFPLGSALQVK
Nop56	5,69	NITLAISDK
		LIELVSFAPFK

Além disso, em tal trabalho (Goldfeder e Oliveira, 2010), é levantada a questão se Utp25 se liga diretamente ao U3 snoRNP ou se associa a este via interação com as proteínas Sas10 e Mpp10, já que é sabido que estas duas proteínas interagem com U3 snoRNP (Dunbar *et al*., 1997; Dragon *et al*., 2002).

A co-purificação das proteínas Snu13 e Nop56 com TAP-Utp25, descobertas neste trabalho, precisam ainda ser confirmadas através de outro método de interação proteína–proteína, porém elas sugerem que a hipótese de que Utp25 se ligue diretamente ao U3 snoRNP seja verdadeira, já que Snu13 e Nop56 fazem parte deste subcomplexo ribonucleprotéico.

De acordo com outro estudo realizado (Charette e Baserga, 2010) as proteínas Utp25 e Sas10, além de interagirem com Mpp10, também interagem com a proteína Utp21, membro do subcomplexo UtpB. Foi sugerido, então, que Utp25 e Sas10 agem como ligantes dos diferentes subcomplexos do SSU processomo.

Se as interações entre Utp25 e as proteínas Snu13, Nop56 e Rrp5 forem confirmadas, a hipótese acima citada também pode ser comprovada: a proteína Utp25 pode agir como um conector dos subcomplexos que formam o SSU processomo, interagindo com o U3 snoRNP, via interação com as proteínas Snu13 e Nop56; com o subcomplexo Mpp10, devido a sua interação

com Mpp10; com o subcomplexo UTP–C, através de interação com a proteína Rrp5 (necessária para a ligação de tal subcomplexo; Figura 3); e com o subcomplexo UTP–B, devido sua interação com a proteína Utp21.

São exatamente esses tipos de interações entre as proteínas que promovem as corretas associações espaciais e temporais entre as várias subunidades do complexo SSU processomo durante as diversas etapas da biogênese da subunidade menor ribossomal (Charette e Baserga, 2010).

4.2 Duplo–Híbrido

Foi realizado o ensaio de duplo-híbrido para verificar interação entre as proteínas Utp25 e Not1, resultado prévio obtido em nosso laboratório ao realizar–se co–purificação através de TAP–Utp25 aliada à espectrometria de massas (Gonzales e Oliveira, dados não publicados). Testamos também, da mesma maneira, a interação da proteína Utp25 com Ccr4, proteína presente no mesmo complexo que Not1. Tal complexo, chamado CCR4–NOT *complex*, é formado por proteínas que afetam a expressão gênica tanto positivamente, quanto negativamente (Liu *et al*., 1998).

Os genes das proteínas Not1 e Ccr4 foram clonados no vetor pGAD–C2, como descrito em 3.3, fusionados ao domínio de ativação da transcrição. Possuíamos de estudos anteriores (Goldfeder e Oliveira, 2010) o gene da proteína Utp25 clonado no vetor pBTM116, fusionado ao domínio de ligação ao DNA.

Como controles positivos foram utilizadas cepas L40 já transformadas com os vetores: (+) pBTM–Nip7 e pGAD–C2-Rrp43 e (++) pBTM–Nip7 e pGAD–C2-Nop8 (Zanchin e Goldfarb, 1999). Para uso como controle negativo transformamos a cepa L40 com pBTM-Utp25 e com o vetor pGAD–C2 sem nenhum gene clonado, como descrito em 3.3.

Inoculamos a cepa L40, transformada com os vetores pBTM116 e pGAD – C2, em placa com o meio de cultura YNB com glicose e com todos os aminoácidos, com exceção de leucina e triptofano, já que estes aminoácidos são marca de seleção dos plamídeos utilizados. Assim, só as células transformadas com ambos os vetores cresceram. Nesta placa, usada como controle de viabilidade das células (Placa 1; Figura 13), em todos os casos (controle +; controle ++; controle -; pBTM116–Utp25 e pGAD–C2–Not1; pBTM116–Utp25 e pGAD–C2–Ccr4) a cepa L40 cresceu bem, o que demonstra que as células estavam viáveis.

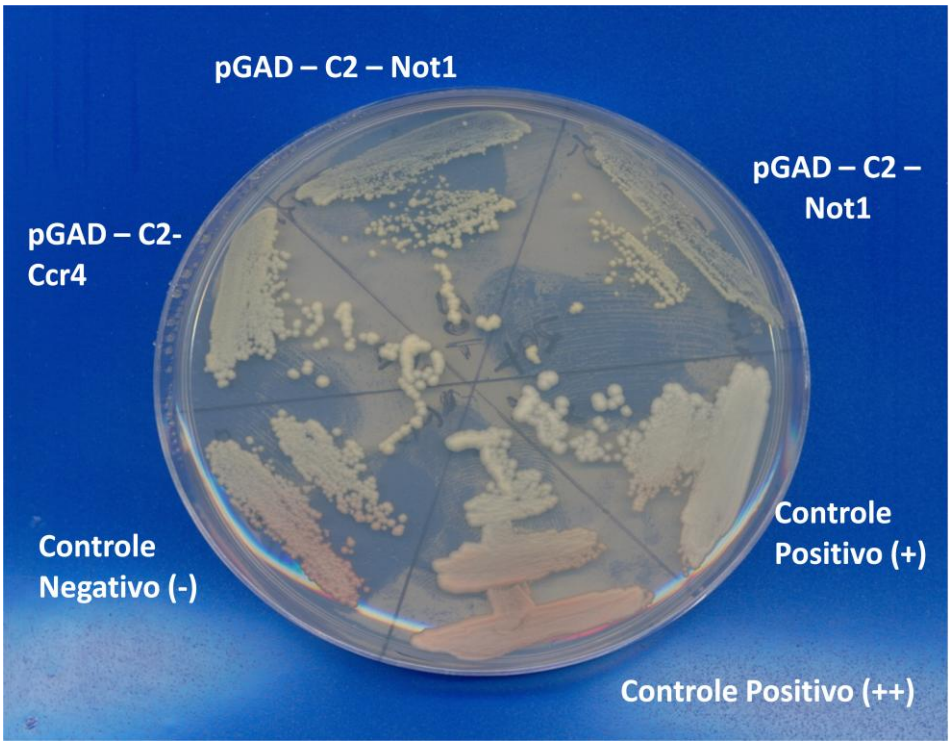


Figura 13. Foto da placa 1, utilizada como controle para o ensaio de duplo–híbrido, realizado para confirmar a interação da proteína Utp25 com as proteínas Not1 e Ccr4. Cepa L40, transformada com os vetores pBTM116 e pGAD–C2, em meio de cultura YNB com glicose e com todos os aminoácidos, com exceção de leucina e triptofano.

Então, para o ensaio de duplo–híbrido, as células que cresceram na Placa 1 foram inoculadas em uma nova placa (Placa 2, Figura 14), que contém o meio de cultura YNB com glicose e com todos os aminoácidos, com exceção de leucina, triptofano e de histidina. Assim, somente as células transformadas com os vetores pBTM116 e pGAD–C2 e que tivessem o gene repórter *HIS3* ativado cresceriam.

Como se pode ver na Figura 14, somente os controles positivos (+ e ++) cresceram em meio de cultura sem histidina, o que indica que a proteína Utp25 não interagiu com a proteína Not1 e nem com a proteína Ccr4, não ativando o gene repórter *HIS3* e assim, não havendo síntese do aminoácido histidina, o que levou a inviabilidade do crescimento das células em tal meio.

Portanto, possivelmente, Not1 foi co–imunopurificada com TAP–Utp25 e identificada por espectrometria de massas devido a uma interação inespecífica ou indireta com Utp25.

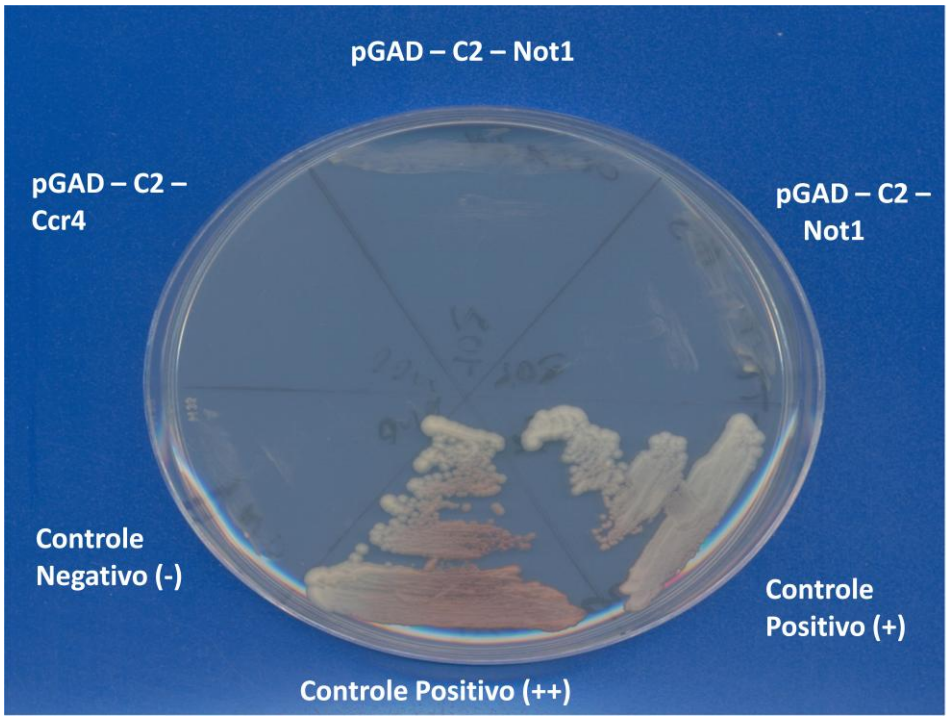


Figura 14. Foto da placa 2, utilizada para o ensaio de duplo–híbrido, realizado para confirmar a interação da proteína Utp25 com as proteínas Not1 e Ccr4. Cepa L40, transformada com os vetores pBTM116 e pGAD–C2, em meio de cultura YNB com glicose e com todos os aminoácidos, com exceção de leucina, triptofano e histidina.

5. CONCLUSÃO

Para entendermos melhor o papel da proteína Utp25 no complexo SSU processomo, responsável pelo processamento da região 5' do pré-rRNA 35S, e na maturação do rRNA 18S, componente da subunidade ribossomal menor, buscamos descobrir novas interações proteína-proteína através do método de TAP–Tag (Puig *et al*., 2001), usando TAP–Utp25 como isca.

No início, encontramos dificuldades em obter bons resultados através de co-imunopurificação aliada à espectrometria de massas provavelmente devido ao fato da interação de Utp25 com outras proteínas do SSU processomo estar sendo perdida em alguma etapa do experimento, como durante as lavagens com tampão, ou tais interações serem transitórias e, por isso, mais difíceis de serem detectadas.

Como já estava previsto desde o começo do projeto, foi necessário testar vários tampões para buscar estabilização das interações entre as subunidades do complexo e, enfim, alcançar resultados satisfatórios.

Após encontramos um tampão adequado para ser usado durante a co–imunopurificação através de TAP–Utp25, obtivemos como resultado as proteínas Snu13 e Nop56, ambas fazendo parte do subcomplexo U3 snoRNP e, também, a proteína Rrp5, necessária para a incorporação do subcomplexo UTP-C, o último subcomplexo a se ligar no SSU processomo.

Essas interações descobertas precisam ser confirmadas através de outro método de detecção de interação proteína–proteína, para se saber se são diretas. Se as interações forem diretas, elas poderão confirmar a hipótese de Utp25 agir como um conector na montagem do SSU processomo, interagindo com proteínas dos diversos subcomplexos que o formam e também a hipótese de Utp25 se ligar diretamente ao U3 snoRNP (e não via interação com as proteínas Sas10 e Mpp10), já que Snu13 e Nop56 fazem parte desse subcomplexo.

A confirmação das interações proteína–proteína entre Utp25 e as proteínas Snu13, Nop56 e Rrp5 através de outro método é uma perspectiva na continuação deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baserga, S. J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast, *195*(November), 643–681. doi:10.1534/genetics.113.153197.

Beltrame M. & Tollervey D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J* 14, 4350-4356.

Borovjagin, A. V, & Gerbi, S. a. (2005). An evolutionary intra-molecular shift in the preferred U3 snoRNA binding site on pre-ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, *33*(15), 4995–5005. doi:10.1093/nar/gki815

Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.

Charette, J. M., & Baserga, S. J. (2010). The DEAD-box RNA helicase-like Utp25 is an SSU processome component. *RNA (New York, N.Y.)*, *16* (11), 2156–69.

Chien, C., Bartel, P., Sternglanz, R., Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for protein that interact with a protein of interest. *PNAS*, 88: 9578-9582.

Choque, E., Marcellin, M., Burlet-Schiltz, O., Gadal, O., & Dez, C. (2011). The nucleolar protein Nop19p interacts preferentially with Utp25p and Dhr2p and is essential for the production of the 40S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biology*, *8*(6), 1158–72.

Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlagek, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F. & Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, *417*(6892), 967–70.

Dunbar D.A., Wormsley S., Agentis T.M. & Baserga S.J. (1997). Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Mol Cell Biol*, 17, 5803–5812.

Dutca, L. M., Gallagher, J. E. G., & Baserga, S. J. (2011). The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing. *Nucleic acids research*, *39*(12), 5164–80. doi:10.1093/nar/gkr044

Ebersberger, I., Simm, S., Leisegang, M. S., Schmitzberger, P., Mirus, O., von Haeseler, A., Schleiff, E. (2014). The evolution of the ribosome biogenesis pathway from a yeast perspective. *Nucleic acids research*, *42*(3), 1509–23. doi:10.1093/nar/gkt1137

Fernández-Pevida, A., Kressler, D., & de la Cruz, J. (2015). Processing of preribosomal RNA in Saccharomyces cerevisiae. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *6*(2), 191–209. doi:10.1002/wrna.1267

Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. Vol. 340, 245-246.

Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., & Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, *313*, 17–42.

García-Gómez, J. J., Babiano, R., Lebaron, S., Froment, C., Monsarrat, B., Henry, Y., & de la Cruz, J. (2011). Nop6, a component of 90S pre-ribosomal particles, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *RNA Biology*, *8*(1), 112–124. doi:10.4161/rna.8.1.14143

Goldfeder, M. B., & Oliveira, C. C. (2010). Utp25p, a nucleolar *Saccharomyces cerevisiae* protein, interacts with U3 snoRNP subunits and affects processing of the 35S pre-rRNA. *The FEBS Journal*, *277*(13), 2838–52.

Henras, A. K., Soudet, J., Gérus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, a, & Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *65*(15), 2334–59.

Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., & Gleizes, P.-E. (2014). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *6*(2), 225–42. doi:10.1002/wrna.1269.

James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425-1436.

Kiss, Tamás. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO Journal*. Vol. 20. No. 12. pp. 3617-22.

Kressler, D., Hurt, E., & Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1803*(6), 673–83.

Kressler, D., Linder, P., & Cruz, J. De. (1999). Protein trans -Acting Factors Involved in Ribosome Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae. Molecular and Cellular Biology*. *19*(12):7897.

Lim, Y.H., Charette, J.M., Baserga, S.J. (2011). Assembling a Protein-Protein Interaction Map of The SSU Processome from Existing Datasets. *PLoS ONE* 6(3): e17701. doi:10.1371/journal.pone.0017701.

Liu, H., Badarinarayana, V., Audino, D. C., Rappsilber, J., Mann, M., & Denis, C. L. (1998). The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively, *17*(4), 1096–1106.

Phipps, K. R., Charette, J. M., & Baserga, S. J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *2*(1), 1–21.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, B., Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods (San Diego, Calif.)*, *24*(3), 218–29.

Steitz, T. A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(3), 242–53.

Tollervey D. (1987). A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J* 6, 4169-4175.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. (1979) ***PNAS*** 76:4350-4354.

Turowski, T. W., & Tollervey, D. (2014). Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *6*(1), 129–39. doi:10.1002/wrna.1263.

Zanchin, N. I. T., & Goldfarb, D. S. (1999). Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1518-1525.

Zhang, L., Lin, J., & Ye, K. (2013). Structural and functional analysis of the U3 snoRNA binding protein Rrp9. *RNA (New York, N.Y.)*, *19*(5), 701–11.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Maria Martins Marques da Cruz.
Nacionalidade: Brasileira.
Naturalidade: Paris, França.
Data de Nascimento: 02/08/1983.

2. EDUCAÇÃO

Graduação em Farmácia.
Universidade Católica de Santos (UNISANTOS).
Conclusão em 2008.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Monitora bolsista PAE – USP
Disciplina de Introdução à Bioquímica para o curso de Química – 2015.

Monitora PAE – USP
Disciplina de Biologia Molecular para o curso de Farmácia – 2014.

Monitora bolsista UNISANTOS
Disciplina de Química Inorgânica I e II para o curso de Farmácia – 2006.

4. OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado – CNPq/ 2013-2015.