

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

THIERRY PUEBLO FREITAS GIROTTO

**Estudo da fosforilação da Cwc24 como fator de
splicing em *Saccharomyces cerevisiae***

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
01/11/2019

THIERRY PUEBLO FREITAS GIROTTO

**Estudo da fosforilação da Cwc24 como fator de
splicing em *Saccharomyces cerevisiae***

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

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Carla Columbano de Oliveira

São Paulo

2019

Página para assinatura para os membros da banca

AGRADECIMENTO(S)

À Deus, por ter me proporcionado uma experiência única de vida, por me ensinar o que há de mais sagrado nesta vida e por me acalantar nos meus momentos de angústia e sofrimento.

À prof^a Carla, por ter me concedido um espaço em seu laboratório e por ensinar coisas muito importantes para meu desenvolvimento profissional.

À minha família, em principal a minha mãe, por mostrar o que é amor incondicional, ser o meu porto seguro e demonstrar todo apoio que preciso. Às minhas tias, por serem como segundas mães para mim e mostrar o sentido da palavra união, aos meus tios e primos pelos momentos de diversão e conversas e sabedorias trocadas.

Aos meus colegas de laboratório, por todos os bons momentos de alegria trocados, discussões e sugestões. À Griselda, por ter sido minha professora e ter me ensinado durante o começo da pós-graduação e por ter me acolhido em sua casa quando precisei, à Fiorella, por ter sido uma excelente colega e ter me sido para mim um modelo de dedicação e exemplo de boa convivência. À Paola e a Ellen, por terem sido excelentes companhias durante todo este trajeto e são pessoas com quem desenvolvi conexões maravilhosas. Ao Felipe Bagatelli, Felipe Carvalho, ao Luiz, pelos momentos de conversa e risada. À Alessandra e a Ivanilde, nossas ótimas técnicas de laboratório.

Agradeço a professora Déborah Schechtman, por contribuir intelectualmente ao meu trabalho, dando a ideia do experimento do Phos-tag

À professora Natalie Cella, por ter cedido o Phos-tag.

Aos meus amigos do IQ, à Samantha, por ter sido minha melhor companhia durante o mestrado, agradeço por ter me escutado enquanto me sentia mal, por compartilhar cada momento importante comigo e pelas nossas trocas de conversa sobre a vida, sempre ajudando um ajudando ao outro a se conhecer. É alguém que quero levar para a vida. À Mayara, por ser uma das pessoas mais fofas que já conheci, obrigado por me fazer sentir acolhido e por ter me ajudado em momentos de dificuldade. Tenho uma admiração incondicional a você. A Cheila, por ser um exemplo de responsabilidade, maturidade e compromisso e por também ajudar a dividir o peso de

fazer uma pós-graduação longe de casa. Ao pessoal do laboratório do professor Alexandre; a Rebeca, a Ana Maria, ao Giovanni, ao Antônio e ao Pedro por compartilharem momentos e risadas comigo.

Ao Fernando e ao Lucas, por terem sido amigos e companheiros, por terem me ajudado e me abrigado aqui em São Paulo e terem feito eu me sentir em um lar pela primeira vez longe de casa.

Aos meus amigos, principalmente ao André e a Tainara, por terem me dado um espaço em sua casa, por terem sido praticamente uma família para mim, obrigado por todos os momentos vividos, por todas as brisas compartilhadas e por me ajudarem dando apoio aos meus momentos difíceis. Vocês são muito importantes para minha história durante esse trajeto e vou levá-los no meu coração. À Brena, por ser uma pessoa que conheci e nos primeiros instantes consegui achar uma conexão muito forte, uma pessoa maravilhosa que transmite luz e paz de espírito e que tenho orgulho de chamar como amiga. Amo você minha linda. Agradeço também a todas as pessoas que a família trance pode me conceder (que foram muitas!)

As minhas amigas de Goiás, a Kamila, por ter sido a minha melhor amiga na graduação e que mesmo estando distante não afeta em nada em nossa amizade, nunca deixou de ser meu porto seguro e de me acalmar em momentos de angústia e desespero. A Gelvana, por tudo o que fez por mim e por todos os momentos que já compartilhamos. São tantas coisas que precisaria de muito mais espaço nessa dissertação para agradecer. Vocês são a prova de amizade verdadeira que sempre busquei, que resiste ao tempo e espaço. Amor incondicional a vocês.

Agradeço a CAPES e a FAPESP (2017/11544-2) pelo apoio financeiro durante a realização do projeto.

“Greatness comes from humble beginnings; it comes from grunt work. It means you’re the least important person in the room – until you change that with results.” – Ryan Holiday

RESUMO

Giroto, T.P.F. **Estudo da fosforilação da Cwc24 como fator de splicing em *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. 56p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Splicing é o nome dado à reação de remoção de íntrons em pré-RNAs e ligação de éxons para formar mRNAs maduros. É catalisado pelo spliceossomo, um complexo altamente dinâmico formado por snRNPs, associações entre snRNAs e proteínas, facilitando o processo de excisão das sequências não codificadoras por meio de duas reações de transesterificação. O spliceossomo é montado *de novo* em cada pré-RNA que será processado. Para isso, a montagem é sequencial e coordenada em grande parte pelas interações proteicas, as quais são cuidadosamente reguladas, muitas vezes por modificações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, entre outras, que podem influenciar as funções das proteínas, e conseqüentemente, etapas durante o splicing. Uma proteína essencial em *Saccharomyces cerevisiae* que possui um papel fundamental no splicing é Cwc24, responsável por proteger o 5'SS (splice site) de um ataque nucleofílico prematuro durante a primeira reação de transesterificação, e que auxilia na estabilização da ligação do complexo U2 snRNP ao pré-RNA. Cwc24 interage com diversas proteínas da maquinaria de splicing. Através de ensaios de *high throughput* de proteômica, foram identificados sítios de fosforilação em Cwc24. Partindo desta informação, o objetivo deste trabalho foi o de caracterizar o papel da fosforilação de Cwc24 no controle de sua função durante o splicing em *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos confirmaram que Cwc24 é fosforilada nos seus dois resíduos de serinas identificados por análise proteômica. Entretanto, mutações nesses dois resíduos de serina não afetaram a viabilidade celular em condições normais e em condições de estresse de crescimento. Testes de estabilidade proteica mostraram que as substituições dos aminoácidos também não possuíam um efeito na estabilidade desta proteína. As mutações também não alteraram o processamento de pré-RNA. A fosforilação de Cwc24 está presente no contexto da interação com outros fatores de splicing, porém não é crucial para a interação, uma vez que o mutante fosfodeficiente é capaz de interagir com as mesmas proteínas da mesma forma que a proteína selvagem. Assim, os resultados obtidos nos permitiram concluir que a fosforilação da Cwc24 pode estar envolvida em algum outro processo celular que possa estar interligado ao splicing de pré-RNA, ou que seu efeito na função de Cwc24 seja muito sutil para ser percebido através da metodologia utilizada.

Palavras-chave: Cwc24, fosforilação, splicing, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Giroto, T.P.F. **Study of Cwc24 phosphorylation as a splicing factor in *Saccharomyces cerevisiae***. 56p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Splicing is the name given to the intron removal reaction in pre-RNAs and binding of exons to form mature mRNAs. It is catalyzed by the spliceosome, a highly dynamic complex formed by snRNPs, snRNAs and protein associations, facilitating the process of excision of noncoding sequences by two transesterification reactions. The spliceosome is assembled on each pré-RNA that will be processed. For this, the assembly is sequential and largely coordinated by protein interactions, which are carefully regulated, often by post-translational modifications, such as phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, among others, which may influence the functions of proteins, and consequently, steps during splicing. An essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* that plays a key role in splicing is Cwc24, which protects the 5'SS (splice site) from a premature nucleophilic attack during the first transesterification reaction, and which assists in stabilizing the binding of the U2 snRNP complex to pre-RNA. Cwc24 interacts with several proteins of the splicing machinery. Phosphorylation sites in Cwc24 sequence were identified in a high throughput proteomics assay. The objective of this work was to characterize the role of the Cwc24 phosphorylation in the control of its function during splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that Cwc24 is phosphorylated in its two serine residues identified by large scale proteomics assays. By creating mutants in these two serine residues, several aspects of the protein were studied. We have seen that mutations did not affect cell viability under normal conditions and under stress growth conditions. Protein stability was tested and we saw that amino acid substitutions also had no effect on the protein. Looking at their function in the context of splicing, we saw that the mutants did not change pre-RNA processing. Cwc24 phosphorylation is present in the context of interaction with other splicing factors, but is not crucial for interaction since the phosphodeficient mutant is capable of interacting with the same proteins as wild protein. Thus, we were able to conclude that Cwc24 phosphorylation could be involved in some other cellular process that may be linked to pre-RNA splicing, or that the methodology used was not sensitive enough to detect of the mutations on Cwc24 function.

Keywords: Cwc24, phosphorylation, splicing, *Saccharomyces cerevisiae*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1. A reação de splicing.....	10
1.2. A dinâmica da fosforilação e seu contexto em splicing	16
1.3. Cwc24 como fator de splicing	19
2. Objetivos	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Cepas de Escherichia coli	23
3.2. Meios de cultura e condições de crescimento	23
3.3. Cepas de Saccharomyces cerevisiae	23
3.4. Meios de cultura	24
3.5. Oligonucleotídeos e plasmídeos	25
3.6. Clonagem e Manipulação do DNA	27
3.6.1. PCR	27
3.6.2. Construção dos plasmídeos	27
3.7. Preparação de células competentes DH5 α	27
3.8. Transformação de bactérias com DNA plasmidial	28
3.9. Transformação de leveduras	28
3.10. Ensaio de viabilidade celular (diluição seriada)	28
3.11. Análise de proteínas	28
3.11.1. Lise celular com glass beads	28
3.11.2. Quantificação de proteína total	29
3.11.3. Ensaio de estabilidade de proteínas	29
3.11.4. Lise por hidróxido de sódio	30
3.12. Co-imunoprecipitação	30
3.13. Separação por SDS-PAGE	32
3.14. Detecção por Western Blotting	32
3.15. Análise de RNA	33
3.15.1. Extração de RNA total de leveduras	33
3.15.2. RT-qPCR.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Construção de mutantes “fosfodeficientes” e fosfomiméticos da Cwc24.....	34
4.2. Ensaio de fosforilação in vivo de Cwc24	35
4.3. Efeitos das mutações na viabilidade celular em condições de estresse	37
4.4. Avaliação dos efeitos das mutações sobre a estabilidade da proteína	40
4.5. O papel da fosforilação na interação de Cwc24 com outros fatores de splicing	42

4.6. Análise da função da Cwc24 e mutantes no processamento do pré-RNA	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. A reação de splicing

Os transcritos da maioria dos genes eucarióticos são sintetizados como mRNAs precursores (pré-mRNAs), que contêm íntrons não codificantes que são removidos no núcleo antes que o mRNA seja exportado para o citoplasma e traduzido em proteína. Os íntrons fornecem às células eucarióticas um grande potencial para expandir sua diversidade proteômica, permitindo que um único gene codifique várias isoformas de proteínas com atividades distintas (NILSEN; GRAVELEY, 2010). De fato, até 94% dos genes humanos sofrem splicing alternativo (WANG et al., 2008b). É importante ressaltar que as proporções relativas de isoformas distintas podem ser moduladas para regular a expressão de um gene (CHEN; MANLEY, 2009). Além de seu papel na diversificação da expressão gênica, o splicing também é importante para uma transcrição eficiente (FURGER et al., 2002), para a exportação de mRNA (VALENCIA; DIAS; REED, 2008), para a localização do RNA (HIR et al., 2001), para a estabilidade do transcrito e para uma tradução eficiente (MOORE; PROUDFOOT, 2009). Além disso, os íntrons estão envolvidos na biogênese de RNAs não codificantes (ncRNAs), incluindo microRNAs (PAWLICKI; STEITZ, 2010).

Os íntrons são removidos do pré-mRNA pelo spliceossomo, uma máquina incrivelmente dinâmica de ribonucleoproteínas de vários megadaltons (RNP), cujos componentes principais são altamente conservados nos eucariotos - desde leveduras até mamíferos (WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009). Nossa compreensão da composição e funcionamento desta máquina celular exclusiva é conhecida principalmente pelo trabalho em células HeLa e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O splicing do pré-mRNA ocorre por duas reações seguidas de transesterificação tipo S_N2 (SHARP, 1987). Na primeira etapa, denominada clivagem no 5' *splice site* (5'SS), a hidroxila-2' de uma adenosina conservada (no chamado ponto de ramificação ou *branchpoint* (BP)) atua como um nucleófilo que ataca um fosfato no 5'SS, gerando um 5'-éxon, com um terminal hidroxila-3' livre e um intermediário com forma de laço ramificado. Na segunda etapa, denominada ligação dos éxons, a hidroxila 3' livre do éxon 5' ataca um fosfato no 3' *splice site* (3'SS) no intermediário com o laço, formando o produto de mRNA maduro e removendo o íntron

do laço ramificado (Figura 1b). Essas reações, catalisadas pelo spliceossomo, são indistinguíveis das catalisadas pelos íntrons do grupo II auto-catalíticos (CECH, 1987). Como as reações do grupo II são necessariamente catalisadas pelo RNA, foi proposto há muito tempo que o spliceossomo catalisa a junção do pré-mRNA através de seus componentes de RNA (CECH, 1986, 1987), onde os sítios de reação dos substratos são definidos por sequências consenso (Figura 1a).

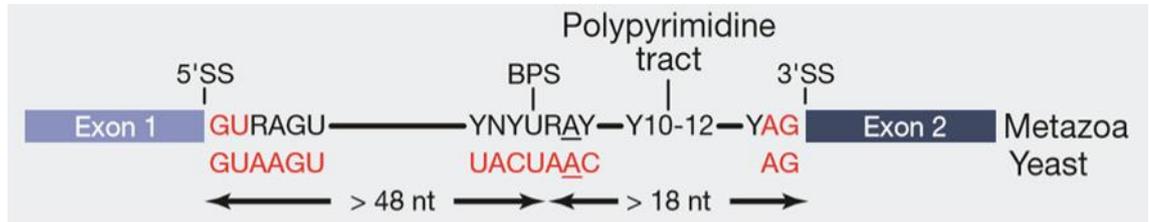
Diferentemente de outras máquinas ribonucleoproteicas, como os ribossomos, os spliceossomos não formam um complexo pré-montado. Em vez disso, seus componentes se reúnem a cada reação a partir de pequenos complexos nucleares de ribonucleoproteínas (snRNPs), cada uma consistindo em um pequeno RNA e proteínas associadas e vários outros fatores que se associam aos snRNPs durante a montagem (WILL; LÜHRMANN, 2011). O spliceossomo é composto pelos snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6 (TARN; STEITZ, 1996a, 1996b).

Dentre os fatores de ação trans, uma classe importante inclui as DExD / H-box ATPases (FAIRMAN-WILLIAMS; GUENTHER; JANKOWSKY, 2010), que mediam dinâmicas estruturais importantes durante o ciclo de splicing. Aproximadamente 80 das proteínas associadas aos complexos de mamíferos são conservadas desde a levedura (FABRIZIO et al., 2009), indicando que esses fatores funcionam no mecanismo mais básico de splicing. Na visão clássica da montagem do spliceossomo, o spliceossomo repete sua formação em cada um dos substratos individuais de pré-mRNA pela montagem em sequência e coordenada de snRNPs (WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009). Então, o spliceossomo é remodelado pela atividade de fatores de splicing durante os estágios catalíticos do splicing. Finalmente, após a formação do mRNA maduro, o spliceossomo se dissocia e recicla para um novo ciclo de splicing (Figura 2A).

Durante a montagem, os snRNAs reconhecem as sequências consenso no 5'SS e no BP. Na primeira etapa de montagem do spliceossomo, o U1 snRNP liga o pré-mRNA de maneira independente de ATP por meio de interações específicas de

pareamento de base entre a extremidade 5' do U1 snRNA e o 5'SS (BINDEREIF; GREEN, 1987; SILICIANO; GUTHRIE, 1988; ZHUANG; WEINER, 1986).

A.



B.

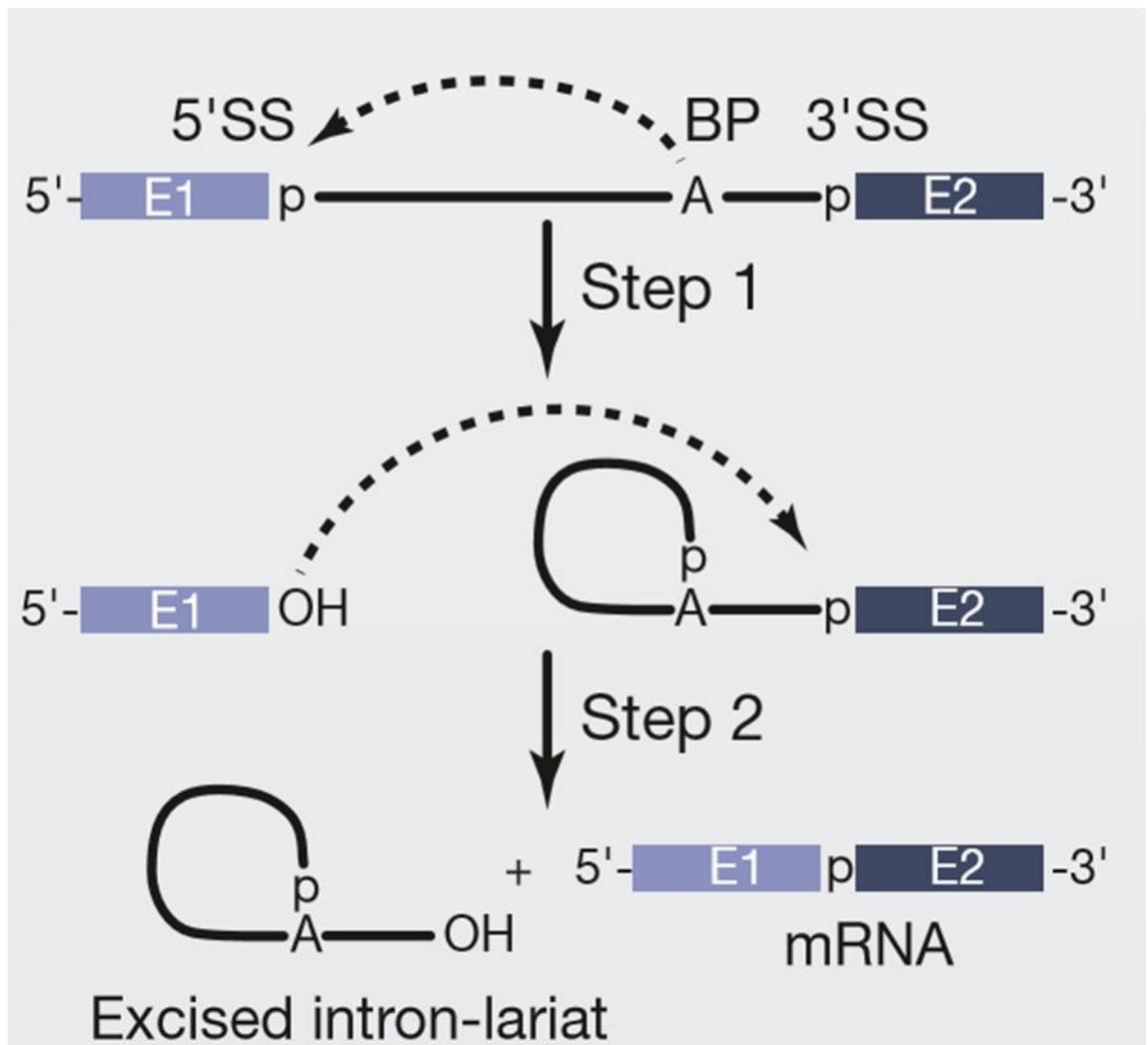


Figura 1. Mecanismos de catálise de splicing. A. Sequências conservadas do 5' splice site, branchpoint site e 3' splice site, tanto em metazoários quanto em levedura (Y=pirimidina; R= purina). B. Reação de splicing utilizando duas reações de transesterificação (WAHL; LÜHRMANN, 2015).

A hélice de RNA dupla fita (dsRNA) que se forma após o pareamento de bases entre uma o 5'SS e a extremidade 5' do U1 snRNA tem um comprimento máximo de 11 pares de bases (bp), pois o 12º nucleotídeo do U1 já está envolvido em um pareamento de bases interno relacionado a formação de sua própria estrutura secundária. Nem todos os pares de bases em diferentes posições 5'SS são igualmente importantes e sua contribuição para o splicing se correlaciona aproximadamente com a sua conservação. As posições do 5'SS mais conservadas estão nos dois primeiros nucleotídeos intrônicos (+1 e +2), que determinam o subtipo de 5'SS. O subtipo GU, com complementaridade Watson-Crick com A7 e C8 no U1, é responsável por 99% dos 5'SS (ROCA; KRAINER; EPERON, 2013).

Alguns íntrons não requerem o reconhecimento do 3'SS nesta fase, mas o reconhecimento do trato de polipirimidina é crucial e sobrepõe a importância do reconhecimento da sequência do BP (BERGLUND; ABOVICH; ROSBASH, 1998). A montagem do spliceossomo geralmente começa com a ligação do U1 snRNP ao 5'SS para formar o complexo E. Além do U1, o complexo E também possui uma quantidade de outros fatores de splicing associados em outras posições do transcrito, como no sítio de ramificação do íntron (em levedura essa associação é feita pela BBP/Mud2) (LARSON; HOSKINS, 2017).

O complexo E pode incluir um U2 snRNP fracamente associado (DAS; ZHOU; REED, 2000). No entanto, a forte associação do U2 snRNP com o pré-mRNA requer a hidrólise de ATP pela DExD / H-box ATPase Prp5, que em leveduras demonstrou remodelar o U2 snRNA, incluindo o desenrolamento de um loop que utiliza as sequências do loop para parear com a sequência do BP, uma vez que é necessário desenrolar a estrutura do snRNA para estabilizar a interação com a sequência do BP (PERRIMAN; JR., 2010). A associação do U2 snRNP com a sequência BP leva à formação do complexo A. (LIM; HERTEL, 2004).

Após a formação do complexo A, os snRNPs U4, U5 e U6 do spliceossomo, são recrutados no complexo A como um tri-snRNP pré-montado no qual os snRNAs U4 e U6, são parcialmente emparelhados por suas bases. O recrutamento do tri-snRNP leva à formação do complexo B, que ainda não está ativo para a catálise e ainda requer uma remodelação dramática (MAKAROV et al., 2002). No spliceossomo,

o U1 snRNP é dissociado do substrato, permitindo que U6 substitua U1 no 5'SS (Figura 2B).

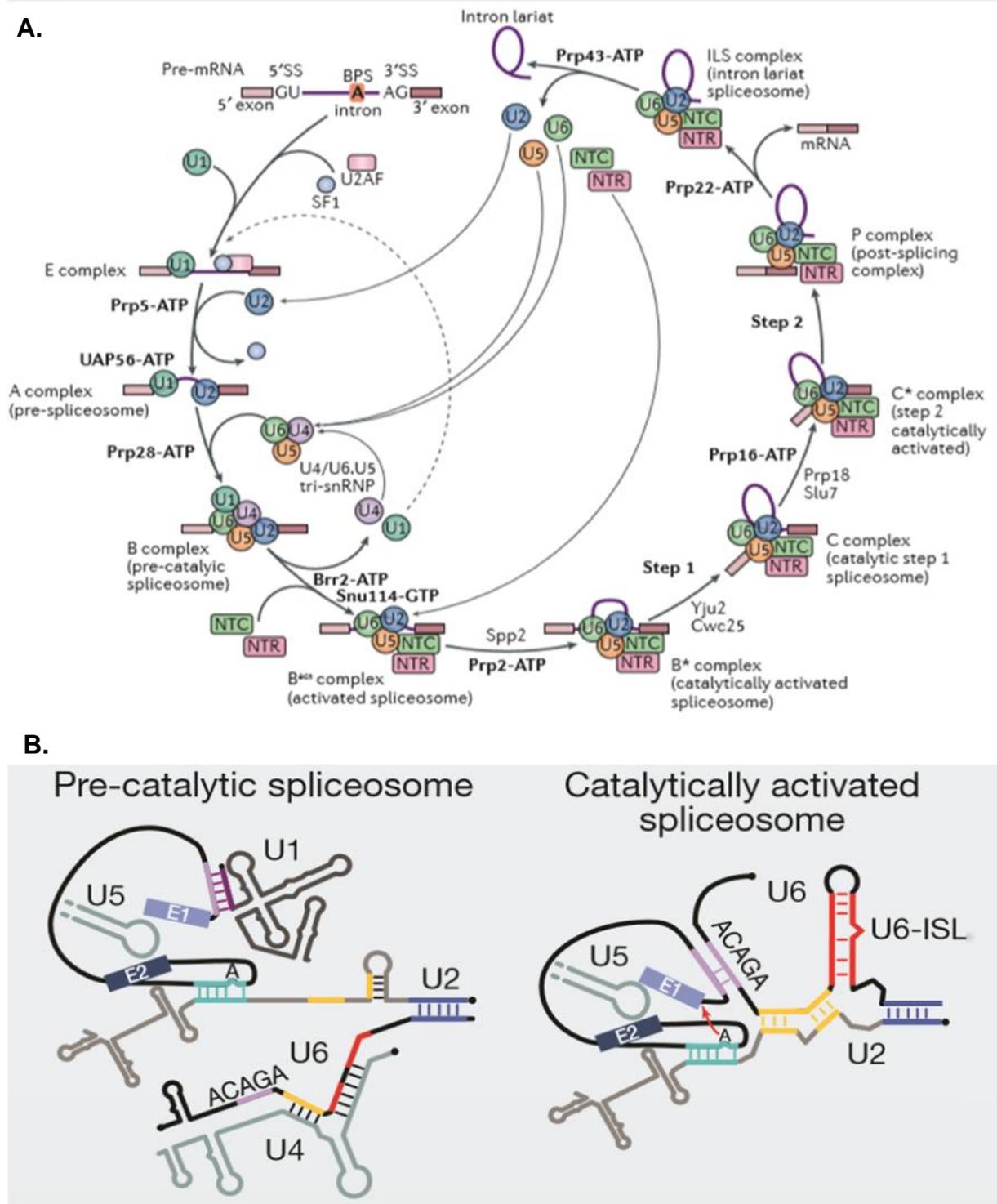


Figura 2. Dinâmica da montagem do spliceossomo. **A.** Montagem sequencial do spliceossomo durante uma reação do ciclo de splicing. (SHI, 2017). **B.** Rearranjo dos snRNAs entre alterações estruturais entre complexos, com ênfase na substituição do pareamento U1-5'SS pelo U6 snRNA (WAHL; LÜHRMANN, 2015).

Em seguida, o U4 snRNP é deslocado do U6, permitindo a formação das principais conformações catalíticas. Essa transição é acompanhada pela associação de um grande complexo de outros fatores de splicing, o Nineteen Complex (NTC) (CHAN et al., 2003), produzindo o complexo spliceossômico B^{act}. Posteriormente, os componentes proteicos do U2 snRNP são desestabilizados, potencialmente revelando o substrato para os sítios de reação, produzindo o complexo B*, que catalisa a clivagem do 5'SS (BESSONOV et al., 2010). Essa primeira reação de transesterificação resulta na remodelação dos componentes de RNA e proteína do complexo B*, levando à formação do complexo C. Nesta fase, os componentes do NTC e do U5 snRNP compõem um núcleo estável ao cerne do spliceossomo (BESSONOV et al., 2010). O complexo C é remodelado ainda mais para permitir o reposicionamento e a justaposição do 5'SS e do 3'SS no centro catalítico (KONARSKA; VILARDELL; QUERY, 2006). O spliceossomo então catalisa a ligação do éxon, resultando na liberação do mRNA como um mRNP, contendo fatores que marcam especificamente a localização dos *splice sites* (LE HIR et al., 2000). Após a liberação do produto mRNA, o spliceossomo libera o íntron excisado e desmonta os snRNPs U2, U6 e U5, deixando-os livres (MAKAROV et al., 2002), que são então reciclados para reformar o tri-snRNP para uma nova rodada de splicing.

A natureza gradual da via de montagem foi descrita pela primeira vez *in vitro*, em leveduras e mamíferos. De fato, a maioria dos componentes proteicos dos intermediários spliceossômicos é conservada de levedura até humanos (FABRIZIO et al., 2009), justificando o estudo dos spliceossomos de levedura como um sistema modelo para os spliceossomos humanos. Estudos recentes *in vivo* apoiam este modelo para montagem de spliceossomos.

A análise da montagem do spliceossomo *in vivo* por CHIP em levedura (GÖRNEMANN et al., 2005; TARDIFF; LACADIE; ROSBASH, 2006) revela um processo gradual em que U1 se liga primeiro, U2 em segundo e U5 snRNP (presumivelmente no contexto da tri-snRNP) se liga após U2, apoiando novamente o modelo gradual de montagem.

Estudos de spliceossomo montados *in vitro* reforçaram essa visão, sugerindo, além disso, que as etapas individuais de montagem são reversíveis (HOSKINS et al., 2011); essa reversibilidade pode ser importante durante o pareamento inicial dos *splice sites*. No entanto, outras observações levaram a um modelo de montagem

alternativo, no qual os snRNPs se associam antes da ligação do substrato. Essas observações incluem o isolamento de um tetra-snRNP de U2.U4/U6.U5 em mamíferos (KONARSKA; SHARP, 1988) e leveduras (STEVENS et al., 2002) e de um penta-snRNP de U1.U2.U4/U6.U5 a partir de leveduras (STEVENS et al., 2002).

1.2. A dinâmica da fosforilação e seu contexto em splicing

A fosforilação reversível de proteínas é usada como mecanismo regulador em quase todos os processos celulares. Eventos dinâmicos de fosforilação são alcançados através da interação de proteínas quinases e fosfatases que promovem a adição e remoção de fosfato, respectivamente (Figura 3A). A fosforilação de proteínas nos complexos é de particular importância, pois altera as interações físicas (interrompendo algumas interações iônicas e facilitando outras), a estabilidade das proteínas e as atividades enzimáticas (COHEN, 2000).

A fosforilação regula muitas das interações dinâmicas que ocorrem durante a montagem do spliceossomo, a catálise da junção e a desmontagem do spliceossomo. Trabalhos iniciais apontaram para um papel dos ciclos de fosforilação e desfosforilação de proteínas, demonstrando que o splicing não pode prosseguir *in vitro* na presença de fosfatases ou inibidores de fosfatases (MERMOUD; COHEN; LAMOND, 1994).

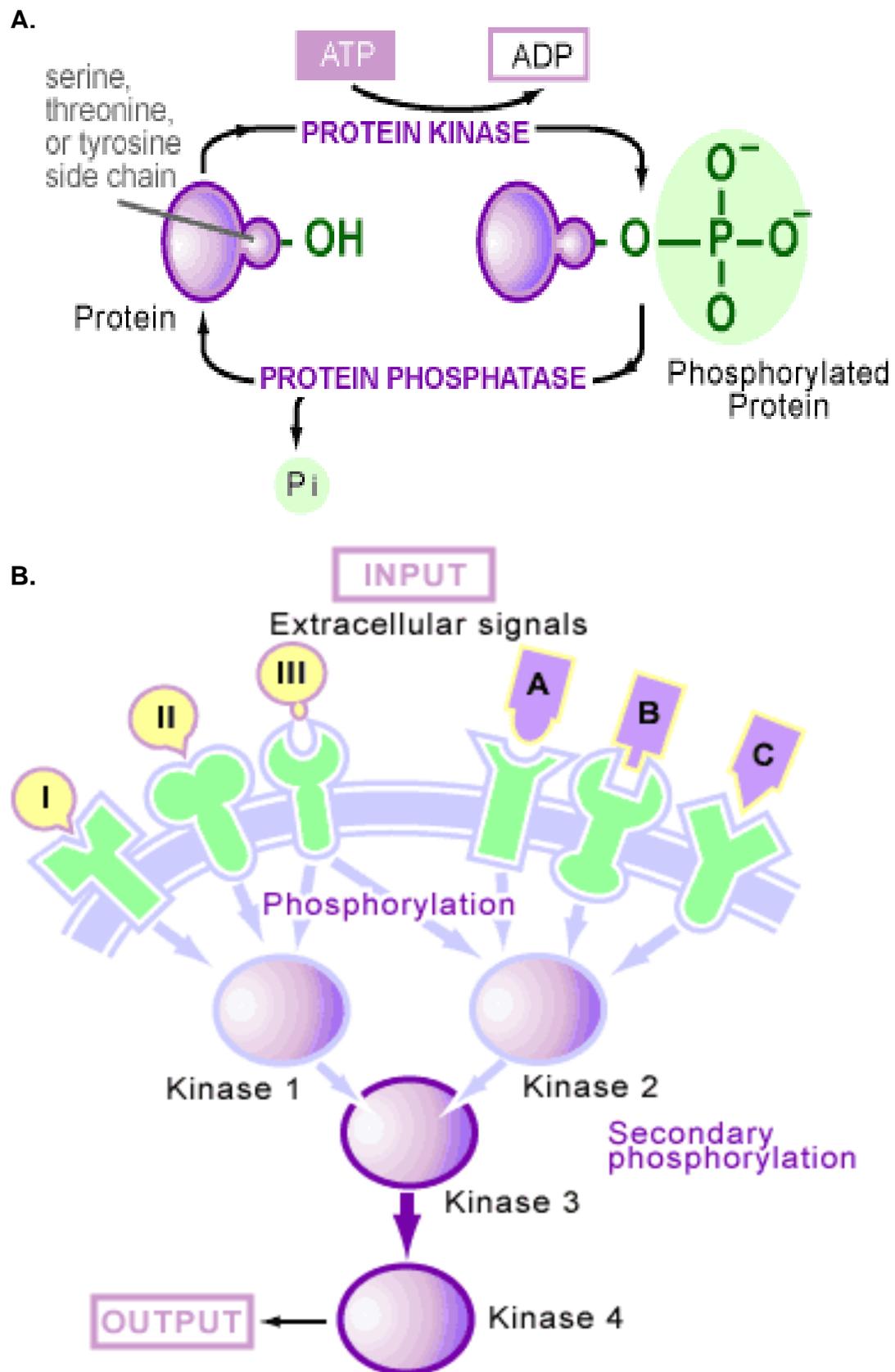


Figura 3. Fosforilação de proteínas. A. Reação de transferência de remoção de um grupo fosfato a uma cadeia polipeptídica. B. Cascata de fosforilação através de sinalização externa (SECKO, 2003).

De fato, existem fatores de splicing representando cada etapa da via de splicing que são fosforilados, sugerindo que a fosforilação e a desfosforilação são importantes ao longo do ciclo de splicing. Embora a fosforilação certamente tenha um papel na orientação da dinâmica do spliceossomo, apenas alguns dos mais de 100 fatores de splicing não-SR foram relatados como substratos da fosforilação e menos ainda foram descritos ao nível molecular.

A análise de dados proteômicos leva a previsões sobre como a fosforilação afeta etapas específicas do splicing, incluindo a formação do *commitment complex* e a formação de pré-spliceossomos. Por exemplo, durante a formação do *commitment complex*, a proteína de ligação do ponto de ramificação da levedura (BBP) e seu parceiro Mud2 (SF1 e U2AF65, respectivamente, em humanos) ligam a região do ponto de ramificação do pré-mRNA e formam uma interação de ponte com o U1 snRNP ligado ao 5'SS (FLECKNER et al., 1997; KISTLER; GUTHRIE, 2001). A formação posterior do pré-spliceossomo requer a troca do snRNP de U2 por BBP/SF1 e Mud2/U2AF65 no ponto de ramificação (KISTLER; GUTHRIE, 2001). Análises em larga escala revelaram que cada um desses fatores é fosforilado, um resultado que levanta a possibilidade de que o papel desses fatores na formação do *commitment complex* e pré-spliceossomos possa ser regulado por sua modificação (ALBUQUERQUE et al., 2008; SMOLKA et al., 2007). De fato, as interações genéticas entre Mud2 e a fosfatase PP1 sugerem que o ciclo de fosforilação e desfosforilação de uma ou de todas essas proteínas possa desempenhar um papel nesta etapa (WILMES et al., 2008).

A fosforilação regulada dos fatores de splicing também pode ser um mecanismo pelo qual as atividades de proteínas específicas são reguladas em resposta às condições celulares. Por exemplo, em dois estudos de larga escala que examinam eventos de fosforilação específicos do ciclo celular, Cus2, um fator do U2 snRNP de levedura importante para facilitar o dobramento adequado de U2 snRNA, (PERRIMAN; ARES, 2007) foi fosforilado, uma descoberta que aumenta a possibilidade de que Cus2 tenha papel no splicing que seja dependente do ciclo celular. Mutações em Cus2 que suprimem o efeito deletério causado pelo mau dobramento do U2 snRNA estão próximas de um possível sítio de reconhecimento por CKII dentro do domínio ácido da proteína. Esse domínio também é amplamente fosforilado no homólogo de mamíferos de Cus2, Tat-SF1, um fato que sugere ainda

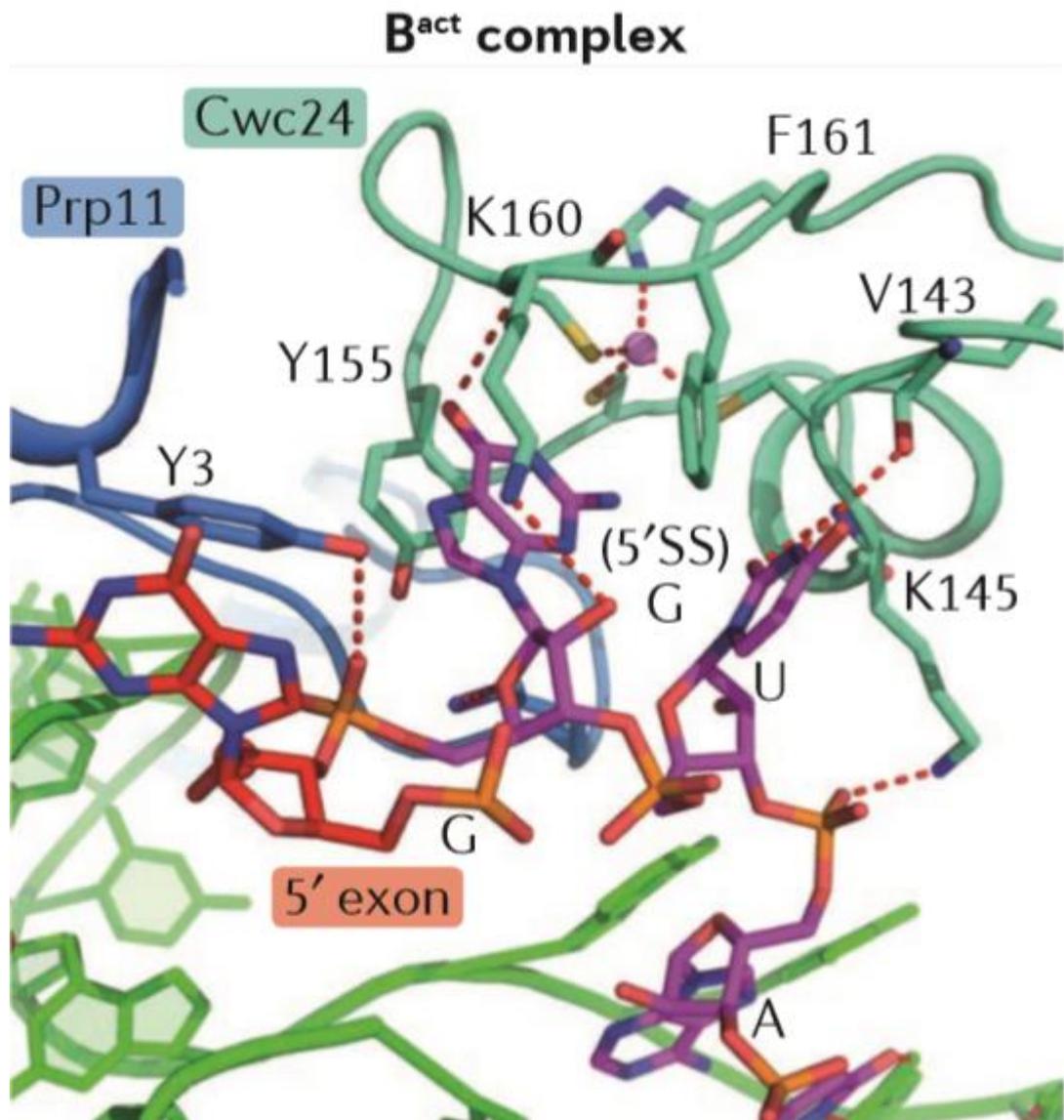
que a fosforilação dentro desse domínio é importante para a atividade de Cus2 (DEPHOURE et al., 1974; LI et al., 2007; MATSUOKA et al., 2007; OLSEN et al., 2006; WANG et al., 2008a; YAN et al., 1998). Além disso, uma vez que estudos recentes ilustram que, sob diferentes condições ambientais, o splicing de um determinado subconjunto de genes requer a atividade de diferentes fatores de splicing, (PLEISS et al., 2007) é provável que as condições envolvidas na progressão no ciclo celular também exijam atividades específicas dos fatores de splicing (modulados por modificações pós-traducionais) para mediar as respostas apropriadas.

Estes estudos destacam duas questões pendentes sobre o papel da fosforilação em splicing; ou seja, como a fosforilação afeta as atividades proteicas, tais como a ligação a RNA e as interações proteína-proteína? E quais mecanismos o spliceossomo emprega para garantir que a fosforilação da proteína ocorra no momento certo? Claramente, novas abordagens precisarão ser empregadas para determinar os efeitos globais da fosforilação no splicing.

1.3. Cwc24 como fator de splicing

A proteína Cwc24 foi inicialmente identificada em um estudo como um fator associado ao *Nineteen Complex* (NTC), Cef1 (OHI et al., 2002). O NTC é um grande complexo proteico consistindo de oito proteínas centrais e aproximadamente dezenove proteínas associadas em *Saccharomyces cerevisiae*, possuindo uma função essencial para a reação de splicing de regulação da formação e progressão das mudanças conformacionais do spliceossomo (CHANARAT; STRÄSSE, 2013). O NTC se associa ao spliceossomo juntamente com o tri-snRNP U4/U6.U5 antes ou durante a liberação do U4 e permanece associado com o spliceossomo durante ambas as etapas do splicing, sendo essencial também para a interação estável entre os snRNPs U5 e U6 após a ativação catalítica do spliceossomo (CHANARAT; STRÄSSE, 2013).

A deleção de Cwc24 afeta fortemente o splicing de transcritos primários contendo sequências não-consensuais no *branch point*, como no caso do splicing do pré-snoRNA U3, (GOLDFEDER; OLIVEIRA, 2008), mas foi demonstrado mais tarde que Cwc24 é um fator geral de splicing, essencial para o splicing tanto in vivo quanto in vitro (COLTRI; OLIVEIRA, 2012)



4. Estruturas da Cwc24 em *Saccharomyces cerevisiae*. A. Desenho esquemático da sequência primária da proteína, evidenciando seus domínios. B. Modelo estrutural da Cwc24 participando na montagem do complexo B^{act} (SHI, 2017).

Cwc24 é uma proteína de 30 kDa que contém um domínio *zinc finger* e um *RING domain* (WU; CHUNG; CHENG, 2016) (Figura 4A). Este *zinc finger* se liga diretamente às bases GU no 5' SS, sendo que o nucleotídeo de guanina fica entre os resíduos de Tyr155 e Phe161 de Cwc24 durante a interação (Figura 4B). Porém, para que ocorra o primeiro ataque nucleofílico da adenosina do *branch point* na guanosina do 5' SS, Cwc24 precisa se dissociar do complexo (WAN et al., 2016).

Cwc24 se dissocia do spliceossomo durante ou após a sua ativação catalítica, porém ela é necessária para a primeira etapa da reação de splicing *in vitro*. A proteína é necessária antes da ação de Prp2, entretanto não para a primeira etapa catalítica em si. Deste modo, a função de Cwc24 deve ser auxiliar na montagem ou na maturação do spliceossomo ativo. Por isso, considera-se Cwc24 como um fator para a montagem do complexo B^{act}, que provavelmente está envolvido na geração da estrutura ou conformação correta do mesmo complexo (OHRT et al., 2012). Além de Cef1, Cwc24 interage com outras proteínas, como Nop17, proteína associada à montagem de snoRNPs box C/D, como pré-U3 snoRNP; Prp19, também constituinte do NTC; Brr2, importante para o posicionamento e estabilização de Cwc24 no centro catalítico do spliceossomo; Prp2, uma RNA helicase dependente de ATP; e Prp8, cuja interação auxilia Cwc24 a se estabilizar no spliceossomo e a Snu114, proteína importante para a ativação do spliceossomo (COLTRI; OLIVEIRA, 2012; GOLDFEDER; OLIVEIRA, 2008; WU; CHUNG; CHENG, 2016).

É importante destacar a interação da Cwc24 com outros fatores de splicing, pois estes fatores estão envolvidos em etapas críticas do remodelamento do spliceossomo e serão estudadas neste trabalho, como por exemplo, a Brr2 é uma grande (2163 resíduos em levedura) proteína do tipo DEXD / H-box e um componente do U5 snRNP, tri-snRNP e o spliceossomo. É responsável por desemparelhar o U4 / U6, uma etapa crucial na ativação do spliceossomo. Brr2 tem um papel suplementar na desmontagem do spliceossomo, possivelmente desenrolando U2 / U6. Mutações em Brr2 afetam potencialmente o desemparelhamento de U4 / U6 ou o reconhecimento de 5'ss (ZHANG et al., 2015). A Prp8 funciona como uma “plataforma” que media a montagem ordenada das proteínas do spliceossomo e dos snRNAs. Ela é necessária para a associação da Brr2 com o U5 snRNP e a montagem seguinte do complexo U4 / U6-U5 tri-snRNP. A Prp8 posiciona os snRNAs U2, U5 e U6 nos *splice sites* do pré-mRNA, de modo que o *splicing* possa ocorrer. Ela interage com os 5' e 3'

splice sites, bem como com a região de ramificação (SIATECKA; REYES; KONARSKA, 1999). A Snu114 é um componente principal do U5 snRNP que está presente no spliceossomo durante todo o ciclo de *splicing*. Snu114 é uma proteína de ligação ao GTP que desempenha um papel fundamental na ativação do spliceossomo, controlando a ação da Brr2 (GAUTAM; BEGGS, 2019).

Uma das perguntas que imediatamente emergem é de quais são os mecanismos pelos quais Cwc24 é recrutada e liberada do complexo B^{act} antes da primeira reação de transesterificação. Foi mostrado em estudos de *high throughput* e fosfoproteomas de *S. cerevisiae*, que Cwc24 é fosforilada nas posições das Ser33 e Ser105, localizadas em regiões consenso de fosforilação por quinases específicas, como a caseína quinase II (CK2) e a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) (PTACEK et al., 2005). Isso sugere que a fosforilação possa influenciar a afinidade de Cwc24 pelo do complexo B^{act}, assim como por outros fatores de *splicing*.

2. Objetivos

Como objetivo geral, o presente projeto visou a caracterização do papel molecular de Cwc24 como fator geral de splicing, analisando como as modificações por fosforilação regulam a função desta proteína dentro do spliceossomo, assim como também sua interação com outros componentes do complexo.

2.1. Objetivos específicos

1. Confirmar a fosforilação de Cwc24;
2. Obtenção de mutantes pontuais de Cwc24 não fosforilados e mutantes fosfomiméticos
3. Analisar o papel da fosforilação de Cwc24 na sua interação com outros fatores de splicing.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas de *Escherichia coli*

As cepas de *E. coli* utilizadas no presente trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *E. coli* utilizadas no presente estudo

Cepa	Genótipo	Referência
DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ	Invitrogen

3.2. Meios de cultura e condições de crescimento

Os meios de cultura utilizados para *E. coli* são detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Meios de cultura de *E. coli* e concentração de suplementos

Meio	Composição
LB	0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl, 2% agar
TYM	0,5% extrato de levedura, 2% triptona, 0,6% NaCl, 0,25% MgSO ₄
Suplementos	
Ampicilina	50 g/mL

3.3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas de *S. cerevisiae* utilizadas no presente trabalho estão listadas na tabela 3.

Tabela 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Nome	Genótipo	Referências
Δ cwc24/ YCp33 GAL1-CWC24	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; LYS2; ura3 Δ 0; CWC24::kanMX4	(GOLDFEDER; OLIVEIRA, 2008)
Brr2-TAP	BJ2168 (MATa, leu2, pep4-3, prB1-1122, prC1-407, trp1, ura3- 52)	C. Guthrie Lab

Prp8-TAP	BJ2168 (MATa, leu2, pep4-3, prB1-1122, prC1-407, trp1, ura3- 52)	C. Guthrie Lab
Snu114-TAP	BJ2168 (MATa, leu2, pep4-3, prB1-1122, prC1-407, trp1, ura3- 52)	C. Guthrie Lab

3.4. Meios de cultura

As cepas de levedura foram cultivadas nos meios de cultura descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Composição dos meios de cultura e concentração de suplementos

Meios	Composições
YPD/YPGal (meio rico)	1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose/ galactose; 2% ágar
YNB Glicose/ Galactose (meio mínimo)	0,7% YNB (yeast nitrogen base); 2% glicose/ galactose; 2% ágar; suplementado com bases nitrogenadas e aminoácidos necessários.
YNB -glicose	0,7% YNB (yeast nitrogen base); 2% ágar; suplementado com bases nitrogenadas e aminoácidos necessários.
Suplementos	
Geneticina	200 µg/mL
Adenina	20 µg/mL
Uracila	20 µg/mL
Arginina	20 µg/mL
Histidina	20 µg/mL
Metionina	20 µg/mL
Triptofano	20 µg/mL
Isoleucina	30 µg/mL
Leucina	30 µg/mL
Lisina	30 µg/mL

Tirosina	30 µg/mL
Fenilalanina	50 µg/mL
Aspartato	100 µg/mL
Glutamato	100 µg/mL
Valina	150 µg/mL
Treonina	200 µg/mL
Serina	400µg/mL
3-amino-1,2,4 triazol (3-AT)	100mM
Rapamicina	200nM

3.5. Oligonucleotídeos e plasmídeos

A sequência dos oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 5 e os plasmídeos utilizados se encontram na Tabela 6.

Tabela 5. Sequência de oligonucleotídeos utilizados

Oligo	Sequência	Referência
CWC24BamFor	5'-GCGGATCCATGTTTCAGAAAGAGATTAGTGAAC -3'	Este estudo
CWC24NcoRev	5'- ATGCCATGGATTTTCCTTTTATTTAGCATCTTCTGTAAG -3'	Este estudo
CWC24SalRev	5'- CGCGTCTGACTCAACTTTTCCTTTTATTTAGCATCTTC-3'	Este estudo
CWC24S33AFor	5'- TAGTGGCCGCCGATGAAGAAAAG-3'	Este estudo
CWC24S33ARev	5'- CTTTCATCGGCGGCCACTAGTTTC-3'	Este estudo
CWC24S33DFor	5'- TAGTGGCCGACGATGAAGAAAAG-3'	Este estudo
CWC24S33DRev	5'- CTTTCATCGTCTCGGCCACTAGTTTC-3'	Este estudo
CWC24S105AFor	5'- GCGACCTGCTGATGACAATGAGCTG-3'	Este estudo
CWC24S105ARev	5'- TGTCATCAGCAGGTCGCCTCTTC-3'	Este estudo
CWC24S105DFor	5'- GCGACCTGATGATGACAATGAGCTG-3'	Este estudo
CWC24S105DRev	5'- TGTCATCATCAGGTCGCCTCTTC-3'	Este estudo
ZnFC144AF	5'- GATTTTCAGCCCGACGTTGCCAAAGATTACAAACAGGG-3'	Este estudo
ZnFC144AR	5'- CCCTGTTTGTAATCTTTGGCAACGTCGGGCTGAAAATC-3'	Este estudo

U3for132	5'- TCAACCATTGCAGCAGCTTT - 3'	(COLTRI; OLIVEIRA, 2012)
EJ snR17F	5'- GACGTACTTCATAGGATCATTCTA -3'	(COLTRI; OLIVEIRA, 2012)
ExU3 2.1	5'- TCTATAGGAATCGTCACTCTTTGACTCT-3'	(COLTRI; OLIVEIRA, 2012)
Ex2snR17R	5'- GACCAAGCTAATTTAGATTCAATTTCCG -3'	(COLTRI; OLIVEIRA, 2012)
5SFor	5'- GGTTGCGGCCATATCTACCA-3'	COLTRI; OLIVEIRA, 2012
5SRev	5'- GCAGCACCTGAGTTTCGCGT-3'	COLTRI; OLIVEIRA, 2012)

Tabela 6. Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeo	Características	Referências
pGEMT	lacZ, Amp ^R	Promega
pMET-TAP	MET17, TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Gonzales et al, 2005
pMET-CWC24-TAP	MET17-CWC24-TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Perona and Oliveira, dados não publicados
pMET-cwc24 ^{S33A} -TAP	MET17-cwc24 ^{S33A} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S33D} -TAP	MET17-cwc24 ^{S33D} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S105A} -TAP	MET17-cwc24 ^{S105A} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S105D} -TAP	MET17-cwc24 ^{S105D} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S33A/S105A} -TAP	MET17-cwc24 ^{S33A/S105A} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S33A/S105D} -TAP	MET17-cwc24 ^{S33A/S105D} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S33D/S105A} -TAP	MET17-cwc24 ^{S33D/S105A} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-cwc24 ^{S33D/S105D} -TAP	MET17-cwc24 ^{S33D/S105D} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo

pMET-cwc24 ^{C144A/T150A} -TAP	MET17- cwc24 ^{C144A/T150A} -TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
--	--	-------------

3.6. Clonagem e Manipulação do DNA

3.6.1. PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando 100ng de DNA genômico de *S. cerevisiae*. Cada reação continha 2mM MgSO₄, 200µM de dNTPs (desoxirribonucleotídeos), 20 pmol de primers forward e reverse específico para cada reação e 1U/reação de High Fidelity Taq Polimerase em uma reação de volume final de 100µL. As condições de amplificação variam de acordo com as sequências de primers utilizados. Os produtos da PCR foram resolvidos por eletroforese em um gel de agarose 1% e purificados do gel utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QUIAGEN).

3.6.2. Construção dos plasmídeos.

Para a criação dos mutantes nas serinas, foi realizada mutagênese sítio dirigida por *overlap extension*. O *template* DNA foi amplificando utilizando os oligos CWC24BamFor e CWC24NcoRev, que contém os sítios de restrição para as enzimas BamHI e NcoI e com os primers mutagênicos para a mutação desejada. A reação possuía as seguintes características: desnaturação a 94°C por 5min, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para o mutante na cisteína, as condições foram diferentes: desnaturação a 94°C por 5min, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto; extensão final a 68°C por 3 minutos.

3.7. Preparação de células competentes DH5α

A partir de um pré-inóculo proveniente de colônia isolada de *E. coli*, cepa DH5α, foi realizada uma diluição 1:100 em meio TYM e incubado a 37°C até OD₆₀₀= 0,6. As células foram centrifugadas 10 minutos a 10.000g em centrífuga refrigerada, e o pellet celular foi ressuspensionado em 100mL de tampão TBF1 (30mM KCH₃COO, 50mM

MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% glicerol) gelado por cada 250mL de cultura. Após nova centrifugação, o pellet celular foi ressuscitado em 10mL de tampão TBF2 (10mM MOPS pH=7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% glicerol) gelado por cada 100mL de cultura inicial. A suspensão celular foi dividida em alíquotas e armazenadas a -80°C.

3.8. Transformação de bactérias com DNA plasmidial

Cem microlitros (100µL) de células competentes foram incubadas com 50-100ng de DNA plasmidial e 80µL de Buffer de Transformação (100mM KCl, 30mM CaCl₂, 50mM MgCl₂, 1,5% PEG6000). Após incubação de 30 minutos em gelo e 10 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 1mL de meio LB e incubado 60 minutos a 37°C antes de plaquear em meio seletivo. As placas foram incubadas por 16 horas em estufa 37°C.

3.9. Transformação de leveduras

Duzentos microlitros (200µl) de células de um pré-inóculo com OD₆₀₀~1,0 foram centrifugados a 6000 rpm por 2min, lavadas com 200µl de TE (10mM Tris-HCl pH=8,0; 1mM EDTA pH=8,0), centrifugadas e ressuscitadas na solução de transformação (0,2M LiOAc/ 40% PEG/ 100mM DTT) com 2 a 5µg de DNA plasmidial. As células foram incubadas a 42°C por 30 min e plaqueadas em meio seletivo até o aparecimento de colônias.

3.10. Ensaios de viabilidade celular (diluição seriada)

A cepa $\Delta cwc24/YCp33-GAL::CWC24$ foi transformada com os plasmídeos pMET-TAP contendo as cópias selvagens e mutantes de CWC24, plaqueados em meio mínimo seletivo, e depois repicados em placas de meio mínimo com ácido 5-fluorotico (5-FOA), o qual faz a seleção negativa do plasmídeo contendo a marca URA3 (YCp33). Uma colônia isolada da repicagem foi inoculada em meio com glicose suplementada com aminoácidos e monitorada até a densidade óptica (OD₆₀₀) das células atingirem a fase logarítmica de crescimento (OD₆₀₀ = 0,3 – 0,8). A partir disso, as células foram diluídas em uma alíquota inicial para uma OD₆₀₀ = 0,1 e subseqüentes alíquotas foram feitas em um fator seriado de diluição de 10 vezes. Três microlitros (3µl) da alíquota inicial e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de

interesse. As placas foram incubadas a 30°C e o crescimento das células foi monitorado.

3.11. Análise de proteínas

3.11.1. Lise celular com glass beads

Uma colônia isolada das cepas $\Delta cwc24/pMET-CWC24-TAP$; $\Delta cwc24/pMET-cwc24^{S33A}-TAP$; $\Delta cwc24/pMET-cwc24^{S105A}-TAP$ e $\Delta cwc24/pMET-cwc24^{S33A/S105A}-TAP$ (cepas após serem tratadas com 5-FOA), foram inoculadas em meio mínimo seletivo. O pré-inóculo foi ressuscitado em mais 50mL do mesmo meio. Quando as células atingiram uma $OD_{600} \sim 1.0$, foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10min e lavadas com água gelada 2 vezes. Em seguida, foram ressuscitadas em 200 μ l de tampão (200mM Tris pH 8,0; 150mM CH_3CO_2K ; 5mM $Mg(CH_3COO)_2$; 1mM DTT com inibidores de proteases (Roche) e fosfatases (Thermo). Adicionou aproximadamente 0,2g de glass beads e as células foram lisadas 3 vezes por agitação no vórtex (1 minuto de agitação no vórtex, seguido de 1 minuto de incubação no gelo). Houve a adição de mais 200 μ l de tampão, centrifugou por 5min a 12000rpm e recuperou o sobrenadante (extrato total proteico).

3.11.2. Quantificação de proteína total

Para a quantificação de proteína total em extratos proteicos foi empregado o método do ácido bicinconinico (BCA)/ sulfato de cobre ($CuSO_4$), descrito por (SMITH et al., 1985), onde 1mL da solução de BCA/ $CuSO_4$ é adicionado a 100 μ l de amostra (extrato total equilibrado com tampão de lise até 5 μ l mais 95 μ l água autoclavada) e incubada a 37°C por 30min. A leitura da absorbância foi feita em 562nm. Para quantificação de proteína total, foi comparada a uma curva padrão feita com BSA (*bovine serum albumine*).

3.11.3. Ensaio de estabilidade de proteínas

As cepas transformantes foram inoculadas em YNB Glicose suplementados necessários, incubando a 30°C overnight. O pré-inóculo foi transferido para 25mL do mesmo meio e incubado na mesma temperatura até atingir $OD_{F=}$ 1,0.

A cultura foi coletada por centrifugação a 3000 rpm por 10min e o pellet formado foi ressuscitado em 8mL do mesmo meio, onde 1mL foi imediatamente coletada

(tempo 0hr), para posteriormente adicionar cicloheximida em uma concentração final de 100µg/mL.

Alíquotas das culturas de células foram coletadas em intervalos de 1,5hrs em um período total de 9hrs. As células foram lisadas por tratamento de hidróxido de sódio e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por Western Blotting.

3.11.4. Lise por hidróxido de sódio

O pellet coletado por centrifugação foi ressuspensionado em 200µl de água. Adicionou 200µl de 0,2M NaOH. A amostra foi homogeneizada e incubada a 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou a amostra por 5 minutos a 12000 rpm. Depois de descartar o sobrenadante, ressuspendeu as células em 20µl de 4x tampão de amostra (50mM Tris-HCl pH 6.8; 200mM β-mercaptoetanol; 2% SDS 0.1% azul de bromofenol; 10% glicerol) e aquecido a 95°C por 5 minutos.

3.12. Co-imunoprecipitação

As cepas derivadas da BJ foram transformadas com pUG36-GFP-CWC24 WT e pUG36-GFP-cwc24^{S33A/S105A}. A partir de uma cultura de 1L em meio YNB glicose suplementado com aminoácidos nas concentrações correspondentes, as células foram coletadas em uma OD₆₀₀ ~1.0, realizando lavagens com água gelada e ressuspensionadas em 1/4 do volume total em tampão contendo 200mM Tris pH 8,0; 150mM CH₃CO₂K; 5mM Mg(CH₃COO)₂; 1mM DTT com inibidores de protease (Roche) e fosfatase (Thermo).

As células foram congeladas em forma de gota em nitrogênio líquido para posterior lise mecânica utilizando esferas de aço no equipamento Ball Mill MM200 (Rescht). As células foram submetidas a seis ciclos de seis minutos com 20Hz cada. O lisado foi descongelado no gelo e centrifugado a 19000rpm por 30 min para separar o sobrenadante do *debris* celular. O sobrenadante (extrato proteico total) foi coletado e quantificado pelo o método do ácido bicinconínico (BCA)/ Sulfato de cobre (CuSO₄).

O extrato total foi incubado com uma resina de IgG-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) durante 2hrs a 4°C. O *flow-through* foi coletado para análises posteriores e a resina foi lavada três vezes com 10 volumes do tampão de ressuspensão/lise, sendo

uma delas contendo 500mM CH₃CO₂K. A eluição foi feita pela a incubação da resina com 10 volumes de coluna de tampão de lise aquecida a 95°C por 5min.

As frações coletadas foram avaliadas realizando um SDS-PAGE e transferindo para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) para análise por *Western Blot* com anticorpos anti-CBP e anti-GFP

3.13. Separação por SDS-PAGE

Para a análise de proteínas foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com Sambrook et al, 1989.

As amostras foram submetidas a desnaturação a 95°C por 5 minutos com tampão de amostra. Após a aplicação das mesmas no gel, a eletroforese é feita uma voltagem de 100-150V em tampão Tris-glicina de eletroforese 1x (25mM Tris; 250mM glicina; 0.1% SDS)

Para os géis de poliacrilamida contendo Phos-tag (Wako), o composto foi adicionado a uma concentração final de 100µM e uma solução salina de MnCl₂ foi adicionada para uma proporção 1:2 de moléculas de Phos-tag para íons de manganês de acordo com o protocolo em (WAKO, 2010)

3.14. Detecção por Western Blotting

A transferência das proteínas para uma membrana foi feita em tampão de transferência gelado (25mM Tris pH 8; 192mM glicina; 15% metanol) durante 2hrs em uma corrente constante de 250mA em uma membrana de PVDF (polivinilideno difluoreto, GE Healthcare). O bloqueio da membrana foi feito com uma solução de TBS-T (10mM Tris pH 7.5; 150mM NaCl; 0.05% Tween 20) com 10% de leite desnatado durante 1 hora, seguido de incubação com anticorpo primário por no mínimo 2 horas e anticorpo secundário por no máximo 2 horas.

Os anticorpos utilizados são: anti-CBP (Millipore) e anti-coelho (Licor) conjugado com IRDye® 680RD. Para a detecção das proteínas, foi utilizado o leitor de fluorescência Odyssey®.

3.15. Análise de RNA

3.15.1. Extração de RNA total de leveduras

Para extrair o RNA total das células foi utilizado o método do fenol quente/clorofórmio, descrito por Kohrer & Domdey, 1991, com algumas modificações. A cepa $\Delta cwc24$ expressando CWC24-TAP, $cwc24^{C144A}$ -TAP, $cwc24^{S33A/S105A}$ -TAP e $cwc24^{S33D/S105D}$ -TAP foram cultivadas em 50mL de YNB glicose contendo aminoácidos e coletadas em $OD_{600}=1,0$. As células foram ressuspensas em 500 μ l do tampão acetado de sódio (50mM $C_2H_3NaO_2$; 10mM EDTA; pH 5.0) e foi adicionado 0,4g de “glass beads”, 100 μ l de SDS 10% e 500 μ l de fenol pré-aquecido a 65°C. A extração por fenol quente foi feita pela incubação das amostras por pelo o menos 10 minutos a 65°C, com agitação no vórtex por 1 minuto, três vezes. As amostras foram resfriadas por 2 minutos no gelo e depois centrifugadas por 10 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi isolada e extraída novamente com fenol à 65°C. A fase aquosa foi isolada novamente e extraída com 500 μ l de fenol-clorofórmio duas vezes, agitando no vórtex três vezes por 1 minuto cada e centrifugando por 10 minutos; sendo que na segunda vez, foi adicionado 60 μ l de 3M acetato de sódio (pH 5,3). A fase aquosa foi precipitada com etanol 100% gelado a -20°C por pelo o menos 1 hora. O RNA foi centrifugado, lavado com etanol 70% e solubilizado em água tratada com DEPC.

3.15.2. RT-qPCR

A quantificação do RNA total foi feita utilizando o Nanodrop® 2000 (Thermo). Logo, 10 μ g de RNA total foi tratado com DNase por 30 minutos a 37°C segundo o protocolo do fabricante (ThermoFisher). O RNA foi purificado pela extração de fenol-clorofórmio, onde o volume da amostra foi ajustado até 500 μ l com água tratada com DEPC e foi adicionado 50 μ l 3M acetato de sódio e 500 μ l de fenol/clorofórmio, agitada no vórtex por 3 minutos e centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi separada e precipitada com etanol 100% a -20°C por pelo o menos 1 hora. O RNA purificado foi quantificado novamente e 1 μ g de RNA foi utilizado para a reação de transcrição reversa usando primers *random hexamers*, seguindo o protocolo da ThermoScript RT-PCR®. Para a realização da PCR quantitativa, foi empregado o corante fluorescente SYBRGreen e oligonucleotídeos específicos. A quantificação da abundância de pré-U3 e U3 maduro foram normalizadas pela a abundância do 5S rRNA. Realizou-se padronização da concentração de cDNA e primers para a reação. Controles para

contaminação com DNA genômico (NTC – no template control) foram utilizados. Para cada amostra foram realizadas três réplicas técnicas.

A reação de qPCR foi feita utilizando uma mix de primers que amplificasse o RNA precursor, o RNA maduro e o RNA total. O alvo escolhido foi o snoRNA U3, uma vez que o processamento desse RNA é o mais afetado na ausência da Cwc24.

Para calcular a razão precursor/maduro, foi utilizada a seguinte equação:

$$P/M = \frac{\Delta\Delta CT_{precursor}}{\Delta\Delta CT_{maduro}}$$

onde P/M significa a razão precursor maduro. Para os cálculos dos $\Delta\Delta C_t$ tanto do precursor quanto do maduro, usaram-se as equações:

$$\Delta\Delta CT_{precursor} = \Delta CT_{precursor} - \Delta CT_{total}$$

$$\Delta\Delta CT_{maduro} = \Delta CT_{maduro} - \Delta CT_{total}$$

4. RESULTADOS

4.1. Construção de mutantes “fosfodeficientes” e fosfomiméticos de Cwc24

Em ensaios de fosfoproteômica em *high-throughput* foram identificados dois sítios de fosforilação em Cwc24, ambos resíduos de serinas localizados no N-terminal da proteína, que ocupam as posições 33 e 105 em sua sequência primária. Para entender a função da fosforilação da Cwc24 nos processos biológicos dos quais ela participa, os potenciais sítios de fosforilação foram mutados e as características destes mutantes foram estudadas em comparação com a proteína selvagem.

A substituição de um resíduo de serina por um resíduo de alanina impossibilita a fosforilação da proteína porque a ausência do grupo hidroxila presente no resíduo de serina é o aceptor do grupo fosfato adicionado pela proteína quinase (SEFTON, HUNTER, 1998); enquanto que as mutações das serinas em aspartato criam o que se chama de mutantes fosfomiméticos, pois a carga negativa do resíduo de aspartato é capaz de imitar a carga negativa do fosfato em condições fisiológicas, indicando um estado de fosforilação constitutiva da proteína.

As mutações foram construídas por mutagênese sítio-dirigida por *overlapping PCR*, no qual a amplificação do gene de interesse foi feita com dois pares de primers, sendo dois primers mutagênicos para o códon desejado, gerando dois fragmentos de DNA com sequências sobrepostas na região com as mutações. Posteriormente, estes dois fragmentos foram utilizados para a próxima reação de amplificação, desta vez, utilizando primers que amplificassem toda a região do gene, contendo sítios de enzimas de restrição BamHI e NcoI para melhor manipulação. O gene de Cwc24 mutado foi inserido em um vetor intermediário (pGEM-T) e foi sequenciado para ver se somente a mutação desejada foi inserida. Após o sequenciamento, o gene foi subclonado em outro vetor (pMET) para posterior análise e expressão em levedura.

4.2. Ensaio de fosforilação *in vivo* de Cwc24

Após identificar os possíveis sítios de fosforilação, para confirmar a fosforilação de Cwc24 *in vivo*, a cepa haploide $\Delta cwc24/YCp33-GAL1::CWC24$ foi transformada com os plasmídeos pMET/CWC24-TAP; pMET/cwc24^{S33A}-TAP; pMET/cwc24^{S105A}-TAP; pMET/cwc24^{S33A/S105A}-TAP, depois foi feita a “cura” do plasmídeo contendo a cópia selvagem da Cwc24 sob controle do promotor de galactose (YCp33-GAL1::CWC24) utilizando o composto ácido 5-fluorótico (5-FOA), e com isso evitar possíveis recombinação entre os genes de Cwc24 e reversão das mutações. Cinquenta mililitros (50mL) de cultura foram crescidas, coletadas por centrifugação, ressuspendidas em tampão e os extratos proteicos foram obtidos por lise com glass beads. Cinco microlitros (5ul) de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida contendo 100µM de Phos-tagTM e a detecção das proteínas foi feita por Western Blotting utilizando anticorpo α -CBP, que detecta esta porção do TAP tag.

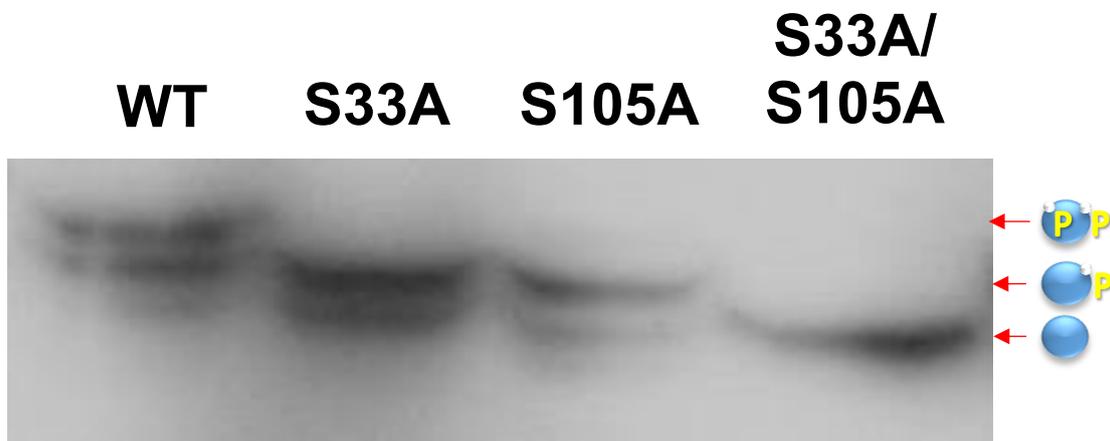
Phos-tagTM é uma molécula funcional que se liga a serinas, treoninas e tirosinas fosforiladas. É um composto químico sintetizado projetado a partir de um domínio catalítico da fosfatase alcalina como modelo e pode ser usado na separação e detecção de proteínas fosforiladas. A molécula utiliza íons metálicos divalentes (zinco ou manganês) para ligar proteínas fosforiladas durante a migração das proteínas na matriz do gel, retardando a sua migração. A separação ocorre com base nos níveis de fosforilação (quanto maior o nível de fosforilação, mais lenta é a velocidade de migração) (WAKO, 2016).

Na figura 5 podemos observar que existem padrões de migração de proteínas diferentes quando comparadas entre si. No duplo mutante no qual as serinas foram substituídas por alanina (S33A/S105A) vê-se uma única banda, indicando a maior velocidade de migração que a proteína poderia alcançar, sem qualquer outra banda que poderia indicar uma proteína fosforilada. Quando comparada com os mutantes em somente uma das serinas (S33A e S105A), é notável a presença de duas bandas: uma situada ao mesmo nível do que o duplo mutante e outra localizada acima, indicando uma menor velocidade de migração da proteína, conseqüentemente oriunda de uma fosforilação (Fig. 5). Uma vez que somente uma das serinas foi mutada, isso possibilita que o outro resíduo possa sofrer a modificação. Quando olha-se para a proteína selvagem, é possível enxergar também duas bandas, porém a

mobilidade delas é complementar a dos mutantes, pois a banda com maior migração é equivalente à banda mono-fosforilada dos mutantes pontuais em somente uma das serinas, enquanto a banda com menor migração na proteína selvagem está acima dos níveis indicados para somente uma modificação, concluindo que os dois resíduos de serina possam ser modificados ao mesmo tempo no interior da célula, indicando assim uma dupla fosforilação.

A.

ET



B.

ET

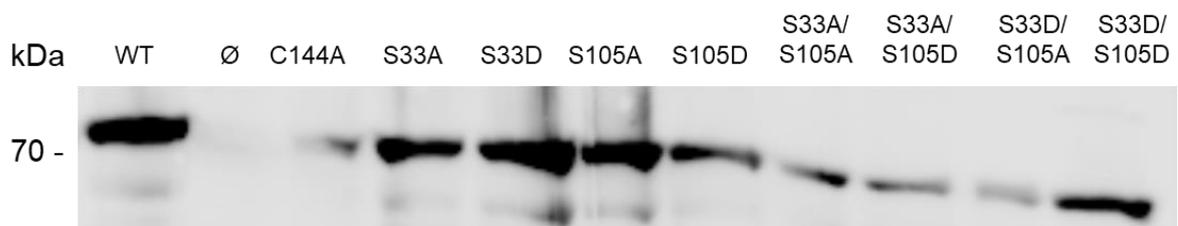


Figura 5. Níveis de fosforilação da Cwc24 *in vivo*. **A.** Extrato total de cepas $\Delta cwc24/pMET-CWC24$ -TAP resolvidas em um gel de poliácridamida 10% contendo 100 μ M Phos-tagTM. Western blotting anti-CBP revela diferentes níveis de fosforilação para a Cwc24. A ausência de um padrão de peso molecular é devido ao fato da molécula de Phos-tag distorcer o padrão, tornando-o assim ambíguo. **B.** Extrato total das cepas separadas em um gel de poliácridamida normal mostrando a migração das proteínas mutantes e selvagens, que mostram o mesmo padrão.

O indicativo de que existam estas diferenças de migrações nas proteínas é capaz de confirmar dos dados de espectrometria de massas, onde foi identificado possíveis sítios de fosforilação na Cwc24 mostra que, não só a proteína é fosforilada *in vivo*, como também ela é fosforilada nos resíduos que foram mutados. É importante ressaltar que Cwc24 encontra-se mono- ou bi-fosforilada nas células, o que pode indicar que cada forma desta proteína possa interagir com proteínas diferentes na célula.

4.3. Avaliação dos efeitos das mutações na estabilidade da proteína.

Analisando outras características que essas mutações poderiam afetar, optou-se por avaliar a estabilidade da proteína quando os resíduos passíveis de fosforilação fossem mutados. Para determinar a estabilidade das proteínas mutantes e conseqüentemente, a sua velocidade de degradação; realizou-se o ensaio com tratamento com cicloheximida, seguido por um *Western Blotting*.

A cicloheximida é um composto com propriedades antifúngicas produzidas pelas bactérias gram-positivas *Streptomyces griseus*; uma molécula permeável à célula que inibe especificamente a tradução em eucariotos prejudicando a translocação do ribossomo. Em um ensaio com cicloheximida, a molécula é adicionada a uma cultura de células e alíquotas de células são coletadas imediatamente e em tempos específicos após adição do composto. As células são lisadas, e a abundância da proteína em cada tempo é analisada. A redução da abundância proteica após adicionar cicloheximida pode ser atribuída a degradação proteica. Uma proteína instável terá sua abundância diminuída em um curto período de tempo, enquanto uma proteína relativamente estável irá exibir pequenas alterações em sua abundância (BUCHANAN et al., 2016).

Na figura 6, vemos a estabilidade e abundância da proteína selvagem como controle nos períodos de tempo determinado. Logo, analisou-se também a estabilidade dos duplos mutantes com alanina (que não é fosforilado) e com aspartato (imita a carga negativa de uma molécula de fosfato através da carga negativa do resíduo de aminoácido). Como pode-se observar na figura 7B e 7C, não houve diferença significativa na quantidade de proteína observada por *Western Blotting*. Não houve redução da abundância das proteínas mutantes em comparação à selvagem, permitindo assim concluir que as mutações não afetam a estabilidade da proteína,

uma vez que os mutantes não estão sendo degradados em uma taxa mais rápida que a selvagem. A constatação de que as substituições dos aminoácidos não afetam a estabilidade de Cwc24, confirmam os resultados de análise de crescimento das cepas expressando os mutantes, que não apresentam fenótipo diferente da cepa selvagem.

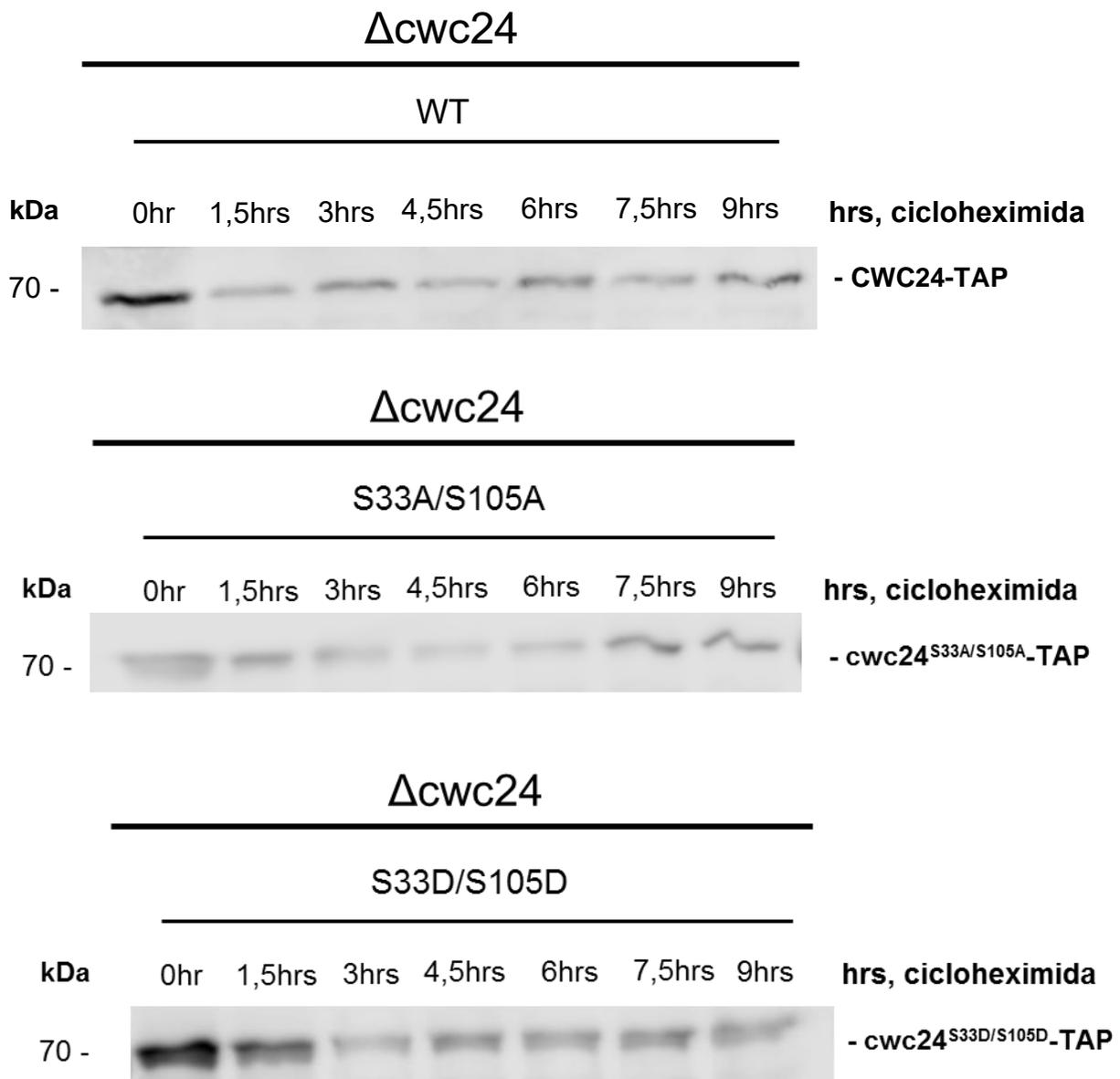


Figura 6. Análise da estabilidade dos mutantes da Cwc24 em ensaio de cicloheximida. A) Estabilidade da proteína selvagem no período de tempo determinado analisada por Western blotting com anticorpo anti-CBP para a detecção da fusão CWC24-TAP. **B)** Mutante fosfodeficiente, onde ambas as serinas foram mutadas para alanina. **C)** Mutante fosfomimético, imitando a proteína fosforilada, nos dois resíduos de serina.

4.4. Efeitos das mutações na viabilidade celular em condições de estresse.

A partir da confirmação da fosforilação de Cwc24, a fim de investigar se os sítios de fosforilação são essenciais para a viabilidade celular, realizou-se análise de crescimento em placa depois de diluição seriada. O ensaio consiste na diluição seriada de uma cultura pré-crescida, pipetadas em gotas em uma placa com o meio a ser testado. As células que se apresentam viáveis são capazes de crescer até as maiores diluições, apresentando um número maior de células e possuem a formação da estrutura de gota bem delimitada, enquanto células com viabilidade afetada apresentam um número menor de células crescendo logo nas primeiras diluições.

A cepa $\Delta cwc24/Ycp33-GAL1::CWC24$ foi transformada com plasmídeos contendo o gene de Cwc24 mutante e depois foi realizada a “cura” do plasmídeo contendo o gene selvagem. Durante a “cura” foi observado que os mutantes complementavam o crescimento da cepa. Porém, para investigar se esta complementação da viabilidade celular era somente parcial, realizou-se a diluição seriada em meio e temperatura padrão de crescimento. Como pode-se ver na figura 6, nenhuma das diluições das cepas mutantes apresentou alguma semelhança com os controles negativos, onde a cepa está transformada, uma com um plasmídeo pMET vazio (não contendo a cópia do gene de Cwc24) e a outra contendo uma mutação pontual capaz de desestabilizar a estrutura da proteína, alterando na sua função (mutante C144A, que rompe o zinc finger) (WU; CHUNG; CHENG, 2017). Como pode-se observar na figura 6, os mutantes são capazes de complementar o crescimento da célula em condições normais de cultura, não havendo assim diferença com a proteína selvagem nem algum efeito semelhante aos controles negativos (na ausência da proteína ou com uma proteína não-funcional).

A regulação da expressão gênica ao nível de processamento de pré-mRNA contribui especificamente e dinamicamente para a adaptação celular a uma ampla variedade de estresses ambientais. Ensaios de microarray foram feitos para medir as mudanças nas quantidades de pré-mRNAs, mRNAs maduros e mRNAs totais dos genes que contêm íntrons seguidos da exposição a estresse ambientais, dentre eles a depleção ou carência de fontes de nitrogênio, inibição de proteínas no metabolismo central da levedura através da presença de compostos, estresses osmóticos e também depleção das fontes de carbono do meio de cultivo. Nestes ensaios, viu-se que diferentes tipos de stress afetam splicing de pré-mRNAs de maneira particular

(BERGKESSEL; WHITWORTH; GUTHRIE, 2011). A partir disso, decidimos testar a viabilidade das células com as proteínas mutantes em condições de estresse. Uma das condições testadas foi na presença de 3-amino-1,2,4 triazol (3-AT), que é um inibidor competitivo da enzima His3, resultando na diminuição da concentração de histidina nas células. Outra condição foi a adição de rapamicina ao meio. A rapamicina é um metabólito secundário natural produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, que inicialmente foi utilizada como agente antifúngico, porém posteriormente seu efeito imunossupressor e antitumoral. A rapamicina age inibindo TOR (**T**arget of **R**apamycin), uma proteína conservada desde levedura até mamíferos, que controla diversos processos na célula, como na regulação do ciclo celular e crescimento da célula, respostas a estresse ambiental e captação de nutrientes (LOEWITH; HALL, 2011). Outros estresses, como o crescimento em meio sem fonte de carbono, também foram testados, uma vez que também afeta a regulação do metabolismo da célula, em relação a detecção de nutrientes, crescimento e divisão celular e também o estresse em crescimento a baixas temperaturas.

Buscando outras condições nas quais as mutações poderiam afetar o crescimento das células, utilizou-se 3-amino-1,2,4-triazol e rapamicina para induzir carência de nutrientes ou mesmo a depleção da fonte de carbono da cultura (meio sem glicose), como também alteração da temperatura de crescimento das células. Em nenhuma das condições (Fig. 7B a E) consegue-se notar uma alteração significativa em relação a condição controle (Fig. 7A), evidenciando que nenhuma das mutações em Cwc24 causa efeito no crescimento celular, logo, a fosforilação da Cwc24 não é importante em nenhuma das condições de estresse testadas, indicando que a modificação da proteína não é essencial para manter a célula viável em situações que possam comprometer o crescimento e proliferação das células. Estes resultados indicam que apesar de Cwc24 estar presente na célula principalmente em sua forma fosforilada (Fig. 5), a forma não fosforilada é funcional e capaz de complementar o crescimento das células na ausência da proteína selvagem.

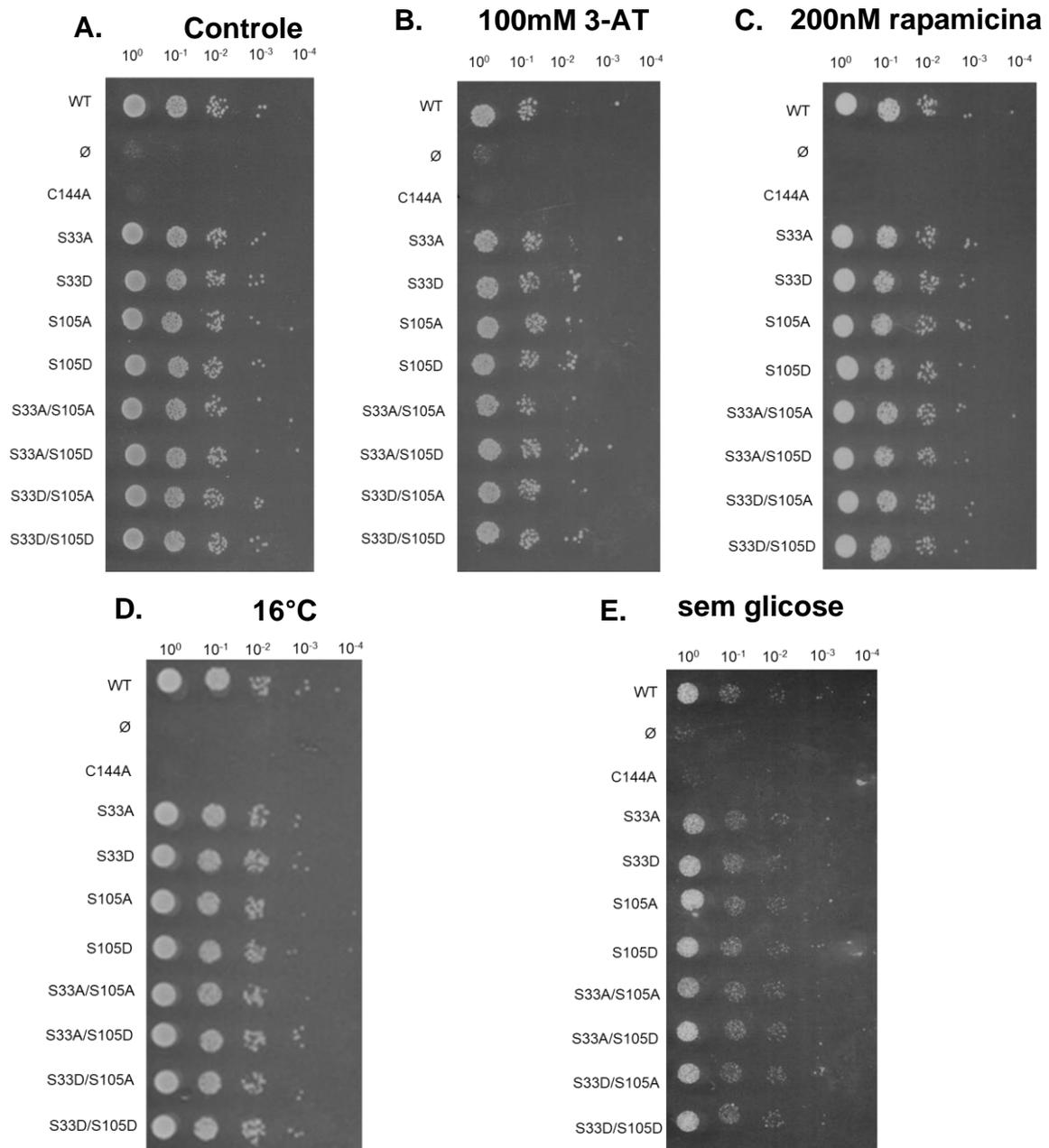


Figura 7. Ensaio de viabilidade celular por diluição seriada dos mutantes da Cwc24. Diluição seriada da cepa $\Delta cwc24$ após o “plasmid shuffle” do YCp33 pelo pMET contendo os mutantes. As células foram diluídas por um fator de diluição de 10 vezes, sendo feita quatro diluições a partir da concentração de células inicial. **A.** Meio mínimo e os aminoácidos requeridos crescidas a 30°C (condição controle) **B.** Em meio contendo 100mM 3-AT, provocando um estresse de carência de aminoácidos. **C.** Meio contendo 200nM de rapamicina, afetando o ciclo celular e induzindo um estresse de fonte de nitrogênio. **D.** Cepas crescidas a 16°C para testar estresses a baixas temperaturas. **E.** Meio sem glicose, criando um estresse na fonte de carbono.

4.5. O papel da fosforilação na interação de Cwc24 com outros fatores de splicing

Para verificar se Cwc24 está fosforilada quando interage com outros fatores de splicing, fez-se uma co-imunoprecipitação, usando as proteínas fusionadas ao TAP tag, seguida de um Western Blotting para identificação de outras proteínas envolvidas no processamento de pré-mRNA.

O TAP tag é utilizado em ensaios de imunoprecipitação para estudar as interações proteína-proteína. O protocolo envolve a fusão do TAP tag com a proteína em estudo. O TAP tag consiste no peptídeo de ligação à calmodulina (calmodulin binding protein - CBP) no N-terminal, seguido por um sítio de clivagem da protease TEV e dois domínios de proteína A, que se ligam a IgG.

Neste estudo, utilizaram-se cepas que continham algumas dessas proteínas fusionadas ao TAP em seu genoma (Brr2; Prp8; Snu114) e foram transformadas com plasmídeos contendo GFP-Cwc24 e GFP-cwc24^{S33A/S105A}. Logo, espera-se que as proteínas do spliceossomo e liguem na resina e que a Cwc24 se ligue nessas proteínas, uma vez que a interação entre elas já foi identificada. O extrato total das células foi incubado com uma resina IgG-Sepharose, que possui afinidade pelo o TAP tag, permitindo a ligação das proteínas na resina. A resina foi lavada e as proteínas foram eluídas com incubação do tampão de lise aquecido a 95°C por 5 minutos. A eluição foi precipitada com ácido tricloroacético (TCA), para subseqüentemente, as proteínas serem separadas por SDS-PAGE contendo 100µM Phos-tagTM, transferidas para uma membrana de PVDF e analisadas por Western Blot utilizando anticorpo anti-GFP (Fig. 8).

Os extratos totais foram utilizados como controle para o Western Blotting, pois através dele podíamos garantir a visualização da presença da proteína de estudo como também o padrão de migração que ela apresenta quando está ou não está fosforilada. Analisando as eluições, etapa onde as proteínas são desligadas e resina e podem ser submetidas a análise caso as proteínas de interesse se interagem entre si. No caso das três proteínas do spliceossomo, conseguimos ver a presença da Cwc24 selvagem na eluição com as proteínas, confirmando sua interação. Além disso, identificamos o mesmo padrão de migração encontrado quando foi feita a identificação da fosforilação na proteína, mostrando a presença da proteína fosforilada na interação

com as demais proteínas. Entretanto, é claramente possível visualizar a presença do mutante fosfodeficiente na eluição com a Brr2, Prp8 e Snu114, indicando que, embora a modificação estivesse presente na interação com a proteína selvagem, a fosforilação da Cwc24 não é essencial para a interação com estas três proteínas. Estes resultados indicam que a fosforilação não afeta a interação de Cwc24 com as três proteínas testadas, que fazem parte do U5 snRNP. É possível, portanto, que a fosforilação de Cwc24 afete sua interação com outras proteínas de outros subcomplexos de splicing.

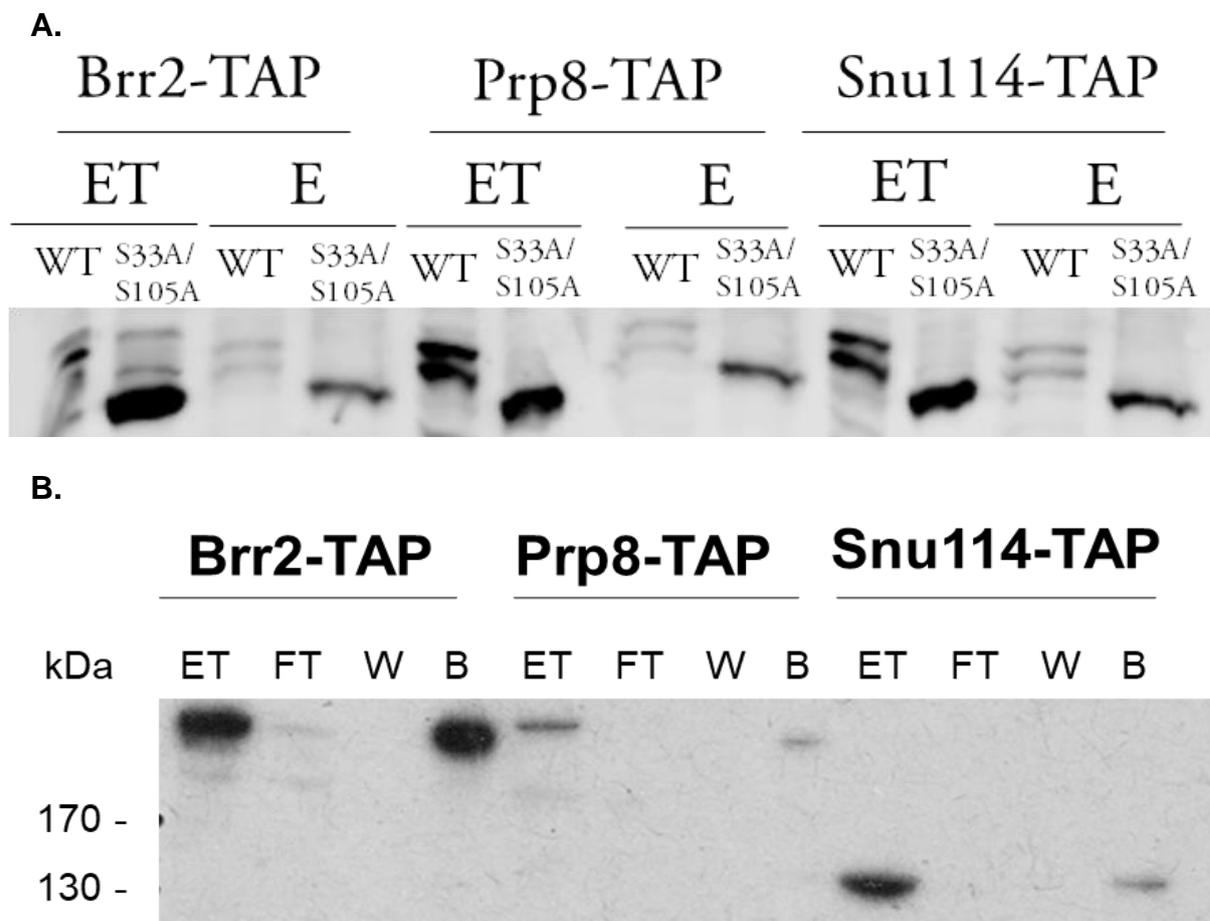


Figura 8. Co-imunoprecitação da Cwc24 com outros fatores de splicing. A. Western Blotting utilizando anti-GFP em um gel com Phos-tag para separar e identificar Cwc24 fosforilada. ET: extrato total; E: eluição. **B.** Western Blotting utilizando anti-CBP em um SDS-PAGE normal para identificar a expressão dos fatores de splicing fusionados ao TAP e sua ligação à resina ao longo da co-imunoprecipitação. Podemos ver a associação das proteínas ainda ligada as beads de IgG-Sepharose. FT: *flow through*; W: *wash*; B: *beads*.

4.6. Análise de processamento de pré-RNA nos mutantes de Cwc24.

Cwc24 é um fator de splicing essencial, porém somente se associa transientemente com o spliceossomo. É responsável por organizar o spliceossomo em uma forma ativa anterior a ação da Prp2 e em promover a interação específica entre o U5 e o U6 com o 5' splice site para a fidelidade da seleção do 5' splice site (WU; CHUNG; CHENG, 2017). A ausência da Cwc24 compromete inteiramente o processamento do pré-RNA, resultando no acúmulo do mesmo na célula.

Para analisar se a fosforilação de Cwc24 é afeta o processamento de pré-RNA, avaliou-se a quantidade de pré-RNA e RNA maduro através de RT-qPCR. As cepas $\Delta cwc24/Ycp33-GAL::CWC24$ transformadas com os plasmídeos pMET-CWC24-TAP, pMET-cwc24^{C144A}-TAP, pMET-cwc24^{S33A/S105A}-TAP, pMET-cwc24^{S33D/S105D}-TAP foram pré-inoculadas em meio com galactose, transferidas para um meio com galactose com volume maior, coletadas e ressuspendidas em meio com glicose e 5-FOA, para fazer a seleção somente dos plasmídeos com a cópia mutante e mantidos em meio com glicose por 48hrs, para fazer a depleção da proteína selvagem na célula. O RNA total da célula foi extraído, tratado com DNase para evitar qualquer interferência durante o experimento, e purificado. A transcrição reversa foi feita utilizando primers *random hexamers* e a amplificação do cDNA foi feita por PCR quantitativa utilizando corante fluorescente SYBRgreen.

Em RT- qPCR utilizando SYBR green, a molécula se liga somente a DNAs duplas fitas e, quando se liga, fluoresce. Durante os ciclos da reação, a amostra produzirá um aumento no sinal de fluorescência enquanto mais DNA dupla fita é gerado, onde o SYBR possa se ligar. A técnica consiste na habilidade do instrumento para detectar o ciclo onde há produto da reação o suficiente para gerar um sinal de fluorescência maior do que o ruído do background. Este ciclo onde o sinal consegue ser reconhecido é chamado de ciclo limiar (C_t = cycle threshold). Quanto maior a quantidade inicial de amostra, mais cedo o limite do ciclo é atingido e menor o valor do C_t (STEPHENSON, 2016).

Como mostrado na figura 9, a razão precursor/maduro dos mutantes nas serinas não mostra diferença em relação ao selvagem, ou seja, sua razão é muito pequena comparada com o mutante na cisteína 144 (controle negativo), já que este resíduo é importante para a estrutura do domínio zinc finger da proteína, responsável

por interagir com o RNA e garantir sua função essencial na célula, logo, o acúmulo de pré-RNA é maior neste mutante. Isso nos permitiu concluir que a fosforilação da Cwc24 não é essencial para sua função durante o processamento do RNA. O fato das mutações não afetarem o splicing do pré-snoRNA U3 foi inesperada, mas confirma os dados de interação entre proteínas e de crescimento das cepas expressando os mutantes.

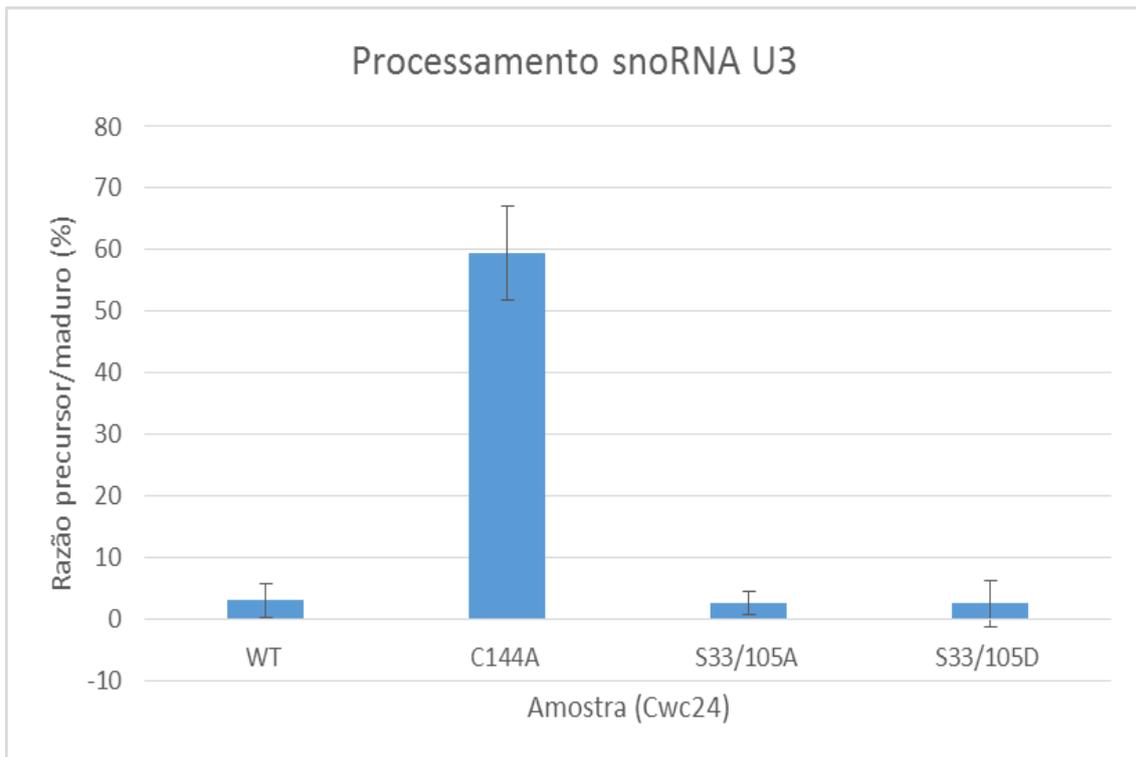


Figura 9. Análise de RT-qPCR para identificação da abundância de pré-RNA nos mutantes de Cwc24. O gráfico representa, em porcentagem, a proporção que existe de pré-RNA em relação ao RNA maduro em cada amostra. Enquanto no mutante em cisteína essa proporção se aproxima quase de 60%, nas amostras que expressam a proteína selvagem e os mutantes nas serinas são menores do que 10%. Triplicata técnica foi realizada calculando o desvio padrão entre as amostras. A triplicata biológica foi realizada reproduzindo o mesmo resultado entre os três experimentos.

DISCUSSÃO

Cwc24 é uma proteína de 30 kDa que contém um domínio zinc finger e um RING domain (WU; CHUNG; CHENG, 2016). A depleção de Cwc24 afeta principalmente o splicing de transcritos primários contendo sequências não-consensuais no *branch point*, como foi demonstrado no caso do splicing do pré-snoRNA U3, (GOLDFEDER; OLIVEIRA, 2008), mas foi demonstrado também que Cwc24 é um fator geral de splicing, essencial para o splicing tanto *in vivo* quanto *in vitro* (COLTRI; OLIVEIRA, 2012). No ensaio realizado por Ptacek et al, 2005; foram identificados, com o uso da tecnologia de chips proteômicos, os substratos *in vitro* reconhecidos pela maioria das proteínas quinases de leveduras e identificaram mais de 4.000 eventos de fosforilação envolvendo 1.325 proteínas diferentes. A fosforilação de Cwc24 foi vista quando houve a incubação com as enzimas PKA e CK2. Ao analisar a sequência primária de Cwc24, observamos a presença destas mesmas regiões consenso para reconhecimento por PKA e CK2, indicando a fosforilação de Cwc24 por estas quinases. Com base nestas informações, foram gerados mutantes pontuais de Cwc24, com as serinas alvo de fosforilação substituídas por alanina ou ácido glutâmico.

Baseado nos dados obtidos, conseguimos confirmar a fosforilação de Cwc24, e identificamos os resíduos de serinas alvos desta modificação através de Western Blotting utilizando Phos-tag, mostrando que a Cwc24 é fosforilada *in vivo*, uma vez que os ensaios de *high throughput* nos mostraram somente a fosforilação da proteína *in vitro*.

Nos ensaios de viabilidade celular, utilizado para detectar se os mutantes afetavam o crescimento da célula em condições normais ou de estresse de crescimento, vimos que os mutantes são capazes de complementar este crescimento tão bem quanto a selvagem em qualquer uma das situações testadas, mostrando que, embora Cwc24 seja uma proteína essencial em levedura, as mutações destes resíduos não afetam o crescimento celular.

Os experimentos de determinação de estabilidade de proteínas mostraram que as mutações feitas nas serinas simultaneamente não são capazes de afetar a estabilidade de Cwc24. A princípio, a ideia era positiva pois qualquer alteração na função biológica da célula seria proveniente do fato das mutações comprometerem as

vias biológicas na qual a Cwc24 fosforilada participa e não pelo o fato de as mutações criarem um mutante instável e rapidamente degradado. Visto isso, uma ideia a ser testada era a de determinar se a presença ou a ausência da fosforilação da proteína comprometeria a sua função, que está envolvida no processamento de pré-mRNA. Para isso, realizou-se uma RT-qPCR para ver se haveria defeitos no processamento do pré-RNA do snoRNA U3, que é o mais afetado pela ausência da Cwc24. Porém identificamos que a razão precursor/maduro, uma razão que mede a proporção de pré-RNA em relação ao RNA maduro dos mutantes nas serinas era semelhante à da proteína selvagem, que possuía uma razão precursor/maduro bem baixa do que com o mutante da cisteína, que afeta completamente no processamento do pré-RNA pois desestabiliza a estrutura da proteína. Isso nos permitiu concluir que a fosforilação desta proteína não afeta o processamento do U3 snoRNA. Porém, isto não impede que estes resíduos possam afetar o processamento de outros substratos, uma vez que a Cwc24 é um fator geral de splicing e está envolvida principalmente no processamento de pre-RNA com sequências não consensuais no *branchpoint*. Para isto, é necessário verificar os defeitos de processamento em outros substratos.

Cwc24 foi identificada em um complexo de proteínas que interagem com Cef1, um componente do NTC complex. Embora a função mais conhecida deste complexo seja a do seu envolvimento com splicing, ele desempenha outras funções biológicas na célula, como na manutenção do genoma, degradação de proteínas pelo proteassomo, na elongação da transcrição do mRNA, entre outras. Por exemplo, a proteína RNF113A, ortóloga de Cwc24 em humanos, foi identificada como uma ubiquitina E3 ligase que interage com UBC13, uma E2 ubiquitina ligase que é responsável pela a formação de cadeias de ubiquitina do tipo K63, que estão envolvidas em via de resposta ao dano de DNA, na via de dano por alquilação mediada pelo complexo ASCC-ALKBH, funcionando como uma transdutora de sinal de dano ao DNA por alquilação. Em uma análise para identificar os substratos mais relevantes da RNF113A, hBRR2 foi a candidata mais encontrada, pois além de co-localizar com RNF113A e os componentes do complexo ASCC, ela foi co-precipitada de uma maneira dependente do N-terminal da RNF113A, como também a ligação da hBRR2 a ASCC2, mediada pelo o RING domain de RNF113A. O RING domain também foi descrito como importante para a ubiquitinação de hBRR2

in vitro. Logo, a hBRR2 representa pelo o menos um substrato fisiológico para RNF113A nesta via de reparo de dano por alquilação (BRICKNER et al., 2017).

Fosforilações também são conhecidas por promoverem ou inibirem eventos posteriores de ubiquitinação alterando os locais de ligação da E3 ligase (HUNTER, 2007). Esse mecanismo de modificações em sequência pode servir para aprimorar os eventos de ubiquitinação direcionando a ligação da E3 ligase, que normalmente ocorre com pouca preferência pela sequência primária. A ideia de que o processo altamente ordenado do rearranjo do spliceossomo se encaixa tão bem com o fato de existirem uma série de modificações tão coordenadas que nos leva a presumir de que os fatores de splicing são multiplamente modificados. Como Cwc24 foi identificada como uma E3 ligase possuindo um RING domain que participa em processos de ubiquitinação e já foi identificada em nosso laboratório que ela é ubiquitinada (PERONA, OLIVEIRA, dados não publicados), é válido buscar entender a relação entre estes dois tipos de modificação dentro do contexto da montagem do spliceossomo, olhando para as interações proteína-proteína ou para outras interações relacionadas a outras vias fisiológicas.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram confirmados dois resíduos de serina na porção N-terminal de Cwc24, posições 33 e 105, que são alvo de fosforilação, confirmando os dados de proteômica em *high throughput*. Apesar de Cwc24 encontrar-se predominantemente em sua forma fosforilada na célula, mutações alterando esses resíduos não resultaram em fenótipos que pudessem ser detectados através dos métodos utilizados. Partindo-se do princípio de que essas modificações pós-traducionais possam resultar em efeitos sutis na função de Cwc24, experimentos estão em andamento para análise do interactoma de Cwc24 selvagem e seus mutantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, C. P. et al. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 7, p. 1389–1396, 2008.
- BERGKESSEL, M.; WHITWORTH, G. B.; GUTHRIE, C. Diverse environmental stresses elicit distinct responses at the level of pre-mRNA processing in yeast. **Rna**, v. 17, n. 8, p. 1461–1478, 2011.
- BERGLUND, J. A.; ABOVICH, N.; ROSBASH, M. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. **Genes and Development**, v. 12, n. 6, p. 858–867, 1998.
- BESSONOV, S. et al. Characterization of purified human B. **Rna**, v. 16, n. 12, p. 2384–2403, 2010.
- BINDEREIF, A.; GREEN, M. R. An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 8, p. 2415–2424, 1987.
- BRICKNER, J. R. et al. A ubiquitin-dependent signalling axis specific for ALKBH-mediated DNA dealkylation repair. **Nature**, v. 551, n. 7680, p. 389–393, 2017.
- BUCHANAN, B. W. et al. Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Visualized Experiments**, n. 110, p. 1–9, 2016.
- CECH, T. R. The generality of self-splicing RNA: Relationship to nuclear mRNA splicing. **Cell**, v. 44, n. 2, p. 207–210, 1986.
- CECH, T. R. The Chemistry of Self-Splicing RNA and RNA Enzymes. v. 391, n. 30, 1987.
- CHAN, S. P. et al. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 279–282, 2003.
- CHANARAT, S.; STRÄSSE, K. Splicing and beyond: The many faces of the Prp19 complex. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 10, p. 2126–2134, 2013.
- CHEN, M.; MANLEY, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 11, p. 741–754, 2009.
- COHEN, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation - A 25 year update. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 12, p. 596–601, 2000.
- COLTRI, P. P.; OLIVEIRA, C. C. Cwc24p Is a General *Saccharomyces cerevisiae* Splicing Factor Required for the Stable U2 snRNP Binding to Primary Transcripts.

PLoS ONE, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2012a.

COLTRI, P. P.; OLIVEIRA, C. C. Cwc24p Is a General *Saccharomyces cerevisiae* Splicing Factor Required for the Stable U2 snRNP Binding to Primary Transcripts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2012b.

DAS, R.; ZHOU, Z.; REED, R. Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. **Molecular Cell**, v. 5, n. 5, p. 779–787, 2000.

DEPHOURE, N. et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. **Langenbecks Archiv für Chirurgie**, v. 337, n. 1, p. 880, 1974.

FABRIZIO, P. et al. The Evolutionarily Conserved Core Design of the Catalytic Activation Step of the Yeast Spliceosome. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 593–608, 2009.

FAIRMAN-WILLIAMS, M. E.; GUENTHER, U. P.; JANKOWSKY, E. SF1 and SF2 helicases: Family matters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 3, p. 313–324, 2010.

FLECKNER, J. et al. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. **Genes and Development**, v. 11, n. 14, p. 1864–1872, 1997.

FURGER, A. et al. Promoter proximal splice sites enhance transcription. **Genes and Development**, v. 16, n. 21, p. 2792–2799, 2002.

GAUTAM, A.; BEGGS, J. D. Mutagenesis of Snu114 domain IV identifies a developmental role in meiotic splicing. **RNA Biology**, v. 16, n. 2, p. 185–195, 2019.

GOLDFEDER, M. B.; OLIVEIRA, C. C. Cwc24p, a novel *Saccharomyces cerevisiae* nuclear ring finger protein, affects pre-snoRNA U3 splicing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 5, p. 2644–2653, 2008.

GÖRNEMANN, J. et al. Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. **Molecular Cell**, v. 19, n. 1, p. 53–63, 2005.

HIR, H. LE et al. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. **EMBO Reports**, v. 2, n. 12, p. 1119–1124, 2001.

HOSKINS, A. A. et al. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes. **Science**, v. 331, n. 6022, p. 1289–1295, 2011.

HUNTER, T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. **Molecular Cell**, v. 28, n. 5, p. 730–738, 2007.

KISTLER, A. L.; GUTHRIE, C. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for Sub2, an essential spliceosomal ATPase. **Genes and Development**, v. 15, n. 1, p. 42–49, 2001.

- KONARSKA, M. M.; SHARP, P. A. Association of U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins in a spliceosome-type complex in absence of precursor RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 15, p. 5459–5462, 1988.
- KONARSKA, M. M.; VILARDELL, J.; QUERY, C. C. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. **Molecular Cell**, v. 21, n. 4, p. 543–553, 2006.
- LARSON, J. D.; HOSKINS, A. A. Dynamics and consequences of spliceosome E complex formation. **eLife**, v. 6, p. 1–22, 2017.
- LE HIR, H. et al. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO Journal**, v. 19, n. 24, p. 6860–6869, 2000.
- LI, X. et al. Large-scale phosphorylation analysis of α -factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 3, p. 1190–1197, 2007.
- LIM, S. R.; HERTEL, K. J. Commitment to splice site pairing coincides with a complex formation. **Molecular Cell**, v. 15, n. 3, p. 477–483, 2004.
- LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.
- MAKAROV, E. M. et al. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2205–2208, 2002.
- MATSUOKA, S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160–1166, 2007.
- MERMOUD, J. E.; COHEN, P. T.; LAMOND, A. I. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. **The EMBO journal**, v. 13, n. 23, p. 5679–5688, 1994.
- MOORE, M. J.; PROUDFOOT, N. J. Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 688–700, 2009.
- NILSEN, T. W.; GRAVELEY, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 457–463, 2010.
- OHI, M. D. et al. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 7, p. 2011–24, 2002.
- OHRT, T. et al. Prp2-mediated protein rearrangements at the catalytic core of the spliceosome as revealed by dcFCCS. **Rna**, v. 18, p. 1244–1256, 2012.
- OLSEN, J. V. et al. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in

Signaling Networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635–648, 2006.

PAWLICKI, J. M.; STEITZ, J. A. Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 52–61, 2010.

PERRIMAN, R. J.; ARES, M. Rearrangement of competing U2 RNA helices within the spliceosome promotes multiple steps in splicing. **Genes and Development**, v. 21, n. 7, p. 811–820, 2007.

PERRIMAN, R.; JR., M. A. Invariant U2 snRNA nucleotides form a stem loop to recognize the intron early in splicing. **Molecular Cell**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2010.

PLEISS, J. A. et al. Rapid, Transcript-Specific Changes in Splicing in Response to Environmental Stress. **Molecular Cell**, v. 27, n. 6, p. 928–937, 2007.

ROCA, X.; KRAINER, A. R.; EPERON, I. C. Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. **Genes and Development**, v. 27, n. 2, p. 129–144, 2013.

SECKO, D. **PROTEIN PHOSPHORYLATION: A GLOBAL REGULATOR OF CELLULAR ACTIVITY.**

SHARP, P. A. Splicing of Messenger RNA Precursors. **Science**, v. 235, p. 766–771, 1987.

SHI, Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 655–670, 2017.

SIATECKA, M.; REYES, J. L.; KONARSKA, M. M. Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. **Genes and Development**, v. 13, n. 15, p. 1983–1993, 1999.

SILICIANO, P. G.; GUTHRIE, C. 5' splice site selection in yeast: genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements. p. 1258–1267, 1988.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SMOLKA, M. B. et al. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10364–10369, 2007.

STEPHENSON, F. H. Real-Time PCR. In: **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edition)**. [s.l: s.n.]. p. 215–320.

STEVENS, S. W. et al. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. **Molecular Cell**, v. 9, n. 1, p. 31–44, 2002.

TARDIFF, D. F.; LACADIE, S. A.; ROSBASH, M. A Genome-Wide Analysis Indicates

that Yeast Pre-mRNA Splicing Is Predominantly Posttranscriptional. **Molecular Cell**, v. 24, n. 6, p. 917–929, 2006.

TARN, W. Y.; STEITZ, J. A. Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1824–1832, 1996a.

TARN, W. Y.; STEITZ, J. A. A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. **Cell**, v. 84, n. 5, p. 801–811, 1996b.

VALENCIA, P.; DIAS, A. P.; REED, R. Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 9, p. 3386–3391, 2008.

WAHL, M. C.; LÜHRMANN, R. SnapShot: Spliceosome Dynamics I. **Cell**, v. 161, n. 6, p. 1474–1474.e1, 2015.

WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701–718, 2009.

WAKO. Phos-tag™ SDS-PAGE GUIDEBOOK. 2010.

WAKO. Phos-Tag guidebook. **Wako**, 2016.

WAN, R. et al. Structure of a yeast catalytic step I spliceosome at 3.5 Å resolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6302, p. 895–904, 2016.

WANG, B. et al. Evaluation of the low-specificity protease elastase for large-scale phosphoproteome analysis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9526–9533, 2008a.

WANG, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470–476, 2008b.

WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–2, 2011.

WILMES, G. M. et al. A Genetic Interaction Map of RNA-Processing Factors Reveals Links between Sem1/Dss1-Containing Complexes and mRNA Export and Splicing. **Molecular Cell**, v. 32, n. 5, p. 735–746, 2008.

WU, N.; CHUNG, C.; CHENG, S. Role of Cwc24 in the First Catalytic Step. v. 37, n. 6, p. 1–16, 2017.

WU, N.-Y.; CHUNG, C.-S.; CHENG, S.-C. The Role of Cwc24 in the First Catalytic Step of Splicing and Fidelity of 5' Splice Site Selection. **Molecular and cellular biology**, n. December, 2016.

YAN, D. et al. CUS2, a Yeast Homolog of Human Tat-SF1, Rescues Function of Misfolded U2 through an Unusual RNA Recognition Motif. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 9, p. 5000–5009, 1998.

ZHANG, L. et al. Brr2 plays a role in spliceosomal activation in addition to U4/U6 unwinding. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 6, p. 3286–3297, 2015.

ZHUANG, Y.; WEINER, A. M. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. **Cell**, v. 46, n. 6, p. 827–835, 1986.