

Caracterização das interações proteína-proteína da U5-200k spliceossomal em *Trypanosoma brucei*.

Camila Maria S. Boralli^{1*}, Ivan R. e Silva¹, Marco Tulio A. da Silva¹, Otavio H. Thiemann¹

¹ Laboratório de Biologia Estrutural, Grupo de Cristalografia, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo;

*camila.boralli@usp.br

Palavras Chave: *Trypanosoma brucei*, *trans-splicing*, U5-200k.

Introdução

A excisão de sequências intrônicas por precursores de mRNAs é um passo crítico durante a expressão gênica eucariótica. Essa reação é catalisada pelo spliceossomo, um complexo macromolecular composto por partículas ribonucleoproteicas nucleares (U snRNPs). A montagem do spliceossomo e catálise do *splicing* ocorrem em um processo ordenado de várias etapas, que inclui vários rearranjos conformacionais (1). Em tripanossomatídeos, onde os genes são transcritos em longas unidades policistrônicas, a reação de *trans-splicing* é requerida para geração de transcritos monocistrônicos maduros. Durante o *trans-splicing*, o exon proveniente da sequência conhecida como *spliced leader* (SL) RNA é adicionado a cada exon de cada transcrito, gerando o mRNA maduro (2). A proteína U5-200K, componente da partícula U5 snRNP, é necessária para a ativação do complexo B* catalítico, e atua desapareando U4/U6 snRNAs heteroduplex através da sua atividade helicase e ATPase (3). Na biogênese da partícula U5 snRNP em levedura, Brr2 (homóloga à U5-200k) é incorporada na partícula somente no núcleo através da interação com a proteína Prp8, após a saída da proteína Aar2 fosforilada, que não foi identificada em *T. brucei* (4).

Resultados e Discussão

Para a investigação da função da proteína, U5-200K de *T. brucei*, a proteína completa, bem como construções sem o segundo domínio helicase e sem a região C-terminal apenas, foram subclonadas no vetor pC-PTP-NEO de recombinação homóloga. Este sistema insere a extensão PTP (ProtC-TEV-ProtA) na extremidade C-terminal da proteína recombinante em *T. brucei*. Após a transfecção e seleção dos clones, análises por PCR confirmaram a correta inserção dos genes de interesse no DNA genômico do parasita e ensaios de Western Blot demonstraram que as proteínas recombinantes estavam fusionadas à extensão PTP. Análises por imunofluorescência indireta utilizando anticorpo para a extensão PTP para analisar a localização das proteínas inteira e truncada no segundo cassete demonstraram que U5-200k-cassete 1 está localizada no citoplasma, enquanto que a proteína recombinante completa contendo a extensão PTP foi encontrada no núcleo. O efeito da localização não nuclear pode ter ocorrido devido à ausência da interação com proteínas responsáveis pelo trânsito núcleo-citoplasma ou pela retirada de alguma sequência de importação nuclear. A técnica de purificação em tandem por afinidade à extensão PTP permite a identificação de interações proteína-proteína e proteína-RNA. Quando comparada com os resultados da referência (3), a purificação das diferentes proteínas recombinantes realizada com os diferentes complexos encontrados através da purificação mostrou que, para ambas as construções, um sub-complexo que contém o core da partícula U5 snRNP foi purificado. Analisando os resultados da purificação e da

imunofluorescência em conjunto, nota-se que o core da partícula U5, no caso da cultura expressando a proteína truncada, está sendo montado no citoplasma e contém a proteína U5-200k, diferentemente do que ocorre em levedura, onde Aar2 substitui U5-200K no citoplasma. O fato desse core permanecer no citoplasma na ausência da região C-terminal de U5-200k, poderia implicar em um defeito de crescimento nessa cultura, já que a proteína deveria ser ativa somente no núcleo da célula. De fato, as curvas de crescimento das culturas transfectadas sugerem que a cultura contendo parasitas expressando a proteína truncada no segundo cassete apresenta um pequeno defeito de crescimento a 26°C em comparação a cultura contendo parasitas expressando a proteína inteira.

Conclusões

Os resultados obtidos ressaltaram a importância do segundo cassete e que, na ausência dessa parte, a localização da proteína na célula é alterada. Também foi mostrado que um sub-complexo que contém o core da partícula U5 foi purificado no caso de ambas as construções, indicando que, na cultura que expressa a proteína truncada, esse core está sendo montado no citoplasma e contém U5-200k, divergindo do que ocorre em levedura. Finalmente, foi demonstrado que a eliminação do segundo cassete inteiro causa um defeito de crescimento nos parasitas, como mostrado em uma curva de crescimento. De fato, a presença do core da partícula U5 no citoplasma na ausência da região C-terminal de U5-200k e não no núcleo, onde desempenha sua função, pode ter implicado nesse defeito de crescimento. Deve-se ressaltar que cada gene possui duas cópias no genoma de *T. brucei* e o truncamento (e adição de extensão PTP) foi realizado em apenas uma das cópias. Deste modo, o efeito do truncamento pode ter sido compensado pela expressão da proteína nativa codificada pela cópia não alterada deste gene. Estudos adicionais são necessários para melhor caracterização deste efeito.

Agradecimentos



1 Mozaffari-Jovin, S.; Wandersleben, T.; Santos, K. F.; Will, C. L.; Lührmann, R.; Wahl, M. C. Novel regulatory principles of the spliceosomal Brr2 RNA helicase and links to retinal disease in humans. *RNA Biology*, v. 11, n. 4, p. 298-312, 2014.

2 Günzl, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryotic Cell*, v. 9, n. 8, p. 1159-1170, 2010.

3 Silva, M. T.; Ambrósio, D. L.; Trevelin, C. C.; Watanabe, T. F.; Laure, H. J.; Greene, L. J.; Rosa, J. C.; Valentini, S. R.; Cicarelli, R. M. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 2, p. 130-138, 2011.

4 Weber, G.; Cristao, V. F.; de L Alves, F.; Santos, K. F.; Holton, N.; Rappsilber, J. D.; Wahl, M. C. Mechanism for Aar2p function as a U5 snRNP assembly factor. *Genes Dev.*, v. 1, n. 25, p. 1601-1612, 2011.