

## **MAPEAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS PUB1 E NAB2 POR DUPLO-HÍBRIDO.** Ana Paula Borges Gregio, Luciano Henrique Apponi, Sandro Roberto Valentini – Microbiologia – Farmácia Bioquímica – Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Câmpus de Araraquara.

Pub1 é a principal proteína que se liga a RNA poliadenilado nuclear e citoplasmático de *Saccharomyces cerevisiae*. Pertence a uma grande família de proteínas que se ligam a RNA por conservar domínios de reconhecimento de RNA (“RNA recognition motifs” – RRM). Pub1 contém três RRM (Anderson e cols., 1993; Matunis e cols., 1993) e está diretamente ligada à estabilização de mRNA. Estudos relacionam o envolvimento de Pub1 à regulação da via de controle de decaimento de mRNA “nonsense-mediated mRNA decay” (NMD) (Ruiz-Echevarría e Peltz, 2000) e também à estabilização de mRNA sujeitos a degradação mediada por ARE (“AU-rich elements”) (Vasudevan e Peltz, 2001). A identificação de possíveis ligantes de Pub1 pode contribuir para um melhor entendimento do mecanismo pelo qual essa proteína exerce sua função fisiológica. Com esse objetivo o sistema de duplo-híbrido foi utilizado para rastrear possíveis ligantes físicos de Pub1. Foram rastreados  $1,9 \times 10^5$  transformantes, dos quais 535 foram capazes de crescer em meio seletivo deficiente de histidina e 17 apresentaram ativação do gene repórter *LacZ*. Os clones foram recuperados e testados novamente quanto a ativação dos genes repórteres (“plasmid linkage”) para confirmar o fenótipo de crescimento em meio deficiente em histidina e de produção de  $\beta$ -galactosidase. O sequenciamento dos clones confirmados pelo “plasmid linkage” revelou Nab2, Air1, Gar1 e Hht1. A interação mais forte foi observada com Nab2, que assim como Pub1, é uma hnRNP, e é requerida no controle do comprimento da cauda poli(A) de RNA assim como no transporte nuclear dessa molécula (Hector e cols, 2002; Marfatia e cols., 2002; Green e cols., 2002). Para confirmar a interação entre as proteínas Pub1 e Nab2 foi realizado um ensaio de interação *in vitro*. O gene *PUB1* foi clonado no vetor de expressão pQE30 para a produção da proteína com cauda de histidinas. O gene *NAB2* foi clonado no vetor de expressão pGEX4T para produção da proteína em fusão com GST. Ambas proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade e submetidas ao ensaio de interação *in vitro*. O experimento realizado confirmou a interação entre Pub1 e Nab2 e demonstrou que ocorre de maneira direta. Com o objetivo de determinar o sítio de interação entre as proteínas Pub1 e Nab2, as regiões codificadoras dos domínios de ambas proteínas foram clonadas nos vetores do sistema de duplo-híbrido. Inicialmente, as regiões codificadoras dos domínios de Pub1 foram obtidas por PCR e clonadas no vetor pJG4-5. A levedura repórter foi transformada com o plasmídeo pEG202-*NAB2* e, em seguida, transformada com cada uma das construções geradas. As leveduras foram testadas quanto à capacidade de crescer em meio deficiente de leucina e quanto ao desenvolvimento de coloração azul no ensaio de  $\beta$ -galactosidase. Nenhuma das leveduras expressando Nab2 e os diferentes domínios de Pub1 apresentou resultado positivo para os testes realizados. Assim, por esse método não foi possível determinar o domínio de Pub1 responsável pela

interação com a proteína Nab2. O gene *PUB1* foi clonado no vetor pJG4-5 e utilizado para transformar a levedura repórter. Em seguida, essa levedura foi transformada com construções que expressam os domínios de Nab2. As leveduras foram então testadas quanto à capacidade de crescer em meio seletivo deficiente de leucina e quanto ao desenvolvimento de coloração azul no ensaio de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados indicam que o domínio C-terminal de Nab2 é necessário e suficiente para a interação com Pub1.

Bolsa: CNPq/PIBIC

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.T.; PADDY, M.R. and SWANSON, M.S. (1993). Pub1 is a major nuclear and cytoplasmatic polyadenilated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, **13**: 6102-6113.
- GREEN, D. M.; MARFATIA, K. A.; CRAFTON, E. B.; ZHANG, X.; CHENG, X. AND CORBETT, A. H. (2002) Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. **J. Biol. Chem.**, **277**: 7752-7760.
- HECTOR, R. E.; NYKAMP, K. R.; DHEUR, S.; ANDERSON, J. T.; NON, P. J.; URBINATI, C. R.; WILSON, S. M.; MINVIELLE-SEBASTIA, L. AND SWANSON, M. S. (2002) Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. **EMBO J.**, **21**: 1800-1810.
- MARFATIA, K. A.; CRAFTON, E. B.; GREEN, D. M. and CORBETT, A. H. (2002) Domain analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, Nab2p. Dissecting the requirements for Nab2p-facilitated poly(A) RNA export. **J. Biol. Chem.**, **278**: 6731-6740.
- MATUNIS, M.J.; MATUNIS, E.L. and DREYFUSS, G. (1993). Pub1; a major yeast poly(A)<sup>+</sup> RNA-binding protein. **Mol. Cell. Biol.**, **13**: 6114-6123.
- RUIZ-ECHEVARRIA, M.J. and PELTZ, S.W. (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. **Cell**, **101**: 741-751.
- VASUDEVAN, S. and PELTZ, S.W. (2001). Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell**, **7**:1191-1200.