

## CARACTERIZAÇÃO DO EQUILÍBRIO OLIGOMÉRICO/CONFORMACIONAL DO DOMÍNIO AMINO-TERMINAL RRM1-2 DO REGULADOR PÓS-TRANSCRICIONAL HUR

Jendiroba, K. A.<sup>1</sup>, Lixa, C.<sup>2</sup>, Oliveira, D. M. P.<sup>3</sup>, AnoBom, C. D.<sup>3</sup>, De Magalhães, Mariana T. Q.<sup>4</sup>, Almeida, F. C. L.<sup>5</sup> & Pinheiro, A. S.<sup>3,6</sup>

1. Estudante de Iniciação Científica do departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ
2. Doutorando do PPGBq no departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ
3. Professor e pesquisador do departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941909, Brasil.
4. Professor e pesquisador do departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270901, Brasil.
5. Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941902, Brasil.
6. Orientador

### Resumo:

O antígeno humano R, HuR, atua como regulador pós-transcricional da expressão gênica exercendo sua atividade estabilizadora de RNA mensageiro (mRNA). A HuR é composta por três domínios funcionalmente distintos denominados motivos de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif* - RRM), RRM1, RRM2 e RRM3. Dentre eles, os domínios amino-terminais RRM1 e RRM2 estão dispostos em *tandem* e são responsáveis pela interação da proteína com sequências ricas em adenina e uracila presentes na região 3' não-traduzida do mRNA.

O presente trabalho visa a caracterização dinâmica do domínio RRM1-2 de HuR por Ressonância Magnética Nuclear, buscando esclarecer o mecanismo pelo qual HuR reconhece de maneira específica seus alvos de mRNA.

**Palavras-chave:** HuR; RRM; RMN

**Apoio financeiro:** CNPq-PIBIC

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFRJ

### Introdução:

A regulação pós-transcricional da expressão gênica se inicia no núcleo com a adição de um resíduo de 7-metilguanósina à terminação 5' (cap-5'), adição de uma cauda de poliadeninas (poliA) à terminação 3', splicing e edição do pré-mRNA. Essas modificações determinam a eficiência dos processos de transporte e tradução, além de serem cruciais para a manutenção da estabilidade dos transcritos. Os mRNAs eucarióticos possuem, além de suas sequências codificantes, regiões regulatórias

não-codificantes presentes principalmente nas terminações 5' e 3' (UTRs – untranslated regions). O controle pós-transcricional destes mRNAs é desempenhado por UTRs conservadas, os chamados elementos regulatórios de sequência não-codificantes (USERS – untranslated sequence elements for regulation) ou, simplesmente, elementos cis-regulatórios. Estas sequências específicas presentes nas UTRs são reconhecidas por um repertório de fatores trans-regulatórios, incluindo proteínas ligantes de mRNA (RBPs – RNA-binding proteins), que regulam o destino do mRNA na célula. A interação entre elementos regulatórios cis e trans pode resultar na degradação, estabilização, ou sequestro do mRNA, modulando assim a taxa de tradução.

Os AREs são os elementos cis-regulatórios mais estudados, sendo observados principalmente nas regiões 3'-UTR de mais de 4000 mRNAs. Eles estão normalmente associados à degradação do mRNA. Entretanto, isso é dependente da sequência do transcrito, de forma que a presença de AREs em mRNAs diferentes pode levar a efeitos distintos.

As únicas RBPs capazes de estabilizar os transcritos de mRNA e exercer efeitos positivos sobre a taxa de síntese proteica são aquelas pertencentes à família ELAV/Hu (Embryonic Lethal Abnormal Vision/Human antigen proteins), especificamente o antígeno humano R.

O antígeno humano R (HuR) é uma proteína pertencente à família ELAV/Hu de RBPs humanas. Dentre os membros da família, a HuR, também conhecida como HuA, é o único cuja expressão se dá de forma ubíqua. Ela é uma proteína de localização predominantemente nuclear. Entretanto, ela sofre translocação para o citoplasma em

resposta a estímulos específicos, como os proliferativos e de estresse. No núcleo, HuR participa da regulação dos eventos de splicing e poliadenilação do pré-mRNA. No citoplasma, ela se liga a uma gama de transcritos de mRNA através da interação com os AREs presentes principalmente nas suas regiões 3'-UTRs. A interação de HuR com AREs geralmente leva a estabilização dos transcritos, podendo estar acompanhada ou não do aumento da tradução.

Dentre os mRNAs alvos de HuR, muitos codificam proteínas que participam de processos essenciais para a formação e desenvolvimento de tumores, como citocinas, fatores de crescimento, supressores tumorais, proto-oncogenes, proteínas reguladoras do ciclo celular, de apoptose e enzimas inflamatórias. Dados clínicos mostram que a superexpressão citoplasmática de HuR está relacionada com características clínico-patológicas específicas do tumor (tamanho e resistência a drogas), bem como com a baixa sobrevida de pacientes. Neste contexto, HuR surge como um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas anti-câncer.

A HuR possui cerca de 36 kDa e apresenta uma arquitetura tripartida formada por três domínios funcionalmente distintos. Esses domínios, conhecidos como RRM (RNA recognition motif), constituem motivos estruturais de reconhecimento de RNA e contribuem individualmente para a interação da proteína com seus substratos de mRNA. Os domínios amino-terminais RRM1 e RRM2 estão dispostos em tandem e são responsáveis pelo reconhecimento dos AREs, levando à estabilização dos transcritos e modulação da tradução. Já o domínio carboxi-terminal RRM3 contribui para a interação com a cauda poliA do mRNA e com outros ligantes de natureza proteica. Além disso, esse domínio apresenta uma atividade 3' adenosiltransferásica capaz de promover o alongamento da cauda poliA. Portanto, HuR é capaz não somente de reconhecer e se ligar, mas também de modificar a sequência dos seus substratos de mRNA.

Os domínios amino-terminais RRM1-2 e o domínio carboxi-terminal RRM3 estão conectados através de uma sequência específica conhecida como HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling). Esta sequência é responsável pela translocação de HuR entre o núcleo e o citoplasma, de forma a estabilizar e aumentar a eficiência da tradução dos seus mRNAs.

A estrutura cristalográfica de HuR RRM1-2 mostra que esses domínios

apresentam um enovelamento canônico, característico de domínios RRM, conhecido como sanduíche  $\alpha\beta$ , cuja topologia é  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ . Diferentemente de outros domínios RRM em tandem, a estrutura cristalográfica de HuR RRM1-2 revela que, na ausência de ligante, a proteína adota uma conformação aberta, com ausência completa de contatos entre os domínios. Contudo, na presença de RNA, a proteína adota uma conformação fechada, onde os dois domínios se aproximam formando uma fenda positivamente carregada responsável pela ligação ao mRNA. A partir da comparação destas estruturas, WANG et al. (2013) postularam que HuR interage com seus substratos de mRNA através de um mecanismo de ajuste induzido. Neste modelo, HuR, na sua conformação aberta, se liga ao mRNA através do domínio RRM1, de forma que a energia liberada por esta ligação induz uma mudança conformacional na proteína que leva a interações adicionais do domínio RRM2 com o mRNA, dando origem à conformação fechada.

### Metodologia:

As células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo RP1B-RRM1-2 foram cultivadas meio M9 enriquecido com  $^{13}\text{C}$ -glicose e/ou  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , contendo canamicina. Elas foram crescidas até densidade ótica apropriada para iniciar a expressão da proteína.

A primeira etapa de purificação de RRM1-2 foi uma cromatografia de afinidade a níquel, que foi realizado usando uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare) acoplada a um sistema de purificação FPLC Äkta Prime plus (GE Healthcare). As frações de interesse foram unidas e incubadas com a protease His6-TEV N1a (S219V), para separação da cauda amino-terminal His6. Juntamente, a amostra foi dialisada para a remoção do imidazol e do sal. Em seguida, a separação de RRM1-2 da protease TEV e da cauda His6 se deu por cromatografia de troca aniônica usando uma coluna HiPrep Q FF 16/10 (GE Healthcare) acoplada ao mesmo sistema. Por fim, a amostra foi submetida a uma cromatografia por exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 75 PG HiLoad 16/60 (GE Healthcare) acoplada ao mesmo sistema. As frações de interesse foram unidas e concentradas.

A pureza e a massa molecular de RRM1-2 foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Os dados foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Utraflex III utilizando modo linear e um

intervalo de m/z de 4000 a 30150.

Os espectros de RMN foram adquiridos a 25°C em espectrômetros Bruker Avance III 800 e 700 MHz, e estão localizados no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ.

O assinalamento sequencial das ressonâncias da cadeia principal dos domínios RRM1-2 foi feito com base nos seguintes experimentos de RMN: 2D [1H,15N] HSQC, 3D HNCACB, 3D CBCA(CO)NH, 3D HNCO e 3D HNCACO.

A dinâmica molecular da cadeia principal de RRM1-2 foi inferida a partir da medida dos parâmetros de relaxação dos núcleos de 15N: R1, R2 e {1H}-15N NOE. O {1H}-15N NOE foi adquirido com e sem pré-saturação dos núcleos de hidrogênio, de maneira intercalada.

Os valores das taxas de relaxação (R1 e R2) foram obtidos a partir do ajuste das intensidades das ressonâncias presentes nos espectros de correlação heteronuclear [1H, 15N] em função dos tempos de relaxação (T) empregando uma equação de decaimento monoexponencial de dois parâmetros.

Os perfis de dispersão de relaxação foram adquiridos em dois campos magnéticos diferentes (11,7 e 16,5 T), utilizando uma sequência de pulsos CPMG do tipo “relaxação compensada”.

Na mobilidade iônica, a amostra purificada de RRM1-2 foi injetada no espectrômetro Synapt II HDMS (Waters Co., MA, EUA), equipado com um ionizador do tipo nanospray e uma cela de TWIMS (traveling wave ion mobility spectrometry) posicionada entre o analisador quadrupolo e o analisador do tipo TOF. Os espectros foram adquiridos por infusão direta com um fluxo de 1 L.min<sup>-1</sup> em um intervalo de m/z de 300 a 4000. O íon de estado de carga +10 foi selecionado no quadrupolo e analisado na cela T-wave e, posteriormente, no analisador TOF.

### Resultados e Discussão:

Os dados obtidos do RMN multidimensional em alta resolução, possibilitou assinalar 98% das ressonâncias de RRM1-2, excetuando os resíduos Met1, Ile152, Ile179 e os artefatos de clonagem N- e C-terminais. Durante o processo, foi observado a presença de ressonâncias extras no espectro de [1H,15N] HSQC, sugerindo, ao menos, uma segunda conformação minoritária em solução. O fato dos deslocamentos químicos do RRM1 tanto isolado quanto no tandem RRM1-2 se mostrar semelhante, sugere ausência de contatos entre os domínios N-terminais.

A região N-terminal intrinsecamente desordenada e o “linker” entre os domínios altamente flexível são altamente flexíveis, como mostra os resultados de dinâmica. Além disso, os loops L3 (RRM1), L3' e L5' (RRM2) experimentam dinâmica térmica. O valor do tempo de correlação estimado para RRM1-2 comparado a de uma proteína globular de massa similar sugere o comportamento dos domínios RRM1 e RRM2 como módulos independentes em solução. O tandem RRM1-2 não experimenta troca conformacional em regime intermediário, como indicam os dados de dispersão de relaxação. Porém, foi observado que determinados resíduos apresentam, nas frequências intermediárias, um aumento de  $R_2^{eff}$ , sugerindo um regime de troca mais lenta. Os dados de ESI-IM-MS sugere que o RRM1-2 na forma livre apresenta três conformações co-populadas. Esses resultados sugerem a participação de um mecanismo de seleção conformacional na dinâmica de interação da HuR com seus substratos de RNA.

### Conclusões:

Com a RMN multidimensional em alta resolução, foi possível assinalar 98% das ressonâncias de RRM1-2, com exceção dos resíduos Met1, Ile152, Ile179 e dos artefatos de clonagem N- e C-terminais.

O espectro [1H,15N] HSQC mostrou a presença de cinco ressonâncias extras, o que pode indicar a existência de ao menos uma segunda conformação minoritária em solução, cuja cinética de troca é da ordem de segundos.

Os deslocamentos químicos do domínio RRM1 de HuR, tanto isolado quanto no contexto do tandem RRM1-2, se mostraram muito semelhantes, sugerindo a ausência de contatos entre os domínios N-terminais.

Os resultados de dinâmica mostraram que a região N-terminal intrinsecamente desordenada e o “linker” entre os domínios RRM1-2 são altamente flexíveis em solução. Além disso, resíduos presentes nos loops L3, L3' e L5' também experimentam dinâmica térmica (ps-ns).

O baixo valor de  $\tau_c$  estimado para RRM1-2 quando comparado a uma proteína globular de mesma massa molecular sugere que os domínios N-terminais RRM1 e RRM2 se comportam como módulos estruturais independentes em solução.

Os dados de DR CPMG indicam que RRM1-21-189 não experimenta troca conformacional em regime intermediário ( $\mu$ -ms). Entretanto, o aumento de  $R_2^{eff}$  em frequências intermediárias de CPMG para

determinados resíduos sugere um regime de troca mais lento, da ordem de segundos.

Os dados de ESI-IM-MS obtidos para RRM1-21-189 na forma livre sugerem a existência de três conformações co-populadas, cujos tempos de deriva são 75,1, 94,8 e 120,0 ms.

Em resumo, os resultados aqui mostrados sugerem a participação do mecanismo de seleção conformacional na dinâmica de interação de HuR com seus substratos de RNA.

### Referências bibliográficas:

BARREAU, C.; PAILLARD, L.; OSBORNE, H. B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 22, p. 7138–7150, 2006.

BEVILACQUA, A.; CERIANI, M. C.; CAPACCIOLI, S.; NICOLIN, A. Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression by Degradation of Messenger RNAs. **Journal of Cell Physiology**, v. 195, n. 3, p. 356–372, 2003.

BRENNAN, C. M.; GALLOUZI, I. E.; STEITZ, J. A. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 1, p. 1–13, 2000.

CASTELLO, A.; FISCHER, B.; EICHELBAUN, K.; HOROS, R.; BECKMANN, B. M.; STREIN, C.; DAVEY, N. E.; HUMPHREYS, D. T.; PREISS, T.; STEINMETZ, L. M.; KRIJQSVELD, J.; HENTZE, M. W. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1393–1406, 2012.

CHEN, C. Y.; SHYU, A. B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 11, p. 465-470, 1995.

DE SILANES, I. L.; ZHAN, M.; LAL, A.; YANG, X.; GOROSPE, M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2987–2992, 2004.

DE SILANES, I. L.; LAL, A.; GOROSPE, M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. **RNA Biology**, v. 2, n. 1, 11–13, 2005.

DENKERT, C.; WEICHERT, W.; WINZER, K. J.; MULLER, B. M.; NOSKE, A.; NIESPOREK, S.; KRISTIANSEN, G.; GUSKI, H.; DIETEL, M.; HAUPTMANN, S. Expression of the ELAV-

like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5580–5586, 2004a.

DENKERT, C.; WEICHERT, W.; PEST, S.; KOCH, I.; LICHT, D.; KÖBEL, M.; RELES, A.; SEHOULI, J.; DIETEL, M.; HAUPTMANN, S. Overexpression of the Embryonic-Lethal Abnormal Vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. **Cancer Research**, v. 64, n. 1, p. 189–195, 2004b.

DOLLER, A.; PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 12, p. 2165–2173, 2008.

FAN, X. C.; STEITZ, J. A. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR (nuclear localization RNA degradation nuclear export). **Biochemistry**, v. 95, n. December, p. 15293–15298, 1998a.

FAN, X. C.; STEITZ, J. A. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. **EMBO Journal**, v. 17, n. 12, p. 3448–3460, 1998b.

MEISNER, N. C.; HINTERSTEINER, M.; SEIFERT, J. M.; BAUER, R.; BENOIT, R. M.; WIDMER, A.; SCHINDLER, T.; UHL, V.; LANG, M.; GSTACH, H.; AUER, M. Terminal adenosyl transferase activity of posttranscriptional regulator HuR revealed by confocal on-bead screening. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 2, p. 435–450, 2009.

MOORE, M. J. From Birth to Death: The Complex Lives of Eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1514–1518, 2 set. 2005.

SRIKANTAN, S.; GOROSPE, M. HuR function in disease. **Frontiers in Biosciences**, v. 17, 189–205, 2012.

WANG, H. et al. The structure of the ARE-binding domains of Hu antigen R (HuR) undergoes conformational changes during RNA binding. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 3, p. 373–380, 2013.