EFEITOS DA AUSÊNCIA DO FATOR DE SPLICING NO INTERACTOMA DE Prp43

Rebeca Barcelos Jantsch
Barros, M.R.A;
Carla Columbano de Oliveira
Instituto de Química
rebecajantsch@usp.br

Objetivos

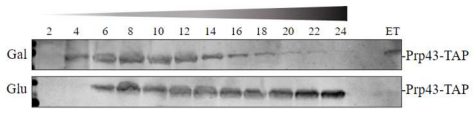
O *splicing* de mRNA é catalisado por uma ribonucleoproteína dinâmica chamada de spliceossomo composta por 5 snRNPs (WILL, C.L; LÜHRMANN, R.; 2011). Durante o ciclo de *splicing*, oito DExD/H-BOX RNA helicases coordenam os remodelamentos estruturais (YAN, C et al.; 2019). Ao mesmo tempo, fatores de *splicing* atuam mediando as interações dos snRNAs com o mRNA e promovendo suporte estrutural do complexo. Um desses fatores, Cwc24, foi caracterizado como proteína essencial e como um fator de *splicing* pelo nosso grupo. Cwc24 atua promovendo a fidelidade da seleção do 5' *splicing site* e na organização do spliceossomo para o complexo B ativado, uma conformação que antecede a primeira reação de transesterificação (WU N-Y et al., 2017). Foi demonstrado pelo nosso grupo que a ausência de Cwc24 prejudica a ação da DEAH-box helicase Prp2, a qual media a reorganização do spliceossomo para a conformação B catalítica para que a primeira reação ocorra, formando assim um spliceossomo aberrante. Spliceossomos defeituosos promovem efeitos acumulativos nas células e estão relacionados a diversas síndromes em humanos. Uma das proteínas associadas ao controle de qualidade do ciclo de *splicing* é a Prp43, uma RNA helicase multifuncional que atua tanto no ciclo de *splicing* quanto na biogênese do ribossomo. No *splicing*, Prp43 é responsável pela dissociação do complexo após a liberação do mRNA maduro. Diante disso, esse projeto tem como objetivo entender os efeitos da ausência de Cwc24 e os mecanismos envolvidos nesse spliceossomo aberrante por meio da análise das últimas etapas do ciclo de *splicing* a partir da análise do interactoma da última RNA helicase que atua no ciclo: Prp43.

Materiais e Métodos

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae GAL1::HA-CWC24/PRP43-TAP* foi cultivada por 30 horas em meio contendo ou galactose ou glicose para a regulação da expressão de Cwc24. O extrato total obtido após lise e clarificação foi submetido à co-imunoprecipitação usando Prp43 como isca e usando a resina *IgG Sepharose.* A eluição foi analisada por *Western Blot* e por espectrometria de massas para identificação das proteínas e complexos proteicos que interagem com Prp43 nessas condições. Além, os RNAs co-imunoprecipitados com Prp43 foram analizados por *Northen Blot*. Foi realizado também um ensaio de gradiente de glicerol e de sacarose e as frações coletadas foram analisadas por *Western Blot*.

Resultados

- Os resultados de espectrometria de massas mostraram que na ausência de Cwc24 Prp43 interage predominantemente com proteínas ribossomais;
- Pelo gradiente de glicerol foi observado uma mudança no perfil de sedimentação de Prp43 na ausência de Cwc24, com Prp43 migrando para as frações mais densas (Figura 1);
- A análise de snRNAs mostrou que não há acúmulo de snRNAs co-imunoprecipitando com Prp43 na ausência de Cwc24;
- A análise de rRNAs não foi efetiva para determinação dos rRNAs que co-imunoprecipitam com Prp43;
- O gradiente de sacarose não mostrou nenhuma alteração no perfil de sedimentação de Prp43 com os componentes ribossomais;



Figurea 1: *Western Blot* do perfil de sedimentação de Prp43 em gradiente de glicerol na presença (Gal) e ausência (Glu) de Cwc24.

Conclusão

Na ausência de Cwc24, foi observado maior interação de Prp43 com proteínas ribossomais. Prp43 não se mostrou uma isca efetiva para a comparação das etapas finais do ciclo de *splicing* nas duas condições estudadas devido a sua interação transiente com o complexo. Para entender as consequências da ausência de Cwc24 para o ciclo de *splicing*, será usada uma isca que interage de forma mais efetiva e por maior tempo com o spliceossomo das últimas etapas. Será realizada uma dupla Co-Ip usando primeiro Prp8-TAP como isca de modo a enriquecer o spliceossomo nas frações eluidas. Com essas frações será realizada uma outra co-ip usando Ntr1-GST como isca. A cepa está sendo construída e a eluição obtida será analisada nas duas condições (presença e ausência de Cwc24) por espectrometria de massas.

Agradecimentos

FAPESP

Referências

ABELSON, N.J.; ARENAS, E.,J.; prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 94,pp.11798-11802, October 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

Gerace E, Moazed D. Coimmunoprecipitation of proteins from yeast. Methods Enzymol. 2014;541:13- 26. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00002-1.
PMID: 24674059; PMCID: PMC4370295. WILL, C.L; LÜHRMANN, R. Spliceossome structure and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a003707. 2011.

WU N-Y, CHUNG C-S, CHENG S-C. 2017. Role of Cwc24 in the first catalytic step of splicing and fidelity of 5'splice site selection. Mol Cell Biol 37:e00580-16. https://doi.org/0.1128/MCB.00580-16.

YAN, C.; WAN, R.; SHI, Y. Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing through Structural Biology of the Spliceosome. Cold Spring Harb Perspect Biol 2019;11:a032409.