



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Investigação das interações moleculares da Proteína  
Citoplasmática Ligante à cauda Poli(A): associação  
PABPC-PABPC

Ricardo Camargo

Brasília

2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Investigação das interações moleculares da Proteína  
Citoplasmática Ligante à cauda Poli(A): associação  
PABPC-PABPC

Ricardo Camargo

Orientador: Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2010

Banca examinadora:

Dr. Eduardo de Oliveira Melo (Embrapa (Cenargen) – Membro Titular)

Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas (UnB – Membro Titular)

Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo (UnB – Membro Titular)

Prof. Dr. Cezar Martins de Sá (UnB – Membro Suplente)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, com apoio financeiro da FAPDF e CNPq.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fátima e Sebastião, pelo apoio durante esta caminhada, pelo incentivo, amor e amizade, e também, por sempre acreditarem nos meus sonhos.

À minha grande companheira e namorada Leila. Obrigado por ter me ajudado tanto tanto tanto nessa jornada. Sem você isto tudo seria muito mais difícil. Amo te...

Ao prof. Cezar pela oportunidade e paciência, pelas discussões e pelo enorme aprendizado.

À profa. Beatriz pelo apoio, disposição e aprendizado. Sempre solícita nas horas mais importantes.

Aos meus irmãos, Marcelo e Eduardo, e cunhada Mariana, pela companhia e até mesmo pelas discussões em torno de um assunto tão “maluco”.

Aos meus parentes que mesmo de tão longe sempre me apoiaram e ficam felizes com as minhas conquistas. Em especial ao Phelipe.

Ao prof. Chicão pela oportunidade oferecida.

À toda galera do Laboratório Labiogene. Valeu pessoal, pela ajuda e disposição. Agradeço em especial a Liliam e a Marinez...sempre dispostas a ajudar, seja com palavras ou na tal preparação dos materiais.

Ao meu amigão Victor. Moleque, te devo várias! Os botecos sempre iluminaram minha cuca.

À prof. Sônia pelas valorosas discussões e pela oportunidade única de ir ao LNLS.

Ao pessoal da biofísica, Larissa e Adelson.

À toda a galera da biologia: Fakão, Tiago, Jubé e as meninas (Karina, Gabizona e Nat).

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
SIGLAS E ABREVIATURAS .....	2
RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO .....	6
1.1 Controle da Expressão Gênica .....	6
1.2 Processamento do mRNA (Capeamento/ <i>Splicing</i> /Poli(A)).....	7
1.3 Proteínas de Ligação à cauda poli(A) – Visão Geral.....	9
1.4 PABPC – Estrutura e associação ao Poli(A) .....	10
1.5 PABPC e a tradução .....	14
1.6 PABPC e estabilidade do mensageiro .....	20
1.7 Regulação da expressão da PABPC .....	22
1.8 PABP nuclear.....	24
1.9 Interação Proteína-Proteína mediada por motivos ricos em Prolina .....	25
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES .....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Materiais.....	30
3.1.1 Linhagens bacterianas.....	30
3.1.2 Anticorpos.....	30
3.1.3 Plasmídeos .....	30
3.1.4 Meios de cultura.....	31
3.1.5 Antibióticos .....	32
3.1.6 Soluções e Tampões de uso comum.....	32
3.1.7 Coquetel de inibidores de proteases.....	33
3.1.8 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	34
3.1.9 Soluções para purificação de proteínas com cauda de histidina .....	34

3.1.10 Soluções para purificação da PABPC de lisado de reticulócito de coelho .....	34
3.1.11 Tampão de Interação para <i>Pull-Down</i> .....	35
3.1.12 Soluções para géis SDS-PAGE .....	35
3.1.13 Soluções para géis de agarose.....	36
3.2 Métodos .....	36
3.2.1 Plasmídeos .....	36
3.2.2 Clonagem .....	37
3.2.3 Preparo de Células Competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.2.4 Transformação de Bactérias por choque térmico. ....	39
3.2.5 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> .....	39
3.2.6 Expressão induzida de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> .....	40
3.2.7 Purificação de proteínas recombinantes fusionadas com GST .....	41
3.2.8 Purificação de proteínas recombinantes contendo cauda de histidina .....	42
3.2.9 Purificação da PABPC de Lisado de Reticulócito de Coelho.....	43
3.2.10 Transcrição e tradução <i>in vitro</i> .....	43
3.2.11 Determinação da taxa de radioatividade incorporada.....	44
3.2.12 Eletroforeses.....	45
3.2.13 Experimentos de <i>Pull-down</i> .....	46
3.2.14 Western Blot .....	47
3.2.15 Quantificação do <i>Pull-down</i> das proteínas analisadas por <i>Western blot</i> . ....	48
3.2.16 Espalhamento de Luz Dinâmico – EDL .....	49
3.2.17 Teste Funcional da His-PABPC .....	50
3.2.18 Dicroísmo Circular .....	50
4. RESULTADOS .....	52
4.1 A PABPC em solução se comporta como um homodímero em ausência de poli(A).....	52
4.2 Construção dos plasmídeos utilizados neste trabalho. ....	53

4.3 Mapeamento das regiões responsáveis pela associação PABPC-PABPC independente de poli(A).....	56
4.3.1 Purificação das proteínas fusionadas com GST; transcrição e tradução <i>in vitro</i> da PABPC, P237-542 e P372-636.....	56
4.3.2 Ensaio de <i>Pull-Down</i> : avaliação do potencial de interação entre o N e o C-terminal da PABPC.....	57
4.4 Purificação da PABPC e de suas variantes truncadas fusionadas com histidina. ....	60
4.5 Análise do padrão estrutural e teste funcional da proteína recombinante His-PABPC.....	61
4.5.1 Dicroísmo Circular .....	61
4.5.2 Teste do potencial da proteína recombinante His-PABPC associar-se ao poli(A). ....	62
4.6. O RBD 4 juntamente com a sequência poliprolina são suficientes para que ocorra a associação PABPC-PABPC independente de poli(A).....	63
4.7. A associação PABPC-PABPC é incrementada na presença de poli(A) quando há mais de um RBD e a sequência poliprolina nos sistemas de interação. ....	66
5. DISCUSSÃO .....	68
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da proteína citoplasmática de ligação ao Poli(A).....	13
Figura 2. Funções da PABPC na tradução e estabilidade do mRNA.....	19
Figura 3. Proteína nuclear de ligação ao poli(A).....	24
Figura 4. Purificação da PABPC de coelho e análise de seu estado oligomérico por espalhamento dinâmico de luz em solução privada de poli(A).....	53
Figura 5. Diagrama das clonagens feitas neste trabalho.....	55
Figura 6. Purificação das proteínas fusionadas com GST; transcrição e tradução <i>in vitro</i> da PABPC, P237-542 e P372-636.....	57
Figura 7. Identificação das regiões envolvidas na interação PABPC-PABPC em ausência de poli(A).....	59
Figura 8. Gel da purificação da PABPC e de suas variantes truncadas fusionadas com histidina.....	60
Figura 9. Estudo por dicroísmo circular do padrão estrutural da proteína recombinante His-PABPC.....	62
Figura 10. Teste da capacidade da proteína recombinante His-PABPC associar-se ao poli(A).....	63
Figura 11. Delimitação das regiões envolvidas na interação PABPC-PABPC independente de poli(A).....	65
Figura 12. Estudo da influência do poli(A) na associação entre P237-542 e as proteínas fusionadas com GST.....	67
Figura 13. Modelo teórico das interações da PABPC e as suas implicações funcionais na síntese proteica.....	74



## SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

CPSF – Fator de especificidade de clivagem e poliadenilação

DCT – Domínio C-terminal

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTT – *dithiothreitol*

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EGTA – Ácido etileno-glicol-tetra-acético

eIF – Fator de iniciação da tradução de eucariotos

eRF – Fator de terminação da tradução de eucariotos

GST – Glutathione S-transferase

GTP – Guanosina trifosfato

HEPES - Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etano-sulfônico

IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

MOPS - 3-(N-morpholino) ácido propanosulfônico

mRNA – RNA mensageiro

NP-40 - Nonidet P-40

PABP – Proteína de ligação ao poli(A)

PABPC – PABP citoplasmática

PABPN – PABP nuclear

PAIP – Proteína de interação com a PABP

PAN – Poli(A) nuclease

PAP – Poli(A) polimerase

pARE – Elemento rico em poli(A)

PARN – Poli(A) ribonuclease

PBS – Tampão fosfato salino

PMSF - Fluoreto de fenilmetanosulfonil

poli(A) – Poliadenosinas

RBD – Domínio de reconhecimento ao RNA

RNP – Ribonucleoproteínas

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED - N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina

TLCK - N-p-tosil-L-lisil-clorometil cetona

TOP – Sequência terminal de oligopirimidinas

TPCK - N-p-tosil-L-fenilalanil-clorometil cetona

Tris - Trihidroximetil aminometano

UTR – Região não traduzida

## RESUMO

A proteína citoplasmática de ligação à cauda poli(A) dos RNAs mensageiros eucariotos (PABPC) desempenha papéis fundamentais em várias etapas da expressão gênica. A PABPC atua na biogênese, exportação nuclear, localização citoplasmática, tradução e meia-vida (*turnover*) dos mRNAs. A sua versatilidade encontra-se fundamentada em uma complexa rede de associações simultâneas entre proteínas e o mensageiro, mantidas por essa única cadeia polipeptídica. A PABPC foi identificada em todos os organismos eucariotos estudados e apresenta elevado nível de conservação da sua sequência primária, desde levedura até mamíferos. Uma PABPC típica tem uma massa molecular de aproximadamente 70 kDa e é composta por duas regiões estruturalmente bem definidas, N e C-terminal, conectadas por uma sequência peptídica não-estruturada rica em resíduos de prolina e glutamina. O N-terminal é formado por quatro domínios consecutivos de interação com o RNA (RBD – RNA *binding domain*), contendo cerca de 90 aminoácidos cada. O domínio C-terminal da PABPC é uma região composta por aproximadamente 75 aminoácidos, bastante estruturada e altamente conservada. Neste trabalho, nós investigamos os aspectos estruturais e moleculares envolvidos na interação da proteína citoplasmática de ligação ao poli(A) em uma associação do tipo PABPC-PABPC, tanto na ausência como na presença de um trato de poliadenosinas. Portanto, mostramos pela primeira vez que essa proteína se comporta como um homodímero em solução privada de poli(A). Observamos por experimentos de *Pull-down* que a interação entre PABPCs independente de poli(A) ocorre entre os seus RBDs (com no mínimo os RBDs 1 e 2) e a sua região intermediária, que compreende o quarto domínio e a região poliprolina. Além disso, também notamos que somente o RBD 4 juntamente com a sequência poliprolina são suficientes para que ocorra a associação PABPC-PABPC em ausência de poli(A). Curiosamente, a interação entre o N-terminal da PABPC e a sua região rica em prolinas foi incrementada na presença de poli(A). Baseados nestes resultados, propomos um modelo teórico no qual a interação PABPC-PABPC é um mecanismo hipotético de inibição a associação precoce de fatores de regulação e iniciação da tradução que utilizem a PABPC como arcabouço.

## ABSTRACT

The cytoplasmatic poly(A) binding protein (PABPC) plays fundamental roles in several steps of gene expression in eukaryotes. The PABPC operates in biogenesis, nuclear export, localization, translation and turnover of mRNAs. Its versatility is anchored in a complex network of simultaneous associations between proteins and the messenger, maintained by this unique polypeptidic chain. PABPC has been identified in all eukaryotes organisms studied showing high level of primary sequence conservation, from yeast until mammals. A typical PABPC has a molecular weight of approximately 70 kDa and It is composed of two well-defined regions, N and C-terminal, connected by an unstructured proline and glutamine-rich linker. The N-terminal is formed by four consecutive RNA binding domains (RBD), each containing approximately 90 amino acids. The C-terminal domain of PABPC is a region comprising approximately 75 amino acids, structured and highly conserved. In this work, we investigated molecular and structural aspects involved in the PABPC-PABPC association, in absence and presence of a poly(A) tract. Therefore, for the first time we showed that this protein behaves as a homodimer in privation of poly(A). We observed by pull-down experiments that the interaction between PABPCs independently of poly(A) occurs between their RBDs (with at least the RBDs 1 and 2) and its intermediary region, which comprises the fourth domain and the proline rich sequence. In addition, we also noted that the RBD 4 together with the polyproline region are sufficient to PABPC-PABPC association in absence of poly(A). Interestingly, the interaction between the N-terminal of PABPC and its proline rich sequence was increased in the presence of poly(A). Based in these results, we proposed a theoretical model that PABPC-PABPC interaction is a hypothetical inhibition mechanism that prevents early association of regulation and translation initiation factors that use PABPC as a scaffold.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Controle da Expressão Gênica

À medida que os conhecimentos sobre as bases moleculares do controle da expressão gênica avançam, nota-se a sua extraordinária complexidade em uma infinidade de mecanismos intrincados que necessitam atuar coordenadamente no tempo e no espaço para a manutenção da integridade dos sistemas biológicos. Estes mecanismos, alguns gerais e outros específicos para determinados grupos de organismos, tipos celulares e/ou situações fisiológicas, têm em comum o fato de usar como base a informação genética oriunda do DNA para codificar todas as moléculas de RNA e de proteínas necessárias.

A partir do ano de 2001 foram divulgados os resultados e as análises comparativas dos projetos de sequenciamento dos genomas do *Homo sapiens* (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) e do *Mus musculus* (Waterston et al., 2002). Nesse período, várias revelações tomaram conta da mídia científica. A mais inesperada foi a conclusão de que o genoma humano não passa de 30 mil genes, assim, contrariando as expectativas dos 100 mil. Outra constatação intrigante indicou que não existe uma correlação direta entre o número de cadeias polipeptídicas e o número de genes e conseqüentemente de RNAs mensageiros. E o resultado mais surpreendente para muitos dos cientistas engajados nesses projetos foi a descoberta de que menos de 1% do montante dos genes humanos não possuem correspondência funcional em camundongo. Esses dados mostram que praticamente toda a diferença biológica existente entre o homem e o camundongo não está contida no número ou nos diferentes tipos de genes e sim, na maneira como esses genes se expressam e se relacionam no espaço e no tempo. Logo, essas informações revelaram que decifrar genomas indiscriminadamente não é suficiente para elucidar as funções biológicas ou padrões fenotípicos observados na natureza. Portanto, a falta de correlação observada entre genes, níveis de mRNA e a respectiva expressão protéica, em eucariotos, mostraram que a dedução da abundância das proteínas a partir apenas da quantidade de genes e de mRNA é inconsistente (Gygi et al., 1999; Roberts et al., 2002). Isso, porque o nível de expressão de uma proteína depende não somente da velocidade de transcrição do

gene, mas também, de mecanismos de controles adicionais, tais como processamento pós-transcricional (e.g. splicing), exportação nuclear, localização do mRNA no citoplasma, estabilidade do transcrito, regulação traducional e pós-traducional. Conseqüentemente, os processos de biogênese do mRNA, controle pós-transcricional e, principalmente, a atividade da maquinaria de síntese protéica despertam grande interesse científico dentro do contexto do desenvolvimento embrionário (Mathews et al., 2000), em respostas aos estímulos extra-celulares (Hinnebusch, 1997), durante a infecção viral (Pestova et al., 1998), instalação de doenças humanas e, ainda, na apoptose (Holk et al., 2000). Desse modo, o estudo do controle da expressão gênica tem papel predominante no entendimento da intrincada rede de expressão e interações que constrói um indivíduo.

Diante dessa temática, decidimos investigar os aspectos estruturais e moleculares envolvidos na interação da proteína citoplasmática de ligação ao poli(A) (PABPC) em uma associação do tipo PABPC-PABPC. Essa proteína desempenha papéis fundamentais em várias etapas da expressão gênica. A sua versatilidade se reflete nas inúmeras interações que é capaz de manter com diversos fatores-chave para o metabolismo celular, envolvidos tanto com a biogênese e estabilidade, quanto com a tradutibilidade dos mRNAs. Sendo assim, a relevância da PABPC para a sobrevivência das células eucarióticas encontra-se fundamentada em uma complexa rede de associações entre proteínas e RNAs, mantidas por essa única cadeia polipeptídica, a qual incita enorme curiosidade científica, e por isso, é objeto de estudos de muitos grupos espalhados pelo mundo.

## **1.2 Processamento do mRNA (Capeamento/*Splicing*/Poli(A))**

Para entendermos os papéis da proteína de ligação à cauda poli(A) (PABP) no metabolismo celular é essencial compreendermos a biologia do mRNA. Em eucariotos, transcrever simplesmente a informação genética de um molde de DNA para um RNA não resulta na completa síntese de um RNA mensageiro funcional. Antes que o transcrito esteja pronto para ser exportado do núcleo, ele deve passar por três eventos principais de processamento até que se torne maduro, apto a engajar-se na síntese proteica. Portanto, o primeiro passo no processamento deste transcrito primário ou pré-mRNA é o capeamento. Assim que o transcrito nascente

atinge 20 a 30 nucleotídeos, um resíduo invertido de guanosina é adicionado em sua extremidade 5' por meio de uma ligação trifosfato 5'-5' realizada pela enzima guanililtransferase. Posteriormente, esta guanosina terminal sofre uma metilação na posição N7 catalisada pela enzima metiltransferase, gerando o popularmente conhecido *Cap* ( $m^7GpppN$  – N é qualquer nucleotídeo) (Revisado em Shatkin e Manley, 2000). A presença do *Cap* é fundamental para os eventos subsequentes de processamento, transporte, tradução e estabilidade dos mRNAs, conforme será visto adiante (Sachs et al., 1997; Gillian-Daniel et al., 1998; Gingras et al., 1999a; Tucker e Parker, 2000; Sonenberg et al., 2000).

Salvo algumas exceções, em eucariotos os pré-mRNAs apresentam dois tipos de sequências: os éxons, porção codificadora dos transcritos primários que estão presentes no mRNA maduro; e os íntrons, sequências que não estão presentes no mRNA maduro e, portanto, não codificam nenhum aminoácido da proteína a ser sintetizada. Para que uma mensagem funcional seja gerada a partir de um gene, os íntrons devem ser removidos do pré-mRNA e os éxons unidos corretamente. Esse processo é denominado de *splicing*. No pré-mRNA existem elementos *consensus* em *cis* que são essenciais para a reação de *splicing*. Dentre eles, estão as sequências conservadas limítrofes da junção éxon-íntron e um importante ponto interno, chamado de ponto de ramificação, composto por uma adenosina seguida por um trato rico em pirimidinas situados entre 20 e 50 nucleotídeos a montante da região de quebra 3'. (Revisado em Proudfoot, 2002). O *Splicing* é catalisado por um grande complexo ribonucleoproteico (spliceossomo), e envolve duas reações de transesterificação sequenciais entre os nucleotídeos dos elementos *consensus*, culminando na junção éxon-éxon (Moore e Sharp, 1993; Kramer, 1996; Burger e et al., 1999).

Outra importante modificação pós-transcricional presente em praticamente todos os mRNAs de eucariotos (exceto os mRNAs histônicos) é a adição de uma cauda de poliadenosinas (poli(A)) na extremidade 3' do transcrito. A adição desta cauda influencia o término da transcrição e determina o final do mensageiro. A sua formação é direcionada por sequências específicas presentes no pré-mRNA e pela maquinaria de poliadenilação, composta por pelo menos seis diferentes fatores proteicos. Antes da adição do poli(A), o pré-mRNA deve ser clivado. Nos metazoários, o sítio de clivagem na maioria dos transcritos primários fica entre a sequência conservada AAUAAA e a sequência à jusante rica em nucleotídeos GU.

O motivo AAUAAA é reconhecido pelo fator específico de clivagem e poliadenilação CPSF, enquanto que os nucleotídeos GU são reconhecidos pelo fator de estimulação da clivagem CstF. A associação cooperativa entre esses dois fatores determinará o sítio de clivagem e poliadenilação do mRNA (Wahle e Ruegsegger, 1999). Os processos de clivagem e poliadenilação também requerem a associação de mais dois fatores de clivagem, CFI e CFII. Esses dois fatores, juntamente com o CPSF, CstF e a PABP nuclear, irão recrutar e ativar a enzima responsável pela poliadenilação, a poli(A) polimerase nuclear (PAP) (Colgan e Manley, 1997; Keller e Minvielle-Sebastia, 1997; Minvielle-Sebastia et al., 1997; Millevoi e Vagner, 2009). Entretanto, a polimerização das primeiras adenosinas ocorre de maneira lenta, e só entrará num ritmo processivo (rápido e contínuo) com a associação da PABP nuclear à cauda poli(A) nascente (Bienroth et al., 1993; Wahle, 1995). A regulação da extensão da cauda poli(A) envolve tanto a participação da PABP nuclear quanto a da PABP citoplasmática, que está presente no núcleo e no citoplasma. (Mangus et al., 2003; Kuhn e Wahle, 2004; Kuhn et al., 2009). Terminada a etapa de polimerização, as caudas de poli(A) recém sintetizadas, dos mais diferentes mRNAs, apresentam-se relativamente homogêneas em comprimento, contendo cerca de 200-250 resíduos de adeninas em mamíferos e 70-90 em leveduras (Jacobson, 1996).

Após o capeamento, *splicing* e adição da cauda poliadenilada, os mRNAs são considerados maduros, para posteriormente serem exportados para o citoplasma na forma de mRNPs, onde serão traduzidos (Dreyfuss et al., 1993; Dreyfuss et al., 1996; Gesteland et al., 1999).

### **1.3 Proteínas de Ligação à cauda poli(A) – Visão Geral**

Conforme visto anteriormente, caudas de poliadenosinas (poli(A)) são adicionadas ao terminal 3' de quase todos os mRNAs eucarióticos durante o processamento pós-transcricional. A sua estrutura homopolimérica única permite a associação sequência-específica com proteínas de ligação à cauda poli(A) (PABP - *Poly(A)-Binding Protein*). Estas proteínas foram identificadas em vários eucariotos, mas estão ausentes nos procaríotos. Elas desempenham papéis cruciais nas vias de expressão gênica quando associadas ao poli(A) de mRNAs recém sintetizados ou



maduros. Agem como efetores em *cis* em etapas específicas da poliadenilação, exportação nuclear, localização citoplasmática, tradução e ciclagem (*turnover*) dos transcritos. Sem atividade catalítica evidente, as PABPs servem como arcabouço para a ligação de fatores que regulam essas etapas da expressão gênica. Dois tipos de PABPs evolutivamente conservadas foram descritos em detalhes: a PABP citoplasmática (PABPC) e a PABP nuclear (PABPN). A PABPC, em vários dos organismos estudados, apresenta multiplicidade gênica (Mangus et al., 2003). Em humanos, por exemplo, quatro genes foram identificados: PABPC1 (a PABPC majoritária), PABPC3 (específica de testículo, mais relacionada à PABPC1), iPABP (induzida, superexpressa em linfócitos T) e PABPC5 (ligada ao cromossomo X), além deles mais quatro pseudogenes estão presentes (Mangus et al., 2003; Baer et al., 1980; Baer et al., 1983; Sachs et al., 1987). A identidade de sequência entre as PABPCs humanas é da ordem de 60 a 90%. Mas, ainda não foram identificadas diferenças nas funções biológicas entre essas proteínas. Em contrapartida, apenas um gene foi identificado como codificador da PABPN em metazoários e leveduras (Mangus et al., 2003).

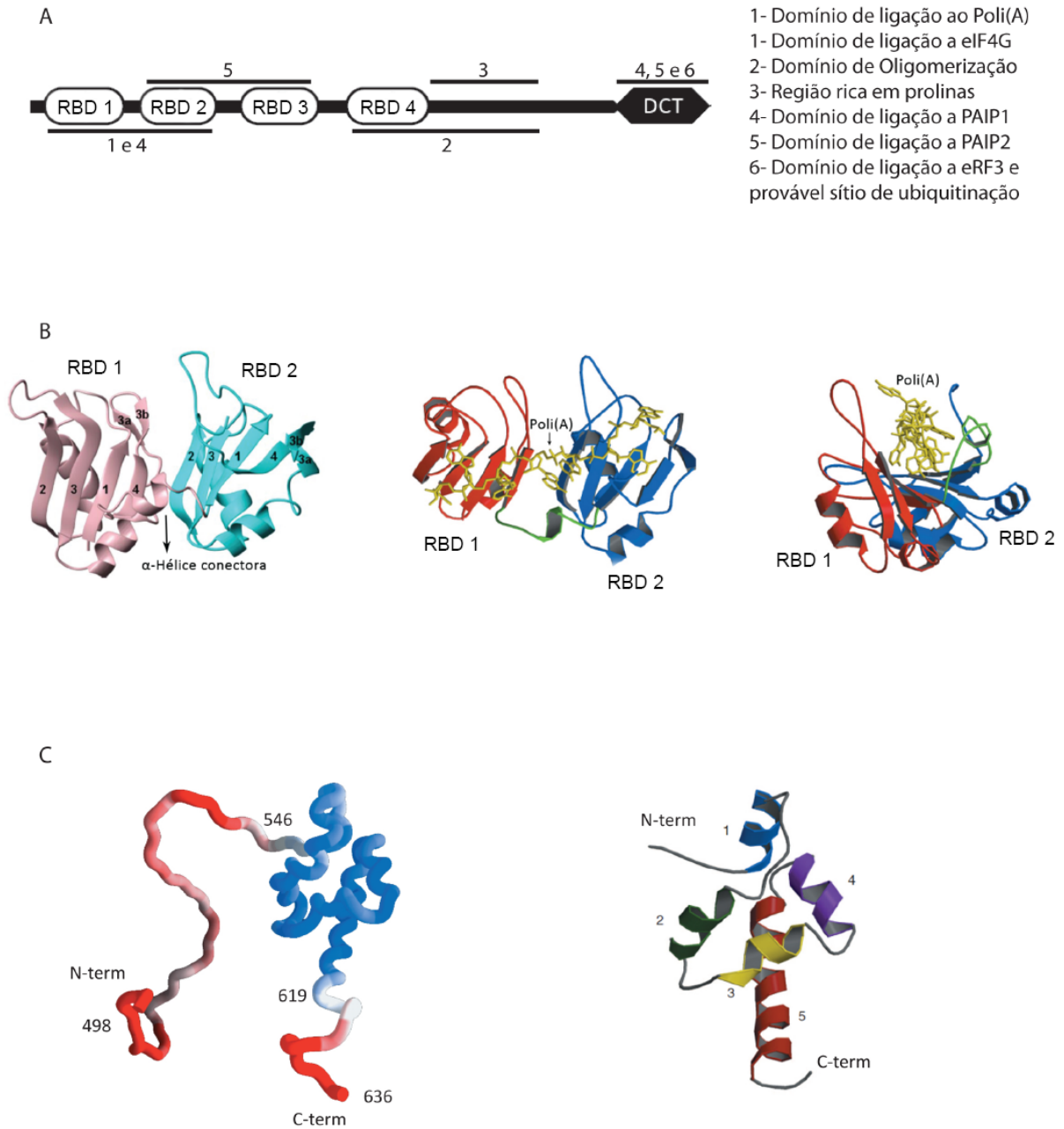
#### **1.4 PABPC – Estrutura e associação ao Poli(A)**

Descoberta em meados de 1973 (Blobel, 1973), a proteína citoplasmática de ligação à cauda poli(A) (daqui em diante descrita em termos da majoritária) está presente em todos os eucariotos e desempenha papéis importantes em pelo menos dois processos, tradução e estabilidade do mRNA (Adam et al., 1986; Sachs et al., 1986). A PABPC encontra-se amplamente distribuída em todos os tipos celulares, sendo uma das principais proteínas constituintes do complexo ribonucleoprotéico (RNP), forma funcional dos mRNAs eucariotos (Blobel, 1973; Vicent et al., 1981; Dreyfuss et al., 1993). A PABPC é uma proteína estável e abundante (cerca de  $8 \times 10^6$  moléculas em células HeLa), tendo uma representatividade cerca de seis vezes maior do que o número de ribossomos por célula (Görlach et al., 1994). De maneira geral, uma PABPC típica tem uma massa molecular de aproximadamente 70 kDa e é composta por duas regiões estruturalmente bem definidas, N e C-terminal, conectadas por uma sequência peptídica não-estruturada rica em resíduos de prolina e glutamina (Fig. 1A) (Adam et al., 1986; Sachs et al., 1986). O N-terminal

é formado por quatro domínios consecutivos de interação com o RNA (RBD – RNA *binding domain*), contendo cerca de 90 aminoácidos cada, interligados por pequenas sequências aminoacídicas. O RBD é o domínio mais comum encontrado em proteínas que se associam à RNAs, já descrito em pelo menos duzentas proteínas deste tipo, sugerindo que este é um domínio ancestral com grande importância na biologia dos ácidos ribonucléicos (Deo et al., 1999). Estudos utilizando ressonância nuclear magnética e cristalografia de raios-X determinaram que os RBDs, de modo geral, são domínios globulares, cada um composto por quatro fitas- $\beta$  antiparalelas envoltas por duas  $\alpha$ -hélices em um arranjo  $\beta\beta\beta\beta$  (Deo et al., 1999; Clery et al., 2008) (Fig. 1B). Dois motivos com sequências conservadas estão localizados nas duas fitas- $\beta$  centrais fazendo contato com o RNA, o octanário RNP1 ((K/R) -G-(F/Y)-(G/A)-F-V-X(F/Y), X é qualquer aminoácido) e o hexamérico RNP2 (((L/I)-(F/Y)-(V/I)-(G/K)-(N/G)-(L/M)). Análises filogenéticas sugerem que os quatro RBDs originaram-se de duplicações sucessivas antes da divergência de leveduras e mamíferos (Fukami-Kobayashi et al., 1993). Os dois primeiros RBDs formam uma unidade funcional e os dois últimos uma segunda. Essa conclusão é derivada em parte da observação de que resíduos de aminoácidos que participam no reconhecimento do RNA presentes no RBD1 são mais similares aos do RBD3, enquanto que os do RBD2 são mais similares aos do RBD4 (Deo et al., 1999). Embora todos os RBDs da PABPC sejam capazes de se ligar ao RNA, eles não são funcionalmente equivalentes, já que possuem afinidades diferentes pelo poli(A) (Kuhn e Pieler, 1996). Sendo assim, os dois primeiros RBDs juntos são os principais responsáveis pelo reconhecimento e ligação à cauda poliadenilada (Fig. 1B), com afinidade de 2-7 nM ( $K_d$ ) (Görlach et al., 1994; Kuhn e Pieler, 1996). O segundo RBD é responsável também pela interação com o importante fator de iniciação da tradução eIF4G (Kuhn e Pieler, 1996). A associação da PABPC com o poli(A) exige um sítio de ligação de no mínimo 12 adenosinas, logo, múltiplas cópias de PABPC podem se ligar a um mesmo trato de poli(A), formando unidades repetidas que cobrem  $\approx$  27 nucleotídeos (Baer et al., 1980; Baer et al., 1983; Sachs et al., 1986; Sachs et al., 1987).

Acredita-se que a região rica em prolina e glutaminas, o primeiro um terço do C-terminal, esteja envolvida com a multimerização entre moléculas de PABPC, facilitando a sua ligação à cauda poli(A) (Fig. 1) (Kuhn e Pieler, 1996; Melo et al., 2003). Esta região será abordada com mais detalhes adiante.

O domínio C-terminal da PABPC é uma região composta por aproximadamente 75 aminoácidos, bastante estruturada e altamente conservada. Em humanos, ele é composto por cinco  $\alpha$ -hélices (Fig. 1C), enquanto que em leveduras apresenta apenas quatro, faltando o ortólogo a primeira hélice (Kozlov et al., 2001; Kozlov et al., 2002). O domínio C-terminal apresenta sítios de interação com fatores reguladores da poliadenilação, deadenilação, iniciação e terminação da tradução, mas não é requerido para o reconhecimento e ligação ao RNA (Kozlov et al., 2001; Deo et al., 2001; Khaleghpour et al., 2001b).



**Figura 1. Estrutura da proteína citoplasmática de ligação ao Poli(A).** (A) Esquema da estruturada proteína PABPC e localização dos seus domínios funcionais (Adaptado de Melo (2003)). (B) Representações da estrutura tridimensional dos RBDs 1 e 2 da PABPC humana sem ou com associação ao poli(A). Esses modelos evidenciam a composição característica dos RBDs: quatro fitas- $\beta$  e duas  $\alpha$ -hélices (retirado com modificações de Deo et al. (1999)). (C) Representação da estrutura tridimensional da segunda metade do C-terminal da PABPC humana. Nesta figura visualizamos parte da região não estruturada rica em prolínas e o domínio C-Terminal (em azul). À direita, a representação detalhada das cinco  $\alpha$ -hélices que compõem o domínio C-terminal (retirado com modificações de Kozlov et al. (2001)).

## 1.5 PABPC e a tradução

Como a síntese proteica é responsável por grande parte do gasto de energia de uma célula em crescimento, a interrupção da tradução ou a presença de um peptídeo incompleto seria extremamente desfavorável para o balanço energético do organismo (Hilleren e Parker, 1999; González et al., 2001). Logo, a iniciação da tradução é uma etapa altamente complexa e regulada da expressão gênica. Neste evento, participam uma grande variedade de fatores denominados eIFs (*eukaryotic initiation factors*), além de outras várias proteínas, dentre elas a PABPC.

A maioria dos mRNAs possui em sua extremidade 5' uma 7-metil-guanosina ( $m^7GpppN$ ), que foi adicionada enzimaticamente durante a transcrição (ver na seção 1.2). Esta estrutura, conhecida como *Cap*, desempenha papéis importantes no *splicing*, na estabilização, no transporte, assim como na tradução do transcrito por interagir com o fator de iniciação da tradução eIF4F. eIF4F é um complexo heterotrimérico composto por uma subunidade que se liga ao *Cap* (eIF4E); uma RNA helicase ATP-dependente (eIF4A); e eIF4G, uma proteína de grande massa molecular que atua como arcabouço para a ligação de eIF4E, eIF4A, PABPC e outras proteínas (Fig. 2b) (Gingras et al., 1999; Hentze, 1997; Hershey e Merrick, 2000). O *Cap* por si só já é um potente determinante da eficiência de tradução do mRNA. Entretanto, ele atua mais fortemente em cooperação com a cauda poli(A). Em animais, plantas e leveduras, os mRNAs que possuem *Cap* e poli(A) são traduzidos muito mais eficientemente do que mensageiros possuidores de apenas uma dessas estruturas. Portanto, o efeito estimulatório dessas duas estruturas é sinérgico (Gallie, 1991; Jacobson, 1996).

Após a chegada do mensageiro ao citoplasma, o complexo poli(A)-PABPC promove a interação entre os terminais 5'-3', resultando na circularização do mRNA e, por consequência, a iniciação da tradução é estimulada (Jacobson, 1996; Tarun e Sachs, 1996; Amrani, 2008). A formação desse *loop* fechado, conforme demonstrado por Sachs e colegas (Tarun e Sachs, 1996; Tarun et al., 1997; Wells et al., 1998), é dependente principalmente da interação eIF4E-eIF4G-PABPC e está envolvida na promoção do recrutamento da subunidade 40S do ribossomo e na reciclagem dos ribossomos do terminal 3' para o 5' de um mesmo mRNA, facilitando o processo de reiniciação da tradução (Fig. 2) (Sachs, 2000; Svitkin e Sonenberg, 2006). eIF4G é o elo fundamental para esta circularização, visto que interage

concomitantemente com eIF4E e PABPC. Além disso, a combinação dessas interações cooperativas aumenta a afinidade de eIF4E pelo *Cap* (Haghighat et al., 1997; Ptushkina, 1998; Borman et al., 2000; Luo e Goss, 2001), estimula a ligação da PABPC ao RNA (Le et al., 1997), e incrementa as atividades de ATPase e helicase de eIF4A e as atividades de eIF4B (Bi e Goss, 2000). Todavia, a relação da PABPC com o processo de tradução não está limitada apenas a sua interação com o complexo eIF4F. A PABPC parece estar envolvida no processo de recrutamento da subunidade ribossomal 60S durante o reconhecimento do códon de iniciação e formação do complexo ribossômico 80S. Isso, por meio de sua interação com o fator eIF5B (Munroe e Jacobson, 1990a; Munroe e Jacobson, 1990b; Searfoss et al., 2001).

Ainda, foi demonstrado em células de mamíferos que a PABPC pode ser regulada por duas proteínas: PAIP1 e PAIP2 (*PABP interaction Protein*). PAIP1 (homóloga ao domínio central de eIF4G) está relacionada com o estímulo da tradução (Craig et al., 1998). Esta proteína (com massa molecular  $\approx 45$  kDa) interage com a PABPC em dois domínios independentes, numa estequiometria de 1:1. A extremidade C-terminal de PAIP1 associa-se com o primeiro e o segundo RBD da PABPC, ao mesmo tempo em que o domínio de ligação presente na metade N-terminal de PAIP1 se liga à extremidade C-terminal da PABPC em sua porção mais conservada (Roy et al., 2002). Foi demonstrado que a região de PAIP1 homóloga à eIF4G tem a capacidade de se associar à RNA helicase eIF4A e estimular a tradução de um mRNA repórter quando PAIP1 é superexpressa em culturas de células (Craig et al., 1998). Em um estudo recente, foi observado que PAIP1 em associação com a PABPC é capaz de se ligar ao fator eIF3, estimulando a iniciação da síntese protéica por facilitar e estabilizar a montagem do ribossomo 80S (Martineau et al., 2008). Contudo, a interação da PABPC com PAIP1 é antagonizada pela associação competitiva com PAIP2, que age como repressor da tradução (Khaleghpour et al., 2001a). PAIP2 (com massa molecular de  $\approx 14$  kDa) se liga a PABPC também por meio de dois domínios com uma estequiometria de 2:1 (PAIP2:PABPC). Onde uma molécula de PAIP2 se liga ao segundo e ao terceiro RBD da PABPC, enquanto que uma segunda molécula de PAIP2 interage com a extremidade do domínio C-terminal da PABPC (Khaleghpour et al., 2001b). Embora, a PABPC e PAIP2 formem um complexo trimérico, apenas uma dessas interações (entre os RBDs 2-3 da PABPC e PAIP2) é importante para a atividade inibitória de

PAIP2 (Khaleghpour et al., 2001a; Khaleghpour et al., 2001b). Um modelo sugere que a associação de PAIP2 com a PABPC enfraquece a sua afinidade pela cauda poli(A), facilitando a ruptura da estrutura circular do mRNA (Khaleghpour et al., 2001a; Karim et al., 2006).

Não obstante, a determinação da função da PABPC durante a iniciação da tradução ainda não está esclarecida, pois a participação de vários domínios da PABPC de maneira independente no estímulo da tradução torna a dissecção do papel desta molécula no processo de tradução uma tarefa extremamente complexa. Além do mais, a participação da PABPC na tradução não está restrita apenas ao processo de iniciação, já que esta proteína também é capaz de interagir por meio de seu domínio C-terminal com o fator de terminação da tradução eRF3 (Fig. 2d) (Hoshino et al., 1999). A terminação da tradução e a liberação do polipeptídeo do ribossomo em eucariotos necessita do fator eRF1, que por sua vez é ativado por eRF3 (Kisselev et al., 2003). Logo, a interação da PABPC com eRF3 aumenta a eficiência da terminação da tradução (Cosson et al., 2002), e a inibição dessa ligação interfere na síntese protéica (Uchida et al., 2002). Desse modo, a associação simultânea da PABPC com eRF3 e eIF4G resulta na aproximação dos códons de terminação e iniciação da tradução favorecendo a reciclagem dos ribossomos (Fig. 2d) (Uchida et al., 2002). Por outro lado, estudos apontam que a interação de eRF3 com o C-terminal da PABPC parece minimizar a capacidade de multimerização dos monômeros de PABPC na cauda poli(A). Este fato possibilita o acesso de enzimas desadeniladoras ou nucleases ao mensageiro e, em última instância, provocará o seu decaimento. (Hoshino et al., 1999). Portanto, essa intrincada rede de interações entre os mais diversos fatores envolvidos nas etapas da tradução e a PABPC fazem com que o seu efeito estimulatório sobre a síntese protéica seja exercido distintamente tanto na presença quanto na ausência do *Cap* (via IRES – ver adiante). (Preiss e Hentze, 1998; Otero et al., 1999; Michel et al., 2000).

Um dos mais espetaculares exemplos da ação da associação PABPC-cauda poli(A) encontra-se no mecanismo de silenciamento da tradução dos mRNAs da célula hospedeira durante uma infecção viral, provocando a substituição forçada da tradução das proteínas da célula pelas proteínas virais.

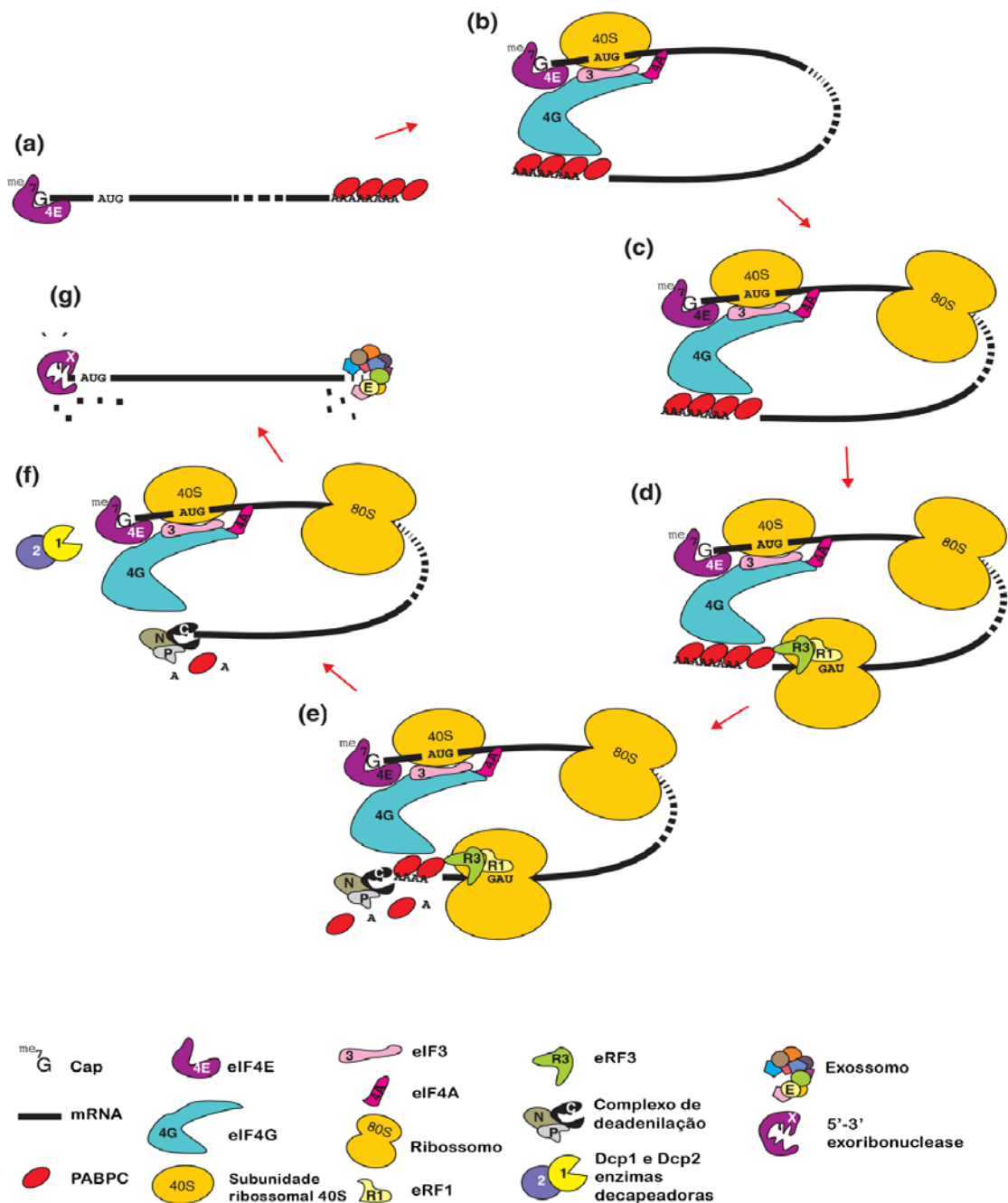
Ao infectar seu hospedeiro eucarioto, o vírus necessita da maquinaria de tradução da célula para sintetizar suas proteínas constituintes. E um dos maiores indicativos do papel central e fundamental da PABPC no controle da tradução se

deve ao fato desta proteína ser um dos principais alvos de inativação da tradução dos mensageiros nas células hospedeiras, tornando quase que exclusiva a síntese proteica a partir dos mRNAs virais. Um exemplo curioso disso é a clivagem da PABPC pelas proteases 2A e 3C de Enterovírus e também pela protease B3 2A de Coxsackievírus (Joachims et al., 1999; Kerekatte et al., 1999). Além da degradação da PABPC, essas proteases clivam eIF4G retirando o seu domínio de interação com a PABPC. Contudo, os mRNAs virais escapariam da inativação por possuírem sítios internos de entrada para o ribossomo (IRES) em sua estrutura (Pe'ery e Mathews, 2000). Os IRES são exceção ao modelo de tradução por varredura dependente de *Cap*. Esses elementos formam estruturas secundárias na extremidade 5' do mensageiro capazes de recrutar a subunidade ribossomal 40S diretamente para o códon iniciador, sem a necessidade de reconhecimento do *Cap* (Hellen e Sarnow, 2001; Vagner et al., 2001; Pestova et al., 2001). Outro mecanismo de escravização da maquinaria de tradução é o utilizado pelos Rotavírus. A proteína rotaviral NSP3 se associa a sequências específicas na região 3' dos mRNAs virais, circularizando efetivamente estes transcritos mimetizando a PABPC. Sendo assim, esta proteína atua sinergicamente com o *Cap* na síntese proteica por meio de sua interação com eIF4G, curiosamente na mesma região empregada pela PABPC (Vende et al., 2000). Logo, NSP3 compete com a PABPC pelo eIF4G, reduzindo ou interrompendo a tradução dos mensageiros da própria célula (Piron et al., 1998; Borman et al., 2000).

Outro exemplo bastante interessante do papel da PABPC em associação com a cauda poli(A) na síntese proteica foi observado no controle da expressão gênica durante a fase inicial do desenvolvimento dos metazoários. Nas primeiras etapas que antecedem à fecundação (maturação dos ovócitos) e em seguida, durante as primeiras divisões celulares do embrião, o processo de transcrição encontra-se quase totalmente latente e praticamente toda a expressão gênica advém dos mRNAs maternos. Esses mensageiros ficam estocados em estado de dormência no citoplasma do ovócito/zigoto devido principalmente ao encurtamento da cauda poli(A) durante a formação do gameta (Rosenthal et al., 1983; Rosenthal et al., 1986). O mecanismo de ativação da tradução dos mRNAs maternos ocorre em grande parte por meio da poliadenilação citoplasmática, que estende a cauda poli(A) até o seu tamanho natural tornando-a apta à tradução (Kuge e Richter, 1995; Barkoff



et al., 1998; Stutz et al., 1998, Radford et al., 2008). Portanto, a extensão da cauda poli(A) e sua associação com a PABPC demonstram o envolvimento desta proteína com o estímulo da tradução dos mRNAs maternos, dos quais, os produtos guiarão a maturação do ovócito e o início do desenvolvimento embrionário (Wormington et al., 1996; de Moor e Richter, 1999).



**Figura 2. Funções da PABPC na tradução e estabilidade do mRNA.** Esse modelo representa os diferentes estágios do “ciclo de vida” de um mRNA no citoplasma, no qual podemos notar as várias funções atribuídas à PABPC. (a) Ao chegar ao citoplasma a PABPC se associa com a cauda poli(A) do mensageiro. (b) A interação da PABPC com o fator eIF4G promove a circularização do mRNA, portanto, (c) estimula a iniciação da tradução ao mesmo tempo que antagoniza o decapeamento do transcrito. (d) A interação da PABPC com o fator de terminação eRF3 aproxima os códons de iniciação e terminação, favorecendo o reinício da síntese protéica por meio da reciclagem dos ribossomos da extremidade 3' para a 5' de um mesmo mRNA. (e) O início da degradação do mRNA é marcado pela dissociação da PABPC e encurtamento da cauda poli(A) pelo complexo de deadenilação. (f) A perda da cauda poli(A) facilita a dissociação das proteínas do mRNP e o decapeamento por meio das enzimas decapeadoras Dcp1 e Dcp2. (g) Agora, o mRNA está suscetível à degradação tanto pela exoribonuclease 5'-3' quanto pelo Exossomo 3'-5' (Retirado com modificações de Mangus et al. (2003)).

## 1.6 PABPC e estabilidade do mensageiro

Assim como a tradução, a meia vida de um mRNA no citoplasma tem profundas consequências na determinação dos níveis de expressão das proteínas. Desse modo, as células eucariotas desenvolveram maneiras de modular a taxa de degradação do mRNA como meio de controlar a expressão de uma grande variedade de transcritos. Portanto, a regulação da estabilidade do mRNA é uma vantajosa adaptação que permite a célula manter um transcrito traduzível sem que haja gastos excedentes de energia com a transcrição, processamento e transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma. Nessas condições, a célula responde prontamente às mudanças dos estímulos intra e extracelulares (Guhaniyogi e Brewer, 2001). Dois mecanismos gerais de decaimento do mRNA foram descritos em leveduras (Caponigro e Parker, 1996; Tucker e Parker, 2000; Parker e Song, 2004). Ambos tem como passo chave no processo de degradação do mensageiro o encurtamento e a remoção da cauda poli(A) pela poli(A) 3' ribonuclease (PARN) (Fig. 2e) (Jacobson e Peltz, 1996; Boeck et al., 1996; Brown et al., 1996; Decker e Parker, 2002; Uchida et al., 2003). No primeiro mecanismo, este fato está intimamente relacionado com a remoção do *Cap* pelas enzimas decapadoras Dcp1 e Dcp2 permitindo o acesso de exonucleases 5'-3' ao mRNA (Fig. 2f-g) (Tucker e Parker, 2000). A remoção do *Cap* acontece no final do processo de retirada do poli(A) tanto em leveduras (Caponigro e Parker, 1995; Bonnerot et al., 2000), quanto em mamíferos (Couttet et al., 1997). Alternativamente a este mecanismo de decapamento dependente de desadenilação, o mRNA pode ser degradado diretamente pela extremidade 3' logo após a remoção da cauda poli(A). Como principal proteína associada à cauda poli(A), a PABPC tem participação decisiva no processo de degradação dos mRNAs (Bernstein et al., 1989a; Bernstein e Ross, 1989b). A PABPC participa como modulador negativo da taxa de remoção da cauda poli(A) por estabilizar eIF4F e impedir o acesso de ribonucleases aos terminais 5' e 3' do mensageiro, e também, por influenciar a hidrólise do *Cap*, já que esta proteína é um forte inibidor das enzimas de remoção desta estrutura (Caponigro e Parker, 1996; Tucker e Parker, 2000; Parker e Song, 2004). Além disso, a PABPC é capaz de impedir a montagem do complexo exossomo responsável pela via de degradação no sentido 3'-5' (Ford et al., 1997) (Fig. 2g) e, ainda, pode associar-se com as subunidades CCR4-NOT1 do complexo de desadenilação, inibindo efetivamente a

sua função degradativa (Zekri et al., 2009). Como exemplo do papel da PABPC na estabilidade de mRNAs, foi demonstrado *in vitro* que o excesso de poli(A) atua como um competidor efetivo pela associação da PABPC com o mRNA (Jacobson e Favreau, 1983; Bernstein et al., 1989a; Ford et al., 1997; Wilusz et al., 2001). Tal competição acelera a taxa de encurtamento da cauda poli(A) do mRNA, indicando que a presença da PABPC exerce um efeito protetor ao terminal 3' do mensageiro (Lamphear et al., 1995; Otero et al., 1999; Wilusz et al., 2001). Na verdade, poderia se dizer que a cauda poli(A) serve unicamente para recrutar as moléculas de PABPC para a extremidade 3' do mRNA, pois esta proteína é capaz de manter a estabilidade dos mensageiros mesmo após a deleção dos RBDs 1 e 2, desde que seja artificialmente alojada na extremidade 3' do mensageiro (Coller et al., 1998). Em contraste, uma proteína contendo os RBDs 1 a 3 estimula a tradução, mas não a estabilidade (Coller et al., 1998; Gray et al., 2000). Coller e colegas (1998) observaram que a capacidade da PABPC em promover a estabilização do mRNA, parece ser exercida pelo quarto RBD juntamente com a região rica em prolinas de seu C-terminal.

A PABPC também influencia o decaimento do mRNA interagindo com proteínas regulatórias, modulando as suas atividades ou sofrendo modulações. Duas proteínas que se ligam ao 3'UTR do mRNA da  $\alpha$ -globina e aumenta a sua estabilidade,  $\alpha$ CP1 e  $\alpha$ CP2, interagem com a PABPC (Wang et al., 1999). Aparentemente, a PABPC estimula a associação das proteínas  $\alpha$ CP às sequências -alvo no terminal 3' do transcrito, ao mesmo tempo que bloqueia o acesso da endonuclease ErEN ao seu sítio específico (Wang e Kiledjian, 2000). Curiosamente, a ligação da PABPC à cauda poli(A) é reciprocamente aumentada pelas proteínas  $\alpha$ CP, indicando que a estabilização do mRNA da  $\alpha$ -globina é mediado por múltiplos eventos interdependentes (Wang e Kiledjian, 2000). A PABPC também participa da estabilidade do mensageiro do gene *c-fos*. Ela faz parte de um complexo protéico que reconhece um elemento determinante de instabilidade (mCRD) presente na região codante do mRNA deste gene. Este complexo é formado pelas proteínas PABPC, PAIP1, hnRNPd, NSAP1 e Unr, e com a tradução e a passagem do ribossomo pela região mCRD essas associações são perturbadas, culminando no encurtamento da cauda poli(A) (Shyu et al., 1991; Grosset et al., 2000). Como discutido acima, a PABPC também interage com o fator de terminação eRF3, e a consequência disso é o decréscimo no número de multímeros de PABPCs

associados à cauda poli(A). Essa observação sugere a existência de um *link* entre a terminação da tradução e o encurtamento da cauda poli(A), e isso seria um mecanismo de regulação temporal que limitaria a meia vida da cauda poli(A), conseqüentemente, a do mensageiro em questão (Hoshino et al., 1999).

Recentemente, foi investigado o papel da PABPC na modulação da função de microRNAs (miRNAs) no controle da expressão gênica (Zekri et al., 2009; Walters et al., 2010). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores, contendo de 20-24 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente em plantas e animais (Lewis et al. 2005; Kim e Nam, 2006; Bushati e Cohen, 2007). Esses pequenos RNAs são previamente processados e só então carregados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (revisado em Kim, 2005). Neste complexo, o miRNA se associa por complementaridade de bases à sítios-específicos na 3'UTR de seus mensageiros-alvos, podendo bloquear a tradução ou degradar estes transcritos (Bushati e Cohen, 2007). Embora, os mecanismos moleculares deste tipo de regulação não estejam muito bem documentados, há evidências de que a associação miRNA-mRNA estimula a desadenilação do mensageiro (Wakiyama e cols., 2007) e conseqüentemente, a sua degradação (Behm-Ansmant et al. 2006; Giraldez et al. 2006; Wu et al. 2006; Eulalio et al. 2009). Portanto, a associação da PABPC com a cauda poli(A) parece exercer um papel protetor ao mensageiro, preservando a sua expressão por inibir a desadenilação influenciada por miRNAs (Zekri et al., 2009; Walters et al., 2010). Mas, outros estudos precisam ser feitos para elucidar os mecanismos de repressão dependentes de miRNAs.

### **1.7 Regulação da expressão da PABPC**

A relevância da PABPC no metabolismo celular evidencia a necessidade de que a sua síntese seja perfeitamente ajustada em resposta a diferentes condições, estímulos externos e internos e ao crescimento celular. Sendo assim, a regulação da expressão da PABPC ocorre tanto ao nível transcricional quanto traducional. Entretanto, o mecanismo de regulação da tradução da PABPC foi o único abordado experimentalmente de modo que suas bases de funcionamento encontram-se melhor compreendidas. Estudos provaram que a expressão da PABPC é regulada principalmente por um mecanismo traducional de autorrepressão. Este mecanismo

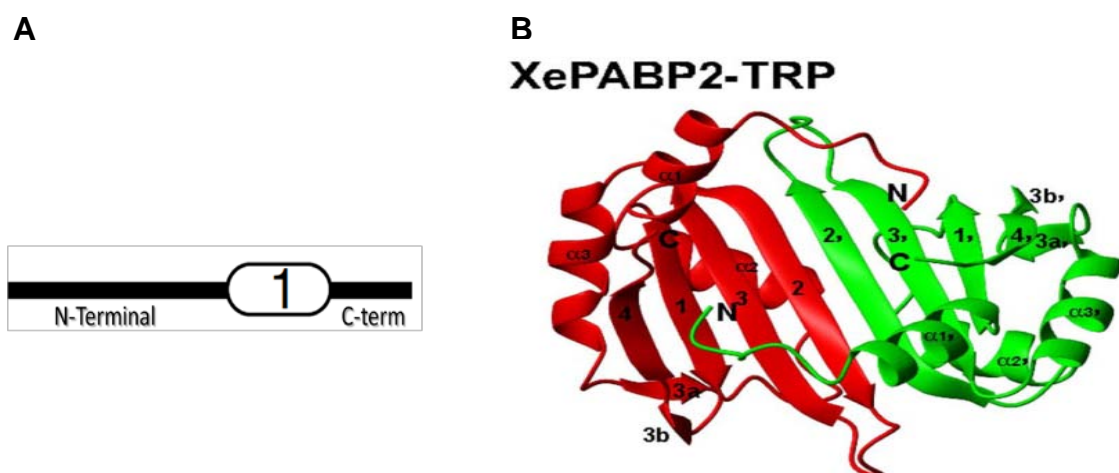
foi primeiramente demonstrado e confirmado *in vitro* (de Melo Neto et al., 1995; Melo et al., 2003) e *in vivo* (Wu e Bag, 1998, Melo et al., 2003), indicando que a PABPC controla sua própria síntese ao se ligar a um elemento rico em resíduos de adenosina (pARE – *poly(A)-Rich Element*) encontrado dentro da 5'UTR de seu próprio mRNA (Grange et al., 1987; Sachs et al., 1996). Foi estabelecido que esta região é um sítio secundário de ligação à PABPC, mas com afinidade menor do que a cauda poli(A) presente na extremidade 3' do mensageiro (Sachs et al., 1996). De acordo com o modelo de autorregulação, a PABPC sintetizada em excesso em relação à quantidade de caudas poli(A), seria capaz de se ligar ao pARE e inibir o processo de iniciação da sua própria tradução (Grange et al., 1987; Sachs et al., 1996, Melo et al., 2003). Além disso, foi observado também que a sequência pARE está relacionada com a redução na abundância do mRNA da PABPC, influenciando a sua taxa de decaimento (Melo et al., 2003b). Outro mecanismo, que controla positivamente a síntese da PABPC, foi proposto durante a estimulação de células em cultura por fatores de crescimento. Esta via é ativada por meio de um motivo rico em resíduos de pirimidinas (5'TOP) situado nos 32 primeiros nucleotídeos da extremidade 5' do mRNA da PABPC humana, similar aos encontrados em diversos mensageiros que codificam fatores da maquinaria de síntese proteica (Hornstein et al., 1999). Acredita-se, que assim como as proteínas ribossomais, a síntese da PABPC seja aumentada pela ativação da cascata de fosforilação comandada pela proteína cinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), facilitando a tradução dos transcritos que contém o elemento TOP. (Meyuhas e Hornstein, 2000; Gingras et al., 2001).

Além dos já estabelecidos mecanismos de regulação pós-transcricionais, parece que a atividade da PABPC também pode ser modulada por eventos pós-tradução. Em mamíferos, foi reportado que pelo menos duas argininas, presentes na região rica em prolinas no C-terminal da PABPC, podem ser modificadas pela ação da enzima arginina metiltransferase CARM1 (Le e Bedfordt, 2002). Mas, o papel desta metilação ainda é desconhecido. Outro caso de controle da atividade da PABPC foi demonstrado em plantas por Le e colegas (2000). Neste trabalho, observou-se que a PABPC possui sua atividade de ligação ao poli(A) e a sua capacidade de interação com eIF4F e eIF4B modulada por seu estado de fosforilação. Sendo assim, a PABPC fosforilada exibe menor afinidade pela cauda poli(A) e ao eIF4F do que a proteína desfosforilada. Ao passo, que esse estado

fosforilado aumenta a sua capacidade de multimerização e a sua afinidade por eIF4B.

### 1.8 PABP nuclear

A PABP nuclear é também ubíqua e abundante nos eucariotos. Em contraste com a PABP citoplasmática, a PABPN contém apenas um único RBD. Em mamíferos, este separa o domínio N-terminal rico em prolinas e glutamatos do domínio C-terminal rico em argininas (Wahle, 1991a; Kuhn e Wahle, 2004). O reconhecimento do poli(A) exige o RBD e o domínio rico em argininas (Wahle e Ruesegger, 1999). Curiosamente, em *Xenopus laevis* esta proteína quando não ligada ao poli(A) forma homodímeros por associação entre o RBD e a região rica em prolinas. Portanto, em cada subunidade do homodímero o sítio canônico para reconhecimento do RNA de uma está ocupado pelo motivo rico em prolinas da outra e vice-versa (Fig 3B). Ao associar-se à cauda poli(A), esta PABPN passa por uma transição dímero-monômero removendo o motivo rico em prolinas de seu RBD estabelecendo a interação com o poli(A) (Song et al., 2008).



**Figura 3. Proteína nuclear de ligação ao poli(A).** (A) Esquema da estrutura da PABPN. Em destaque o seu único RBD. (B) Diagrama estrutural do homodímero do domínio resistente à protease (TRP) da PABPN de *Xenopus Laevis*. As subunidades individuais estão em vermelho e verde (retirado de Song et al., 2008).

A PABPN, conforme estudos com BtnPABP2 (PABP2 nuclear de *Bos taurus*), atua na adição da cauda poli(A) durante o processamento do pré-mRNA (Wahle, 1991b; Bienroth et al., 1993; Wahle et al., 1993). Após a clivagem 3' sítio-específica do pré-mRNA, uma pequena cauda de poli(A), de 11-14 resíduos de adenina, é adicionada ao transcrito pela poli(A) polimerase (PAP) (Meyer et al., 2002). A PABPN se liga a esta pequena cauda e, juntamente com alguns fatores, dentre eles o fator específico de clivagem e poliadenilação (CPSF), estimulam e regulam a processividade de PAP (Bienroth et al., 1993; Wahle, 1995; Keller et al., 2000; Kuhn et al., 2009). A associação contínua de vários monômeros de PABPN é acompanhada pela formação de um filamento linear que apresenta partículas esféricas de 21 nm regularmente espaçadas (Keller et al., 2000). O controle do comprimento da cauda poli(A) é determinado pela redução da processividade de PAP quando esta enzima atinge entre 200-250 resíduos de adenina. Além deste ponto, o aumento da cauda poli(A) é comprometido pelo rompimento da interação entre a PAP e o fator CPSF (Keller et al., 2000).

Além disso, a PABPN, assim como a PABPC, parecem estar envolvidas na exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma. Em mamíferos e leveduras, mRNAs são geralmente retidos no núcleo quando não possuem um sinal de poliadenilação funcional ou quando a poliadenilação é inibida pela ausência ou inativação de fatores catalíticos específicos (Huang e Carmichael, 1996; Dower e Rosbash, 2002; Hammel et al., 2002). Em leveduras, também foi observado que Nab2p (seu equivalente a PABPN) interage com Gfd1p, uma proteína associada ao poro nuclear (Uetz et al., 2002), e Pab1p (sua PABPC) interage com nucleoporinas específicas e com o receptor de sinalização para exportação nuclear Xpo1p (Allen et al., 2001; Hammel et al., 2002). Em mamíferos, a inibição da PABPN pela proteína NS1 do vírus influenza previne a exportação de mRNAs (Chen e Krug, 1999). Mas, estes mecanismos de exportação ainda não estão muito bem elucidados e necessitam de novos estudos para a sua compreensão.

### **1.9 Interação Proteína-Proteína mediada por motivos ricos em Prolina**

Alguns estudos indicam que a região rica em prolinas e glutaminas da PABPC, o primeiro um terço de seu C-terminal, compõe uma importante estrutura



envolvida na multimerização entre moléculas desta proteína na presença de poli(A) (Kuhn e Pieler, 1996; Melo et al., 2003). Essa interação entre PABPCs facilitaria a sua ligação à cauda poli(A) (talvez de maneira cooperativa) de modo a influenciar algumas de suas funções, como por exemplo, a redução na taxa de desadenilação de um mensageiro e até mesmo o seu próprio mecanismo de autorregulação (Kuhn e Pieler, 1996; Melo et al., 2003). Por se tratar de uma proteína arcabouço, alvo de várias interações proteína-proteína, a estrutura da PABPC merece atenção especial. Em face disto, faz-se necessária uma breve apresentação das características biofísicas gerais dos motivos ricos em prolina e também de alguns domínios ligantes envolvidos em interações entre proteínas.

Sequências ricas em prolina são extensivamente encontradas em diversos proteomas, tanto de procariotos como de eucariotos (Rubin et al., 2000; Chandra et al., 2004). Estima-se, por exemplo, que em *Drosophila* há pelo menos 579 destas regiões, sendo estes, os motivos mais abundantes de seu proteoma (Rubin et al., 2000). Estudos feitos por análises comparativas entre diferentes genomas sugerem que as sequências poliprolina e os domínios de suas proteínas ligantes co-evoluíram na natureza (Rubin et al., 2000). Portanto, compõem o módulo de associação entre proteínas mais recorrente nos metazoários (Castagnoli et al., 2004). Desse modo, essa dupla de estruturas desempenha papéis indispensáveis na mediação de interações proteína-proteína que por sua vez são essenciais em vários processos celulares (Chandra et al., 2004; Castagnoli et al., 2004). Por exemplo, estão presentes na iniciação da transcrição, em cascatas de sinalização e rearranjos do citoesqueleto.

Estruturas sabidamente envolvidas no reconhecimento e ligação aos motivos poliprolina incluem os domínios SH3 (presentes em proteínas do citoesqueleto e na transdução de sinal em eucariotos) (Mayer, 2001); WW (assim denominado devido a sua ocorrência após dois resíduos conservados de triptofano, são encontrados em vários fatores de transcrição) (Kay et al., 2000; Kato et al., 2004); EVH1 (módulo de interação proteína-proteína presente em VASP - fosfoproteína estimulada por vasodilatação, são encontrados em várias proteínas que participam do remodelamento da actina e na sinalização pós-sináptica) (Prehoda et al., 1999; Ball et al., 2002; Volkman et al., 2002); GYF (assim denominado devido à presença da tríade conservada Gly-Tyr-Phe, originalmente identificado em CD2BP2, uma proteína que se liga ao CD2 das células-T e regula a sua adesão) (Freund et al.,

1999); profilina (descrito como regulador da polimerização dos filamentos de actina) (Mahoney et al., 1997; Mahoney et al., 1999) e UEV (variante da enzima conjugadora de ubiquitina E2) (Pornillos et al., 2002). Esses domínios têm tamanhos de 30 a 150 resíduos de aminoácidos e os mais abundantes nos vertebrados são o SH3 e o WW, com 409 e 125 cópias, respectivamente, no proteoma humano (Castagnoli et al., 2004).

As razões pelas quais as sequências ricas em prolina são comuns em diferentes organismos e participam das mais variadas associações entre proteínas serão destacadas a seguir. Primeiro, para uma sequência peptídica atuar em uma interação binária, ela deve estar exposta ao solvente e acessível ao seu ligante. Portanto, dos 20 aminoácidos de ocorrência natural, a prolina tem as características ideais para tal tarefa. Este aminoácido é conhecido por interromper estruturas secundárias regulares como  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  que são fundamentais para o dobramento e a topologia das proteínas. Logo, as sequências ricas em prolina são frequentemente encontradas na superfície, em oposição a estarem enterradas na proteína (Holt e Koffer, 2001). Segundo, a prolina é o único aminoácido que apresenta uma estrutura cíclica devido à ligação do nitrogênio do grupo amina a sua cadeia lateral alifática. Este anel de cinco átomos (pirrolidina) restringe o seu ângulo diedral  $\phi$  em aproximadamente  $-60^\circ$ . Isto limita bastante as conformações que a prolina e as sequências poliprolina podem adotar. Consequentemente, a estrutura mais comum formada por dois ou mais resíduos de prolina em sequência é a chamada hélice PPII (poliprolina tipo II), uma hélice à esquerda com três resíduos por volta do tipo PxxP (onde x é qualquer aminoácido) (Kay et al., 2000; Li, 2005). Esta estrutura é mais estendida e menos relaxada do que uma  $\alpha$ -hélice ideal que possui 3,6 resíduos por volta. Assim, a rigidez relativa deste trecho poliprolina perde pouca entropia conformacional durante uma associação, ligando-se mais favoravelmente ao seu alvo do que outras sequências peptídicas (i.e não globulares) expostas (Kay et al., 2000). A estabilidade entrópica do motivo PPII foi estimada em 1 kcal/mol por aminoácido, tanto experimentalmente (Petrella et al., 1996) quanto teoricamente (Williamson, 1994). Contudo, as sequências ricas em prolina não se associam tão fortemente quanto os domínios globulares; entretanto, esta ligação mais fraca pode ser de grande vantagem, visto que ela permite célere modulação das interações (Kay et al., 2000). Dessa maneira, a sua associação ou desassociação pode ser bastante rápida. Terceiro, as cadeias laterais e as

carbonilas da cadeia principal da estrutura PPII estão projetadas para fora do eixo da hélice, desse modo, ficam livres para interagirem com outras moléculas. Portanto, as prolina que estão na mesma face da hélice formam um ambiente hidrofóbico de fácil acesso, enquanto que as carbonilas são sítios ideais para pontes de hidrogênio (Zarrinpar et al., 2003). Logo, a interação entre o motivo poliprolina e os seus domínios ligantes não exige superfícies de grande complementaridade. Por fim, a estrutura PPII é estável e resistente a substituições de aminoácidos. Sendo assim, várias combinações entre outros aminoácidos e resíduos de prolina podem ser incorporadas na sequência peptídica sem comprometer a integridade estrutural da hélice PPII (Li, 2005). Esta propriedade única do motivo PPII provavelmente influenciou a evolução dos domínios que se ligam às sequências poliprolina. Por isso, pequenas variações tanto na sequência do motivo poliprolina como no próprio domínio de ligação, devido as já citadas substituições ou por modificações covalentes, como por exemplo, fosforilação, permitem grandes mudanças no  $K_d$  dessas interações tornando-as bastante plásticas (Kay et al., 2000).

Levando em conta todas essas características atribuídas aos motivos poliprolina, o papel destas sequências está mais relacionado com o recrutamento ou aproximação de proteínas que posteriormente se associarão, ao invés de participar ativamente da formação de complexos estruturalmente definidos e estáveis. Isso significa que estes motivos funcionam como “adaptadores” transientes nos mais diferentes processos celulares (Kay et al., 2000; Li, 2005).

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

O presente trabalho teve como objetivo o estudo dos aspectos estruturais e moleculares envolvidos na interação da proteína citoplasmática de ligação ao poli(A) em uma associação do tipo PABPC-PABPC, tanto na ausência como na presença de poliadenosinas. Diante deste tema, nós procuramos responder as seguintes perguntas:

- A PABP citoplasmática se autoassocia em ausência de poli(A)?
- Quais regiões da PABPC estão envolvidas na interação PABPC-PABPC independente de RNA? Será que é um mecanismo semelhante ao da PABP nuclear?
- Esta associação influencia o reconhecimento e ligação da PABPC à cauda poliadenilada?
- As regiões que participam da multimerização da PABPC na presença de poli(A) são as mesmas envolvidas na interação independente de ácido nucleico?
- Quais as implicações funcionais desta associação no contexto do metabolismo celular?

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas nos procedimentos de clonagem e expressão de proteínas recombinantes estão destacadas a seguir, juntamente com o seu genótipo:

DH5 $\alpha$  (Invitrogen): F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) phoA supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1.

BL21 (DE3) pLysE (Invitrogen): F<sup>-</sup> ompT hsdSB(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysE (CamR).

Os genes listados indicam alelos mutantes.

##### 3.1.2 Anticorpos

Nos experimentos de *Western Blot* foram utilizados anticorpos monoclonais (IgG2a) anti-histidina<sub>6</sub> produzidos em camundongos (GE *Healthcare*) e anticorpos produzidos em coelho anti-IgG de camundongo conjugados com fosfatase alcalina (Zymed - Invitrogen).

##### 3.1.3 Plasmídeos

###### PGEX2T:

Plasmídeo comercial de 4,9 kb produzido pela GE *Healthcare*; contém o promotor *tac*, induzível por IPTG. Foi utilizado para clonagem e indução da expressão de proteínas fusionadas com Glutathione-S-Transferase (GST) em *E. coli*.

#### pcDNA3:

Plasmídeo comercial de 5,4 kb produzido pela Invitrogen; contém os promotores CMV, T7 e SP6. Foi utilizado para clonagem e síntese de proteínas *in vitro*.

#### pET28a(+):

Plasmídeo comercial de 5,3 kb produzido pela Novagen; contém o promotor T7. Foi utilizado para clonagem e indução da expressão de proteínas (em *E. coli* da linhagem BL21) fusionadas com uma cauda de polihistidina<sub>6</sub> N-terminal.

### **3.1.4 Meios de cultura**

#### LB (Luria-Broth)

Peptona de caseína 1,0% (p/v); Extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1,0% (p/v). Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 min. a 121°C.

#### LB ágar

Adicionar ágar bacteriológico ao LB a uma concentração final de 1,5% (p/v). A esterilização foi feita em autoclave por 20 min. a 121°C.

#### Meio 2YT

Peptona de caseína 1,6% (p/v); Extrato de levedura 1,0% (p/v); NaCl 0,5% (p/v). Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 min. a 121°C.

#### SOB

Peptona de caseína 2,0% (p/v); Extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 0,05%; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 min. a 121°C. Deixar esfriar, e em seguida adicionar ao meio o MgCl<sub>2</sub> (já em solução esterilizada por filtração).

#### SOC

Adicionar glicose (já em solução esterilizada por filtração) ao meio SOB a uma concentração final de 20 mM.

### 3.1.5 Antibióticos

Ampicilina (1000X): 100 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q.

Canamicina (1000X): 30 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q.

As soluções foram esterilizadas por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, aliquotadas assepticamente e armazenadas a -20 °C.

### 3.1.6 Soluções e Tampões de uso comum

#### PBS (5X)

NaCl 685,0 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 35,0 mM; KCl 13,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,5 mM

#### PBST (1X)

Adicionar Tween-20 em PBS 1X a uma concentração final de 0,05%.

#### Tampão TB para células competentes

Pipes 10 mM; MnCl<sub>2</sub> 55 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 250 mM. Dissolver todos os sais exceto o MnCl<sub>2</sub>; ajustar o pH para 6,7 com KOH. Em seguida, adicionar o MnCl<sub>2</sub> e esterilizar por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm; armazenar a 4°C.

#### IPTG

Solução estoque 1 M: 238,21 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q. A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, aliquotada e armazenada a -20°C.

#### Lisozima

Solução estoque: 10 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q. A solução foi filtrada através de filtro Millipore 0,45 µm, aliquotada e armazenada a -20 °C.

#### Tampão de Lise (1X)

Tris HCl (pH 6,8) 80 mM; Sacarose 12%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 2%; Azul de Bromofenol 0,01%. O tampão foi aliquotado em microtubos de 1,5 ml e armazenados a -20 °C.

### DTT

Solução estoque 1 M: 154,5 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q. A solução foi filtrada através de filtro Millipore 0,22 µm, alíquotada e armazenada a -20 °C.

### Solução Cintiladora

PPO 5 g; POPOP 0,3 g; Tolueno, até completar 1 litro.

## **3.1.7 Coquetel de inibidores de proteases**

### TPCK

A solução estoque (3 mg/ml) era preparada em etanol 100% à temperatura ambiente. Ao poucos, adicionava-se o TPCK e a dissolução era feita sob agitação leve e contínua. Era estocada a -20°C. Concentração de uso: 50 µg/ml.

### TLCK

A solução estoque (1 mg/ml) era preparada em tampão acetato (pH 5,0) 50mM, e estocada a -20°C. Concentração de uso: 50 µg/ml.

### PMSF

A solução estoque (100 mM) era preparada em isopropanol 100% à temperatura ambiente. Ao poucos, adicionava-se o PMSF e a dissolução era feita sob agitação leve e contínua. Era estocada a -20°C. Concentração de uso: 1 mM.

### Iodoacetamida

A solução estoque (1 M) era preparada em Tris-HCl (pH 7,4) 20mM, e estocada a -20°C. Concentração de uso: 5 mM.

### Leupeptina

A solução estoque (10 mg/ml) era preparada dissolvendo-se a Leupeptina em um pequeno volume de DMSO (5 µl para 1 mg), completando-se o volume final com água. Esta solução era dividida em alíquotas e estocada a -20°C. Concentração de uso: 2 µg/ml.



### Aprotinina

A solução estoque (10 mg/ml) era preparada em PBS 1X e estocada, em alíquotas, a -20°C. Concentração de uso: 2 µg/ml.

Para uso, cada um desses inibidores era misturado aos sistemas ou soluções.

## **3.1.8 Soluções para extração de DNA plasmidial**

### Solução STET

NaCl 0,1 M; Tris HCl (pH 8,0) 10 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 5%.

### Solução I

Glicose 50 mM; Tris HCl (pH 8,0) 25 mM; EDTA 10 mM. Esterilizar em autoclave 20 min. a 121°C.

### Solução II

NaOH 0,2 M; SDS 1%.

### Solução III

Acetato de Sódio 3 M; ácido acético 2 M; pH 4,8-5,0

## **3.1.9 Soluções para purificação de proteínas com cauda de histidina**

### Tampão fosfato de sódio (8X)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM; NaCl 4 M. Ajustar o pH para 7,4 e filtrar através de filtro Millipore 0,45 µm; armazenar a 4°C.

### Imidazol

Solução estoque 2 M: 136,2 mg/ml. Ajustar o pH para 7,4 com HCl concentrado e filtrar através de filtro Millipore 0,45 µm; armazenar a 4°C.

## **3.1.10 Soluções para purificação da PABPC de lisado de reticulócito de coelho**

### Solução de Formamida

Formamida 90%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; EDTA 10 mM; pH 7,5.

### Solução A

Tris HCl (pH 6,7) 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; KCl 50 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; DTT 1 mM.

### Solução B

Tris HCl (pH 7,4) 10 mM; Uréia 1 M; LiCl 2 M.

### **3.1.11 Tampão de Interação para *Pull-Down***

KCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; Hepes (pH 7,2) 10 mM; NP-40 0,2%; Glicerol 10%.

### **3.1.12 Soluções para géis SDS-PAGE**

#### Gel separador 13%

Tris HCl (pH 8,8) 0,375 M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida (39:1 p/p) 13%; Persulfato de amônia 1,0%; TEMED 0,1%.

#### Gel concentrador 4%

Tris HCl (pH 6,8) 0,125 M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida (39:1 p/p) 4%; Persulfato de amônia 1,0%; TEMED 0,1%.

#### Tampão de Corrida Tris-Glicina (5X)

Tris Base 0,125 M; Glicina 1,25 M; SDS 0,5%.

#### Tampão de Amostra (2X)

Tris HCl (pH 6,8) 0,16 M; Sacarose 24%; SDS 4%; β-Mercaptoetanol 4%; Azul de Bromofenol 0,05%. O tampão foi alíquotado em tubos de 1,5 ml e armazenados a -20 °C.

#### Solução Corante – Coomassie

Coomassie Blue R250 0,25%; Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%.

#### Solução Descorante/Fixadora

Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%

### Tampão de Transferência para *Western Blot*

Trisma base 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,0375%; Metanol 20%

### **3.1.13 Soluções para géis de agarose**

#### Tampão TBE (10X)

Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M

#### Tampão de amostra (10X)

TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%

#### Brometo de Etídeo

Solução estoque: 10 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q

#### Tampão MOPS/EDTA (10X)

MOPS (pH 7,0) 0,4 M; Acetato de Sódio 0,1 M; EDTA 0,01 M (pH 8,0).

O pH do tampão foi ajustado para 7,0 com NaOH (livre de RNase) e então armazenado em frasco âmbar a 4°C

#### Tampão de amostra para eletroforese desnaturante

Formamida 50%; MOPS/EDTA 1X; Formaldeído 2,15 M; Glicerol 5%; Azul de Bromofenol 0,05%.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Plasmídeos**

O plasmídeo contendo o gene da PABP citoplasmática humana (construção P10-636, sem os nove aminoácidos iniciais), clonado no sítio *Bam*H I do vetor pGEX2T (GE *Healthcare*), foi descrito por de Melo Neto e colegas (1995). Os plasmídeos codificadores das variantes da PABP fusionadas com GST: P10-190, P10-370, P237-542 e P372-636, clonados também no vetor PGEX2T, foram descritos por Melo e colegas (2003). Os plasmídeos pcDNA3-50As/PABPC,

pcDNA3-50As/P237-542 e pcDNA3-50As/P372-636, utilizados na transcrição e tradução *in vitro*, e também os plasmídeos pcDNA3-50As/P10-190 e pcDNA3-50As/P10-370 são todos derivados das construções supracitadas. Portanto, os fragmentos encerrando o gene da PABPC humana e as suas variantes foram retirados do vetor PGEX2T após digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI* e, posteriormente, clonados nos sítios *BamHI/EcoRI* do vetor pcDNA3-50As. Este plasmídeo é derivado do vetor pcDNA3 (Invitrogen), no qual inserimos previamente um oligonucleotídeo com cinquenta adeninas em seus sítios *NotI/XbaI* (GCGGCCGCA<sub>50</sub>AAGCTTTCTAGA). Isso, de modo que este trato rico em adeninas ficasse a jusante do gene clonado, a fim de simular durante a tradução *in vitro* a cauda de poli(A) 3' de mRNAs eucarióticos naturais e juntamente com o *Cap* melhorar a eficiência e fidelidade da síntese protéica. A clonagem desse oligonucleotídeo foi confirmada por eletroforese em gel de agarose após a análise do perfil de digestão do plasmídeo pcDNA3-50As com *HindIII* (sítio presente no interior do oligonucleotídeo). Os plasmídeos codificadores da PABPC humana e de suas variantes contendo uma cauda de histidina em seu N-terminal foram obtidos a partir da digestão de suas respectivas sequências clonadas no vetor pcDNA3-50As, utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *NotI*. Em seguida, estes fragmentos foram clonados nos sítios *BamHI/NotI* do vetor pET28a(+) (Novagen).

### 3.2.2 Clonagem

#### Digestão com enzimas de restrição

Para a digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição, misturas de reação foram feitas com volumes totais de 15 µl (no caso de análise de restrição) ou 50 µl (no caso de preparação dos vetores e insertos para os experimentos de clonagem). Para as análises de restrição digeriu-se 1 µg de DNA por períodos de 2 à 4 horas a 37°C, e para as clonagens digeriu-se 5 µg de DNA por períodos de 4 à 18 horas a 37°C. As enzimas foram utilizadas com os seus respectivos tampões de reação, com adição ou não de BSA de acordo com as recomendações do fabricante.

### Purificação de fragmentos de DNA de géis de agarose

Em todas as clonagens, tanto o fragmento do vetor como o inserto, foram fracionados em géis de agarose preparativos segundo o protocolo descrito no item 3.2.12. As bandas de interesse foram excisadas do gel, colocadas em microtubos de 1,5 ml e o DNA purificado utilizando-se o kit *GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

### Ligação de fragmentos de DNA

Todas as reações de ligação foram feitas em um volume total de 10 µl com adição de uma unidade de T4 DNA Ligase (Gibco) e incubadas a 16°C por 18 horas. A metade do sistema foi usada para a transformação de células competentes DH5α. A proporção vetor / inserto foi calculada de acordo com a fórmula descrita em *Promega Protocols & Applications Guide* (1991), tendo como base a adição de 100 ng do vetor ao sistema de reação.

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{relação molar inserto/vetor}}{\text{kb do Inserto}} = \text{ng de inserto}$$

### **3.2.3 Preparo de Células Competentes de *Escherichia coli* (Inoue et al, 1990).**

Células estocadas em nitrogênio líquido da linhagem DH5 (Invitrogen) ou BL21 (DE3) pLysE (Invitrogen) foram descongeladas, estriadas em placa de LB ágar e em seguida incubadas a 37°C por 18 horas. Desta placa, 4 a 6 colônias de 2-3 mm de diâmetro foram coletadas, inoculadas em 100 ml de meio SOB e cultivadas sob agitação (220 RPM) a 30°C até atingir uma OD<sub>600</sub>/ml de 0,6. Logo após, a cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2500 x g a 4°C durante 10 minutos. O sedimento de células foi gentilmente ressuspensionado em 32 ml de tampão TB gelado, incubou-se em banho de gelo por 10 minutos e novamente centrifugou-se a 2500 x g a 4°C por 10 minutos. O sedimento obtido foi gentilmente ressuspensionado em 8 ml de tampão TB, posteriormente, adicionou-se DMSO lentamente homogeneizando-o para uma concentração final de 7%. Após incubar a

suspensão de células em banho de gelo por 10 minutos, alíquotas de 200 µl foram distribuídas em tubos de 1,5 ml e imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido.

### **3.2.4 Transformação de Bactérias por choque térmico.**

Tubos contendo 200 µl de células competentes foram descongelados em banho de gelo e a eles adicionados 50-100 ng do plasmídeo desejado. As células foram incubadas em gelo por uma hora, depois, submetidas ao choque térmico por 1 minuto a 42°C e rapidamente transferidas para o banho de gelo por 2 minutos. Em cada tubo adicionou-se 0,8 ml de SOC, os deixando a 37°C por 1 hora. Após este período, as células foram semeadas em placas de LB ágar contendo o antibiótico de seleção adequado e cultivadas a 37°C por 14-18 horas.

### **3.2.5 Extração de DNA plasmidial de *E. coli***

Método *Boiling* (Holmes & Quigley, 1981)

Para extração de DNA plasmidial, clones selecionados foram inoculados em tubos contendo 3 ml de meio 2YT suplementado com o antibiótico adequado; e estes, incubados sob agitação (220 RPM) a 37° C por 18 horas. Uma alíquota de 1,5 ml da cultura foi retirada e centrifugada em microtubo a 10500 x g por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células foram adicionados 400 µl de solução STET e 40 µl de solução de lisozima a 20 mg/ml. As células foram ressuspensas em homogeneizador do tipo vortex, aquecidas em banho-maria 90-100°C por 1 minuto, e em seguida colocadas em banho de gelo. Após centrifugação a 12000 x g por 30 minutos, o sedimento foi retirado por intermédio de palitos estéreis de madeira e 400 µl de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 12000 x g por mais 20 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol a 70% (-20°C) e

centrifugado por mais 5 minutos. Após secagem do sedimento à temperatura ambiente, este foi ressuspenso em 40 µl de água milli Q e armazenado a -20°C.

#### Método da Lise Alcalina (Birnboim & Doly, 1979)

Uma alíquota de 1,5 ml de uma cultura de *E. coli* em fase estacionária de crescimento foi retirada e centrifugada em microtubo a 10500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspenso em 100 µl de solução I com auxílio de homogeneizador do tipo vortex. Adicionou-se 200 µl de solução II e, por inversão do tubo misturou-se o seu conteúdo por 10 vezes deixando-o por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µl de solução III e por inversão do tubo misturou-se a solução até o aparecimento do precipitado de DNA cromossomal. Incubou-se no gelo por mais 5 minutos e centrifugou-se a 12000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo no qual foi adicionado um volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada, incubada por 5 minutos e centrifugada a 12000 x g por mais 30 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70% (-20°C), sem ressuspenso, e centrifugado por mais 5 minutos. Depois de seco ao ar livre em temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspenso em 40 µl de água milli Q e armazenado a -20°C.

Para a obtenção de DNA plasmidial em maior escala e grau de pureza aceitável para transcrição e tradução *in vitro* utilizou-se o kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Midiprep Kit (Invitrogen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

### **3.2.6 Expressão induzida de proteínas recombinantes em *E. coli***

A indução da expressão das proteínas recombinantes fusionadas com GST ou contendo uma cauda de polihistidina N-terminal foi realizada como descrito a seguir. Inicialmente, uma colônia de *E. coli* da linhagem BL21 transformada com o plasmídeo desejado foi inoculada em 3 ml de meio 2YT suplementado com o antibiótico de seleção; ampicilina (100 µg/ml) para as clonagens feitas no pGEX2T

ou canamicina (30 µg/ml) para as clonagens feitas no pET28a(+). Este pré-inóculo foi incubado por 16 h a 37°C sob agitação de 220 RPM. Após este período, o inóculo foi diluído 1:100 em meio 2YT contendo o antibiótico adequado e incubado a 30°C sob agitação de 220 RPM até obter OD<sub>600</sub>/ml = 0,6-0,8. Uma alíquota de 2 ml da cultura (antes da indução) foi retirada e processada: centrifugada a 6000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 1 ml de PBS 1X e ressuspendido em 60 µl de tampão de lise 1X. Em seguida, a indução foi realizada adicionando-se IPTG à cultura de modo a obter a concentração final de 1 mM, e esta foi incubada por 3 horas a 30°C. Durante esse tempo, mais duas alíquotas de 2 ml foram retiradas, com 1,5 h e 3 h de indução, processadas como descrito anteriormente e analisadas em SDS-PAGE 13%. Passadas as três horas de indução, a cultura de bactérias foi centrifugada a 3000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 10 ml de PBS 1X, posteriormente bem escorrido e armazenado a -80 °C até a purificação das proteínas recombinantes.

### **3.2.7 Purificação de proteínas recombinantes fusionadas com GST**

Para a purificação das proteínas recombinantes fusionadas com GST, primeiramente, foram feitos extratos bacterianos a partir dos sedimentos de células provenientes das induções feitas em volumes de 100 ml de meio 2YT. Estes sedimentos foram descongelados em banho de gelo e ressuspendidos em 2 ml de PBS 1X gelado contendo coquetel de inibidores de proteases e 1 mM de DTT. Adicionou-se lisozima para a concentração final de 0,2 mg/ml e incubou-se à temperatura ambiente sob agitação branda por 30 minutos. Depois, as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo, 4 pulsos de 15 s com intervalos de 45 s em uma amplitude de 50%. Os extratos obtidos foram clarificados por centrifugação a 12000 x g durante 10 min. a 4 °C, de modo a eliminar a fração celular insolúvel. Em seguida, 500 µl do sobrenadante, acrescidos de 350 µl de PBS 1X, foram incubados por 2 h a 4°C sob leve agitação com 150 µl de resina de Glutathiona-Sepharose (Amersham – Pharmacia) previamente lavados duas vezes em PBS 1X+0,1% Triton-X100. Após este período, a resina foi sedimentada por meio de uma centrifugação de 1000 x g durante 5 min., lavados quatro vezes com 1 ml de PBS 1X + 0,1%



Triton-X100 e ressuspendidos em 300 µl de PBS 1X suplementado com coquetel de inibidores de proteases. Uma amostra de 5 µl foi analisada em gel desnaturante de poli-acrilamida 13% para verificar a pureza dos produtos obtidos. As proteínas, ainda ligadas à resina, foram armazenadas a 4°C até a realização dos experimentos de *Pull-down*.

### **3.2.8 Purificação de proteínas recombinantes contendo cauda de histidina**

Primeiramente, foram feitos extratos bacterianos a partir dos sedimentos obtidos das culturas de células induzidas em volumes de 100 ml de meio 2YT. Os sedimentos foram descongelados em banho de gelo e ressuspendidos em 2 ml de tampão de ligação ( TL - Tampão fosfato de sódio 1X; Imidazol 20 mM; pH 7,4) suplementado com 1 mM de PMSF. Adicionou-se lisozima para a concentração final de 0,2 mg/ml e incubou-se à temperatura ambiente sob agitação branda por 30 minutos. Depois, as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo, 4 pulsos de 15 s com intervalos de 45 s em uma amplitude de 50%. Os extratos obtidos foram clarificados por centrifugação a 12000 x g durante 10 min. a 4 °C, de modo a eliminar a fração celular insolúvel. Em seguida, as proteínas em questão foram purificadas utilizando-se o kit His SpinTrap™ (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. As colunas de Níquel-Sepharose foram equilibradas com 600 µl de TL e centrifugadas por 30 s a 100 x g. Aplicou-se 600 µl das amostras clarificadas e novamente centrifugou-se por 30 s a 100 x g. As colunas foram lavadas duas vezes com 600 µl de TL e centrifugadas por 30 s a 100 x g. As proteínas foram eluídas com a adição de 200 µl de tampão de eluição (Tampão fosfato de sódio 1X; Imidazol 500 mM; pH 7,4) e centrifugação por 30 s a 100 x g, e este passo repetido mais uma vez, de modo que o primeiro eluato continha a maioria das proteínas-alvo. Ao final, os eluatos foram armazenados a 4°C.

Para os experimentos de dicroísmo circular e teste funcional, a proteína His-PABPC foi dialisada em água Milli Q utilizando-se o microfiltro YM30 microcon (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.2.9 Purificação da PABPC de Lisado de Reticulócito de Coelho

A purificação da PABP citoplasmática de Lisados de Reticulócito de Coelho (Promega) foi feita por cromatografia de afinidade utilizando-se a resina Poly(A)-Sepharose 4B (Amersham). Todas as etapas foram feitas na câmara fria a 4°C e o fluxo da coluna mantido por ação da gravidade. Inicialmente, 0,05 g desta resina foram reconstituídos em 5 ml de NaCl 0,1 M (pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida, depositou-se esta solução em uma coluna cromatográfica de polipropileno (Spectrum®) e incubou-se até que se sedimentasse por completo. Lavou-se o gel com 10 ml de NaCl 0,1 M (pH 7,5) e com 10 ml de solução de formamida. A coluna foi equilibrada com 10 ml de solução A e 10 ml do lisado (previamente diluído em 30% de solução A) foram adicionados e reciclados 10 vezes através do sistema cromatográfico. Lavou-se a coluna com 50 ml de solução A e 50 ml de solução A + 0,5 M KCl, e então, a PABPC foi eluída com a adição de 2 ml de solução B. A PABPC purificada foi concentrada e dialisada em água Milli Q utilizando-se o microfiltro YM30 microcon (Millipore), posteriormente, analisada em gel SDS-PAGE 13% e armazenada a 4°C.

### 3.2.10 Transcrição e tradução *in vitro*

A transcrição *in vitro* dos plasmídeos pcDNA3-50As/PABPC, pcDNA3-50As/P237-542 e pcDNA3-50As/P372-636 (previamente linearizados com *Xba I*) foi realizada utilizando-se o sistema RiboMax *Large Scale RNA Production* – T7 (Promega), e as reações conduzidas de acordo com as especificações do fabricante. A fim de obter mRNAs capeados, adicionou-se aos sistemas de reação um análogo de *Cap* (Ribo m<sup>7</sup>G *Cap Analog* - Promega) para a concentração final de 3 mM, associado com a redução da concentração final de GTP para 0,6 mM, gerando uma relação entre o análogo de *Cap* e o GTP de 5:1. Os sistemas de reação foram incubados durante quatro horas a 37°C. Após a transcrição *in vitro*, os produtos foram tratados com 1 unidade de DNase para cada µg de DNA molde e incubados por 15 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se um volume de fenol saturado com citrato (pH 4,7):clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1), misturando-os bem, e centrifugou-se a 12000 x g por 2 minutos. Após a transferência da fase aquosa para

novo microtubo, adicionou-se um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se a 12000 x g por 2 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e o RNA precipitado com o acréscimo de 300 mM de acetato de sódio (pH 5,2) e um volume de isopropanol, homogeneizou-se e centrifugou-se a 12000 x g por 20 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol a 70% (-20°C) e centrifugado por mais 5 minutos. Após secagem do sedimento à temperatura ambiente, este foi ressuscitado em 40 µl de água milli Q livre de RNase e armazenado a -80°C. Os mRNAs foram quantificados no espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia Biotech) e analisados por eletroforese em gel desnaturante de agarose, segundo o protocolo descrito no item 3.2.12.

Para as reações de tradução *in vitro*, usou-se lisado de reticulócito de coelho (TnT T7 *Coupled Reticulocyte Lysate System* – Promega) e uma concentração final de transcrito de 20 µg/ml. As reações foram incubadas durante 90 minutos a 30 °C com [<sup>35</sup>S]-metionina (Perkin Elmer), segundo as especificações do fabricante. Em seguida, determinou-se a taxa de radioatividade incorporada em cintilador Beckman LS 7000. Os produtos radioativamente marcados foram analisados em gel SDS-PAGE 13% e autorradiografados com auxílio do equipamento Typhoon 9210 (Molecular Dynamics - Pharmacia).

### 3.2.11 Determinação da taxa de radioatividade incorporada

Para a determinação da radioatividade incorporada, alíquotas de 1 µl dos sistemas de tradução *in vitro* foram aplicadas em pedaços de papel de filtro Whatman nº1 de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, deixados secar à temperatura ambiente e tratados como descrito a seguir. Primeiramente, os papéis foram incubados em 10 ml de TCA a 10% durante 10 min. em banho de gelo, depois, transferidos para 5 ml de TCA a 5% e fervidos por 5 min. nessa solução. Após este período, os papéis foram novamente submetidos à incubação no gelo por 5 min em 5 ml de TCA a 5%, em seguida, lavados em 10 ml de metanol a 100% por 2 min. e em 10 ml de acetona por 2 min. Os papéis foram secos novamente à temperatura ambiente e transferidos para frascos de cintilação contendo 1 a 2 ml de solução cintiladora. A contagem foi realizada em cintilador Beckman LS 7000. Foi obtida, em média, uma taxa de incorporação de radioatividade de 0,2 a 0,6x10<sup>6</sup> cpm/µl de sistema de reação. Como

controle, a determinação da radioatividade total foi feita em 1 µl de sistema de reação sem os tratamentos com TCA.

### 3.2.12 Eletroforeses

#### Eletroforese unidimensional em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970)

As proteínas recombinantes, assim como as sintetizadas *in vitro* e os experimentos de *Pull-down* foram analisados em géis desnaturantes de poliacrilamida segundo Laemmli (1970). Para a confecção dos géis, foram utilizadas placas de vidro de 16,5 cm x 15,5 cm, espaçadores de 0,75 mm e pentes com 10 (8 mm de comprimento/poço) e 16 poços (4 mm de comprimento/poço). Depois de montadas, às placas adicionava-se a solução do gel separador (com os catalizadores, persulfato de amônia e TEMED, acrescentados imediatamente antes do uso), e sobre esta, depositada levemente uma fina camada de butanol saturado com água. Após a polimerização, 15-30 min., o butanol era retirado, a superfície do gel lavada com água destilada e o espaço entre as placas seco com papel de filtro. Em seguida, a solução do gel concentrador era adicionada, e sobre esta se colocava o pente. Após a polimerização, 10-15 min., o pente e o espaçador debaixo eram retirados e os poços lavados com água destilada. Esse sistema era acoplado à cuba de eletroforese, e só então, esta era preenchida com tampão de corrida 1X. Às amostras de proteínas foi adicionado o tampão de amostra 2X, estas eram aquecidas em banho-maria a 100 °C por 3 min., e depois aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente e a 25 mA constantes. Após a eletroforese, os géis das proteínas recombinantes, os já transferidos para a membrana de nitrocelulose e dos ensaios de *Pull-down* feitos com as proteínas radioativas eram corados por 18 h com Coomassie Blue R250, segundo Maniatis e cols., (1989) e fotografados no fotodocumentador (BIO-RAD). Os géis das proteínas sintetizadas *in vitro* (previamente incubados na solução fixadora por 30 min. sob leve agitação) e, também, dos ensaios de *Pull-down*, já corados, eram incubados em solução amplificadora (*Amplify* – Amersham) por 30 min. à temperatura ambiente

sob agitação branda. Em seguida, estes géis eram secos no aparelho *Gel-Dryer* (BIO-RAD) durante 2 h a 80 °C sob vácuo e expostos ao *Storage Phosphor screen* (Molecular Dynamics – Pharmacia) por 18 h à temperatura ambiente. Após esse período, o *screen* era autorradiografado com auxílio do equipamento Typhoon 9210 (Molecular Dynamics - Pharmacia) no modo *Storage Phosphor*.

#### Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TBE 0,5X, sendo empregado o corante brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/ml. As amostras a serem analisadas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra para a concentração final de 1X. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X utilizando-se uma voltagem constante de aproximadamente 5 V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografada no fotodocumentador (BIO-RAD).

#### Eletroforese em gel desnaturante de agarose

Para a análise das amostras de mRNA, géis de agarose com a concentração de 1,2% foram feitos em tampão MOPS 1X e formaldeído 2% sob condições livre de RNase. Dois microlitros dos produtos das transcrições *in vitro* foram colocados em microtubos e a eles adicionados 20 µl de tampão de amostra. Após incubação a 65 °C por 15 min., 1 µl da solução de brometo de etídeo 1 mg/ml foi adicionado às amostras e estas aplicadas no gel. A corrida eletroforética aconteceu em tampão MOPS 1X sob uma voltagem constante de aproximadamente 5 V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografada no fotodocumentador (BIO-RAD).

### **3.2.13 Experimentos de *Pull-down***

Os experimentos de *Pull-Down* utilizando as proteínas marcadas radioativamente foram realizados como descrito a seguir. Os produtos das traduções

*in vitro* foram previamente tratados com a enzima micrococcus nuclease (250 unidades/ml; por 20 minutos a 20 °C na presença de 1,5 mM de CaCl<sub>2</sub>) e a reação interrompida com a adição de 6 mM de EGTA. Em seguida, 5 µl desses produtos foram misturados com 5 µl da proteína GST-PABP ou as suas variantes (ainda ligadas à resina de Glutathiona-Sepharose) em 100 µl de tampão de interação (TI – KCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; Hepes (pH 7,2) 10 mM; NP-40 0,2%, Glicerol 10%). Incubou-se os sistemas de reação por 1 h a 4°C sob leve agitação. Após este período, as resinas foram sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 5 min. e lavadas três vezes com 1 ml de TI gelado. Os complexos proteicos foram eluídos por meio da adição de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE, fervidos em banho-maria por 4 min. e as amostras analisadas em SDS-PAGE 13%. Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue R250, fotodocumentados, secos e autorradiografados como descrito no item 3.2.12.

Para os experimentos de *Pull-Down* utilizando a PABPC e as suas variantes contendo a cauda de polihistidina, misturou-se 5 µl destas proteínas com 5 µl das proteínas fusionadas com GST ligadas à resina de Glutathiona-Sepharose em 100 µl de TI adicionado de 50 mM Imidazol. No caso dos ensaios contendo poli(A) ou poli(C) (Pharmacia), acrescentou-se 20 µg/ml destes homopolímeros à reação, e todo o experimento foi realizado sob condições livres de RNase. Os sistemas de interação foram incubados por 1 h a 25°C sob leve agitação. Após este período, as resinas foram sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 5 min. e lavadas três vezes com 1 ml de TI gelado. Os complexos proteicos foram eluídos por meio da adição de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE; fervidos em banho-maria por 4 min.; e as amostras submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) 13%. Em seguida, os géis obtidos foram analisados por *Western Blot*, e posteriormente, corados com Coomassie Blue R250 e fotodocumentados.

### **3.2.14 Western Blot (Towbin et al., 1979)**

#### Transferência para membrana

A técnica de transferência semi-seca foi realizada utilizando-se o sistema *Semi-Dry Transfer Cell* (BIO-RAD), com membrana de nitrocelulose Hybond-C extra

0,45 µm (Amersham). Neste sistema, foi colocado sobre o eletrodo catiônico uma pilha de três papéis de filtro Whatman 3MM, sobre esta pilha, colocou-se a membrana de nitrocelulose, e sobre esta, depositou-se o gel e mais três pedaços de papel de filtro. Todos estes componentes foram previamente cortados justamente do tamanho do gel e imersos em tampão de transferência por 20 min. O eletrodo aniônico foi acoplado ao sistema e a transferência realizada com uma amperagem constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de membrana por aproximadamente 1 h.

#### Incubação com os anticorpos e revelação

Imediatamente após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi saturada em uma solução de leite desnatado a 5% em PBST 1X (p/v) durante a noite sob agitação branda a 4°C. Depois, descartou-se a solução com leite e a membrana foi lavada em PBST 1X por 5 min. Após a lavagem, a membrana foi incubada sob agitação leve por 1h 30 min. com o anticorpo primário anti-histidina<sub>6</sub> (GE *Healthcare*) na diluição de 1:3000 em PBST 1X contendo 1% de leite desnatado (p/v). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em PBST 1X (5 min. para cada lavagem) e posteriormente, incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Zymed – Invitrogen) na diluição de 1:1000 em PBST 1X contendo 1% de leite desnatado (p/v). Após a incubação por 1h e 30 min. sob agitação, a membrana foi novamente lavada três vezes em PBST 1X, antes de ser submetida à revelação. Utilizou-se para a revelação os reagentes BCPI/NBT (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. A membrana permaneceu nesta solução até o aparecimento das bandas e o contraste desejado.

#### **3.2.15 Quantificação do *Pull-down* das proteínas analisadas por *Western blot*.**

A quantificação das proteínas que sofreram *pull-down* nos testes revelados por *Western blot* foi feita por densitometria utilizando-se o programa *Scion Image* (Disponível em <http://www.scioncorp.com>). Embora as imagens analisadas tenham sido obtidas de *blots* diferentes, durante as aquisições, estas foram ajustadas igualmente com o mesmo tempo de exposição, resolução e níveis de brilho e contraste. Os dados adquiridos se referem à densidade relativa, que são medidas da

intensidade de pixels na escala de cinza dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. Esses valores foram plotados num gráfico de barras usando o programa de computador Excel 2007 (Microsoft).

### 3.2.16 Espalhamento de Luz Dinâmico – EDL

O experimento de EDL foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), com o equipamento DynaPro modelo LSR. O comprimento de onda usado foi o de 800 nm e a forma molecular escolhida para a proteína foi a globular. Em cada experimento foram feitas 150 mensurações, e a temperatura de 25°C mantida constante por um sistema Peltier acoplado ao detector. A concentração utilizada de PABPC purificada de lisado de reticulócito de coelho (item 3.2.9) foi de 2 µM em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Antes da leitura, as amostras foram filtradas em filtro Millipore 0,22 µm e, só então, adicionadas à cubeta de quartzo. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa Dynamics V6, observando a relação entre o diâmetro hidrodinâmico e a intensidade de espalhamento de luz, e também, os valores de massa molecular em kDa. Estas medidas são provenientes das flutuações do espalhamento de luz em função do tempo oriundas de uma partícula devido ao seu movimento Browniano. A partir destas flutuações o coeficiente de difusão da partícula é deduzido, assim como o seu diâmetro hidrodinâmico empregando-se a equação abaixo.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

onde D é o coeficiente de difusão, k a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade do solvente e R<sub>H</sub> o raio hidrodinâmico da partícula.

Durante a coleta dos dados da curva de correlação, os valores foram filtrados a partir da linha de base 1. Já para a análise dos dados, a linha de base foi ajustada para o valor de  $1 \pm 0,005$  e a SOS (soma da diferença dos quadrados) ajustada para 1.



### 3.2.17 Teste Funcional da His-PABPC

A avaliação da capacidade da His-PABPC associar-se ao poli(A) foi feita utilizando-se a resina de *Poly(A)*-Sephadex 4B (Amersham). Como controle negativo de interação, empregou-se a resina de glutathiona-sephadex. Inicialmente, um miligrama da resina de poli(A)-sephadex foi reconstituído em 500 µl de NaCl 0,1 M (pH 7,5) por 15 minutos. Após este período, a resina foi lavada com 1 ml de NaCl 0,1 M (pH 7,5) e com 1 ml de solução de formamida. Para bloquear possíveis interações inespecíficas entre as proteínas e as resinas utilizadas neste experimento, tanto a resina de poli(A)-sephadex quanto a de glutathiona-sephadex, foram previamente incubadas com 4 mg/ml de ovoalbumina em 300 µl de solução A por 30 minutos. Depois, estas foram lavadas com 1 ml de solução A. Em seguida, incubou-se 3 µg da proteína His-PABPC com cada uma destas resinas em um sistema de interação contendo 300 µl de solução A por uma hora a 4°C sob leve agitação. Após este período, as resinas foram sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 5 min. e lavadas três vezes com 1 ml de PBS 1X + 0,1% Triton-100X gelado. As proteínas foram eluídas por meio da adição de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE; fervidas em banho-maria por 4 min.; e as amostras submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 13%.

### 3.2.18 Dicroísmo Circular

A análise estrutural da His-PABPC contendo a cauda de histidina foi realizada no espectropolarímetro Jasco 816. As amostras foram lidas em comprimento de onda longe do UV, de 195 a 260 nm, a 25°C em uma cubeta de quartzo de um milímetro. A concentração de PABPC utilizada foi de 0,3 mg/ml em H<sub>2</sub>O Milli Q. Os dados foram coletados em triplicata, onde o valor final era uma média aritmética dos valores obtidos. O sinal dicróico foi medido a uma velocidade de 100 nm/min. e processado pelo programa Spectra Manager (JASCO). Os valores registrados em miligraus foram convertidos para elipticidade molar residual usando a seguinte equação:

$$\theta = 112 \cdot \alpha / C \cdot \ell$$

Onde,  $\alpha$  é o sinal dicróico em milligraus, C é a concentração da amostra em miligramas por mililitro e  $l$  é a espessura da cubeta utilizada, em centímetros. Os dados obtidos foram corrigidos utilizando como linha de base uma leitura feita somente com H<sub>2</sub>O Milli Q.

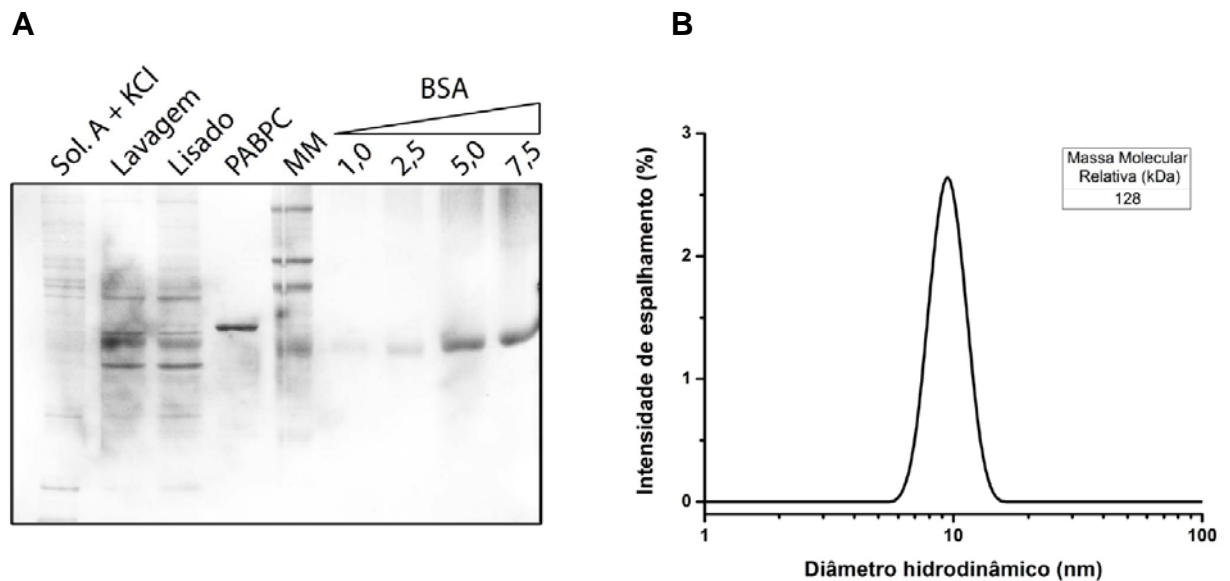
As porcentagens de estruturas secundárias da His-PABC foram calculadas utilizando o software CD Spectra Deconvolution (Institut für Biotechnologie, Alemanha), escolhendo como tipo de sinal dicróico Elipticidade Molar. O valor selecionado foi o que apresentou somatório das porcentagens mais próximo de 100%. Esses dados foram plotados num gráfico de barras usando o programa de computador Excel 2007 (Microsoft).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 A PABPC em solução se comporta como um homodímero em ausência de poli(A).

A PABPC é uma proteína fundamental em várias etapas da expressão gênica por intermediar inúmeras interações proteína-proteína quando associada à cauda poliadenilada dos mRNAs eucariotos. Contudo, poucos estudos foram feitos sobre a estrutura e o comportamento desta proteína em ausência de poli(A). Diante disso, examinamos por espalhamento dinâmico de luz (EDL) o estado oligomérico da PABPC quando pura em solução privada de ácidos nucleicos. A PABPC nativa obtida para esse experimento foi purificada por cromatografia de afinidade a partir de lisados de reticulócitos de coelho utilizando-se uma resina de sepharose conjugada com pequenas caudas de poliadenosina (Fig. 4A). Para os ensaios de EDL usamos 2  $\mu$ M de PABPC em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e a temperatura constante de 25°C. O experimento foi feito em duplicata com duas amostras de PABPC e 150 aquisições para cada amostra.

As soluções de PABPC apresentaram-se de maneira monodispersa contendo um único pico (representando 99,9% das partículas ali encontradas) com um diâmetro hidrodinâmico de 9,4 nm. Este valor corresponde a uma massa molecular de 128 kDa (Fig. 4B). Como a massa molecular da PABPC de coelho é de 69,8 kDa (de Melo Neto et al., 1995), neste experimento, esta proteína em solução comportou-se como um homodímero (já que a massa estimada para esse estado oligomérico é de 139,6 kDa). A diferença observada entre a massa estimada e a mensurada no EDL deve-se à redução da camada de hidratação nos locais de interação do homodímero. A curva de autocorrelação obtida após a aquisição dos dados apresentou um erro mínimo bastante próximo de zero, validando os resultados.



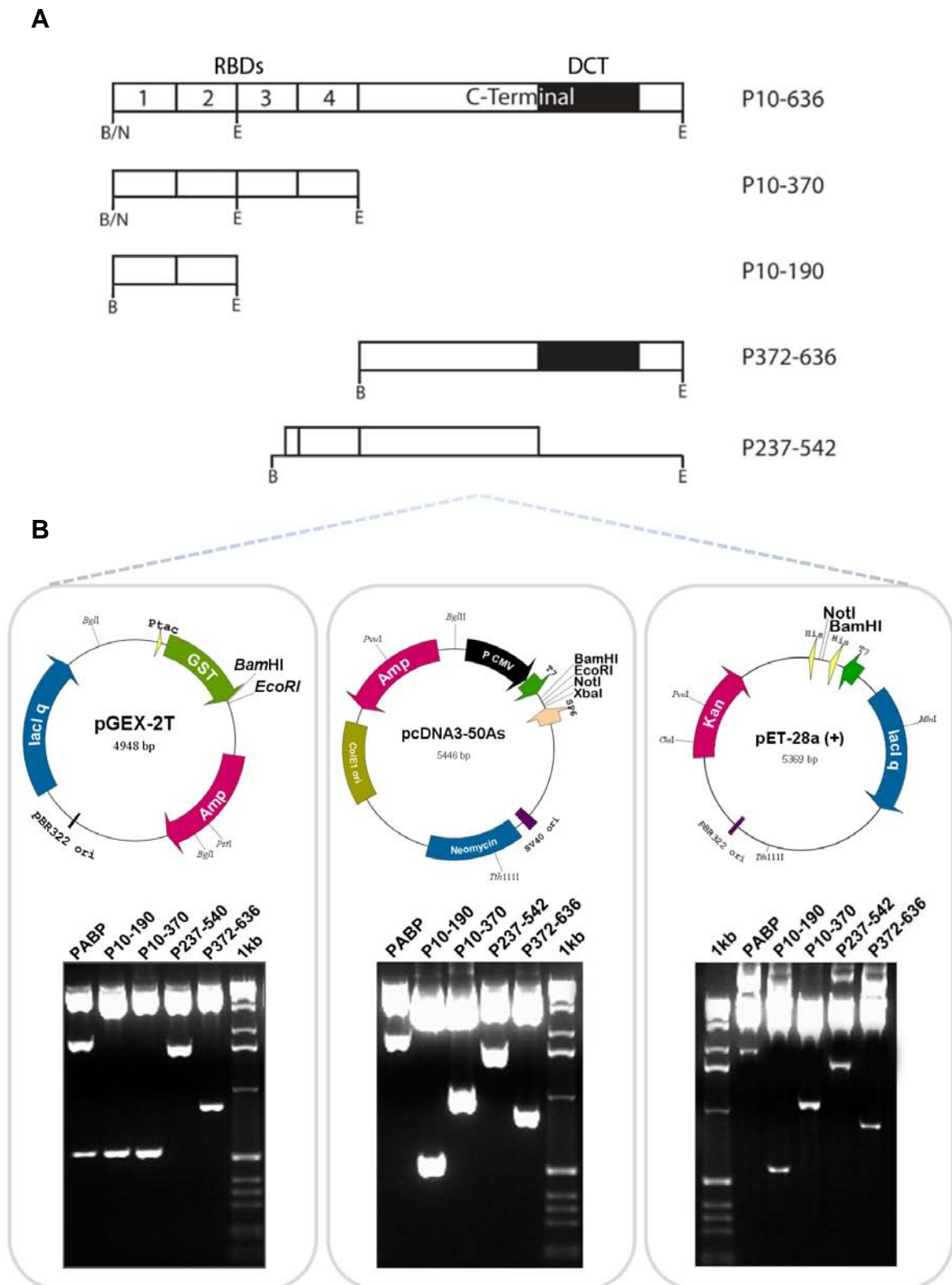
**Figura 4. Purificação da PABPC de coelho e análise de seu estado oligomérico por espalhamento dinâmico de luz em solução privada de poli(A).** (A) A PABPC nativa obtida para o experimento de EDL foi purificada por cromatografia de afinidade a partir de lisados de reticulócitos de coelho utilizando-se uma resina de poli(A)-sepharose. A coluna cromatográfica foi primeiramente lavada com solução A e depois com solução A + 0,5 M KCl. Em seguida, a proteína foi eluída com a adição de 2 ml de solução B (Ver metodologia). A PABPC purificada foi concentrada e dialisada em água Milli Q, e posteriormente, analisada em gel SDS-PAGE 13%. Neste gel, adicionamos quantidades de 1,0 à 7,5 µg de BSA (66,4 kDa), para estimarmos a concentração e o tamanho da PABPC pura. (B) A avaliação do estado oligomérico da PABPC de coelho foi feita por espalhamento dinâmico de luz utilizando 2 µM desta proteína em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 a 25°C. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico de intensidade de espalhamento de luz em função do diâmetro hidrodinâmico da partícula e, com isto, a sua massa molecular foi estimada.

#### 4.2 Construção dos plasmídeos utilizados neste trabalho.

Para identificarmos quais os domínios ou regiões da proteína citoplasmática de ligação à cauda poli(A) são responsáveis pela associação PABPC-PABPC, três conjuntos de plasmídeos foram construídos a partir do gene da PABPC humana. Diferentes deleções foram feitas neste gene para a produção de proteínas truncadas (Fig. 5A). Desse modo, em cada conjunto temos um plasmídeo contendo a sequência da PABPC selvagem (P10-636); um codificando somente os RBDs 1 e 2 (P10-190); um os RBDs 1 a 4 (P10-370); outro contendo o RBD 4 juntamente com a região rica em prolinas, mas sem o domínio C-terminal (P237-542); e por fim, um plasmídeo encerrando toda a sequência C-terminal (P372-636) (Fig. 5). Estas proteínas foram nomeadas de acordo com o número de aminoácidos remanescentes em relação à PABPC humana selvagem e os conjuntos de plasmídeos determinados pelo tipo de vetor utilizado nas clonagens. Os plasmídeos do primeiro conjunto

tiveram as cinco sequências supracitadas clonadas no vetor pGEX-2T, utilizado para expressão induzida em bactérias de proteínas recombinantes fusionadas com Glutathione-S-Transferase (GST) (Fig. 5B à esquerda). Já no segundo conjunto, essas sequências foram clonadas no vetor de expressão pcDNA3-50As sob o comando do promotor viral T7 a fim de sintetizar *in vitro* proteínas marcadas radioativamente com [<sup>35</sup>S]-metionina (Fig. 5B centro). As construções do terceiro conjunto foram feitas no vetor para expressão induzida em bactérias pET28a(+), com o objetivo de obtermos proteínas fusionadas com uma cauda de histidina N-terminal (Fig. 5B à direita).

Para a confirmação de todas as clonagens, análises de restrição foram realizadas utilizando as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, no caso das construções feitas no PGEX2T, e *BamHI* e *NotI* para as clonagens feitas tanto no pcDNA3-50As quanto no pET28a(+). Todos os fragmentos liberados corresponderam aos tamanhos esperados, conforme visto nos géis da figura 5B.

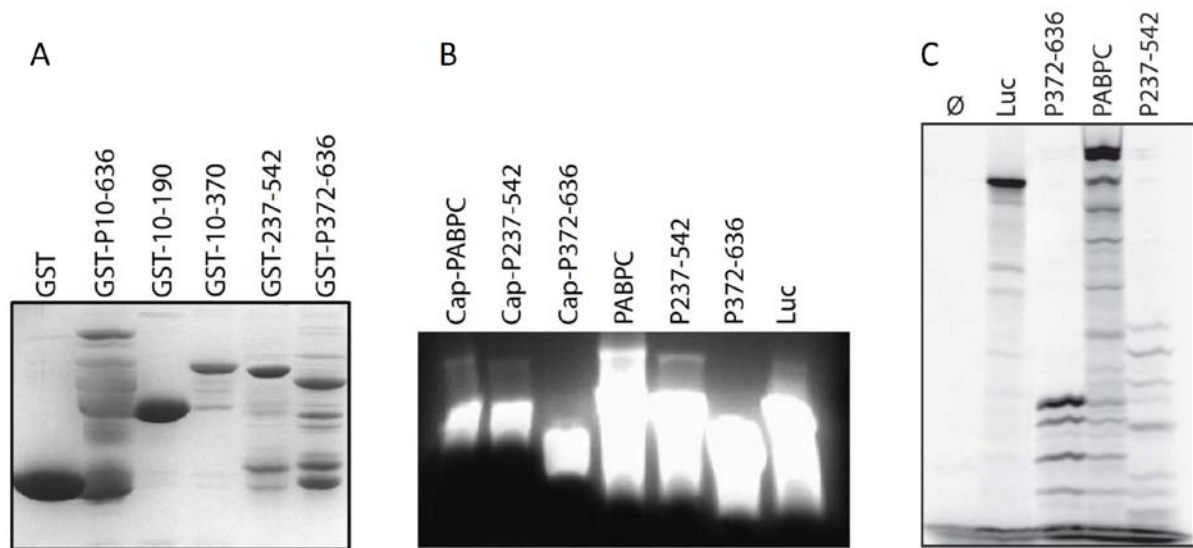


**Figura 5. Diagrama das clonagens feitas neste trabalho.** (A) Esquema das cinco proteínas básicas utilizadas nos experimentos de *Pull-down*. A PABPC e as suas formas truncadas foram nomeadas de acordo com o número de aminoácidos remanescentes da proteína humana completa, como mostrado à direita. A posição dos quatro RBDs, assim como o do domínio C-terminal (DCT), estão indicadas no modelo P10-636. Em destaque, estão as localizações dos sítios de reconhecimento das enzimas restrição *BamHI* (B), *EcoRI* (E) e *NcoI* (N). Na parte superior do painel (B), estão representados os três vetores utilizados nas diferentes clonagens. Na parte inferior, estão os resultados das análises de restrição visualizadas por eletroforese em gel de agarose. Para a digestão dos plasmídeos empregou-se as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, no caso das construções feitas no PGEX2T, e *BamHI* e *NotI* para as clonagens feitas no pcDNA3-50As e no pET28a(+).

### 4.3 Mapeamento das regiões responsáveis pela associação PABPC-PABPC independente de poli(A).

#### 4.3.1 Purificação das proteínas fusionadas com GST; transcrição e tradução *in vitro* da PABPC, P237-542 e P372-636.

Segundo os trabalhos de Kuhn e Pieler (1996) e de Melo et al. (2003), a região C-terminal da PABPC confere a habilidade de multimerização a esta proteína em presença de poli(A), e aparentemente, o RBD 4 é o principal domínio envolvido na mediação desta interação. Sendo assim, decidimos investigar as regiões responsáveis pela associação entre PABPCs em ausência de poli(A), visto que essa proteína se comporta como um homodímero quando em solução (Fig. 4). Para isso, expressamos em *E. coli* e purificamos por cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de glutationa-sepharose, a proteína PABPC e as suas variantes truncadas, todas fusionadas com GST (Fig. 6A). As proteínas GST-P10-636, GST-P237-542 e GST-P372-636 apresentaram bandas de menor massa molecular em relação à da proteína completa, talvez devido à degradação ou instabilidade intrínseca. Além disso, fizemos a transcrição e a tradução *in vitro* da PABPC selvagem (P10-636), do RBD 4 juntamente com a região poliprolina (P237-542) e de todo o C-terminal (P372-636). Usamos para a síntese proteica lisado de reticulócito de coelho suplementado com [<sup>35</sup>S]-metionina, logo, as proteínas produzidas estavam marcadas radioativamente (Fig. 6B e 6C). Nota-se na figura 6C que as proteínas traduzidas *in vitro* apresentaram algumas bandas inespecíficas de menor tamanho em relação à proteína completa (banda mais elevada). Curiosamente, este fenômeno se deu mesmo com a adição do análogo ao *Cap* aos sistemas de transcrição e da cauda poli(A) sintética clonada na extremidade 3' dos mRNAs, haja vista que estes elementos estão sabidamente envolvidos na fidelidade ao primeiro códon AUG e no aumento da eficiência da tradução (Ver introdução). Portanto, isso pode indicar que a síntese proteica iniciou-se em diferentes códons para metionina (AUG), já que a extremidade 5'UTR desses mensageiros não apresentam sequências *consensu* para o reconhecimento da trinca iniciadora (e.g sequências de Kozak). Mas também, a terminação pode ter ocorrido de maneira precoce.



**Figura 6. Purificação das proteínas fusionadas com GST; transcrição e tradução *in vitro* da PABPC, P237-542 e P372-636.** (A) A proteína PABPC e as suas variantes truncadas fusionadas com GST foram produzidas em *E. coli*, purificadas por cromatografia de afinidade utilizando uma resina de glutationa-sepharose e analisadas em gel SDS-PAGE corado com Comassie *Blue*. (B) A transcrição *in vitro* dos plasmídeos pcDNA3-50As/PABPC, pcDNA3-50As/P237-542 e pcDNA3-50As/P372-636 foi realizada empregando-se o sistema RiboMax *Large Scale RNA Production* – T7 (Promega) e os seus produtos analisados em gel desnaturante de agarose 1,2%. A fim de obtermos mRNAs capeados, adicionou-se às reações de transcrição um análogo do  $m^7G$ -Cap. Apesar da eficiência da transcrição ter sido menor nos sistemas com *Cap*, a quantidade e a qualidade dos mRNAs foi satisfatória. (C) As traduções *in vitro* dos mRNAs sintéticos foram feitas em lisados de reticulócito de coelho com a adição de 20  $\mu$ g/ml de transcrito. As reações foram incubadas durante 90 minutos a 30°C com [ $^{35}$ S]-metionina. Os seus produtos foram analisados por autorradiografia após corrida eletroforética em gel SDS-PAGE. Como controle positivo da reação, utilizamos um plasmídeo contendo o gene da Luciferase (Luc).

#### 4.3.2 Ensaio de *Pull-Down*: avaliação do potencial de interação entre o N e o C-terminal da PABPC.

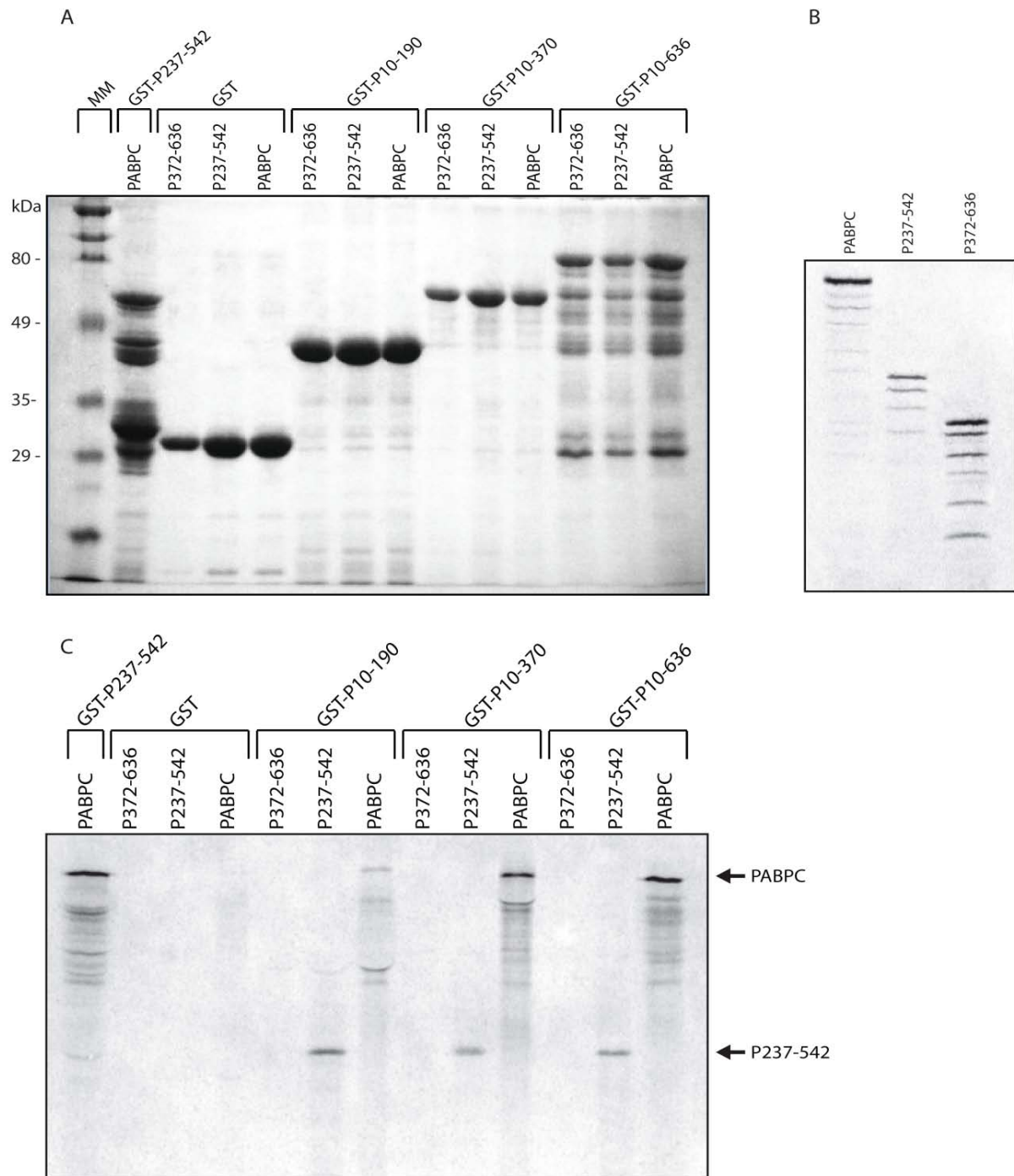
A fim de delimitarmos as regiões envolvidas na associação PABPC-PABPC em ausência de poli(A), realizamos ensaios de *Pull-down* nos quais diferentes proteínas fusionadas com GST, ainda ligadas à resina de Glutathione-Sepharose, foram combinadas com as traduzidas *in vitro*. Estas combinações foram feitas de modo que a PABPC selvagem (GST-P10-636) e as extensões do seu N-terminal (GST-P10-190 e GST-P10-370) fossem incubadas com cada uma das proteínas marcadas radioativamente. Portanto, neste experimento investigou-se tanto as



interações entre as PABPCs selvagens, a título de confirmação do resultado obtido no EDL, como as associações entre o N e o C-terminal.

Para evitar qualquer tipo de interferência das caudas poli(A) dos sistemas de tradução *in vitro* nos ensaios de *Pull-down*, ao término das reações de síntese proteica os seus produtos foram tratados com a enzima *Micrococcus nuclease* a fim de eliminar qualquer mRNA presente. Após a incubação e lavagem dos sistemas de interação, os complexos proteicos ligados à resina de Glutathiona-Sepharose foram eluídos e as proteínas analisadas por SDS-PAGE, coradas com Coomassie *Blue* e autorradiografadas.

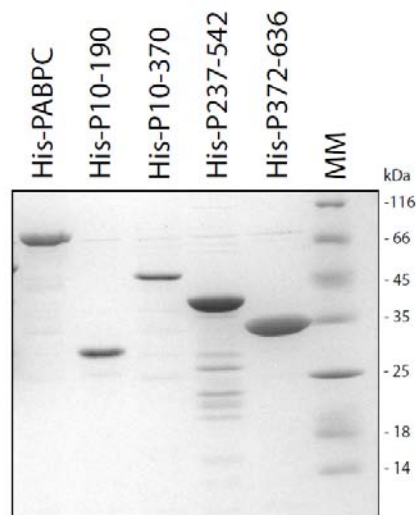
O painel superior (A) da figura 7 indica que quantidades aproximadamente iguais de GST-PABPC e das variantes truncadas foram utilizadas dentro de cada grupo de *Pull-down*. O painel da direita (B) apresenta a quantidade das proteínas marcadas com [<sup>35</sup>S]-metionina aplicadas neste experimento. Conforme mostrado na autorradiografia do painel inferior (C) a [<sup>35</sup>S]-PABPC se ligou tanto à GST-P10-190 e GST-P10-370, ou seja, com os domínios presentes em seu N-terminal, quanto à GST-P237-542, fragmento que inclui o RBD 4 e a região rica em prolinas. Além disso, também podemos notar a sua capacidade de autoassociação (poço GST-P10-636/PABPC), confirmando o resultado obtido no EDL. Ainda, a PABPC selvagem fusionada com GST (GST-P10-636) e as variantes GST-P10-190 e GST-P10-370 também se ligaram à [<sup>35</sup>S]-P237-542, mas nenhuma delas interagiu com [<sup>35</sup>S]-P372-636. Isto indica que a associação PABPC-PABPC ocorre entre os seus RBDs (com no mínimo os RBDs 1 e 2, mesmo que mais fracamente) e a sua região intermediária, que compreende o quarto domínio e a região poliprolina. O RBD 4 parece desempenhar um papel fundamental nesta associação, visto que a sua deleção suprime a interação PABPC-PABPC, conforme observado nos testes de *Pull-down* com [<sup>35</sup>S]-P372-636. Já o domínio C-terminal aparentemente não influencia esta ligação, como mostrado em estudos anteriores de interação entre a PABPC sintetizada *in vitro* e a variante GST-237-636, que nada mais é do que a variante GST-237-542 acrescida do domínio C-terminal (Melo et al., 2003). Como controle experimental para monitorar a ocorrência de associações inespecíficas, as proteínas marcadas radioativamente também foram submetidas ao *Pull-down* somente com a proteína GST, mas nenhuma interação foi notada (Poços GST).



**Figura 7. Identificação das regiões envolvidas na interação PABPC-PABPC em ausência de poli(A).** Os ensaios de *Pull-down* foram feitos por combinações entre as proteínas fusionadas com GST: P10-636, P10-190 e P10-370, e as proteínas traduzidas *in vitro*. Após a incubação e lavagem, os complexos proteicos ligados à resina de glutiona-sepharose foram eluídos por meio da adição de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE, fervidos em banho-maria e as amostras analisadas em gel desnaturante de poliácridamida. Depois da eletroforese, o gel foi corado com Coomassie *Blue*, fotodocumentado, seco e autorradiografado. (A) Visualização do *Pull-down* por coloração com Coomassie *Blue*. Neste painel, vemos predominantemente as proteínas fusionadas com GST. À esquerda, estão indicadas as massas moleculares em kDa referentes ao padrão MM (BIO-RAD *Prestained Standards*). (B) Autorradiografia das proteínas marcadas com  $^{35}\text{S}$ -metionina. As mesmas quantidades das proteínas observadas neste gel foram aplicadas nos sistemas de interação. (C) Autorradiografia do experimento de *Pull-down*. As setas destacam a localização da  $^{35}\text{S}$ -PABPC e  $^{35}\text{S}$ -P237-542 que se associaram às proteínas fusionadas com GST.

#### 4.4 Purificação da PABPC e de suas variantes truncadas fusionadas com histidina.

No experimento anterior, os testes de associação entre a PABPC e os seus diversos fragmentos ficaram restritos a combinações entre o N e o C-terminal. Sendo assim, realizamos uma nova série de arranjos de modo que todas as possíveis interações fossem analisadas, tanto N com N-terminal quanto C com C-terminal. Para isso, precisaríamos de outro conjunto de proteínas que fossem mais regulares, estáveis e abundantes do que aquelas sintetizadas *in vitro*. Logo, expressamos em *E. coli* e purificamos por cromatografia de afinidade a proteína PABPC e as suas variantes truncadas, todas contendo uma cauda de polihistidina N-terminal. A cromatografia foi feita em colunas de Níquel-Sepharose e os eluatos dialisados em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. As proteínas obtidas foram analisadas em gel SDS-PAGE, sendo bastante satisfatório o grau de pureza, quantidade, regularidade e estabilidade observada (Fig. 8).



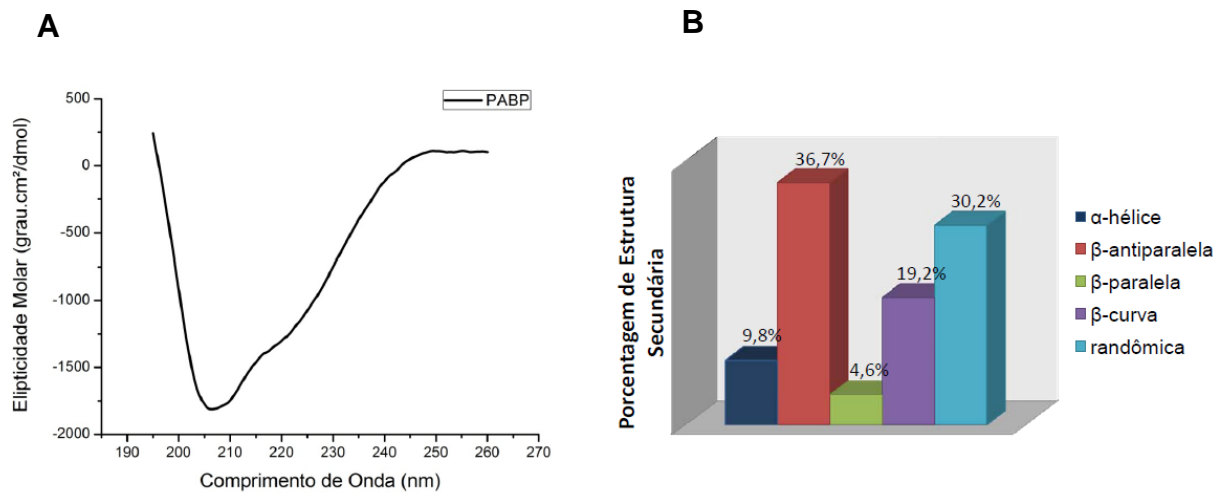
**Figura 8. Gel da purificação da PABPC e de suas variantes truncadas fusionadas com histidina.** A proteína PABPC e as suas variantes truncadas contendo uma cauda de polihistidina N-terminal foram produzidas em *E. coli* da linhagem BL21. Estas proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando uma resina de níquel-sepharose, e posteriormente, analisadas em gel SDS-PAGE corado com Comassie *Blue*. À direita do gel, estão indicadas as massas moleculares em kDa referentes ao padrão MM (Fermentas *Unstained MW Standard*).

## 4.5 Análise do padrão estrutural e teste funcional da proteína recombinante His-PABPC.

### 4.5.1 Dicroísmo Circular

Utilizamos a técnica de dicroísmo circular para avaliar o nível de dobramento da proteína recombinante His-PABPC, tendo como base as estruturas resolvidas por cristalografia de raio-X da PABPC nativa (Ver Introdução – Fig. 1). Os espectros foram obtidos em comprimentos de onda longe do UV, de 195 a 260 nm, a uma temperatura de 25°C usando 0,3 mg/ml de His-PABPC em H<sub>2</sub>O Milli Q. A curva espectral apresentou bandas características de  $\alpha$ -hélice e de estruturas- $\beta$ , em 208 e 215 nm respectivamente, contrabalanceados por valores de elipticidade molar positivos em 217 nm referentes à estruturas randômicas (Fig. 9A). A partir destes dados, as porcentagens de estruturas secundárias da His-PABPC foram calculadas utilizando o software CD Spectra Deconvolution (Institut für Biotechnologie, Alemanha), escolhendo como tipo de sinal dicróico Elipticidade Molar. O valor selecionado foi o que apresentou o somatório das porcentagens mais próximo de 100%, no caso 100,5%.

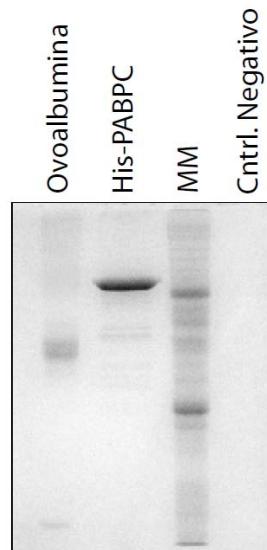
Na figura 9B podemos notar o alto conteúdo de estruturas- $\beta$  antiparalelas (36,7%) na proteína His-PABPC em concordância com os quatro RBDs da PABPC nativa, haja vista que cada um destes domínios é composto por quatro fitas- $\beta$  antiparalelas envoltas por duas  $\alpha$ -hélices em um arranjo  $\beta\alpha\beta\alpha$ . Contudo, a porcentagem de  $\alpha$ -hélice encontrada (9,8%) foi inferior ao esperado, levando em consideração que o domínio C-terminal da proteína nativa é altamente estruturado formado por cinco  $\alpha$ -hélices (Ver Introdução - Fig. 1). Portanto, este resultado nos leva a crer que o C-terminal da His-PABPC possa estar mal-dobrado ou parcialmente estruturado, o que é consistente com o elevado conteúdo de estruturas randômicas (30,2%). Todavia, esperávamos um valor considerável deste tipo de estrutura, pois no primeiro um terço do C-terminal da PABPC (dos aminoácidos 392-542) encontra-se a região poliprolina, altamente rígida e desestruturada. Sendo assim, os resultados obtidos indicam que a proteína heteróloga His-PABPC é estruturada apresentando um padrão de dobramento parecido com o da proteína nativa.



**Figura 9. Estudo por dicroísmo circular do padrão estrutural da proteína recombinante His-PABPC.** Os experimentos de dicroísmo circular da proteína His-PABPC foram feitos em comprimentos de onda longe do UV, de 195 a 260 nm, a uma temperatura de 25°C, empregando-se 0,3 mg/ml desta proteína em H<sub>2</sub>O Milli Q. (A) Curva espectral da elipticidade molar da proteína His-PABPC em função do comprimento de onda. (B) As porcentagens de estruturas secundárias da proteína foram calculadas utilizando o software CD Spectra Deconvolution a partir dos valores de elipticidade molar obtidos em A.

#### 4.5.2 Teste do potencial da proteína recombinante His-PABPC associar-se ao poli(A).

Já que a proteína His-PABPC apresentou um grau de organização estrutural próximo ao da PABPC nativa, conforme visto nas análises de dicroísmo circular, decidimos examinar a funcionalidade desta proteína testando a sua capacidade de ligação a um trato de poliadenosinas. Para isso, elaboramos um experimento de *Pull-down* empregando como “isca” uma resina de sepharose conjugada com pequenas caudas de poli(A). A proteína His-PABPC foi incubada por uma hora a 4°C com tal resina e também com uma resina de glutationa-sepharose. Esta última, utilizada como controle negativo para monitorar possíveis interações inespecíficas. Após a lavagem e a sedimentação dos complexos por centrifugação, as proteínas foram analisadas em gel SDS-PAGE e posteriormente coradas com Coomassie *Blue* (Fig. 10). Neste gel, podemos observar que a His-PABPC se associou ao poli(A) (poço His-PABPC) desempenhando a sua função tal como a proteína nativa. Logo, os resultados do dicroísmo circular e do teste funcional da His-PABPC sugerem que esta proteína recombinante produzida em *E. coli* apresenta as características da PABPC nativa. E isto, permite o seu uso experimental em substituição à forma natural.



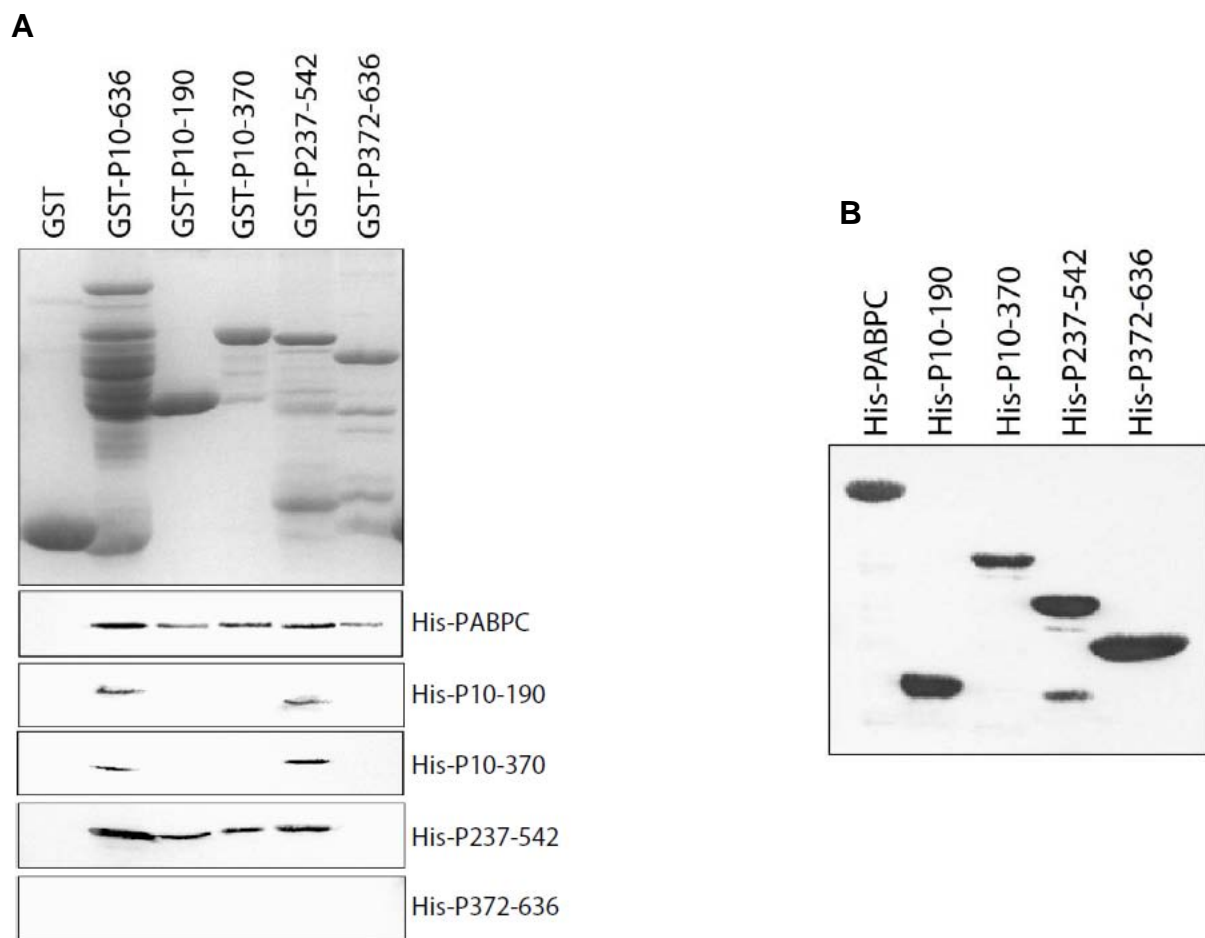
**Figura 10. Teste da capacidade da proteína recombinante His-PABPC associar-se ao poli(A).** Neste ensaio, a proteína His-PABPC foi incubada por uma hora a 4°C com uma resina de poli(A)-sepharose previamente saturada com 4 mg/ml de ovoalbumina. Após a lavagem e a sedimentação dos complexos por centrifugação, as proteínas foram analisadas em gel SDS-PAGE 13% corado com Coomassie *Blue*. Como controle negativo, para monitorarmos possíveis interações inespecíficas, esta mesma proteína foi incubada com uma resina de glutationa-sepharose.

#### **4.6. O RBD 4 juntamente com a sequência poliprolina são suficientes para que ocorra a associação PABPC-PABPC independente de poli(A).**

Como visto no experimento de *Pull-down* anterior (Fig. 7) e no trabalho de Melo et al. (2003), o RBD 4 juntamente com a sequência poliprolina, ou seja, a proteína truncada P237-542, aparentemente é a principal região envolvida na associação PABPC-PABPC. Levando em consideração que nestes experimentos as combinações entre a PABPC e os seus diversos fragmentos ficaram restritas a interações entre o N e o C-terminal ou interações com a proteína completa, realizamos uma nova série de arranjos de modo que todas as possíveis ligações fossem testadas, tanto N com N quanto C com C-terminal, e também com a PABPC inteira. Portanto, fizemos ensaios de *Pull-Down* utilizando como “iscas” todo o conjunto de proteínas fusionadas com GST. Estas proteínas foram incubadas em reações de interação com os vários fragmentos da PABPC contendo a cauda de polihistidina N-terminal. Após a lavagem e a sedimentação dos complexos por centrifugação, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante, e em seguida, analisadas por *Western blot*.

No painel superior da figura 11A estão em evidência as proteínas fusionadas com GST, nota-se que quantidades aproximadamente iguais tanto da GST-PABPC quanto de suas variantes truncadas foram utilizadas neste experimento. No painel da direita (B) visualizamos as proteínas contendo a cauda de polihistidina e as respectivas quantidades aplicadas no *Pull-down*. Nas diversas tiras que compõem o painel inferior da figura 11A estão os resultados das interações entre as proteínas analisadas por *Western blot*. Na primeira tira observa-se que a proteína His-PABPC se associou com os fragmentos N-terminais GST-P10-190 e GST-P10-370, e também com a forma GST-P237-542. Mais uma vez, notamos a autoassociação da PABPC em ausência de poli(A) (poço GST-P10-636/His-PABPC). Curiosamente, neste ensaio o fragmento C-terminal GST-P372-636 interagiu, mesmo que fracamente, com a His-PABPC. Isto pode ser consistente com a literatura (Kuhn e Pieler, 1996), na qual a mesma associação foi observada, mas em presença de um pequeno trato de poli(A). Na segunda e na terceira tira analisamos as possíveis ligações entre o N-terminal da PABPC e as outras diversas regiões, inclusive as combinações N com N-terminal. Interessante, que somente a PABPC inteira (GST-P10-636) e o fragmento intermediário GST-P237-542 interagiram com as proteínas His-P10-190 e His-P10-370. Estas associações foram pelo menos duas vezes mais fracas com His-P10-190 do que His-P10-370. Mas, neste experimento não detectamos associação entre os próprios RBDs. Estes fatos sugerem que a interação PABPC-PABPC independente de poli(A) acontece entre os RBDs e a região que compreende o quarto domínio incluindo a sequência poliprolina. Confirmamos estes resultados quando fizemos o *Pull-down* entre a proteína His-P237-542 e as variantes truncadas fusionadas com GST. Portanto, na quarta tira podemos notar que a região intermediária P237-542 complexou-se com as proteínas contendo os RBDs 1 e 2 e 1 à 4 (GST-P10-190 e GST-P10-370) e também com a PABPC selvagem (GST-P10-636). Sendo que a interação GST-P10-636/His-P237-542 foi duas vezes mais forte do que as outras deste experimento (Fig. 12B grupo "Sem RNA"). Além disso, esta proteína se ligou ao seu equivalente fusionado com GST numa associação GST-P237-542/His-P237-542 aparentemente estável. Contudo, não observamos ligação com o C-terminal GST-P372-636. Na quinta tira, nenhuma interação foi identificada entre His-P372-636 e os fragmentos da PABPC. Nem mesmo a associação com a PABPC completa se repetiu, conforme visto no poço GST-P372-636/His-PABPC. De acordo com os estudos feitos por difração

circular da proteína His-PABPC, podemos estimar que His-P372-636 (fragmento que contém o estruturado domínio C-terminal) provavelmente não possui um dobramento correto ou suficientemente estruturado interferindo na sua associação com as demais proteínas. Ou estas interações simplesmente não ocorrem em ausência de poli(A) devido a exigência do RBD 4 junto à sequência poliprolina. Conforme observado no primeiro experimento de *Pull-Down* (Fig. 7).



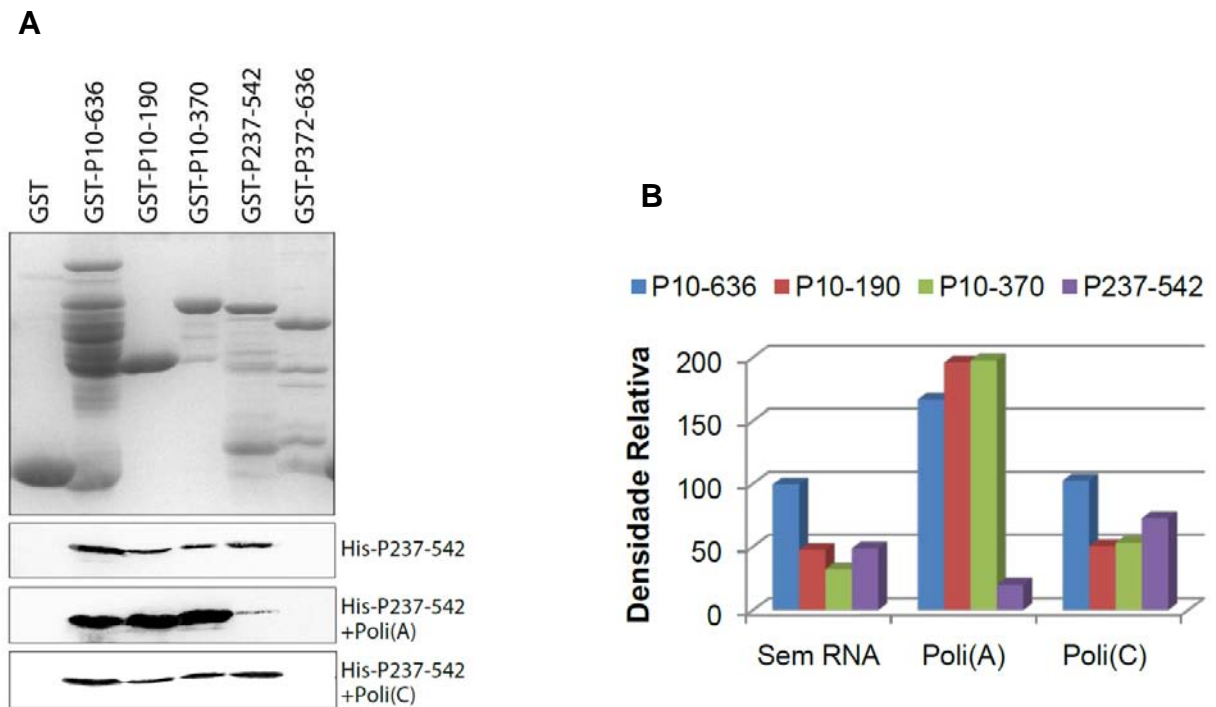
**Figura 11. Delimitação das regiões envolvidas na interação PABPC-PABPC independente de poli(A).** Os ensaios de *Pull-down* foram feitos por combinações entre as proteínas fusionadas com GST (“iscas”) e as proteínas contendo a cauda polihistidina N-terminal. Após a incubação e lavagem, os complexos proteicos ligados à resina de glutationa-sepharose foram eluídos por meio da adição de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE, fervidos em banho-maria e as amostras submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Depois da corrida eletroforética, as proteínas foram analisadas por *Western blot* e o gel corado com Coomassie *Blue*. Painel superior (A): Visualização do *Pull-down* por coloração com Coomassie *Blue*. Neste painel, vemos predominantemente as proteínas fusionadas com GST. Painel inferior (A): Nas diversas tiras que compõem este painel estão os resultados das interações entre as proteínas analisadas por *Western blot*. À direita, estão destacadas as proteínas reconhecidas pelo anticorpo primário anti-polihistidina. (B) *Western blot* das proteínas recombinantes fusionadas com histidina reconhecidas pelo anticorpo primário anti-polihistidina. As mesmas quantidades das proteínas observadas neste gel foram aplicadas nos sistemas de interação.



#### **4.7. A associação PABPC-PABPC é incrementada na presença de poli(A) quando há mais de um RBD e a sequência poliprolina nos sistemas de interação.**

Diante de todos esses resultados, surgem algumas questões: a associação PABPC-PABPC dependente de RNA também só requer o quarto RBD e a sequência poliprolina? O que acontece se saturamos com poli(A), como uma forma de competição, os sistemas de interação entre His-P237-542 e as proteínas fusionadas com GST? Será que dessa forma a ligação P237-542/P237-542 é rompida, visto que o seu único RBD pode estar ocupado pelo poli(A)? Para responder essas perguntas, fizemos um ensaio de *Pull-down* de acordo com a situação supracitada, ou seja, adicionamos 20 µg/ml de poli(A) nos sistemas de interação entre His-P237-542 e as proteínas fusionadas com GST. Logo, na segunda tira da figura 12A podemos observar que as interações entre His-P237-542 e as proteínas GST-PABPC, GST-P10-190 e GST-P10-370 foram incrementadas na presença de poli(A). Este aumento foi de pelo menos uma vez e meia para a GST-PABPC e duas vezes para GST-P10-190 e GST-P10-370 em relação ao *Pull-down* sem RNA (Fig. 12B). Em contrapartida, a associação GST-P237-542/His-P237-542 foi reduzida pela metade. Vale lembrar que a proteína truncada GST-P237-542 não tem grande afinidade pelo poli(A), conforme estudos de *band-shift* feitos por Melo et al. (2003), consequentemente, a proteína His-P237-542 deve se comportar da mesma maneira. Este fato eliminaria possíveis pontes de interação mediada pelo RNA entre estas proteínas, portanto, estamos avaliando as interações proteína-proteína dependentes de poli(A). Para monitorarmos se este fenômeno é realmente devido ao poli(A), repetimos o mesmo *Pull-down*, mas ao invés de poliadenina adicionamos poli(C) aos sistemas de interação, pois é um ácido nucleico inespecífico à atividade da PABPC. Neste experimento, não houve variação significativa na afinidade das ligações entre as proteínas combinadas; isto, em comparação aos resultados obtidos nos ensaios de *Pull-down* privados de RNA (terceira tira Fig. 12A e grupo “poli(C)” Fig. 12B). Desse modo, podemos concluir que há um aumento na afinidade entre as PABPCs em presença de poli(A), mas somente quando disponível mais de um RBD e a sequência poliprolina nos sistemas de interação. Em oposição, a associação entre proteínas contendo apenas um RBD, neste caso o RBD 4, e o trato poliprolina foi

reduzida após a adição do ácido nucleico. Talvez, a saturação com poli(A) do sistema de interação GST-P237-542/His-P237-542 interfira na ligação destas proteínas por ocupar ou mudar a conformação do RBD 4, tornando-o menos afim ou incapaz de se associar à região poliprolina.



**Figura 12. Estudo da influência do poli(A) na associação entre P237-542 e as proteínas fusionadas com GST.** Estes ensaios de *Pull-down* foram feitos como descrito na figura 11, mas com adição de 20 µg/ml de poli(A) ou poli(C) aos sistemas de interação. No painel superior (A) visualizamos o *Pull-down* por coloração com Coomassie *Blue*. Neste gel, estão em evidência as proteínas fusionadas com GST. Nas tiras do painel inferior (A), estão os resultados das interações entre as proteínas analisadas por *Western blot*. À direita, estão destacadas as proteínas reconhecidas pelo anticorpo primário anti-poli-histidina e os RNAs utilizados neste experimento. Os resultados das interações entre His-P237-542 e as proteínas fusionadas com GST foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. Portanto, o gráfico (B) mostra a quantidade de His-P237-542 que sofreu *pull-down* na ausência ou presença de RNA. Na legenda, estão em destaque as proteínas (“iscas”) fusionadas com GST que interagiram com His-P237-542. Os valores obtidos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de cinza dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos uma investigação sistemática sobre os aspectos estruturais e moleculares envolvidos na interação PABPC-PABPC. De acordo com os objetivos propostos, procuramos identificar as regiões mediadoras desta associação em presença ou ausência de poli(A). Com base nos resultados obtidos, discutiremos as implicações funcionais desta ligação no contexto do metabolismo celular.

Conforme visto na introdução, a PABPC desempenha papéis fundamentais em várias etapas da expressão gênica. A sua versatilidade se reflete nas inúmeras interações que é capaz de realizar com diversos fatores-chave para o metabolismo celular, envolvidos tanto com a biogênese e estabilidade, quanto com a tradutibilidade dos mRNAs. Dessa maneira, a relevância da PABPC para a sobrevivência das células eucarióticas encontra-se fundamentada em uma complexa rede de associações simultâneas entre proteínas e o mensageiro, mantidas unicamente por essa cadeia polipeptídica. Por exemplo, o primeiro e o segundo domínio de ligação ao RNA da PABPC interagem ao mesmo tempo com a cauda poli(A) e com os fatores eIF4G e PAIP1 (Burd et al., 1991; Kessler e Sachs, 1998; Imataka et al., 1998; Roy et al., 2002). Nesta associação, um lado da molécula estaria ligado ao poli(A), enquanto que o seu verso estaria envolvido com a interação dos fatores protéicos (Deo et al., 1999; Pérez-Cañadillas e Varani, 2001). Do mesmo modo, esta sobreposição funcional é observada no seu domínio C-terminal. Esta região altamente conservada e estruturada está envolvida na interação com os fatores eRF3, PAIP1, PAIP2 (Hoshino et al., 1999; Kozlov et al., 2001; Khaleghpour et al., 2001b; Roy et al., 2002), sendo essencial para a viabilidade celular em leveduras (Coller et al., 1998). A região de conexão entre os RBDs e o domínio C-terminal da PABPC, antigamente era tida como pouco relevante para as funções da proteína devido a baixa conservação de sua sequência primária. Em oposição, os nossos estudos e trabalhos anteriores (Kuhn e Pieler, 1996; Melo et al., 2003) mostraram que esta região rígida e desestruturada com alta concentração de prolina é fundamental para a interação entre moléculas de PABPC. Surpreendentemente, na PABPC humana, um em cada 5 ou 6 aminoácidos neste local é uma prolina e um em cada 3 é uma glutamina, asparagina ou arginina.

Também, não há nenhum resíduo negativamente carregado num trato de pelo menos 150 aminoácidos. Embora, a análise por homologia entre as sequências do C-terminal da PABPC de diferentes organismos não tenha demonstrado grande conservação na região conectora, os aminoácidos prolina, glutamina e, em menor quantidade, asparagina e arginina foram mantidos, assim como a ausência de resíduos ácidos (Melo et al., 2003). As sequências ricas em prolina são extensivamente encontradas nos mais diferentes organismos, sendo os motivos mais recorrentes envolvidos em associações entre proteínas, devido as suas características biofísicas (Kay et al., 2000; Li, 2005).

Em nosso trabalho, nós observamos por espalhamento dinâmico de luz que a PABPC de coelho se comporta como um homodímero em solução privada de poli(A) (Fig. 4). Esse resultado foi confirmado nos experimentos de *Pull-down*, nos quais novamente a associação PABPC-PABPC foi observada. Portanto, pela primeira vez, o estado oligomérico desta proteína foi definido em ausência de outros fatores. Diante destes resultados, nós delimitamos as regiões responsáveis por esta associação, tanto dependente quanto independentemente de poli(A). Já se sabia que o C-terminal da PABPC estava envolvido na multimerização desta proteína em presença de poli(A) (Kuhn e Pieler, 1996). Estudos recentes mostraram que a interação PABPC-PABPC não tinha a participação de seu domínio C-terminal, mas foi notado que o quarto RBD contribuía significativamente para esta associação, tanto em ausência quanto em presença de poli(A) (Melo et al., 2003). Nós confirmamos estes resultados, mas também, descobrimos por experimentos de *Pull-down* que a interação entre PABPCs independente de poli(A) ocorre entre os seus RBDs (com no mínimo os RBDs 1 e 2) e a sua região intermediária, que compreende o quarto domínio e a região poliprolina. Além disso, observamos que o RBD 4 juntamente com a sequência poliprolina são suficientes para que ocorra a associação PABPC-PABPC em ausência de poli(A). O RBD 4 parece desempenhar um papel fundamental nesta associação, visto que a sua deleção suprime a interação PABPC-PABPC, conforme observado nos testes de *Pull-down* com a forma truncada P372-636. Estes resultados podem ser relacionados com os obtidos em leveduras, onde nem os dois primeiros RBDs nem os 50 últimos aminoácidos da PABPC, o que inclui grande parte de seu domínio C-terminal, estão envolvidos na estabilização dos mRNAs (Coller et al., 1998). O RBD 4 é o domínio menos

compreendido das PABPCs. Uma análise comparativa da conservação da sequência primária dos RBDs de diferentes organismos mostra que o quarto domínio é tão conservado quanto o RBD 2, o qual está envolvido em importantes funções, tais como o reconhecimento da cauda poli(A), associação com eIF4G, PAIP1 e PAIP2. Em contraste, os RBDs 1 e 3 são muito menos conservados. Essas observações sugerem que os quatro RBDs originaram-se de duplicações sucessivas antes da divergência de leveduras e mamíferos (Fukami-Kobayashi et al., 1993). Portanto, os resíduos de aminoácidos do RBD 1 são mais similares aos do RBD 3, enquanto que os do RBD 2 são mais similares aos do RBD 4 (Deo et al., 1999). A relativa conservação do RBD 4 e a similaridade com o RBD 2 pode explicar em parte o seu envolvimento na interação PABPC-PABPC. Embora, o RBD 4 seja descrito como fundamental à viabilidade celular por desempenhar papéis importantes na tradução e estabilidade do mRNA (ver introdução), nenhum fator de interação com este domínio foi identificado até o momento.

Diante deste cenário, avaliamos se a associação PABPC-PABPC em presença de poli(A) sofreria alguma influência deste ácido nucleico, haja vista que a proteína pode mudar a sua conformação quando ligada a este homopolímero. Curiosamente, a associação entre o N-terminal da PABPC e a sua região intermediária foi incrementada na presença de poli(A). O mesmo fenômeno foi observado com a proteína completa. Uma explicação para estes eventos é que possivelmente na presença de poli(A) os RBDs sofrem uma mudança conformacional expondo os desconhecidos motivos de oligomerização aumentando a superfície de contato com a região poliprolina da proteína truncada P237-542. Em oposição, a associação entre as proteínas contendo apenas o RBD 4 e o trato poliprolina foi reduzida após a adição do ácido nucleico. Talvez, a saturação com poli(A) do sistema de interação GST-P237-542/His-P237-542 interfira na ligação destas proteínas por ocupar ou mudar a conformação do RBD 4, tornando-o menos afim ou incapaz de se associar à região poliprolina. Um fato semelhante foi observado no trabalho de Kuhn e Pieler (1996), quando num experimento de *band-shift*, utilizando como sonda um trato de 23 adeninas, a proteína truncada contendo apenas o RBD 3 e o C-terminal perdeu a capacidade de se oligomerizar. Em contrapartida, neste mesmo experimento as formas truncadas da PABPC contendo os RBDs 2-3 ou 3-4 mais o C-terminal apresentaram-se como multímeros na

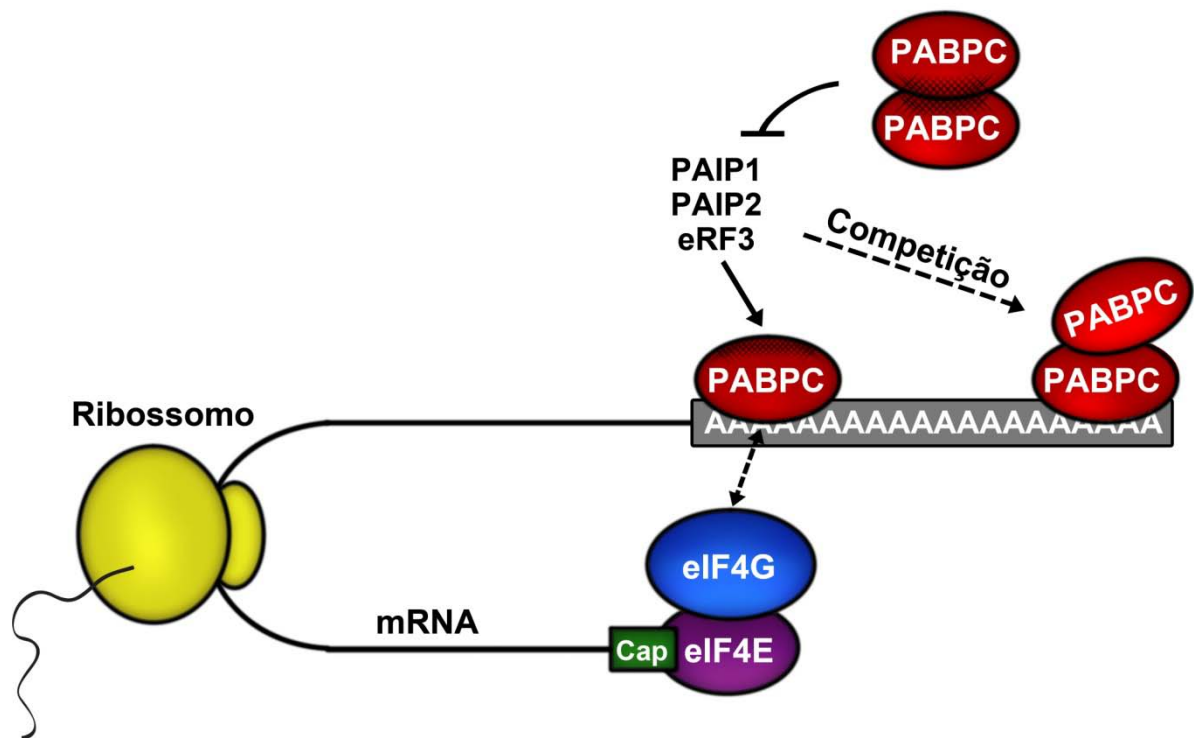
presença de poli(A). Sendo assim, podemos concluir que há um aumento na afinidade entre as PABPCs em presença de poli(A), mas somente quando há disponível mais de um RBD e a sequência poliprolina nos sistemas de interação. No nosso caso, as interações exigiram mais de um RBD e a unidade “RBD 4 + sequência poliprolina” (associação de P237-542 com P10-190, P10-370 e P10-636). Com isto em mente, podemos inferir que pelo menos um dos dois RBDs, em uma associação entre dois domínios e a região poliprolina, deve ser ou RBD 2 ou o RBD 4. Isto, devido ao grau de conservação entre estes dois domínios. Entretanto, nos ensaios de *Pull-down* combinando-se os RBDs com a proteína truncada P372-636 (que não contém o RBD 4 conjugado com a região poliprolina), nenhuma associação foi notada, tanto na presença como na ausência de poli(A). Este evento sugere que somente a presença da sequência poliprolina combinada com os RBDs não é suficiente para a associação PABPC-PABPC. Portanto, esta interação exige o RBD 4 junto à sequência poliprolina, aparentemente, compondo uma unidade fundamental de interação. Mas, isso pode ser questionado porque nenhum trabalho foi feito utilizando somente a sequência poliprolina, combinando-a com os diferentes RBDs. De acordo com os nossos estudos feitos por dicroísmo circular da proteína His-PABPC, podemos estimar que a variante His-P372-636 provavelmente não possui um dobramento correto ou suficientemente estruturado interferindo na sua associação com as demais proteínas. O fato de nossa única construção sem os RBDs contendo a região poliprolina ser esta proteína, indica que o seu dobramento incorreto poderia mascarar ou encobrir a habilidade do motivo poliprolina mediar à associação PABPC-PABPC sem estar conjugada com o quarto RBD.

A sequência rica em prolina foi relacionada como candidata a mediadora da interação PABPC-PABPC, porque sabidamente os motivos poliprolina estão envolvidos numa enorme variedade de interações entre proteínas. Estas sequências possuem as características ideais para tal tarefa. São frequentemente encontradas na superfície, em oposição a estarem enterradas nas proteínas, tornado-se acessíveis ao seu ligante (Holt e Koffer, 2001). Estes motivos também são estáveis e resistentes a substituições de aminoácidos. Sendo assim, várias combinações entre outros aminoácidos e resíduos de prolina podem ser incorporadas na sequência peptídica sem comprometer a integridade estrutural. Além disso, a rigidez relativa de um trecho poliprolina perde pouca entropia conformacional durante uma

associação, ligando-se mais favoravelmente ao seu alvo do que outras sequências peptídicas. Contudo, as sequências ricas em prolina não se associam tão fortemente quanto os domínios globulares; entretanto, esta ligação mais fraca pode ser de grande vantagem, visto que ela permite célere modulação das interações (Kay et al., 2000). Dessa maneira, a sua associação ou desassociação pode ser bastante rápida. Portanto, o papel destas sequências estaria mais relacionado com o recrutamento ou aproximação de proteínas que posteriormente se associarão, ao invés de participar ativamente da formação de complexos estruturalmente definidos e estáveis. Isso significa que estes motivos funcionam como “adaptadores” transientes nos mais diferentes processos celulares (Kay et al., 2000; Li, 2005). Tal propriedade seria de grande utilidade para uma proteína como a PABPC que serve de arcabouço e é mediadora de interações entre os mais variados fatores proteicos. Esse comportamento também poderia estar relacionado com a sua homodimerização em ausência de poli(A). Logo, quando a PABPC está livre no citoplasma da célula ela encontra-se autoassociada numa conformação fechada bloqueando os seus sítios de interação com os fatores proteicos, e assim que uma cauda poli(A) esteja disponível, este homodímero avidamente se associa ao mRNA (Fig. 13). Ou, tomando como modelo a PABP nuclear de *Xenopus laevis* (Ver introdução – Fig. 3), este homodímero seria desfeito pelo rompimento das interações entre a sequência poliprolina e os RBDs e, então, a PABPC se associaria como monômero ao poli(A), e depois seria capaz de se multimerizar. Portanto, poderíamos especular que a interação PABPC-PABPC é um mecanismo hipotético de inibição a associação precoce de fatores de regulação e iniciação da tradução que utilizem esta proteína como arcabouço (Fig. 13). Isto, por exemplo, regularia os eventos que antecedem a montagem do complexo de iniciação da tradução. Desse modo, a PABPC não se associaria ao mRNA já ligada a um fator repressor, como PAIP2. A interação entre a PABPC e os diversos eIFs deve seguir uma regulação temporal baseada na cooperação entre os próprios fatores. Sendo assim, a PABPC se ligaria à cauda poli(A) e ao eIF4F e só então poderia ser regulada por PAIP1 e PAIP2 ou capaz de se associar ao eRF3. Esta hipótese pode estar de acordo com o que foi visto em leveduras. A interação da Pab1p (denominação da PABPC em levedura) com a Pbp1p (proteína de ligação a Pab1p), que atua como reguladora negativa da Pab1p no processo de poliadenilação, só foi detectada por meio de ensaios de *two-hybrid*, onde apenas o domínio C-terminal da Pab1p foi usado como “isca” (Mangus

et al., 1998). Isso demonstra que a presença do N-terminal provavelmente bloqueia a capacidade do C-terminal interagir com Pbp1p em ausência de poli(A). Observação similar também foi feita em relação à ligação da PABPC com eRF3, pois a interação entre ambos foi incrementada quando apenas o C-terminal da PABPC era empregado no estudo da ligação com o N-terminal de eRF3 (Hoshino et al., 1999). Este resultado mostra que a capacidade do N-terminal bloquear as propriedades de ligação do C-terminal não era um fenômeno restrito apenas a Pbp1p. Logo, poderíamos inferir que essas duas proteínas truncadas que continham somente o C-terminal da PABPC não possuem a capacidade de se autoassociarem, deixando expostos os sítios de interação com os descritos fatores protéicos. Ao passo que, com a PABPC completa haveria a formação do homodímero e, conseqüentemente, estes sítios estariam bloqueados. Curiosamente, também foi observado que eRF3 suprime a habilidade da PABPC multimerizar-se quando associada ao poli(A) (Hoshino et al., 1999). Isto sugere que a ligação dos fatores protéicos com a forma homodimerizada da PABPC se dá competitivamente. Dessa maneira, estes elementos interfeririam na interação PABPC-PABPC quando em associação com o poli(A), deslocando uma das proteínas de modo que a ligação ocorresse somente com a forma monomérica da PABPC. Algumas outras evidências indicam que a atividade da PABPC também pode ser modulada por modificações covalentes. Em plantas, a fosforilação da PABPC parece regular a sua capacidade de ligação ao poli(A), uma vez que apenas as proteínas modificadas oligomerizam-se na presença deste ácido nucleico (Le et al., 2000). Em humanos, a PABPC foi identificada como substrato da enzima arginina metiltransferase (CARM1) (Lee e Bedford, 2002). As proteínas modificadas por enzimas apresentando este tipo de atividade parecem sofrer interferência em seus potenciais de interação proteína-proteína (Bedford et al., 2000). Interessante, que a região de ocorrência da metilação da PABPC pela CARM1 foi identificada nos resíduos 384-478, flanqueando a sequência poliprolina (Lee e Bedford, 2002). Os dois resíduos de arginina que são frequentemente modificados são: R455 e R460 (Lee e Bedford, 2002). Já que os nossos ensaios foram feitos *in vitro* utilizando proteínas recombinantes essas modificações não puderam ser relacionadas com os resultados obtidos. Mas, um fato pode ser levado em consideração, a multimerização, pela menos da PABPC humana, independe de fosforilação ou metilação.





**Figura 13. Modelo teórico das interações da PABPC e as suas implicações funcionais na síntese proteica.** A PABPC, quando não associada ao poli(A), se comporta como um homodímero. Este estado oligomérico inibiria a associação precoce de fatores de regulação e iniciação da tradução, evitando, por exemplo, que a PABPC se ligue ao mRNA já conjugada com um fator repressor, como PAIP2. Logo, a interação entre a PABPC e os diversos eIFs deve seguir uma regulação temporal baseada na cooperação entre os próprios fatores proteicos. Desse modo, a PABPC se ligaria à cauda poli(A) e ao eIF4E e só então poderia ser regulada por PAIP1 e PAIP2 ou capaz de se associar ao eRF3. Além disso, as proteínas PAIP1, PAIP2 e eRF3 compete pela PABPC que compõe o homodímero ligada ao poli(A), deslocando uma das proteínas de modo que a ligação entre estes fatores aconteça somente com a forma monomérica da PABPC.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O conjunto de resultados apresentados nessa dissertação contribui para a compreensão das atividades e dos mecanismos de regulação da proteína PABPC. A PABPC é uma proteína amplamente conservada entre os eucariotos, apresentando uma enorme gama de funções inerentes à sua capacidade de associação com inúmeros fatores proteicos e ribonucleotídeos. Sua flexibilidade funcional pode explicar o vasto espectro de participação da PABPC em processos fundamentais relacionados ao metabolismo do mRNA, tais como: biogênese, localização, tradução e degradação desta molécula. Neste trabalho, nós mostramos que a interação entre PABPCs independente de poli(A) ocorre entre os seus RBDs (com no mínimo os RBDs 1 e 2) e a sua região intermediária, que compreende o quarto domínio e a região poliprolina. Além disso, também notamos que somente o RBD 4 juntamente com a sequência poliprolina são suficientes para que ocorra a associação PABPC-PABPC em ausência de poli(A). Curiosamente, a interação entre o N-terminal da PABPC e a sua região rica em prolinas foi incrementada na presença de poli(A). Contudo, novos trabalhos precisam ser feitos para definir precisamente a estrutura e a conformação da PABPC quando associada ao poli(A), e também, na ausência deste ácido nucleico. O estudo da oligomerização da PABPC e o mapeamento das regiões envolvidas nas diversas interações das quais esta proteína participa é bastante importante, haja vista, por exemplo, que há muito a se descobrir sobre o papel da PABPC no orquestrado mecanismo de síntese proteica. Além disso, foi demonstrado que a associação entre PABPCs facilita a sua ligação à cauda poli(A) (talvez de maneira cooperativa) e influencia algumas de suas atividades, como por exemplo, a redução na taxa de desadenilação de um mensageiro e o seu próprio mecanismo de autorregulação (Kuhn e Pieler, 1996; Melo et al., 2003). Neste trabalho, algumas questões permaneceram insolúveis, enquanto outras foram levantadas. Desse modo, os resultados obtidos abrem um leque de perspectivas a serem investigadas experimentalmente. Essas abordagens permitirão o prosseguimento de estudos para um melhor entendimento do controle da intrincada rede expressão gênica em eucariotos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, S.A.; NAKAGAWA, T.; SWANSON, M.S.; WOODRUFF, T.K.; DREYFUSS, G. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. **Mol Cell Biol.** 6: 2932–2943, 1986.
- ALLEN, N.P.; HUANG, L., BURLINGAME, A.; REXACH, M. Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. **J Biol Chem.** 276: 29268-29274, 2001.
- AMRANI, N.; GHOSH, S.; MANGUS, D.A.; JACOBSON, A. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. **Nature** 453: 1276–1280, 2008.
- BAER, B.W.; KORNBERG, R.D. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. **J Cell Biol.** 96: 717-721, 1983.
- BAER, B.W.; KORNBERG, R.D. Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA.** 77: 1890-1892, 1980.
- BALL, L.J.; JARCHAU, T.; OSCHKINAT, H.; WALTER, U. EVH1 domains: structure, function and interactions. **FEBS Lett.** 513: 45–52, 2002.
- BARKOFF, A.; BALLANTYNE, S.; WICKENS, M. Meiotic maturation in *Xenopus* requires polyadenylation of multiple mRNAs. **EMBO J,** 17: 3168-3175, 1998.
- BEDFORD, M.T.; FRANKEL, A.; YAFFE, M. B.; CLARKE, S.; LEDER, P.; RICHARD, S. Arginine Methylation Inhibits the Binding of Proline-rich Ligands to Src Homology 3, but Not WW, Domains. **J. Biol. Chem.** 275: 16030-16036, 2000.
- BEHM-ANSMANT, I.; REHWINKEL, J.; DOERKS, T.; STARK, A.; BORK, P.; IZAURRALDE, E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. **Genes & Dev** 20: 1885–1898, 2006.
- BERNSTEIN, P.; PELTZ, S.W.; ROSS, J. The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. **Mol Cell Biol.** 9: 659-670, 1989a.

BERNSTEIN, P.; ROSS, J. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. **Trends Biochem Sci.** 14: 373-377, 1989b.

BI, X.; GOSS, D.J. (2000). Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. **J Biol Chem.** 275: 17740-17746, 2000.

BIENROTH, S.; KELLER, W.; WAHLE, E. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. **EMBO J.** 12: 585-594, 1993.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res,** 7(6): 1513-23, 1979.

BLOBEL, G. A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 70: 924–928, 1973.

BOECK, R.; LAPEYRE, B.; BROWN, C.E.; SACHS, A.B. Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast *spb8-2* mutant. **Mol Cell Biol.** 18: 5062-5072, 1998.

BOECK, R.; TARUN, S.; RIEGER, M.; DEARDORFF, J.A.; MÜLLER-AUER, S.; SACHS, A.B. The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity, **J Biol Chem.** 271: 432–438, 1996.

BONNEROT, C.; BOECK, R.; LAPEYRE, B. The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p Interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. **Mol Cell Biol.** 20: 5939-5946, 2000.

BORMAN, A.M.; MICHEL, Y.M.; KEAN, K.M. Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. **Nucleic Acids Res.** 28: 4068-4075, 2000.

BROWN, C.E.; TARUN, S.Z., BOECK, R.; SACHS, A.B. PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol.** 16: 5744– 5753, 1996.

BURD, C. G.; MATUNIS, E.L; DREYFUSS, G. The mutiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. **Mol. Cell Biol.** 11: 3419-3424, 1991.

BURD, C.G.; DREYFUSS, G. Conserved structures and diversity of functions of rna-binding proteins. **Science** 265: 615-621, 1994.

BUSHATI, N.; COHEN, S.M. MicroRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23: 175–205, 2007.

CAPONIGRO, G.; PARKER, R. Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*, **Microbiol Rev.** 60: 233–249, 1996.

CAPONIGRO, G.; PARKER, R. Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. **Genes Dev.** 9: 2421–2432, 1995.

CASTAGNOLI, L.; COSTANTINI, A.; DALL'ARMI, C.; GONFLONI, S.; MONTECCHI-PALAZZI, L.; PANNI, S.; PAOLUZI, S.; SANTONICO, E.; CESARENI, G. Selectivity and promiscuity in the interaction network mediated by protein recognition modules. **FEBS Lett.** 567: 74–79, 2004.

CHANDRA, B.R.; GOWTHAMAN, R.; AKHOURI, R.R.; GUPTA, D.; SHARMA, A. Distribution of proline-rich (PxxP) motifs in distinct proteomes: functional and therapeutic implications for malaria and tuberculosis. **Protein Eng. Des. Sel.** 17: 175–182, 2004.

CHEN, Z.; LI, Y.; KRUG, R.M. Influenza A virus NS1 protein targets the poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. **EMBO J.** 18: 2273–2283, 1999.

CLERY, A.; *et al.* RNA recognition motifs: Boring? Not quite. **Curr Opin Struct Biol.** 18: 290–298, 2008.

COLGAN, D.F.; MANLEY, J.L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. **Genes Dev.** 11: 2755–2766, 1997.

COLLER, J.M.; GRAY, N.K.; WICKENS, M.P. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. **Gene Dev.** 12: 3226-3235, 1998.

COSSON, B.; COUTURIER, A.; CHABELSKAYA, S.; KIKTEV, D.; INGEVECHTOMOV, S.; PHILIPPE, M.; ZHOURAVLEVA, G. Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence PSI+ propagation. **Mol Cell Biol.** 22: 3301–3315, 2002.

COUTTET, P.; FROMONT-RACINE, M.; STEEL, D.; PICTET, R.; E GRANGE, T. Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94: 5628-5633, 1997.

CRAIG, A.W.; HAGHIGHAT, A.; YU, A.T.; SONENBERG, N. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. **Nature.** 392: 520-523, 1998.

DE MELO NETO, O.P.; STANDART, N.; MARTINS DE SA, C. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. **Nucleic Acids Res.** 23: 2198-2205, 1995.

DE MOOR, C.H.; RICHTER, J.D. Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. **EMBO J,** 18: 2294-2303, 1999.

DECKER, C.J.; PARKER, R. mRNA decay enzymes: decappers conserved between yeast and mammals. **Proc Natl Acad Sci USA.** 99: 12512-12514, 2002.

DEO, R.C.; BONANNO, J.B.; SONENBERG, N.; BURLEY, S.K. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. **Cell.** 98: 835-845, 1999.

DEO, R.C.; SONENBERG, N.; BURLEY, S.K. X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: An ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. **Proc Natl Acad Sci USA.** 98: 4414–4419, 2001.

DOWER, K.; ROSBASH, M. T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3 end formation to mRNA nuclear export. **RNA** 8: 686-697, 2002.

DREYFUSS, G.; HENTZE, M.; LAMOND, A.I. From transcript to protein. **CELL,** 85: 963-972, 1996.

DREYFUSS, G.; MATUNIS, M.J.; PINOL-ROMA, S.; BURD, C.G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. **Annu Ver Biochem.** 62: 289-321, 1993.

EULALIO, A.; HUNTZINGER, E.; NISHIHARA, T.; REHWINKEL, J.; FAUSER, M.; IZAURRALDE, E. Deadenylation is a widespread effect of Mirna regulation. **RNA** 15: 1-12, 2009.

FORD, L.P.; BAGGA, P.S.; WILUSZ, J. The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. **Mol Cell Biol.** 17: 398-406, 1997.

FREUND, C.; DOTSCHE, V.; NISHIZAWA, K.; REINHERZ, E.L.; WAGNER, G. The GYF domain is a novel structural fold that is involved in lymphoid signaling through proline-rich sequences. **Nat. Struct. Biol.** 6: 656–660, 1999.

FUKAMI-KOBAYASHI, K.; TOMODA, S.; GO, M. Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins. **FEBS Lett** 335: 289-293, 1993.

GALLIE, D.R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. **Genes Dev.** 5: 2108–2116, 1991.

GESTELAND, R.F.; CECH, T.R.; ATKINS, J.F. The RNA World (GESTELAND, R. F., CECH, T, R., ATKINS, J. F), **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.**, 1999.

GILLIAN-DANIEL, D.L.; GRAY, N.K.; ASTROM, J.; BARKOFF, A.; WICKENS, M. Modifications of the 5'cap of mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation: independence from changes in poly(A) length and impact on translation. **Mol. Cell Biol.**, 18: 6152-6163, 1998.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu Rev Biochem.** 68: 913–963, 1999.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Development**, 15: 807–826, 2001.

GIRALDEZ, A.J.; MISHIMA, Y.; RIHEL, J.; GROCOCK, R. J.; VAN DONGEN, S.; INOUE, K.; ENRIGHT, A.J.; SCHIER, A.F. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. **Science** 312: 75–79, 2006.

- GONZALEZ, C.I.; BHATTACHARYA, A.; WANG, W.; PELTZ, S.W. Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, 274: 15-25, 2001.
- GÖRLACH, M.; BURD, C.G.; DREYFUSS, G. The mRNA poly(A)-binding protein: Localization, abundance, and RNA-binding specificity. **Exp. Cell Res.** 211: 400–407, 1994.
- GRANGE, T.; DE SA, C.M.; ODDOS, J.; AND PICTET, R. Human mRNA polyadenylate binding protein: evolutionary conservation of a nucleic acid binding motif. **Nucleic Acids Res.** 15: 4771-4787, 1987.
- GRAY, N.K.; COLLER, J.M.; DICKSON, K.S.; WICKENS, M.P. Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. **EMBO J** 19: 4723–4733, 2000.
- GROSSET, C.; CHEN, C.Y.; XU, N.; SONENBERG, N.; JACQUEMIN-SABLON, H.; SHYU, A.B. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. **Cell** 103: 29-40, 2000.
- GUHANIOYOGI, J.; BREWER, G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. **Gene**. 265: 11-23, 2001.
- GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol.** 19: 1720-1730, 1999.
- HAGHIGHAT, A.; SONENBERG, N. eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. **J Biol Chem.** 272: 21677-21680, 1997.
- HAMMELL, C.M.; GROSS, S.; ZENKLUSEN, D.; HEATH, C.V.; STUTZ, F.; MOORE, C.; COLE, C.N. Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. **Mol Cell Biol.** 22: 6441-6457, 2002.
- HELLEN, C.U.; SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. **Genes Dev.**, 15: 593-612, 2001.
- HENTZE, M.W. eIF4G: A multipurpose ribosome adapter? **Science.** 275: 500–501, 1997.



HERSHEY, J.W.B.; MERRICK, W.C. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: *Translational Control of Gene Expression*. (SONENBERG, N., HERSHEY, J.W.B., MATHEWS, M.B., eds.) **Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p. 33–88, 2000.

HILLEREN, P.; PARKER, R. Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. **Annu. Rev. Genet.**, 33: 229-260, 1999.

HINNEBUSCH, A.G. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. **J Biol Chem**. 272: 21661-21668, 1997.

HOLK, M.; SONENBERG, N.; KORNELUK, R.G. Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. **TIG**. 16: 469-473, 2000.

HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A.; rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal Biochem**, 114(1): 193-7, 1981.

HOLT, M.R.; KOFFER, A. Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. **Trends Cell Biol**. 11: 38–46, 2001.

HORNSTEIN, E.; GIT, A.; BRAUNSTEIN, I.; AVNI, D.; MEYUHAS, O. The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif. **J Biol Chem**. 274: 1708-1714, 1999.

HOSHINO, S.; IMAI, M.; KOBAYASHI, T.; UCHIDA, N.; KATADA, T. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of eRF3/GSPT with polyadenylate-binding protein. **J Biol Chem**. 274: 16677-16680, 1999.

HUANG, Y.; CARMICHAEL, G.C. Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. **Mol. Cell Biol**. 16: 1534-1542, 1996.

IMATAKA, H.; GRADI, A.; SONENBERG, N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and function in poly(A) dependent translation. **EMBO J** 17: 7480-7489, 1998.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96(1): 23-8, 1990.

JACOBSON, A. Poly(A) metabolism and translation: The closed-loop model. In: *Translational Control*. (HERSHEY, J.W.B.; MATHEWS, M.B.; SONENBERG, N., eds) Plainview, **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p. 451–480, 1996.

JACOBSON, A.; FAVREAU, M. Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. **Nucleic Acids Res.** 11: 6353-6368, 1983.

JACOBSON, A.; PELTZ, S.W. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. **Annu Rev Biochem.** 65: 693-739, 1996.

JOACHIMS, M.; VAN BREUGHEL, P.C.; LLOYD, R.E. Cleavage of poly(A)- binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. **J. Virol.** 73: 718–727, 1999.

KARIM, M.M.; SVITKIN, Y.V.; KAHVEJIAN, A.; DE CRESCENZO, G.; COSTA-MATTIOLI, M.; SONENBERG, N. A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 103: 9494-9499, 2006.

KATO, Y.; NAGATA, K.; TAKAHASHI, M.; LIAN, L.; HERRERO, J.J.; SUDOL, M.; TANOKURA, M. Common mechanism of ligand recognition by group II/III WW domains: redefining their functional classification. **J. Biol. Chem.** 279: 31833–31841, 2004.

KAY, B.K.; WILLIAMSON, M.P.; SUDOL, M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. **FASEB J.** 14: 231–241, 2000.

KELLER, R.W.; KUHN, U.; ARAGON, M.; BORNIKOVA, L.; WAHLE, E.; BEAR, D.G. The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. **J Mol Biol.** 297: 569-583, 2000.

KELLER, W.; MINVIELLE-SEBASTIA, L. A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing. **Curr. Opin Cell Biol.**, 9: 329-336, 1997.

KEREKATTE, V.; KEIPER, B.D.; BADORFF, C.; CAI, A.; KNOWLTON, K.U.; RHOADS, R.E. Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2<sup>a</sup> protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff?. **J. Virol.** 73: 709–717, 1999.

KESSLER, S.H.; SACHS, A.B. RNA recognition motif 2 of yeast pab1p is required for this functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. **Mol. Cell Biol.** 18: 51-57, 1998.

KHALEGHPOUR, K.; SVITKIN, Y.V.; CRAIG, A.W.; DEMARIA, C.T.; DEO, R.C.; BURLEY, S.K.; SONENBERG, N. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. **Mol Cell.** 7: 205–216, 2001a.

KHALEGHPOUR K.; KAHVEJIAN A.; DE CRESCENZO G.; ROY G.; SVITKIN Y.V.; IMATAKA H.; O'CONNOR-MCCOURT, M.; SONENBERG, N. Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. **Mol Cell Biol.** 21: 5200–5213, 2001b.

KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat. Ver. Mol. Cell Biol.** 6(5): 376-385, 2005.

KIM, V.N.; NAM, J.W. Genomics of microRNA. **Trends Genet** 22: 165–173, 2006.

KISSELEV, L.; EHRENBERG, M.; FROLOVA, L. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? **EMBO J.** 22: 175-182, 2003.

KOZLOV, G.; SIDDIQUI, N.; COILLET-MATILLON, S.; TREMPE, J.F.; EKIEL, I.; SPRULES, T.; GEHRING, K. Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. **J Biol Chem.** 277: 22822-22828, 2002.

KOZLOV, G.; TREMPE, J.F.; KHALEGHPOUR, K.; KAHVEJIAN, A.; EKIEL, I.; GEHRING, K. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. **Proc Natl Acad Sci USA.** 98: 4409–4413, 2001.

KUGE, H.; RICHTER, J.D. Cytoplasmic 3'poly(A) addition induces 5'cap ribose methylation implications for translational control of mammalian mRNA. **EMBO J,** 14: 6301-10, 1995.

KUHN U.; GÜNDEL M.; KNOTH A.; KERWITZ Y.; RÜDEL S.; WAHLE E. Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. **J Biol Chem.** 284(34): 22803-22814, 2009.

KUHN, U.; PIELER, T. Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. **J Mol Biol.** 256: 20-30, 1996.

KUHN, U.; WAHLE, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. **Biochim Biophys Acta.** 1678: 67-84, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LAMPHEAR, B.J.; KIRCHWEGER, R.; SKERN, T.; RHOADS, R.E. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. **J Biol. Chem.** 270: 21975-21983, 1995.

LANDER, E.S.; *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature.** 409, 860-921, 2001.

LE H.; BROWNING K.S.; GALLIE D.R. : The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F and eIF4B. **J Biol Chem** 275: 17452-17462, 2000.

LE, H.; TANGUAY, R.L.; BALASTA, M.L.; WEI, C.C.; BROWNING, K.S.; METZ, A.M.; GOSS, D.J.; GALLIE, D.R. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. **J Biol Chem.** 272: 16247-16255, 1997.

LEE, J.; BEDFORD, M.T. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays, **EMBO Rep.** 3: 268–273, 2002.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, 120: 15–20, 2005.

LI, S.S. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. **Biochem J.** 390(3): 641-653, 2005.

LUO, Y.; GOSS, D.J. Homeostasis in mRNA initiation: wheat germ poly(A)-binding protein lowers the activation energy barrier to initiation complex formation. **J Biol Chem.** 276: 43083- 43086, 2001.

MAHONEY, N.M.; JANMEY, P.A.; ALMO, S.C. Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. **Nat. Struct. Biol.** 4: 953–960, 1997.

MAHONEY, N.M.; ROZWARSKI, D.A.; FEDOROV, E.; FEDOROV, A.A.; ALMO, S.C. Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. **Nat. Struct. Biol.** 6: 666–671, 1999.

MANGUS, D.A.; AMRANI, N.; JACOBSON, A. Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. **Mol. Cell Biol.** 18: 7383-7396, 1998.

MANGUS, D.A.; EVANS M.C.; JACOBSON A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. **Genome Biology.** 4: 1-14, 2003.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.** p. 18.55, 1989.

MARTINEAU, Y.; DERRY, M.C.; WANG, X.; YANAGIYA, A.; BERLANGA, J.J.; SHYU, A.B.; IMATAKA, H.; GEHRING, K.; SONENBERG, N. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. **Mol Cell Biol** 28: 6658-6667, 2008.

MATHEWS, M.B.; *et al.* Origins and principles of translational control. In Translational control of gene expression (SONENBERG, N. et al, eds), **Cold Spring Harbor Monograph Series, Cold Spring Harbor Laboratory Press.** p. 1-31, 2000.

MAYER, B. SH3 domains: complexity in moderation. **J. Cell Sci.** 114: 1253–1263, 2001.

MELO, E.O. Mecanismos moleculares envolvidos no controle da síntese da Proteína de Ligação a Poliadenosinas (PABP). Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2003.

MELO, E.O.; DHALIA, R.; MARTINS DE SÁ, C.; STANDART, N.; DE MELO NETO, O.P. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)–PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. **J. Biol. Chem.** 278: 46357–46368, 2003.

MELO, E.O. ; DE MELO NETO, O.P.; MARTINS DE SA, C. Adenosine-rich elements present in the 5'-untranslated region of PABP mRNA can selectively reduce the abundance and translation of CAT mRNAs in vivo. **FEBS Lett.** 546: 329–334, 2003b.

MEYER, S.; URBANKE, C.; WAHLE, E. Equilibrium studies on the association of the nuclear poly(A) binding protein with poly(A) of different lengths. **Biochemistry.** 41: 6082-6089, 2002.

MEYUHAS, O.; HORNSTEIN, E. Translational control of TOP mRNAs,( in: N. SONENBERG, J.W.B. HERSHEY, M.B. MATHEWS, eds.), *Translational Control of Gene Expression*, **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY** 671–693, 2000.

MICHEL, Y.M.; PONCET, D.; PIRON, M.; KEAN, K.M.; BORMAN, A.M. Cap–poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. **J. Biol. Chem.** 275: 32268–32276, 2000.

MILLEVOI, S.; VAGNER, S. Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. **Nucleic Acids Res.** 2009.

MINVIELLE-SEBASTIA, L.; PREKER, P.J.; WIEDERKEHR, T.; STRAHM, Y.; KELLER, W. The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 94: 7897–7902, 1997.

MOORE, M.J.; SHARP, P.A. Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. **Nature** 365: 364-368, 1993.

MUNROE, D.; JACOBSON, A. mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. **Mol Cell Biol.** 10: 3441–3455, 1990a.

MUNROE, D.; JACOBSON, A. Tales of poly(A): A review. **Gene**. 91: 151–158, 1990b.

OTERO, L.J.; ASHE, M.P.; SACHS, A.B. The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. **EMBO J**. 18:3153–3163, 1998.

PARKER, R.; SONG, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover, **Nat Struct Mol Biol**. 11: 121– 127, 2004.

PE'RY, T.; MATHEWS, M.B. Viral Translational Strategies and host Defense Mechanisms. In *Translational Control of Gene Expression* (SONENBERG, N., HERSHEY, J. W.B., MATHEWS, M. B., eds), **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.**, 2000.

PEREZ-CANADILLAS, J.M.; VARANI, G. Recent advances in RNA-protein recognition. **Curr. Opin. Struct. Biol**. 11: 53-58, 2001.

PESTOVA, T.V.; KOLUPAEVA, V.G.; LOMAKIN, I.B.; PILIPENKO, E.V.; SHATSKY, I.N.; AGOL, V.I.; HELLEN, C.U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 98: 7029-7036, 2001.

PESTOVA, T.V.; SHATSKY, I.N.; FLETCHER, S.P.; JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. **Genes Dev**. 12: 67-83, 1998.

PETRELLA, E.C.; MACHESKY, L.M.; KAISER, D.A.; POLLARD, T.D. Structural requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. **Biochemistry** 35: 16535–16543, 1996.

PIRON, M.; VENDE, P.; COHEN, J.; PONCET, D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4. **EMBO J** 17: 5811 –5821, 1997.

PORNILLOS, O.; ALAM, S.L.; DAVIS, D.R.; SUNDQUIST, W.I. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. **Nat. Struct. Biol**. 9: 812–817, 2002.

PREHODA, K.E.; LEE, D.; LIM, W. A. Structure of the enabled/VASP homology 1 domain–peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. **Cell** 97: 471–480, 1999.

PREISS, T.; HENTZE, M.W. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. **Nature** 392: 516–520, 1998.

PROUDFOOT, N.J.; FURGER, A.; DYE, M.J. Integrating mRNA processing with transcription. **Cell** 108(4): 501-512, 2002.

PTUSHKINA, M.; VON DER HAAR, T.; VASILESCU, S.; FRANK, R.; BIRKENHAGER, R.; MCCARTHY, J.E. Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E binding to the mRNA 5'cap in yeast involves a site partially shared by p20. **EMBO J.** 17: 4798-4808, 1998.

RADFORD, H.E.; MEIJER, H.A.; DE MOOR, C.H. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. **Biochim. Biophys. Acta** 1779(4): 217-229, 2008.

ROBERTS, G.C.; SMITH, C.W.J. Alternative splicing: combinatorial output from the genome. **Curr. Op. In Chem. Biol.** 6: 375-383, 2002.

ROSENTHAL E.T.; TANSEY T.R.; RUDERMAN J.V. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger RNA after fertilization of *Spisula* oocytes. **J. Mol. Biol.** 166: 309, 1983.

ROSENTHAL E.T.; WILT F.H. Patterns of maternal messenger RNA accumulation and adenylation during oogenesis in *Urechis caupo*. **Dev. Biol.**, 117: 55, 1986.

ROY, G.; DE CRESCENZO, G.; KHALEGHPOUR, K.; KAHVEJIAN, A.; O'CONNOR-MCCOURT, M.; SONENBERG, N. PAIP1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. **Mol Cell Biol.** 22: 3769-3782, 2002.

RUBIN, G.M.; YANDELL, M.D.; WORTMAN, J.R.; GABOR MIKLOS, G.L.; NELSON, C.R.; HARIHARAN, I.K.; FORTINI, M.E.; LI, P.W.; APWEILER, R. et al. Comparative genomics of the eukaryotes. **Science** 287: 2204–2215, 2000.

SACHS, A. Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. In *Translational Control of Gene Expression*. (Eds.



SONENBERG, N., HERSHEY, J.W., MATHEWS, M.B.) **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.** P: 447-465, 2000.

SACHS, A.B.; BOND, M.W.; KORNBERG, R.D. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. **Cell.** 45: 827-835, 1986.

SACHS, A.B.; DAVIS, R.W.; KORNBERG, R.D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. **Mol Cell Biol.** 7: 3268-3276, 1987.

SEARFOSS, A.; DEVER, T.E.; WICKNER, R. Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: Relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5B (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. **Mol Cell Biol.** 21: 4900–4908, 2001.

SHATKIN, A.J.; MANLEY, J.L. The ends of the affair: capping and polyadenylation. **Nat. Struct. Biol.** 7: 838-842, 2000.

SHYU, A.B.; BELASCO, J.G.; GREENBERG, M.E. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. **Genes Dev** 5: 221-231, 1991.

SLADIC, R.T.; LAGNADO, C.A.; BAGLEY, C.J.; GOODALL, G.J. Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. **Eur. J. Biochem.** 271: 450–457, 2004.

SONENBERG, N.; HERSHEY, J.W.B.; MATHEWS, M.B. Translational Control of Gene Expression (SONENBERG, N.; HERSHEY; J.W.B.; MATHEWS, M.B., eds), **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.**, 2000.

SONG, J.; MCGIVERN, J.V.; NICHOLS, K.W.; MARKLEY, J.L.; SHEETS, M. Structural basis for RNA recognition by a type II poly(A)-binding protein. **PNAS.** 105: 15317-15322, 2008.

STUTZ, A.; CONNE, B.; HUARTE, J.; GUBLER, P.; VOLKEL, V.; FLANDIN, P.; VASSALI, J.D. Masking, unmasking and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. **Genes Dev.**, 12: 2535-2548, 1998.

SVITKIN, Y.V.; AND SONEBERG, N. Translational control by the poly(A) binding protein: a check for mRNA integrity. **Molecular Biology**. 40: 611-619, 2006.

TARUN, S.Z JR.; SACHS, A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. **EMBO J**. 15: 7168-7177, 1996.

TARUN, S.Z JR.; WELLS, S.E.; DEARDORFF, J.A.; SACHS, A.B. (1997). Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94: 9046-9051, 1997.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and application. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76(9): 4350-4354, 1979.

TUCKER, M.; PARKER, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu Rev Biochem**. 69: 571-595, 2000.

UCHIDA, N.; HOSHINO, S.; IMATAKA, H.; SONENBERG, N.; KATADA, T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation, **J Biol Chem**. 277: 50286– 50292, 2002.

UCHIDA, N.; HOSHINO, S.; KATADA, T. Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein, **J Biol Chem**. 279: 1383–1391, 2003.

UETZ, P.; GIOT, L.; CAGNEY, G.; MANSFIELD, T.A.; JUDSON, R.S.; KNIGHT, J.R.; LOCKSHON, D.; NARAYAN, V.; SRINIVASAN, M.; POCHART, P., *et al*. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**. 403: 623-627, 2000.

VAGNER, S.; GALY, B.; PYRONNET, S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. **EMBO J** Rep 2: 893-898, 2001.

VENDE, P.; PIRON, M.; CASTAGNE', N.; PONCET, D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. **Mol. Cell. Biol**. 74: 7064–7071, 2000.

- VENTER, J.C.; *et al.* The sequence of the human genome. **Science**. 291: 1304-1351, 2001.
- VICENT, A.; GOLDENBERG, S.; STANDART, N.; CIVELLI, O.; IMAIZUMI-SCHERRER, T.; MAUNDRELL, K.; SCHERRER, K. Potential role of mRNP proteins in cytoplasmic control of gene expression in duck erythroblasts. **Mol Biol Rep**. 7: 71-81, 1981.
- VOLKMAN, B.F.; PREHODA, K.E.; SCOTT, J.A.; PETERSON, F.C.; LIM, W.A. Structure of the N-WASP EVH1 domain–WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott–Aldrich syndrome. **Cell** 111: 565–576, 2002.
- WAHLE, E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. **Cell**. 66: 759-768, 1991a.
- WAHLE, E. Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. **J Biol Chem**. 270: 2800-2808, 1995.
- WAHLE, E. Purification and characterization of a mammalian polyadenylate polymerase involved in the 3' end processing of Messenger RNA precursors. **J Biol Chem**. 266: 3131–3139, 1991b.
- WAHLE, E.; *et al.* Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. **J Biol Chem**. 268: 2937–2945, 1993.
- WAHLE, E.; RUEGSEGGER, U. 3'-end processing of pre-mRNA in eukaryotes. **FEMS Microbiol Rev**. 23: 277-295, 1999.
- WAKIYAMA, M.; TAKIMOTO, K.; OHARA, O.; YOKOYAMA, S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. **Genes & Dev**, 21: 1857–1862, 2007.
- WALTERS, R.W.; BRADRICK, S.S.; GROMEIER, M. Poly(A)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression. **RNA** 16(1): 239-50, 2010.
- WANG, Z.; DAY, N.; TRIFILLIS, P.; KILEDJIAN, M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. **Mol Cell Biol** 19: 4552-4560, 1999.

WANG, Z.; KILEDJIAN, M. The poly(A)-binding protein and na mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. **Mol Cell Biol** 20: 6334-6341, 2000.

WATERSTON, R.H.; *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**. 420: 520-562, 2002.

WELLS, S.E.; HILLNER, P.E.; Vale. R.D.; Sachs, A.B. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. **Mol Cell**. 2: 135-140, 1998.

WILLIAMSON, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. **Biochem. J.** 297: 249–260, 1994.

WILUSZ, C.J.; GAO, M.; JONES, C.L.; WILUSZ, J.; PELTZ, S.W. Poly(A)-binding proteins regulate both Mrna deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. **RNA** 7: 1416-1424, 2001.

WORMINGTON, M.; SEARFOSS, A.M.; HURNEY, C.A. Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in *Xenopus* oocytes. **EMBO J.** 15: 900–909, 1996.

WU, J.; BAG, J. Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region. **J Biol Chem**. 273: 34535-34542, 1998.

WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J.G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 103: 4034–4039, 2006.

ZARRINPAR, A.; BHATTACHARYYA, R.P.; LIM, W.A. The structure and function of proline recognition domains. **Science STKE**, 179: RE8, 2003.

ZEKRI, L.; HUNTZINGER, E.; HEIMSTADT, S.; IZAURRADLE, E. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of miRNA targets and is required for target release. **Mol Cell Biol**. 29(23): 6220-6231, 2009.