

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/53381

IB/ 81906

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

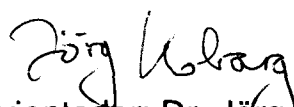


Estudo Funcional e Estrutural da Proteína Humana AUF1

Karen Cristiane Martinez de Moraes

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Karen Cristiane Martinez de
Moraes
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada no Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular - área de
concentração Genética Humana e Médica


Prof. Orientador: Dr. Jörg Kobarg

Campinas
2003

UNIDADE	IB/81906
Nº CHAMADA	Unicamp
	M791e
V	EX
TOMBO BC/	53381
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
FREQ	138 11.00
DATA	29/04/03
Nº CPD	

0M001B21B9-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M791e

Moraes, Karen Cristiane Martinez de

Estudo funcional e estrutural da proteína humana AUF1/

Karen Cristiane de Moraes.--

Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Jörg Kobarg

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .

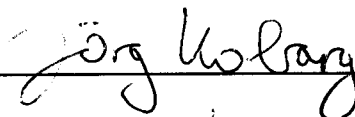
Instituto de Biologia.

1.Proteína. 2.Reciclagem. I. Kobarg, Jörg. II. Universidade
Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III.Título.

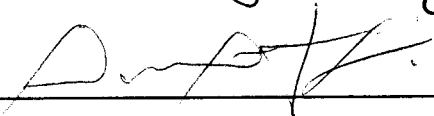
Data da defesa: 9 de janeiro de 2003

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador)



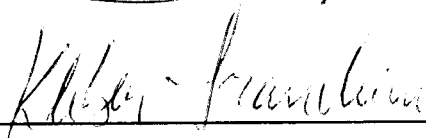
Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Prof. Dra. Christine Hackel



Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini



Prof. Dra. Carla Columbano Oliveira



Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dr. Marcelo José Surpili

O saber não é como nós comumente chamamos "um tipo de conhecimento", o sábio não é um sujeito que conhece muitas coisas, mas um sujeito que tem uma habilidade muito peculiar de perceber uma ocorrência, avaliar essa ocorrência, tomar uma decisão em relação a essa ocorrência e agir em resposta a essa ocorrência, tudo de forma correta. A sabedoria consiste em perceber, avaliar, decidir e agir de forma correta. Isso não é privilégio de diplomados, nem de pessoa que tenha formação superior, erudição, nada disso. Isso é privilégio apenas de alguém que desenvolveu a capacidade de ouvir a voz interior. A capacidade de ouvir o seu próprio mestre interior. A voz do espírito, a voz do silêncio. Esse indivíduo que escuta essa voz, e segue essa orientação e que decide e age da forma correta é o sábio.

Helena Petrovna Blavatsky

A meus pais,

Ei!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Vocês se lembram quando eu era pequena
e chegava da escola cantarolando:

*“Mamãe quero ir,
à escola aprender
uma porção de coisas
prá quando eu crescer...
Ter uma cartola,
anel de doutor,...”*

(cantiga popular de autor desconhecido)

Parece que finalmente o dia chegou.....

Pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos de
minha só me resta agradecer...

Amo vocês.

Ao amado Carlos Alberto,

*presença transformadora em minha vida...
Obrigada pelo seu exemplo, pela sua
alegria, pelo seu apoio,
pelo seu amor....*

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Jörg Kobarg, pela orientação e por ter me aceito como parte integrante do seu grupo de trabalho.

Aos doutores Carla Columbano de Oliveira, Christine Hackel, Kleber Gomes Franchini Marcelo Menossi Teixeira, Carmen Sivia Bertuzzo e Marcelo José Surpili membros da banca examinadora.

Aos doutores Edi Lúcia Sartorato, Marcelo Menossi Teixeira e Nilson Ivo Zanchin pela contribuição na pré-banca.

Ao Dr. Robert J. Schneider (NYU, New York, USA) por nos ceder plasmídeos contendo clones de cDNA das isoformas AUF1.

Ao Prof. Dr. Rogério Meneghini pelas leituras críticas dos manuscritos.

Ao Dr. Wen Hwa Lee pela valiosa contribuição na modelagem do domínio RRM2 da proteína AUF1.

A Dra. Karen Maehnss pelos experimentos iniciais com o sistema do duplo híbrido de levedura.

Ao Alexandre Quaresma, pela sua participação nesse projeto e pela sua valiosa contribuição nos estudos de mapeamento dos domínios das proteínas que interagem com AUF1.

A todos os colegas, técnicos e amigos do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), LNLS, pelo companheirismo, pela ajuda técnica e por todos nossos bons momentos.

Aos queridos amigos e companheiros de laboratório do grupo BMO, pela convivência e paciência nos meus momentos de loucura....

À amiga Taíla, por dividir as dificuldades e alegrias surgidas no laboratório e pela ótima convivência e companheirismo nesta etapa da minha vida.

Ao Dr. Marcelo Surpili, pela ajuda, companheirismo e prontidão em vários momentos desse doutoramento.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela oportunidade de desenvolver esse trabalho de doutoramento

A minha família, pela participação e carinho ao longo de toda a vida.

A FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual esse trabalho não seria possível.

	Página
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
A regulação da expressão gênica em eucariotos	5
O controle transcricional	6
A regulação pós- transcricional	11
A degradação do mRNA como um mecanismo de controle da expressão gênica	13
Vias de degradação de mRNAs nas células de mamíferos	14
A regulação da degradação de mRNAs pelos elementos de ação <i>cis</i>	17
A proteína AUF1 (<i>AU-rich binding factor 1</i>)	20
OBJETIVOS	24
APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS	
Artigo 1 - <i>Analysis of the Structural Determinants for RNA Binding of the Human Protein AUF1/ hnRNP D</i>	25
Artigo 2 - <i>Identification of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA factor AUF1 (hnRNP D0)</i>	33
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES	77
BIBLIOGRAFIA	79

Figura 1 – Representação esquemática do controle da expressão gênica	5
Figura 2 - Representação esquemática dos elementos TBPs	8
Figura 3 - Representação esquemática das vias de degradação de mRNAs	16
Figura 4 - As isoformas AUF1	22
Tabela 1 – Proteínas que se ligam a regiões ricas em AU	19

ABREVIATURAS

AMP	(<i>adenosine monophosphate</i>) adenosina monofosfato
ARE	(<i>AU-rich elements</i>) elementos ricos em AU
ATP	(<i>adenosine triphosphate</i>) adenosina trifosfato
AU	(<i>adenine, uracil</i>) adenina, uracila
AUBP	(<i>AU binding proteins</i>) proteína que se liga a regiões ricas em AU
AUF1	(<i>AU binding factor 1</i>) fator que se liga a regiões ricas em AU
5'-cap	estrutura protetora na extremidade 5'
CSD	(<i>cold shock domain</i>) domínio de choque ao frio
CTD	(<i>carboxyl-terminal domain</i>) domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II
DNA	(<i>deoxyribonucleic acid</i>) ácido desoxirribonucléico
dsRBD	(<i>double strand RNA binding domain</i>) domínio de ligação a RNA fita dupla
ELAV	(<i>embryonic lethal abnormal vision</i>) visão anormal letal embrionária
EMSA	(<i>electrophoretic mobility shift assay</i>) ensaio de retardamento de migração em gel
GM-CSF	(<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>) fator estimulador de colônias granulocíticas macrofágicas
hnRNP	(<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>) ribonucleoproteína nuclear heterogênea
Hsp	(<i>heat shock protein</i>) proteína de choque térmico
IMP-2	(<i>Insuline-like growth factor II mRNA-binding protein</i>) proteína que se liga a mRNA similar ao fator de crescimento insulina II
kDa	quilodalton
KH	(<i>hnRNP K homology (KH) domain</i>) domínio (KH) homólogo ao da proteína hnRNP K
m⁷G	(<i>7-methylguanosine</i>) 7-metilguanosina
mCDR	(<i>major-coding-region determinant</i>) principal região decodificadora determinante de instabilidade
mRNA	(<i>messenger RNA</i>) RNA mensageiro
mRNP	(<i>messenger RNA of ribonucleoproteins</i>) RNA mensageiro de ribonucleoproteínas

NMD	(<i>nonsense-mediated decay</i>) degradação de mRNAs não traduzíveis
NSAP-1	(<i>Non Structural Associated Protein 1</i>) proteína associada não estrutural 1
NSEP-1	(<i>Nuclease sensitive element binding protein 1</i>) proteínas que se liga aos elementos nucleares sensitivos
PABP	(<i>Poly(A)-binding protein 1</i>) proteína que se liga a regiões ricas em adenina (A)
PAIP1	(<i>PAB interacting protein 1</i>) proteína 1 que interage com PABP
PARN	(<i>Poly(A) ribonuclease</i>) ribonuclease que deadenila regiões poli(A)
pb	pares de base
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>) ácido ribonucléico
rRNA	(ribosomal <i>RNA</i>) RNA ribossomal
RRM	(<i>RNA recognition motif</i>) motivo de reconhecimento de RNA
S	unidade <i>Svedberg</i>
SAF-B	(<i>scaffold attachment factor B</i>) fator B de ligação e sustentação
snRNP	(<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>) pequenas ribonucleoproteínas nucleares
TAFs	(<i>TBP – associated factors</i>) fatores associados a TBP
TBP	(<i>TATA bindin protein</i>) proteína que se liga a região promotora TATA box
TNF-α	(<i>tumor necrosis factor-alpha</i>) fator tumoral necrosante alfa
tRNA	(<i>transfer RNA</i>) RNA transportador
UBCE2I	(<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2e</i>) enzima conjugadora de ubiquitina E2I
UTR	(<i>untranslated region</i>) região não traduzida

A concentração citoplasmática de mRNAs é um fator crítico na regulação da expressão gênica. Assim, a reciclagem seletiva de mRNAs é um mecanismo importante para a manutenção do equilíbrio celular. A degradação de certos mRNAs que apresentam altas taxas de reciclagem como mRNAs de proto-oncogenes e citocinas é controlada pela presença de um elemento rico em adenina e uracila (AU) na região 3' não traduzida (3'UTR). Um maior detalhamento dos mecanismos envolvidos na regulação e reciclagem dos mRNAs vem sendo realizado desde a clonagem do fator AUF1 (*AU-rich binding factor 1*) de humanos. O fator AUF1 /hnRNP D é uma proteína de ligação a domínios ricos em AU e está envolvido com a degradação rápida de mRNAs.

Pelo fato da proteína AUF1 não possuir atividade de ribonuclease, sugere-se que ela esteja acoplada a um complexo protéico envolvido com o processamento seletivo de mRNAs. Para a identificação das proteínas que se acoplam a AUF1, utilizamos a técnica do duplo híbrido de levedura e detectamos, além da própria proteína AUF1, outras quatro proteínas: NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 e UBCE2I. Todas as interações foram confirmadas *in vitro* e os domínios das proteínas envolvidos na interação com AUF1 foram mapeados. Ensaio de retardamento de migração em gel (EMSA) realizados com as proteínas recombinantes que interagem com AUF1 mostraram que essas proteínas também interagem com oligonucleotídeos de RNA ricos em AU. É interessante ressaltar que a proteína NSEP-1 apresentou atividade de endorribonuclease *in vitro*. Esses dados em conjunto sugerem que as proteínas identificadas por interagirem com AUF1 possam estar envolvidas na regulação da estabilidade de mRNAs mediada por AUF1.

A construção de um modelo molecular do domínio RRM2 da proteína AUF1 permitiu uma análise dos determinantes estruturais da proteína envolvidos no acoplamento a

moléculas de RNA. Nosso modelo mostrou que as interações de AUF1 com o RNA ocorrem predominantemente pelo empilhamento de anéis de aminoácidos aromáticos (*stacking*) com as bases do RNA, o que confere baixa especificidade no reconhecimento de bases. Nossas análises mostraram também que os aminoácidos envolvidos nessas interações são conservados em outras proteínas da família das hnRNPs. Nossas predições sobre os determinantes estruturais da proteína AUF1 envolvidos na interação com moléculas de RNA foram confirmadas em ensaios de retardamento de migração em gel, utilizando-se vários oligonucleotídeos de RNA. Em conjunto, nossos resultados sugerem que *in vivo* outros fatores possam modular o reconhecimento específico de moléculas de RNA pela proteína AUF1, tais como a oligomerização e a formação de um grande complexo protéico pela interação proteína-proteína.

The cytoplasmatic concentration of mRNA is a critical factor for gene expression regulation. The selective mRNA turnover is an important mechanism to maintain the cellular equilibrium. Rapidly degraded mRNAs, such as those encoding oncoproteins and cytokines are controlled by the presence of AU-rich elements (AREs) in their 3'-untranslated region (3'-UTR). A better understanding of the mechanisms involved in mRNA turnover regulation has been achieved since the cloning of the human AUF1 ("AU-rich binding factor 1")/hnRNP D. AUF1 binds specifically to ARE-containing sequences and has been reported to be involved in the accelerated degradation of ARE-containing mRNAs.

The fact that AUF1 does not degrade mRNA by itself led to the suggestion that other AUF1 interacting proteins might be involved in the process of selective mRNA degradation. Here we used the "Yeast Two-hybrid system" in order to identify proteins that bind to AUF1. We detected AUF1 itself as well as NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2L. All interactions were confirmed *in vitro* and we mapped the protein domains that are involved in the AUF1 interaction. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using the recombinant AUF1-interacting proteins also showed the interaction with AU-rich RNA oligonucleotides. Most interestingly, the AUF1-interacting protein NSEP-1 showed an endo-ribonuclease activity *in vitro*. These data suggest that these AUF1-interacting proteins might be involved in regulation of mRNA stability mediated by AUF1.

A molecular model of the RNA recognition motif 2 (RRM2) of AUF1 allowed us to begin to address the structural determinants for the binding of AUF1 to RNA. Our comparative modelling studies revealed that AUF1 interacts with RNA predominantly through stacking interactions, which provide low base specific recognition. The analysis

also showed, that the aminoacids of AUF1 involved in the stacking interactions are conserved in other hnRNP family members. The model-based predictions of the binding determinants of AUF1 could be largely confirmed by eletrophoretic mobility shift assays with a panel of RNA oligonucleotides. These results suggest that the specificity of the RNA recognition *in vivo* might be modulated by additional factors such as oligomerization and the formation of large protein complexes by protein-protein interactions.

A regulação da expressão gênica em eucariotos

Os diferentes tipos de células e tecidos de um organismo dependem diretamente dos genes que são expressos. Basicamente, o controle da expressão gênica ocorre em quatro níveis distintos:

- I - Regulação transcricional;
- II - Regulação pós-transcricional, que regula o processamento, transporte e degradação do RNA mensageiro já formado;
- III - Regulação traducional;
- IV - Regulação pós-traducional, que abrange as modificações nas proteínas sintetizadas, tais como fosforilação, glicosilação e acilação.

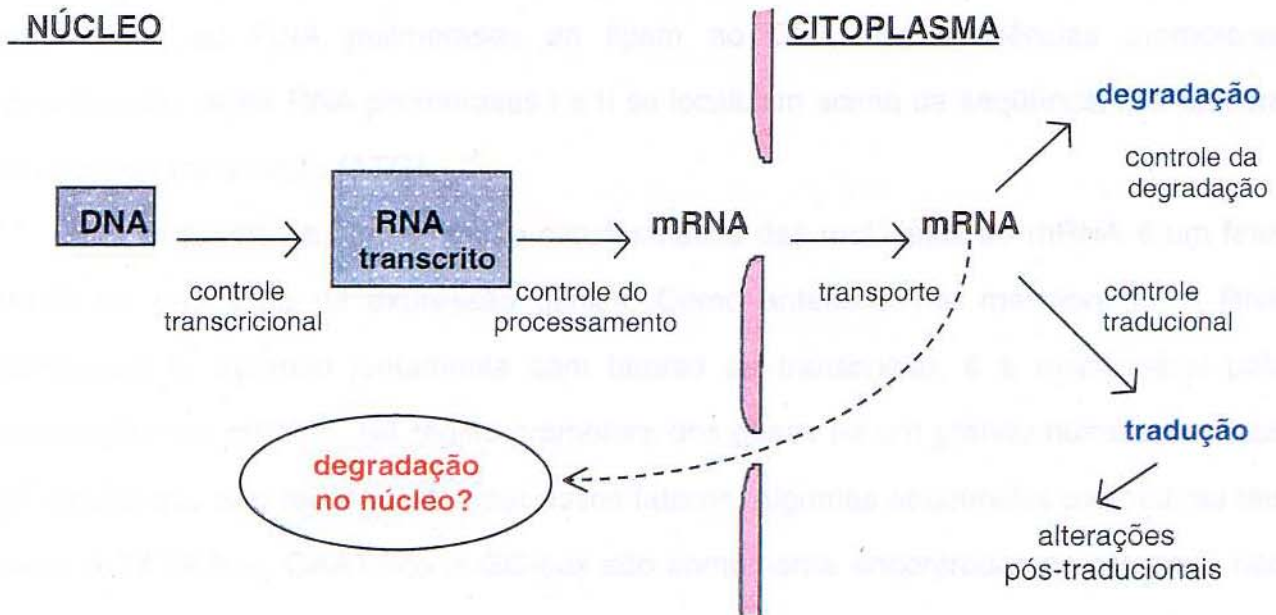


Figura 1. Representação esquemática ilustrando as etapas envolvidas no controle da expressão gênica.

O controle transcricional

Em eucariotos, o controle primário da regulação da expressão gênica ocorre a nível transcricional, que é coordenada por três grupos de RNA polimerases. Os genes são classificados pelos seus promotores e cada classe é transcrita por uma RNA polimerase diferente - RNA polimerase I, II e III (Lewin, 1994).

A RNA polimerase I está envolvida com a transcrição dos genes de RNA ribossomal (rRNA), a RNA polimerase II transcreve moléculas de RNAs mensageiros (mRNA) e a RNA polimerase III está envolvida com a transcrição de RNAs transportadores (tRNA), a subunidade 5S do RNA ribossomal e alguns outros pequenos RNAs nucleares. Entretanto, todas as três RNA polimerases atuam em conjunto com os chamados fatores de transcrição, que são proteínas acessórias e que estão envolvidas com o início da transcrição. Essas proteínas reconhecem seqüências de DNA conservadas nas regiões promotoras dos genes. Após o acoplamento dos fatores de transcrição às regiões promotoras, as RNA polimerases se ligam ao DNA. As seqüências promotoras reconhecidas pelas RNA polimerases I e II se localizam acima da seqüência sinalizadora do início da transcrição (ATG).

Nos eucariotos a concentração citoplasmática das moléculas de mRNA é um fator crítico na regulação da expressão gênica. Como anteriormente mencionado, a RNA polimerase II, atuando juntamente com fatores de transcrição, é a responsável pela transcrição dos mRNAs. Na região promotora dos genes há um grande número de sítios de ligação que são reconhecidos por esses fatores. Algumas seqüências promotoras tais como o TATA-box, CAAT-box e GC-box são comumente encontradas na região 5' não traduzida dos genes.

O TATA box corresponde a uma seqüência encontrada na maioria dos promotores e localizada a aproximadamente - 25 pares de base (pb) do local do início da transcrição. Esta seqüência formada pelo consenso TATAa/tAa/t é importante no reconhecimento do

ponto inicial de transcrição. O elemento CAAT-box, localizado a aproximadamente - 75 pares de bases do ATG inicial, orienta a transcrição. Mutações nessa sequência promotora causam uma redução significativa na transcrição. Finalmente, a sequência rica em GC (GGGCGGG – GC-box) localizada a -90 pares de bases do local do início da transcrição também parece atuar na orientação do processo transcricional.

Paralelamente os promotores também podem ser estimulados pelos “acentuadores” (*enhancers*) (Lewin, 1994). Esses elementos funcionam em qualquer direção e também a grandes distâncias da região promotora. Funcionam se estão antes ou após o ATG inicial, ou mesmo se localizados dentro do gene. Não há sequência consenso para esses elementos e o mecanismo de ação também é pouco conhecido. Supõem-se que eles atuem à distância pela ligação a proteínas específicas que interagem com os fatores de transcrição ligados ao promotor.

Conforme revisado por Maldonado e Reinberg (1995), o processo de transcrição pode ser dividido em cinco fases:

1. formação do complexo de pré-iniciação, onde os fatores basais reconhecem suas seqüências alvo;
2. iniciação, onde os reguladores modulam a atividade do complexo formado anteriormente;
3. escape do promotor, que é a saída da RNA polimerase II do promotor iniciando a transcrição;
4. alongamento, que é a transcrição propriamente dita;
5. terminação, que corresponde ao final da transcrição.

A regulação da transcrição ocorre, na maioria das vezes, durante a iniciação, envolvendo diversos elementos necessários para esse processo (Figura 2). Vários autores (Serizawa, *et al.*, 1994; Roeder, 1996) mostraram que a formação do complexo de pré-iniciação começa pela interação da proteína TBP (*TATA binding protein*) com o elemento TATA-box. Embora a proteína TBP seja requisitada para a transcrição mediada

por qualquer uma das RNA polimerases (I, II e III), o acoplamento dessa proteína às polimerases I e III não é dependente da sequência TATA na molécula de DNA.

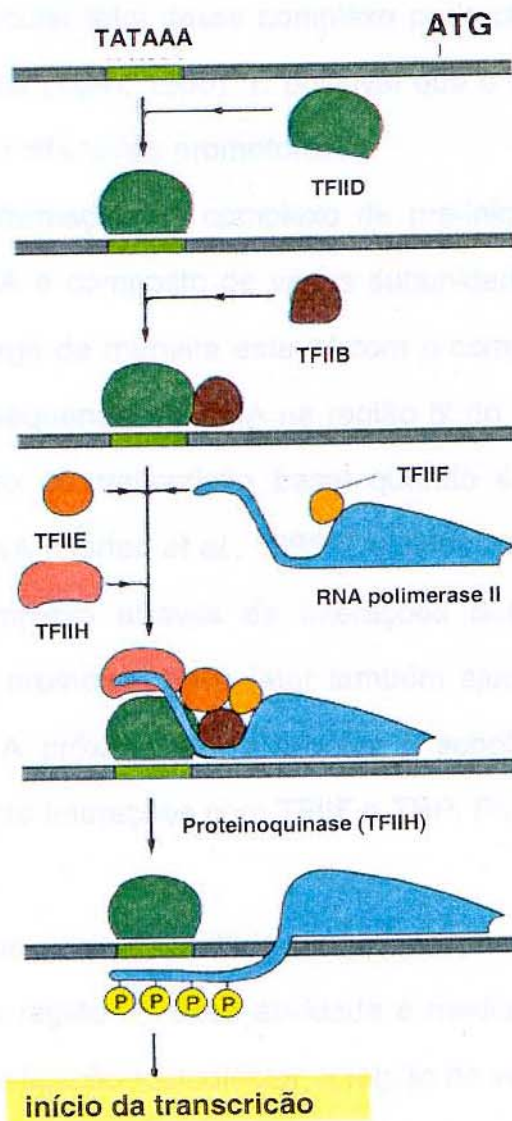


Figura 2. Representação esquemática ilustrando as etapas e os elementos envolvidas no controle do início da transcrição mediada pela RNA polimerase II (Adaptado segundo Alberts *et al.*, 1994).

A TBP é uma das proteínas mais conservadas durante a evolução de eucariotos. Quando de sua interação com a região promotora ocorre um dobramento significativo do

DNA de aproximadamente 80°. Em seguida, vários outros fatores basais denominados TAFs (*TBP-associated factors*) associam-se à TBP, formando o complexo conhecido como TFIID. A massa molecular total desse complexo pode chegar a mais de 800 kDa com até 12 TAFs associados (Tijan, 1995). É possível que o complexo TFIID contendo diferentes TAFs reconheçam diferentes promotores.

A etapa seguinte na formação do complexo de pré-iniciação é a associação do TFIIA a TFIID. O fator TFIIA é composto de várias subunidades (duas em leveduras e três em mamíferos) e interage de maneira estável com o complexo através de contatos diretos com TBP e com a sequência de DNA na região 5' do promotor. O fator TFIIA é importante para o processo de transcrição basal quando é necessário estabilizar a interação de TBP com o DNA (Cortes *et al.*, 1992; Coulombe *et al.*, 1992). O fator TFIIB interage então com o complexo através de interações diretas com TBP e com a sequência na região 3' do promotor. Esse fator também ajuda nas estabilizações das interações de TBP-TATA. A próxima etapa envolve o acoplamento de TFIIIE à RNA polimerase II e provavelmente interações com TFIIIF e TBP. Forma-se assim, o complexo de pré-iniciação.

Em seguida, TFIIIF, que possui atividade de helicase, separa as fitas de DNA por uma extensão de 10 pb na região 3'. Essa atividade é mediada pela hidrólise de ATP. Com a formação da primeira ligação fosfodiéster, a região de separação das fitas de DNA é estendida por mais alguns pares de base. Durante a fase de alongamento dos transcritos, a região contendo as fitas de DNA separadas se desloca na direção terminal 5', ocorrendo simultaneamente a renaturação da região anterior.

Ainda na presença de ATP, a proteína TFIIH fosforila a região carboxi-terminal da RNA polimerase II (CTD). Essa etapa está associada com a transição da fase de iniciação para a fase de alongamento. Essa fosforilação resulta em alterações conformacionais que permitem à enzima RNA polimerase II deixar o complexo de pré-

iniciação. Uma fosfatase específica regenera a RNA polimerase à forma não fosforilada, necessária ao recrutamento durante a formação do complexo de pré-iniciação.

Além dos elementos envolvidos diretamente na formação do complexo de pré-iniciação, que orientam o início da transcrição, existem os reguladores da transcrição. Esses elementos regulam a transcrição gênica e são compostos basicamente de três domínios: um domínio de multimerização, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação. Essa composição permite que um conjunto relativamente pequeno de módulos gere reguladores da transcrição altamente especializados (Tijian e Maniatis, 1994).

O domínio de multimerização viabiliza a formação de dímeros e outros multímeros. Muitos reguladores só são ativos em suas formas multiméricas como, por exemplo, AP-1, b-ZIPs, c-Jun e c-Fos (Wagner e Green, 1994). Os domínios de ligação ao DNA e de ativação reconhecem seqüências específicas no DNA e interagem com os fatores basais do complexo de pré-iniciação respectivamente. Essas interações entre os reguladores e os fatores basais regulam a transcrição, resultando na estabilização ou desestabilização do complexo de pré-iniciação (Latchman, 1997).

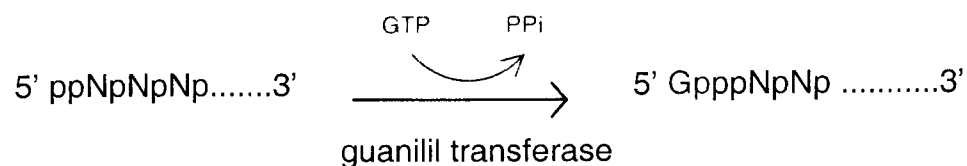
Dependendo do tipo e do estágio de desenvolvimento da célula, pode haver a síntese de um novo regulador ou modificações em um regulador pré-existente de modo a alterar a sua atividade. Conseqüentemente, os reguladores coordenam a expressão de genes em resposta a diversos estímulos. A fosforilação, por exemplo, é um dos mecanismos que mais atuam na modificação de um regulador de transcrição (Hunter e Karin, 1992; Hill e Treisman, 1995). Ela pode modificar a função de um regulador, alterando a sua capacidade de interagir com um sítio alvo no DNA ou com o complexo de pré-iniciação. Pode ainda alterar a localização dos reguladores nos diferentes compartimentos celulares (Lewin, 1994). Alterações bruscas na regulação da expressão gênica podem acarretar sérias complicações fenotípicas e/ou inviabilizar a estruturação de um organismo.

A regulação pós- transcricional

Em todas as células o fluxo da informação gênica parte da molécula de DNA e os processos de transcrição e tradução são compartimentalizados (Figura 1). Mesmo a expressão de genes com regulação simples envolve uma série de eventos relacionados ao processamento e maturação da molécula de mRNA para gerar um produto protéico acurado e eficiente.

Em eucariotos, o mRNA produzido pela transcrição de um gene necessita de algumas modificações antes de ser enviado ao citoplasma. As moléculas de RNA recém sintetizadas pela RNA polimerase II no núcleo são conhecidas como transcritos primários. Basicamente essas moléculas sofrem três alterações: a adição de 7-metilguanosina (m^7G) à extremidade 5' (5'-*cap*), a adição da cauda poli(A) à extremidade 3' pela poli(A) polimerase e o processamento dos íntrons (*splicing*).

A adição de m^7G à extremidade 5' ocorre logo após a síntese dos transcritos primários, precedendo todos os demais eventos que fazem parte do processamento (Babich *et al.*, 1980). A adição da m^7G 5' terminal é catalisada pela enzima nuclear guanilil transferase da seguinte maneira:



A estrutura 5' assim formada é submetida a uma ou mais metilações, catalisadas pela enzima guanina-7-metiltransferase e 2'-O- metiltransferase. A estrutura pode ser representada como $m^7G(5')ppp(5')X$, onde a metilação terminal ocorre na guanina, enquanto que as metilações subseqüentes podem envolver a base e/ou o açúcar do penúltimo e antepenúltimo nucleotídeos.

A presença do grupo m^7G na extremidade 5' assegura uma tradução eficiente dos mRNAs (Dreyfuss, 1986). Esse grupamento tem importante atuação na iniciação da

síntese protéica, uma vez que está envolvido diretamente com o posicionamento das subunidades ribossomais. Além disso, a presença dessa estrutura em moléculas de mRNA confere estabilidade aos transcritos frente ao ataque de fosfatases e previne a degradação exonucleolítica 5' → 3' (Furuichi, *et al.*, 1977).

Outro mecanismo envolvido com a edição dos transcritos primários é a adição de uma cauda poli(A) à extremidade 3' (Lim e Cannelaski, 1970; Edmonds *et al.*, 1971; Brawerman, 1976) por enzimas poli(A) polimerases. Essas enzimas apresentam alta especificidade por ATP e requerem um polirribonucleotídeo com o grupo 3'-hidroxil livre ao qual um resíduo AMP possa ser acrescentado (Edmonds e Winters, 1976; Edmonds, 1982). A seqüência poli(A) não é codificada pelo DNA e sua adição aos transcritos primários somente é feita após a liberação da cadeia de mRNA pela RNA polimerase II. Na maioria dos mRNAs de eucariotos, a presença da seqüência AAUAAA, localizada a aproximadamente 20 nucleotídeos acima do sítio de adição da cauda poli(A) é a responsável pela liberação da molécula de RNA da RNA polimerase II, uma vez que essa seqüência é reconhecida como um sinal de clivagem por endonucleases.

A adição da cauda poli(A) parece ter várias funções, tais como a de auxiliar o transporte da molécula de mRNA maduro para o citoplasma, aumentar a estabilidade da molécula e servir como um sinal de reconhecimento para uma tradução eficaz pelos ribossomos. Entretanto, algumas moléculas de mRNA não possuem a seqüência poli(A) na extremidade 3', predominantemente os mRNAs de histonas (Lewin, 1997). A ausência dessa estrutura parece, no entanto, não afetar o transporte núcleo-citoplasmático e a estabilidade da molécula parece estar associada à estrutura secundária formada na sua porção 3'.

A retirada dos íntrons nos transcritos primários é a etapa final na maturação do RNA, que só então é exportado para o citoplasma. Os íntrons são seqüências que não codificam polipeptídeos. Usualmente os íntrons são delimitados por uma seqüência de

dinucleotídeos consenso GU na extremidade 5' e AG na extremidade 3' (Breathnach e Chambon, 1981; Mount, 1982) .

.....Éxon...../ GU.....Íntron.....AG /.....Éxon.....

Os nucleotídeos imediatamente adjacentes às bordas dos íntrons são conservados em 75% das seqüências. Uma mutação pontual nessas regiões geralmente resulta na inativação do sítio de processamento.

Sabe-se também que a remoção dos íntrons é realizada por pequenas proteínas nucleares denominadas snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*), tais como U1, U2 e U4-6.

A degradação do mRNA como um mecanismo de controle da expressão gênica

A degradação de mRNA é uma etapa importante na regulação da expressão gênica. Sabe-se que a regulação da tradução é controlada diretamente pelas concentrações de mRNA presentes no citoplasma da célula. Entretanto, as concentrações desses mRNAs dependem de um balanço entre a taxa de síntese do RNA nuclear, do processamento, do transporte para o citoplasma e das taxas de degradação dessa molécula. Estudos desenvolvidos nas últimas duas décadas demonstram que a degradação do mRNA é considerada um ponto central no controle da expressão gênica e que a estabilidade dessas moléculas é freqüentemente relacionada a sua função.

Em células de mamíferos a meia-vida dos mRNAs pode variar de minutos a dias. RNAs mensageiros com meia-vida curta respondem a mudanças na transcrição mais rapidamente do que aqueles que são relativamente estáveis (Ross, 1995). Além do mais, a reciclagem diferencial dos mRNAs (síntese e subsequente degradação) contribui para a adaptação da célula, e do organismo como um todo, a rápidas mudanças ambientais, hormonais ou relacionadas a estímulos intrínsecos ao tipo e estágio de desenvolvimento celular (Bernstein *et al.*, 1989; Bernstein *et al.*, 1992; Ross, 1995).

RNAs mensageiros como os da β -globina apresentam grande estabilidade. Os mRNAs das globinas estão entre os mais estáveis com meia-vida estimada em sessenta horas (Lodish e Small, 1976; Volloch e Housman, 1981). Essa estabilidade é crítica para a produção e acúmulo de hemoglobina pelos eritrócitos. Por outro lado, entre os mRNAs de mamíferos de curta estabilidade estão aqueles que codificam proteínas como fatores de crescimento, citocinas, fatores de transcrição e alguns proto-oncogenes, que são expressos transitoriamente em resposta a estímulos extracelulares (Greenberg e Ziff, 1984; Caput, *et al.* 1986; Shaw e Kamen, 1986; Cosman, 1987; Gillis e Malter, 1991; Chen *et al.*, 1994; Shyu *et al.*, 1991; Pende *et al.*, 1996). Os transcritos dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* estão entre os mRNAs de maior instabilidade e servem de modelo de estudo para a elucidação dos mecanismos que controlam a rápida degradação e reciclagem de mRNAs. Esses proto-oncogenes codificam fatores de transcrição que exercem papéis críticos no processo de crescimento e diferenciação celular (Curran e Franza, 1988). Vários estudos apontam que um domínio rico em adenina e uracila (AU) na região 3' não traduzida (UTR) desses e de alguns outros mRNAs se correlaciona com a rápida degradação dos mesmos (Cleveland e Yen, 1989; Chen e Shyu, 1995; Zubiaga *et al.*, 1995). Deleções das seqüências ricas em AU na região 3' UTR de *c-fos* (Wilson e Treisman, 1988) e *c-myc* (Jones e Cole, 1987) conferem estabilidade aos transcritos.

Vias de degradação de mRNAs nas células de mamíferos

A regulação da degradação de mRNAs é coordenada pelas interações entre elementos em *cis* na própria estrutura da molécula de mRNA e fatores de atuação em *trans* que se ligam aos elementos em *cis*. Entre os elementos em *cis* incluem-se a extremidade 5'-*cap*, a extremidade 5' não traduzida (UTR), a região codificadora da proteína, a extremidade 3'-UTR e a cauda poli(A) na porção 3'.

Sabe-se que a maioria dos mRNAs de mamíferos são poliadenilados. A cauda 3' poli(A), como mencionado anteriormente, assume importantes funções relativas ao processamento da molécula de mRNA nuclear, transporte para o citoplasma, tradução e estabilidade da molécula no citoplasma (revisado por Bernstein e Ross 1989; Sachs 1990). Duas observações permitem inferir que a extremidade poli(A) protege mRNAs de uma rápida degradação: (1) a deadenilação é o primeiro passo na degradação de muitos mRNAs; (2) a proteína que se liga a regiões poli(A) (PABP) interage com a extremidade 3' protegendo mRNAs de uma rápida degradação *in vitro* (Bernstein *et al.*, 1989). Dados mostram que mRNAs poliadenilados são rapidamente degradados quando incubados em extratos celulares onde a proteína PABP tenha sido previamente retirada. Entretanto, esses mesmos tipos de mRNA são estabilizados quando aos extratos celulares são adicionados um excesso de PABP. Na ausência da seqüência 3' poli(A), mRNAs são instáveis na presença ou ausência de PABP (Bernstein *et al.*, 1989; Ross *et al.*, 1987).

Em células de mamíferos a degradação de mRNAs é freqüentemente iniciada por um encurtamento gradual da cauda poli(A) e este processo é mediado por pelo menos uma poli(A) ribonuclease (PARN) (Korner e Wahle, 1997; Korner *et al.*, 1998). Por outro lado, a estrutura 5'-cap permanece acoplada de maneira estável ao fator de iniciação da tradução eIF4E (Ptushkina *et al.*, 1999). Evidências indiretas sugerem que a retirada da m⁷G da extremidade 5' só ocorre após o encurtamento da cauda poli(A) (Couttet *et al.*, 1997). A retirada da estrutura 5'-cap permite o acesso de exonucleases possibilitando uma degradação 5' → 3' e, muitas vezes, uma degradação simultânea 3' → 5' (Brewer, 1999). O isolamento de uma enzima em murinos, homóloga a exorribonuclease (5' → 3') Xrn 1p de levedura, fortalece as evidências de que a via de degradação de mRNAs de mamíferos envolve a degradação 5' → 3' (Figura 3). RNAs mensageiros com códons sem sentido (NMD - *nonsense-mediated decay pathway*) também apresentam uma degradação 5' → 3'. A degradação desses mRNAs previne o acúmulo de transcritos e/ou

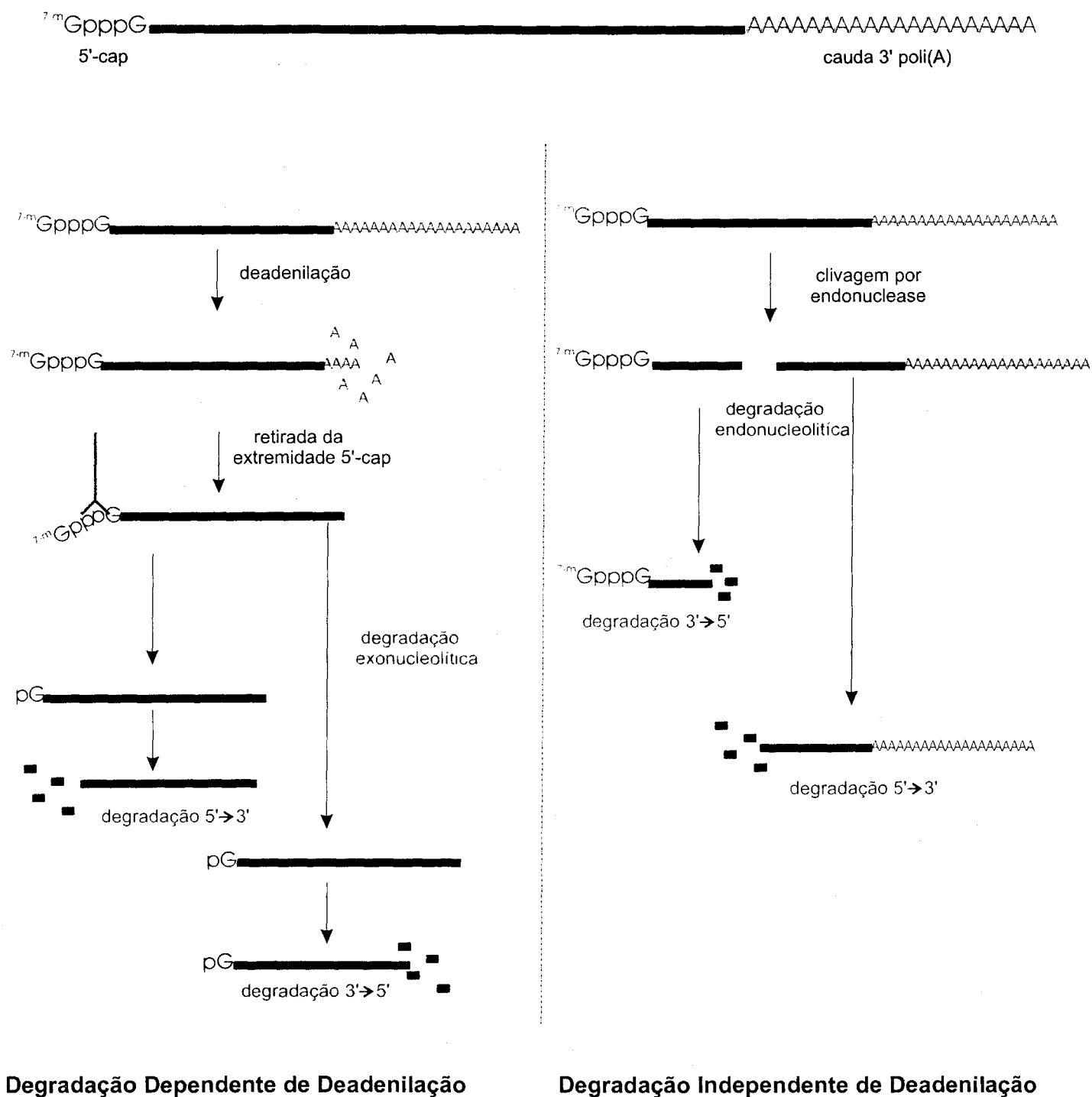


Figura 3 - Representação esquemática das vias de degradação de mRNAs em células de mamíferos. As moléculas de mRNA estão representadas com as estruturas 7^mG (7^mGpppG) e a cauda poli(A). À esquerda está representada a via de degradação dependente da deadenilação. Dados sugerem que esta é a principal via de degradação e a identificação de exorribonucleases $5'\rightarrow 3'$ e $3'\rightarrow 5'$ sugere que os mRNAs podem ser degradados bidirecionalmente. À direita está representada a via de degradação independente da deadenilação. A clivagem endonucleolítica do mRNA gera dois produtos que podem ser degradados por exonucleases.

proteínas aberrantes. Em *S. cerevisiae* essa via envolve a retirada do 5'-cap independentemente da deadenilação (Culbertson, 1999; Hilleren e Parker 1999). Em mamíferos essa seqüência de degradação não é conhecida.

Dependendo do processo da deadenilação, alguns mRNAs são ainda degradados no sentido 3' → 5' por um complexo de exonucleases denominado exossomo. Dados recentes demonstram que a degradação 3' → 5' mediada pelos exossomos está diretamente ligada à degradação de muitos mRNAs de mamíferos (Chen *et al.*, 2001; Wang e Kiledjian, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002), incluindo-se mRNAs com regiões ricas em AU.

Em mamíferos alguns mRNAs apresentam uma via de degradação independente da deadenilação. Esses mRNAs são degradados por uma enzima com atividade endonucleolítica. (Beelman e Parker, 1995). Esse tipo de clivagem resulta em dois fragmentos: um contendo a estrutura 7-metilguanossina (m⁷G) na porção 5' e portanto susceptível a uma provável degradação 3' → 5', enquanto um outro fragmento possui uma cauda poli(A) na extremidade 3', podendo se tornar substrato de uma enzima com atividade de degradação 5' → 3' (Figura 3). Seqüências alvo ao ataque de endorribonucleases são identificadas na estrutura de mRNAs da α-globina de células eritrocitárias (Wang e Kiledjian, 2000).

A regulação da degradação de mRNAs mediada pelos elementos de ação *cis*

A reciclagem de mRNAs é um processo altamente conservado. Vários elementos de atuação *cis* podem regular a taxa de reciclagem de um transcrito, tanto pela ativação quanto pela inibição da degradação. Entre os elementos de atuação *cis* mais bem estudados e caracterizados estão as seqüências ricas em adenina e uracila (*ARE - AU Rich Element*) encontradas na porção 3' UTR de mRNAs lábeis como os de citocina, proto-oncogenes e fatores de crescimento (Zubiaga *et al.*, 1995; Chen e Shyu, 1995).

Entretanto não se deve necessariamente assumir que a presença do domínio rico em AU seja suficiente para a desestabilização do mRNA. Dados sugerem que a desestabilização mediada por tais domínios não se deve a sua estrutura primária, mas sim a sua estrutura secundária (Shaw e Kamen, 1986; Wilson e Treisman, 1988).

A função regulatória dos elementos AU ricos foi postulada por Caput *et al.*, (1986), que observaram a sequência consenso UUAUUUAU em mRNAs de citocinas e oncogenes. As análises subsequentes feitas por Shaw e Kamen (1986) reforçaram a importância do domínio rico em AU na região 3' UTR. Esses pesquisadores inseriram na região 3' não traduzida do gene da β -globina de coelho uma sequência de 51 nucleotídeos correspondente à região rica em AU do fator humano estimulador de colônias granulocíticas-macrofágicas (GM - CFS). A inserção desse fragmento conferiu instabilidade aos transcritos da β -globina.

Os elementos AU ricos são caracterizados pela habilidade de favorecerem uma rápida degradação de mRNA dependente da deadenilação. Tipicamente esses elementos contêm múltiplas cópias do pentanucleotídeo AUUUA e aparecem em conjunto com uma ou mais regiões ricas em uracila. Baseado nas características sequenciais e na cinética de deadenilação e de degradação, os elementos ricos em AU foram classificados em três classes principais (Xu *et al.*, 1997):

Classe I - encontrada em muitos mRNAs de proto-oncogenes e é composta de uma ou três cópias do motivo AUUUA em uma região rica em U; controlam o sincronismo entre o encurtamento da cauda poli(A) e a degradação do mRNA. Ex. c-fos; c-myc (.....AUUUA.....);

Classe II - encontrada em mRNAs de citocinas e contêm cópias múltiplas do motivo AUUUA ; estão envolvidos em um processo assíncrono entre deadenilação e degradação do mRNA. Ex. GMCSF, TNF- α (.....AUUUAUUUAUUUAUUUA.....);

Classe III - nenhuma sequência consenso rica em AU é identificada, embora assegure um processo sincronizado entre o encurtamento da cauda poli(A) e a degradação do mRNA. Ex. c-jun (.....UUUUUUUUUUUU.....).

Essas classes dos elementos ricos em AU apresentam diferenças sequenciais sutis. Essas diferenças favorecem uma heterogeneidade de mecanismos de reciclagem de mRNAs modulados por diversos fatores que se ligam a essas regiões ricas em AU e/ou por diversas interações RNA-proteína e proteína-proteína.

Várias proteínas que se ligam a regiões ricas em AU vêm sendo descritas desde a década passada (Zhang *et al.*, 1993). Essas proteínas são consideradas fatores de atuação *trans* e conferem maior ou menor estabilidade aos mRNAs. A tabela 1 resume as principais características de alguns desses fatores:

Tabela 1: Proteínas que se ligam a regiões ricas em adenina e uracila (AU) e suas principais características

Fator	Função
AUF1/ hnRPD¹ ¹ Zhang <i>et al.</i> , 1993	quatro isoformas oriundas de processamento alternativo de íntrons (<i>splicing</i>); liga-se como tetrâmero <i>in vitro</i> ; liga-se a domínios ricos em AU e está correlacionada a instabilidade e/ou estabilidade de mRNAs dependendo da fisiologia celular
HuR²/ HuA³ ² Fan e Steitz, 1998; ³ Mayer <i>et al.</i> , 1997	proteína homóloga a ELAV (<i>embryonic lethal abnormal vision</i>) liga-se a domínios AU ricos e relaciona-se com a estabilidade de mRNAs; envolvida com o transporte núcleo – citoplasmático de mRNAs

HuD⁴, Hel-N1 (HuB)⁵, HUC⁶ proteínas que se ligam a regiões ricas em AU de mRNAs do sistema nervoso (*ELAV-like proteins*)
^{4,5,6}Fan e Steitz, 1998
Hel-N1 está envolvida com a tradução de certos mRNAs

Tristetraprolin⁷ ⁷ Lai <i>et al.</i> , 1999	CCCH proteína <i>zinc finger</i> , desestabiliza mRNA ricos em AU
TIA-1⁸, TIAR⁹ ⁸ Piecyk <i>et al.</i> , 2000; ⁹ Gueydan <i>et al.</i> , 1999	modula a tradução do mRNA de TNF- α

Entretanto, o reconhecimento de seqüências específicas de RNAs pelas proteínas se deve à presença de domínios de reconhecimento de RNA que variam de 70 a 150 aminoácidos. De acordo com a estrutura molecular de cada um desses domínios, três classes principais são apontadas: RRM - motivo de reconhecimento de RNA; dsRBD - domínio de ligação de RNA fita dupla e KH - domínio homólogo ao da proteína hnRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogênea) K. A compreensão dos mecanismos envolvidos na ligação entre moléculas de RNA e proteínas para a formação de um complexo funcional é um dos grandes desafios da biologia estrutural.

A regulação das concentrações de mRNA é um processo complexo e sincronizado. Irregularidades no metabolismo de mRNAs podem acarretar conseqüências sérias ao organismo, como câncer, resposta inflamatória crônica e doenças coronárias, ou ainda doenças associadas a problemas metabólicos causados pela deficiência na produção de receptores acoplados à proteína G (Polymeropoulos *et al.*, 1996; Pandis *et al.*, 1995).

A proteína AUF1 (*AU-rich binding factor 1*)

AUF1 é uma proteína que se liga à região 3' não traduzida de mRNAs que se caracterizam por apresentarem rápida reciclagem. Essa proteína também é denominada hnRNP D e pertence ao grupo das ribonucleoproteínas. Sob condições normais, a

interação de AUF1 com a região 3' de mRNAs funciona como um elemento de desestabilização, levando à degradação desses mesmos mRNAs (Zhang *et al.*, 1993, Sirenko *et al.*, 1997).

A proteína AUF1 foi descoberta com o auxílio de um sistema de análise das concentrações de mRNA *in vitro*, especialmente desenvolvido para a identificação dos fatores que contribuem para a degradação do proto-oncogene *c-myc* (Brewer, 1991). O proto-oncogene *c-myc* está envolvido no controle dos mecanismos de crescimento, diferenciação, transformação e divisão celulares (Cole, 1986; Marcu, *et al.*, 1992, Swartwout e Kinniburg, 1989). Muitos mRNAs de proto-oncogenes são instáveis e a expressão de genes como *c-myc* é estritamente controlada, não somente pela transcrição, processamento nuclear e tradução, mas também pela reciclagem do mRNA (Marcu *et al.*, 1992).

Quatro isoformas da proteína AUF1 humana estão descritas (Wagner *et al.*, 1998; DeMaria *et al.*, 1997; Figura 4) e dados sugerem que essas isoformas são produtos do processamento alternativo de um único pré-mRNA existente, transcrito por um gene localizado no cromossomo 4 (Wagner *et al.*, 1998). Possuindo aproximadamente 37, 40, 42 e 45 kDa essas isoformas são denominadas AUF1-p37, AUF1-p40, AUF1-p42 e AUF1-p45 (Buzby *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1993; DeMaria *et al.*, 1997). Wagner *et al.* (1998) demonstraram que essas isoformas apresentam diferenças em suas especificidades e afinidades de ligação a mRNAs e são expressas controladamente nas células dependendo do tipo e do seu estágio de desenvolvimento (Buzby *et al.*, 1996; Pende *et al.*, 1996), embora a maneira de atuação de cada isoforma ainda não esteja bem definida.

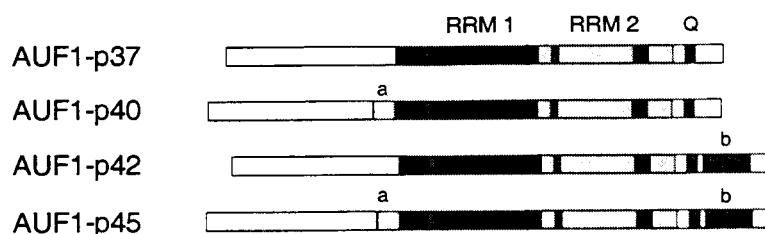


Figura 4. Representação esquemática das isoformas de AUF1 mostrando os domínios RRM (*RNA recognition motif*). Os blocos em negro correspondem a regiões conservadas dentro dos domínios RRM. A área identificada pela letra Q corresponde a domínios ricos em glutamina na porção C-terminal. As quatro proteínas são muito semelhantes e as diferenças entre as isoformas se devem aos domínios N- e C- terminais. Nas isoformas p40 e p45 há uma inserção de 19 aminoácidos (a) na porção N-terminal e nas isoformas p42 e p45 há uma inserção de 49 aminoácidos na porção C-terminal (b).

A análise da sequência de aminoácidos dessas isoformas indica que cada polipeptídeo contém em comum uma porção N-terminal, dois motivos de 90 aminoácidos que reconhecem RNA denominados RRM (*RNA Recognition Motifs*) e um domínio rico em glutamina. Basicamente a diferença entre as isoformas se dá pela presença ou ausência de 19 aminoácidos na porção N-terminal e/ou de 49 aminoácidos na porção C-terminal (Figura 4). Evidências sugerem que a presença dessa sequência de 49 aminoácidos na porção C-terminal retém as isoformas p42 e p45 no núcleo da célula (Arao *et al.*, 2000). Por outro lado, as isoformas p37 e p40 são localizadas na região citoplasmática.

A análise da sequência de outras proteínas que se ligam a mRNAs, como as proteínas hnRNP A1 e hnRNP A2 (Shamoo *et al.*, 1997) evidencia a presença de um ou vários motivos RRM. Esses motivos estão envolvidos no acoplamento de diferentes sequências de RNAs. A análise de 20 motivos RRM conhecidos mostrou que uma região de 6 a 8 aminoácidos é estritamente conservada, inferindo sua importância no reconhecimento e acoplamento a moléculas de RNA. Além disso, a análise das estruturas tridimensionais de algumas dessas proteínas disponíveis em bancos de dados evidenciou

um arcabouço comum composto por duas fitas β antiparalelas e duas α -hélices. No caso da proteína nuclear U1, as duas fitas β centrais contêm as regiões conservadas de 6 a 8 aminoácidos (Nagai *et al.*, 1990).

Análises preliminares envolvendo deleções parciais da proteína AUF1 evidenciam, entretanto, que os dois domínios RRM sozinhos não são suficientes para uma ligação de alta afinidade de AUF1 a regiões ricas em AU. Dados sugerem que as regiões N- e C-terminal dos dois domínios RRM estão envolvidas na ligação a moléculas de RNAs (DeMaria *et al.*, 1997), o que explica as diferentes afinidades de ligação das isoformas a um determinado substrato de mRNA rico em AU (Wagner *et al.*, 1998).

Vários estudos sugerem que a estabilidade de mRNAs ricos em AU é regulada por um complexo multi-protéico, cuja composição dinâmica pode determinar o destino desses mRNAs (Henics *et al.*, 1999; Laroia *et al.*, 1999; Grosset *et al.*, 2000). Além disso, condições exógenas e endógenas às células, tais como variações ambientais, alterações hormonais e condições de estresse, atuam na regulação dos níveis dos mRNAs. A própria proteína AUF1, que se correlaciona com mecanismos de desestabilização de mRNAs, parece estar envolvida em mecanismos de sinalização em resposta ao estresse celular (*heat shock*; Laroia *et al.*, 1999).

A literatura mostra claramente a relevância do fator AUF1 nos mecanismos de reciclagem de mRNAs e na regulação da expressão gênica. Assim, esse trabalho de doutoramento foi desenvolvido buscando-se a identificação de proteínas que interagem com AUF1 e modulam a estabilidade de mRNAs e visando a análise dos determinantes estruturais da proteína AUF1 envolvidos na interação com motivos ricos em AU em moléculas de RNA. Dois artigos, um publicado e o outro no prelo, resumem os estudos e as análises desenvolvidas.

O controle dos níveis citoplasmáticos de mRNAs é um fator crítico na regulação da expressão gênica. Em eucariotos, a degradação desses mRNAs é regulada de acordo com o tipo e estágio de desenvolvimento celular.

RNAs mensageiros lábeis como os que codificam oncoproteínas e citocinas são rapidamente degradados e freqüentemente possuem elementos ricos em AU, baseado no motivo consenso AUUUA em sua porção 3' não traduzida. A proteína humana AUF1/hnRNP D se acopla a essas seqüências, funcionando como um fator de desestabilização e acelerando o processo de degradação de mRNAs.

Dada a relevância do fator AUF1 nos mecanismos que controlam os níveis de mRNAs, essa tese de doutoramento foi realizada considerando-se os seguintes objetivos:

- Análise funcional *in vivo* e *in vitro* da proteína AUF1, visando a identificação de proteínas que se acoplam a AUF1 e que possivelmente estivessem envolvidas na regulação da estabilidade de mRNAs;
- Análise dos determinantes estruturais da proteína AUF1 envolvidos no reconhecimento de motivos ricos em AU.

Dois trabalhos são apresentados a seguir, um deles já publicado e o outro aceito para publicação.

ARTIGO 1

Analysis of the Structural Determinants for RNA Binding of the Human Protein AUF1/hnRNP D

Karen C.M. Moraes, Wen Hwa Lee and Jörg Kobarg.

Biological Chemistry **383**, 831-837 (2002).

Short Communication

Analysis of the Structural Determinants for RNA Binding of the Human Protein AUF1/hnRNP D

Karen C.M. Moraes^{1,2,*}, Wen Hwa Lee^{1,a,b} and Jörg Kobarg^{1,2,*}

¹ Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, CP 6192, CEP 13084-971 Campinas, SP, Brasil

² Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil

* Corresponding author

The protein AUF1/hnRNP D was one of the first factors identified that binds to the AU-rich region of certain mRNAs and mediates their fast degradation. Here we describe experiments to address the structural determinants for the binding of AUF1 to the RNA by combining comparative molecular modeling with gel shift assays. From our model of the RNA binding region of AUF1 we predicted that it interacts with RNA predominantly through stacking interactions that do not provide base-specific recognition. Only two RNA positions bound by AUF1 show base preferences: one for pyrimidine bases and the second for a conserved adenine residue. Gel shift assays with a panel of RNA oligonucleotides largely confirmed these model-based binding determinants. An alignment with proteins of the hnRNP family demonstrated that the amino acids involved in the stacking interactions are conserved whereas those that confer a base-specific recognition in AUF1 are variable.

Key words: AU-rich element/Gel-shift assay/Molecular modeling/RNA recognition motif/Sequence-specific RNA recognition/Stacking interaction.

The cytoplasmic concentration of the mRNA is a critical factor for the final production of the gene product. Therefore the mRNA degradation rate critically influences the expression of many gene products. The mRNA decay in eucaryotes is an important step in gene expression regulation and is either defined by constitutive mRNA decay

rates or in response to changes in the cellular environment (Bernstein *et al.*, 1989, 1992; Ross, 1995). Rapidly degraded mRNAs, such as those encoding oncoproteins, cytokines or inflammatory mediators, frequently contain AU-rich elements (AREs) based on repeats of the motif AUUUA in their 3'-untranslated regions (3'-UTRs). Multiple copies of these AREs mediate the rapid degradation of mRNAs. The human protein AUF1, which also has been termed hnRNP D, binds specifically to ARE-containing sequences and has been reported to be involved in the accelerated degradation of ARE-containing mRNAs (Zhang *et al.*, 1993).

Although AUF1 has been shown to bind to AREs it is not clear what specific motifs are recognized in the AREs and what kind of molecular interactions provide the sequence specificity. AUF1 contains two RNA recognition motifs (RRMs) that are responsible for its binding to the ARE (DeMaria *et al.*, 1996). Here we describe how we began to address the structural determinants for the binding of AUF1 RRM1/2 to RNA by combining comparative molecular modeling and gel-shift assays with different RNA substrates. We took advantage of the fact that the structure of AUF1 domain RRM1 had been resolved by NMR previously (Nagata *et al.*, 1999; 1HD0) and modeled the structure of the AUF1 domain RRM 2. Initially, we performed a Blast search to find the RRM2 domain of another protein, the structure of which had been resolved. We found that the RRM2 domain of the human protein UP1 (also named hnRNP A1) has 45.7% sequence identity and 85.2% sequence similarity with the RRM2 domain of AUF1 (2UP1, Ding *et al.*, 1999) (Figure 1). This high degree of sequence similarity of UP1 RRM2 provided the basis for the molecular modeling of AUF1 RRM2. Moreover, an inspection of several members of the same family of RNA binding proteins, whose structures had been solved either by crystallography or NMR, indicated that the overall folding is well conserved (PDB IDs: 2UP1, 1HA1, 1UP1, 2MSS, 1D9A). Therefore, we decided to approach the prediction of the AUF1 RRM2 structure by homology modeling. The program MODELLER 4.0 (Sali and Blundell, 1993) was used to model the RRM2 of AUF1 by using the structure RRM2 of UP1 as a template. We applied Cartesian randomization on the initial model up to 4.0 Å, followed by the variable target built-in MODELLER. The resulting models were then refined using a fast MD annealing optimization, including all atoms. Forty-seven models were generated and were evaluated for stereochemical regularity and chemical self-consistency by us-

^a These authors contributed equally to this work.

^b Present address: Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA.

ing the programs PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) and WHAT-CHECK (Hooft *et al.*, 1996). Analysis of our best model of AUF1 RRM2 using PROCHECK indicates that 91.2% of the residues fall within the most favorite regions of the Ramachandran plot and that no residues were found in disallowed regions. The overall G-factor of the model is 1.3. As the superimposition of the structures of AUF1 RRM2 and RRM2-2UP1 shows, (Figure 2A) the secondary structure elements and α -alpha backbone tertiary structure are very similar. This also suggests that our model of AUF1 RRM2 is reliable.

After achieving a stereochemically acceptable model,

we began to address the RNA binding specificity issue. We started by superimposing our AUF1 model with the solved structure of an RRM-containing protein bound to its target RNA oligonucleotide, in order to verify the structural influence of the residues positioning to the RNA sequence recognition. We chose the crystal structure of the RRM 1 and 2 of PABP bound to an 11mer poly-A RNA oligonucleotide and then superimposed it over the RRM 1 and 2 of AUF1. The choice of a structure with a bound RNA molecule enabled us to pinpoint the amino acid residues of PABP responsible for the interactions with the RNA and project these into our AUF1 model. As expect-



Fig. 1 Amino Acid Sequence Alignment of the RRM2 (RNA Recognition Motifs) of the Human Proteins AUF1 (RRM2), 2UP1, PABP and Related Proteins.

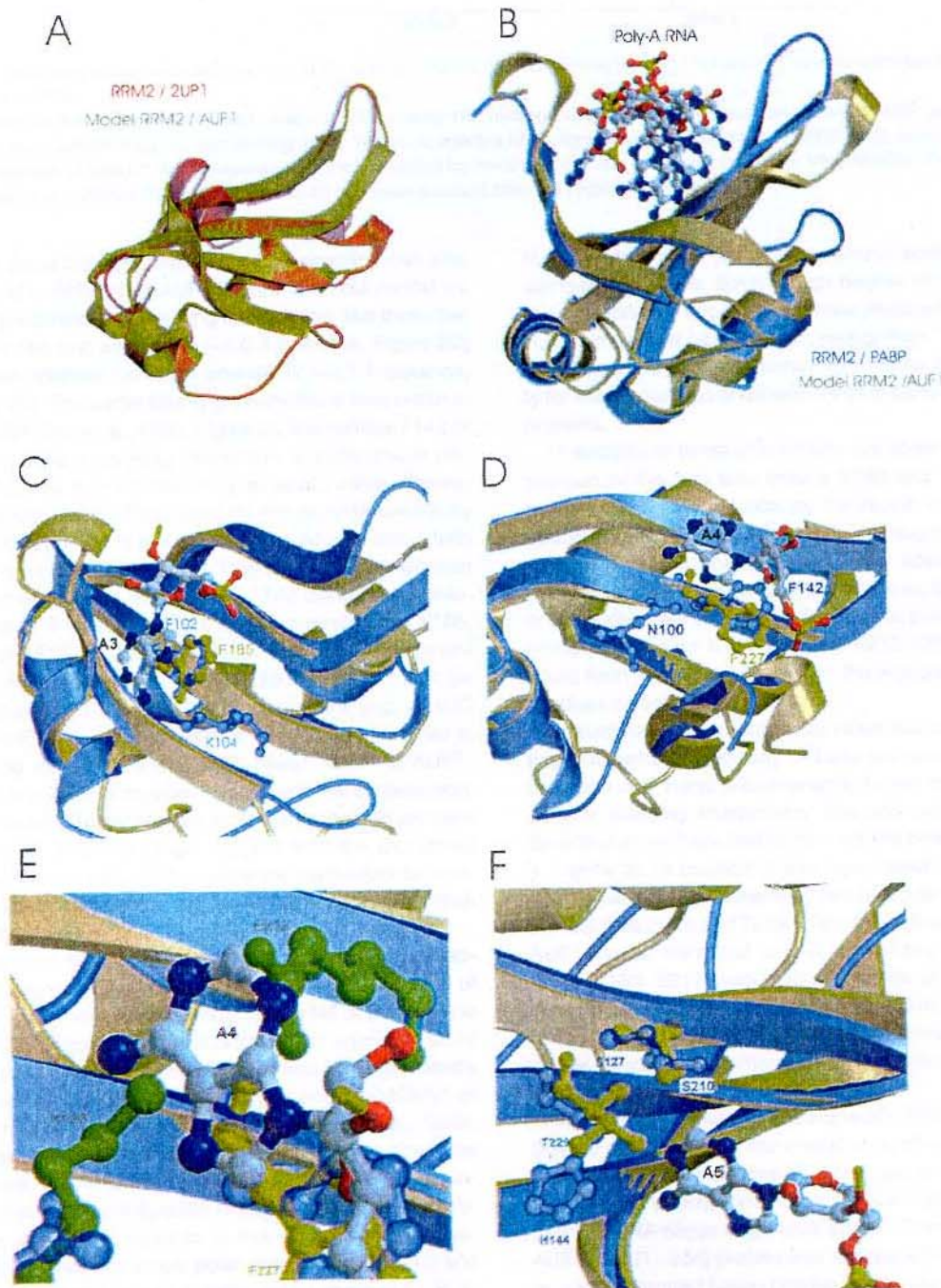
Comparison of the protein sequences of human AUF1 (NM_031370), human 2UP1 (2194069), human PABP (XP_042055), mouse MSS (NP_032655), human hnRNPR (NM_005826), mouse HUC (Q14576), human hnRNPI (NM_002819), human hnRNPL (NM_001533). Known secondary structure elements of UP1 (Ding *et al.*, 1999; 2UP1) and PABP (Deo *et al.*, 1999; 1CVJ) are highlighted by light gray (α -helix) or boxing (β -strand) as indicated at the bottom of the figure. AUF1 residues predicted to make contacts with the RNA are marked by asterisks (*). Residues that make contact with the RNA and are conserved in the compared protein sequences are typed in bold. The numbers in parenthesis indicate the first amino acid residue of the protein shown in the Figure.

Fig. 2 Structure and RNA Recognition of the Modeled AUF1 RRM2.

(A) Superposition of the ribbon diagrams of the RRM2 domain of the protein UP1 (Ding *et al.*, 1999; 2UP1) with the model of RRM2 of AUF1 obtained by molecular modeling using the program MODELLER 4.0 (Sali and Blundell, 1993) (UP1, red; AUF1, green). (B) Superposition of the ribbon diagrams of the AUF1 RRM2 model (green) with the structure of PABP RRM2 (blue) bound to a poly-A RNA oligonucleotide nonamer shown as a ball-and-stick model colored by atom type (blue, nitrogen; carbon, white; red, oxygen; yellow, phosphorus). (C–F) Comparison of poly-A RNA oligonucleotide recognition by PABP RRM2 and the model of AUF1 RRM2. (C) Stacking interaction of F102 from PABP RRM2 and adenine III is conserved in F185 of AUF1 RRM2. This kind of interaction does not provide base-specificity. (D) Adenine IV of the poly-A sequence is recognized by both stacking interactions (F142) and hydrogen bonding (N100) in the RRM2 of PABP. Again the stacking interaction is conserved in AUF1 RRM2 (F227) but does not provide base specificity. (E) On the contrary, the positioning of the side chains of K183 and E212 in the model of AUF1 RRM2 does not allow a bulky purine base (A or G) at position IV. However, it is possible to accommodate a smaller pyrimidine base (U or C) in that position and form hydrogen bonds between the N of the pyrimidine base and the residues K183 (N α atom) and/or E212 (OE atoms). (F) The base-specific recognition of an adenine residue in position V is conserved in the model of AUF1 RRM2. The hydrogen bonds between H144 and S127 of PABP RRM2 and adenine V are conserved in residues T229 and S210 of the AUF1 RRM2 model. This Figure was produced with the program MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

ed, the superimposition of RRM2-AUF1 with RRM2-PABP showed a good agreement (Figure 2B). We then concentrated on the RNA binding region and examined the side chains of our model (RRM1/2 of AUF1), comparing their positions with those of the RRM1/2 in the PABP. We examined the amino acid residues of AUF1 that are equivalent to those of PABP that make contact with the poly-A RNA oligonucleotide (Figure 2 C-F, Figure 3). An analysis of the interactions between PABP and poly-A re-

vealed that the interactions are mostly based on relatively weak interactions (such as van der Waals interactions, hydrogen bonds and stacking interactions), which seems to be necessary for the regulatory role presented by this protein. It is noteworthy that the stacking interactions in PABP do not provide base specificity to the interactions, whereas the base-specific recognition of the adenine bases is mostly based on hydrogen bridges (Deo *et al.*, 1999).



Poly-A Binding Protein (PABP)	G139 Stack			M85 Stack	Y14 Stack		Y56 Stack	
	Y140 VDW	F102 Stack	F142 Stack	H144 HB	E88 HB		S12 HB	
	N105 HB	K104 HB	N100 HB	S127 HB	W86 HB	D45 HB	N58 HB	R41 HB
position of the adenine (poly-A)	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
"ARE":	N2	N3	U/C4	A5	N6	(N7)	N8	(N9)
AUF1	G224 VDW	F185 Stack	F227 Stack	T229 HB	F100 Stack		F142 Stack	
	F225 VDW			S210 HB				
	RRM 2				RRM 1			

Fig. 3 Summary of Contacts between the AUF1 and Its Putative AU-Rich Element (ARE) RNA and of Contacts between Human PABP and Poly-A RNA.

VDW: van der Waal's interaction; Stack: stacking interactions; HB: hydrogen bond; RRM: RNA recognition motif; PABP: poly-A binding protein; AUF1 (=hnRNP D); AU-rich binding factor 1; poly-A: adenine RNA oligonucleotide bound to the PABP; ARE: AU-rich element of the consensus UUUUUUA; the base-specificities indicated by the analysis of our model are indicated: NNUANNNN. The numbering of the adenine positions (Roman numbers II–IX) has been adapted from the PABP (Deo *et al.*, 1999).

The same basic determinants of interaction can also be found in RRM1/2 of AUF1 (Figure 3). In our model we found predominantly stacking interactions, like those between F185 and adenine III (~4.0 Å distance, Figure 2C) or those between F227 and adenine IV (~3.1 Å distance, Figure 2D). The same stacking interactions also occur in the PABP (Deo *et al.*, 1999; Figure 3). The residue F142 of PABP makes a stacking interaction of comparable distance (3.3 Å) with adenine IV (Deo *et al.*, 1999). Stereochemically, these interactions do not provide specificity to the recognition of the base and could also occur with any of the other bases C, G or U. A sequence comparison with other proteins that contain RRM domains homologous to AUF1-RRM2 (Figure 1) demonstrates that F185, F225 and F227 of AUF1-RRM2 are also highly conserved in the other sequences. F185, F225 and F227 might be substituted by L, I or Y in the other proteins (e.g. in HUC or hnRNP I), but these residues also can be involved in stacking interactions with RNA bases. G224 in AUF1-RRM2 is a residue engaged in van der Waal's interaction, which is also highly conserved in the compared proteins (Figure 1). These findings suggest that the discussed residues might be part of a conserved framework for non-base-specific contacts of the proteins with their RNA substrates.

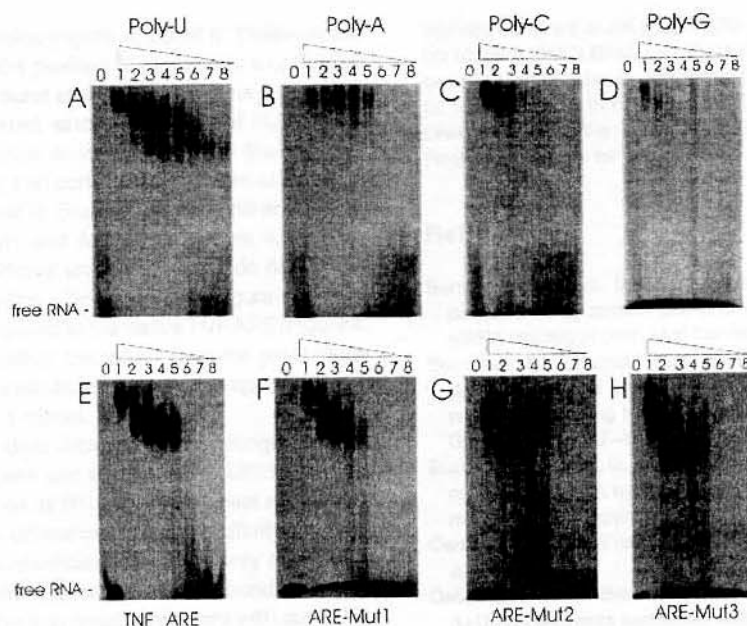
The only two 'conserved' hydrogen bonds we observed, comparing our model of RRM2-AUF1 with that of PABP, were those formed from T229 to N6 of the adenine V (2.92 Å length) and from S210 to N1 of adenine V (2.79 Å length) (Figure 2F). In PABP these two hydrogen bonds involve the residues S127 (hydrogen bonds to N6/N1 of A5) and H144 (Nδ1 to N6 of A5; 3.2 Å) (Deo *et al.*, 1999). The sequence alignment (Figure 1) shows that the residues S210 and T229 from AUF1-RRM2, which are involved in an adenine-specific recognition of the RNA substrate, are highly variable in the other compared sequences. The two small polar amino acids, S210 and T229, from AUF1 can be substituted by charged (D, R, K,

H, E), hydrophobic (V) or other amino acids (N) in the compared proteins. Such a high degree of variability in this position may suggest that these residues are also involved in a rather base-specific recognition. The variability in these and other positions might confer the specificity for the recognition of different RNA substrates by these proteins.

In addition to these interactions we observed that the position of the two side chains K183 and E212 in the model of RRM2-AUF1 occupy the region of adenine IV bound to PABP-RRM2 (Figure 2E). This suggests that it is not possible to accommodate a bulky adenine base in the AUF1 model at the position IV. However, the smaller U or C residues are allowed in the RNA at position IV. Our model shows that K183 (Nz) and E212 (OE1 and OE2) could form hydrogen bonds with the nitrogens in U or C residues in the RNA.

In summary, the interactions observed in our model suggest that the specificity of base recognition is rather limited in AUF1 and predominantly based on non-base-specific stacking interactions. The only two RNA positions that show base restrictions are the positions IV and V (Figure 3). In position V the base-specific binding of AUF1 to an adenine is made by two hydrogen bonds from the residues S210 and T229. In the RNA position IV of the AUF1 model, we found side-chains of two large amino acids (K183, E212) occupying the place of the adenine base. These findings suggest the possibility that binding to the AU-rich motif (UUUUAUU) might primarily depend on the specific recognition of a U in position IV and of a very conserved adenine in position V.

We set out to test the base-specific RNA recognition that we predicted from our model by synthesizing a panel of RNA oligonucleotides (Figure 4, panel I) and testing the ability of a recombinant human AUF1 protein to bind to these RNA oligos in gel shift assays. The recombinant AUF1-p37 (1–284) protein was expressed in *E. coli* cells as a 6xHis-tagged fusion protein and purified by Ni-affin-



Sequences of the used RNA substrates

Name	Sequences (5' - 3')
Poly-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Poly-C	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
Poly-G	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
Poly-U	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
TNF ARE	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
ARE-Mut1	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
ARE-Mut2	AAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
ARE-Mut3	AUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU

Fig. 4 Electrophoretic Mobility Shift Assay Showing Retardation of Different Radiolabeled, Single-Stranded RNA Oligonucleotides by Recombinant Human 6xHis-AUF1 Fusion Protein.

The AUF1p37 cDNA (encoding amino acid residues 1–284) was amplified by PCR and directionally cloned into the bacterial expression vector pET3c. After transformation of *E. coli* BL21 cells the AUF1 protein was expressed as a 6xHis-tagged fusion protein and purified by Ni-affinity chromatography. (A–H) Decreasing amounts of AUF1 protein (3.5 nmol to 11 pmol) are indicated on top of the panels: 0: free oligonucleotide; 1: 3.5 nmol; 2: 700 pmol; 3: 350 pmol; 4: 175 pmol; 5: 88 pmol; 6: 44 pmol; 7: 22 pmol; 8: 11 pmol 6xHis AUF1 protein. 30 fmol of [³²P]-radiolabeled RNA (~10 000 cpm) oligonucleotide were used in each lane. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed as described previously (Carey, 1991; Rui *et al.*, 2001). RNA-protein complexes were run on a non-denaturing 6% polyacrylamide gel in 0.5x TBE buffer. Dried gels were exposed for 24 h to X-ray films at –80 °C. Oligonucleotide RNAs were purchased from Dharmacon Research. In panel (I) the names and sequences of the used RNA substrates are shown.

ity chromatography. The recombinant protein bound with high affinity to the native AU-rich 21mer RNA oligonucleotide substrate (TNF ARE, Figure 4, panel E and I), which contains the classical AU-rich repeats as found in the 3'-region of the TNF- α mRNA (Wilson *et al.*, 1999). An analysis of poly-A, -C, -G and -U 25mers revealed that AUF1 binds to all of these homopolymers though with different affinity that decreases in the order: poly-U > poly-A > poly-C > poly-G (Figure 4, panels A–D). The relative affinity of AUF1 to the poly-U homopolymer (Figure 4, panel A, lane 8) was significantly higher than that observed for the oligonucleotide containing the native AU-rich motif (TNF ARE, Figure 4, panel E, lane 5). This conclusion can be drawn because to yield a visible

shift of the poly-U oligonucleotide, approximately 8 times less AUF1 protein is required (compare panel A, lane 8, with panel E, lane 5) (Carey, 1991; Rui *et al.*, 2001). This affinity difference can be readily understood from our AUF1 model, which indicates that no adenine can be tolerated in position IV. The less tight binding of AUF1 to the poly-A, and especially to the poly-C and poly-G oligonucleotides, is probably due to the non-base-specific stacking interactions in positions III, VI, and VIII (Figures 3 and 2).

Comparable shifts of the TNF ARE and ARE-Mut2 oligonucleotides (Figure 4, panels G and E, lanes 1–5) are caused by the same amounts of AUF1 protein. This suggests that AUF1 has very similar affinities to these dif-

ferent oligonucleotides (Figure 4, panel I). These results emphasize that in the position IV most likely a uridine (or cytosine) base is bound and a bulky adenine base could not be accommodated, since the binding of AUF1 to the poly-A oligonucleotide is weaker than to the oligonucleotide ARE-Mut2 that contains an isolated U substitution (Figure 4, panels B, G and I). The two other oligonucleotides, ARE-Mut1 and ARE-Mut3 (Figure 4, panel I), which contain additional uridine residues, do not significantly alter the binding affinity of AUF1 (Figure 4, panels F and H) when compared to the native TNF ARE (Figure 4, panel E). Taken together, the results from the gel shift assays confirm the predictions of the base specificity derived from our AUF1 model.

In summary, our data show that AUF1 recognizes RNA with very limited base and sequence specificity. At high AUF1 concentrations all RNA homopolymers are bound, although with large differences in relative affinity. Four different RNA oligonucleotides composed only of adenine and uridine residues (Figure 4 E–H) all bound with high affinity to AUF1. This is in good agreement with our AUF1 model, which indicates that only the positions IV (pyrimidine base) and V (conserved adenine) are recognized in a base-specific manner.

The limited base and sequence selectivity of AUF1 has some implications for its functional selectivity for mRNAs containing AREs in the cell. Possibly a specific and high affine binding of AUF1 to its predicted ARE target RNA sequences *in vivo* depends on multiple regulatory events like the presence of divalent cations like Mg^{2+} (Wilson *et al.*, 2001b), the dimerization or higher order oligomerization of AUF1 itself (Wilson *et al.*, 1999), the structural remodeling of the ARE RNA by the binding of proteins (Wilson *et al.*, 2001a) and especially the interaction of AUF1 with several other proteins that are also found to be associated with the ARE (Henics *et al.*, 1999; Laroia *et al.*, 1999; Grosset *et al.*, 2000). Various studies suggested that the stability of the ARE-containing mRNAs is regulated by a multi-protein complex, whose composition and dynamic alterations may determine the fate of the ARE-containing mRNA (Sirenko *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998; Laroia *et al.*, 1999; Grosset *et al.*, 2000). Such a complex protein machinery might have evolved to allow a specific regulation of the degradation of mRNA sub-sets in response to environmental (Laroia *et al.*, 1999; Gallouzi *et al.*, 2000), hormonal (Pende *et al.*, 1996) or developmental stimuli (Buzby *et al.*, 1999). It has been shown that activation of the MAP-kinase signaling pathway stabilizes interleukin mRNAs through an ARE-targeted mechanism (Winzen *et al.*, 1999). Future studies of larger complexes between the ARE binding proteins and their target RNAs will allow us to understand the importance of these regulatory events in the degradation of ARE-containing mRNAs.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo/FAPESP through processes

98/05891-9 (grant to J.K.), 99/07423-5 (fellowship to K.C.M.M.), 00/10266-6 (SMOLBNet) and 98/14138-2 (CEPID) and the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). We are indebted to Dr. R.J. Schneider (NYU, New York, USA) for providing plasmid DNA containing the cDNA encoding AUF1 and Professor Rogério Meneghini for critical review of the manuscript.

References

- Bernstein, P., Peltz, S.W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 9, 659–670.
- Bernstein, P.L., Herrick, D.J., Prokipcak, R.D., and Ross, J. (1992). Control of c-myc mRNA half-life *in vitro* by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev.* 6, 642–654.
- Buzby, J. S., Brewer, G., and Nugent, D.J. (1999). Developmental regulation of RNA transcript destabilization by A+U-rich elements is AUF1 dependent. *J. Biol. Chem.* 274, 33973–33978.
- Carey, J. (1991). Gel retardation. *Methods Enzymol.* 208, 103–226.
- DeMaria, C.T. and Brewer, G. (1996). AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J. Biol. Chem.* 271, 12179–12184.
- Deo, R. C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N., and Burley, S., (1999). Recognition of polyadenylated RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98, 835–845.
- Ding, J., Hayashi, M.K., Zhang, Y., Manche, L., Krainer, A.R., and Xu, R.M. (1999). Crystal structure of the two RRM domains of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev.* 13, 1102–1115.
- Gallouzi, I.-E., Brennan, C.M., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Eversole, A., Maizels, N., and Steitz, J.A. (2000). HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3073–3078.
- Grosset, C., Chen, C.-Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemim-Sablon, H., and Shyu, A.-B. (2000). 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.
- Henics, T., Nagy, E., Oh, H.J., Csermely, P., von Gabin, A., and Subjeck, J.R. (1999). Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind in RNA motifs involved in mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 274, 17318–17324.
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E.E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272.
- Kraulis, J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946–950.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 284, 499–502.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993). Procheck – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283–291.
- Nagata, T., Kurihara, Y., Matsuda, G., Saeki, J.-I., Kohno, T., Yanagida, Y., Ishikawa, F., Uesugi, S. and Katahira, M. (1999). Structure and interactions with RNA of the N-terminal UAG-specific RNA-binding domain of hnRNP D0. *J. Mol. Biol.* 287, 221–237.
- Pende, A., Tremmel, K.D., DeMaria, C.T., Blaxall, B.C., Minobe, W.A., Sherman, J.A., Bisognano, J.D., Bristow, M.R. Brewer, G., and Port, J.D. (1996). Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the β -adrenergic receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 8493–8501.

- Peng, S.S.-Y., Chen, C.-Y.A., Xu, N., and Shyu, A.-B. (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* 17, 3461–3470.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* 59, 423–450.
- Rui, E., de Moura, P.R., and Kobarg, J. (2001). Expression of deletion mutants of the hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of its RNA binding activity. *Virus Res.* 74, 59–73.
- Sali, A., and Blundell T.L., (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Sirenko, O.I., Lofquist, A.K., DeMaria, C.T., Morris, J.S., Brewer, G., and Haskill, J.S. (1997). Adhesion dependent regulation of an A+U-rich element binding activity associated with AUF1. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3898–3906.
- Wilson, G.M., Sun, Y., Lu, H., and Brewer, G. (1999). Assembly of AUF1 oligomers on AU-rich RNA targets by sequential dimer association. *J. Biol. Chem.* 47, 33374–33381.
- Wilson, G.M., Sutphen, K., Chuang, K., and Brewer, G. (2001a). Folding of A+U-rich RNA elements modulates AUF1 binding. Potential roles in regulation of mRNA turnover. *J. Biol. Chem.* 276, 8695–8704.
- Wilson, G.M., Sutphen, K., Moutafis, M., Sinha, S., and Brwer, G. (2001b). Structural remodeling of an A+U-rich RNA element by cation or AUF1 binding. *J. Biol. Chem.* 276, 38400–38409.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.-Y., Shyu, A.-B., Müller, M., Gaestel, M., Resch, K., and Holtmann, H. (1999). The p38 MAP Kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP Kinase-activated protein Kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 18, 4969–4980.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L., and Brewer, G. (1993). Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell Biol.* 13, 7652–7665.

Received November 1, 2001; accepted December 19, 2001

ARTIGO 2

Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D)

Karen C.M. Moraes, Alexandre J.C. Quaresma, Karen Maehnss and Jörg Kobarg.

Biological Chemistry **384**, in press (2003).

Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D)

**Karen C. M. Moraes^{1,2}, Alexandre J. C. Quaresma¹, Karen Maehnss^{1,a}
and Jörg Kobarg^{1,2,*}**

Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P. 6192, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

¹ Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, CP 6192, Campinas, SP, CEP 13084-971, Brasil, Tel.: +55-19-3287-4520 ext. 516, Fax: +55-19-3287-7110.

² Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

^a Present address: Karen Maehnss, BioVisioN AG, Feodor-Lynen-Str. 5, 30625 Hannover, Germany.

* corresponding author

Running title: Characterization of AUF1 interacting proteins

Summary

The mRNAs that encode certain cytokines and proto-oncogenes frequently contain a typical AU-rich motif that is located in their 3'-untranslated region. The protein AUF1 is the first factor identified that binds to AU-rich regions and mediates the fast degradation of the target mRNAs. AUF1 exists as four different isoforms that are generated by alternative splicing (p37, p40, p42 and p45). The fact that AUF1 does not degrade mRNA itself, had led to the suggestion that other AUF1 interacting proteins might be involved in the process of selective mRNA degradation. Here we used the "Yeast Two-hybrid system" in order to identify proteins that bind to AUF1. We detected AUF1 itself as well as the ubiquitin-conjugating enzyme E2I and three RNA binding proteins: NSEP-1, NSAP-1 and IMP-2 as AUF1 interacting proteins. We confirmed all interactions *in vitro* and mapped the protein domains that are involved in the interaction with AUF1. Gel-shift-assays with the recombinant purified proteins suggest that the interacting proteins and AUF1 can bind simultaneously to an AU-rich RNA oligonucleotide. Most interestingly, the AUF1 interacting protein NSEP-1 showed an endo-ribonuclease activity *in vitro*. These data suggest the possibility that the identified AUF1 interacting proteins might be involved in the regulation of the mRNA stability mediated by AUF1.

Keywords:

Domain mapping / mRNA degradation / Protein-protein interactions / Ribonuclease / RNA binding domains / RNA binding proteins

Introduction

The cytoplasmatic concentration of the mRNA is a critical factor for the final production of the gene expression and the mRNA degradation rate critically influences the expression of many gene products. The mRNA decay in eucaryotes is either defined by constitutive mRNA decay rates or in response to changes in the cellular environment (Bernstein et al., 1989; Bernstein et al., 1992; Ross, 1995).

Rapidly degraded mRNAs, such as those encoding oncoproteins, cytokines or inflammatory mediators, frequently contain one or more AU-rich elements (ARE) based on the motif AUUUA in their 3'-untranslated regions (3'-UTR). AU-rich elements mediate the deadenylation and subsequent cleavage of the body of mRNA. Several groups set out to clone and characterize specific proteins that bind to these critical AU-rich regions. The proteins that were discovered include: HuR, (Fan and Steitz, 1998), Elav (Robinow et al., 1988), AU-A (Katz et al., 1994), AU-B (Bohjanen et al., 1992), AUH (Nakagawa et al., 1995), hnRNP A1 and C (Hamilton et al., 1993) and AUF1 (Zhang et al., 1993). All of these proteins are part of a cellular degrading machinery, which is responsive to AU-rich elements (Holtmann et al., 1999; Winzen et al., 1999). Some of these proteins (e.g. HuR) stabilize AU-rich element containing mRNAs while others are involved with the mRNA degradation process. The protein AUF1 has been reported to be associated with an accelerated degradation of mRNAs (Bristow et al., 1993; Buzby et al., 1996; DeMaria and Brewer, 1996). The mechanisms that links the association of proteins like AUF1 with the process of accelerated decay are still unknown. However, a few reports also contribute a stabilizing effect to AUF1 (Kiledjian et al., 1997; Xu et al., 2001).

AUF1 is the best studied ARE-binding protein and had been discovered by an *in vitro* mRNA decay system, designed to identify factors that are involved in the degradation of the *c-myc* mRNA (Brewer, 1991). *C-myc* is involved in the control of cell growth, division, differentiation, and transformation, and its expression rate is tightly controlled on all levels of regulation. The loss of the degradation of the *c-myc* mRNA mediated by AU-rich elements has been shown to be associated with transforming phenotypes (Lee et al., 1988).

Since its initial discovery several lines of evidence demonstrated that the binding of AUF1 to the ARE of a mRNA is associate with its accelerated turnover. First, polysomal *c-myc* mRNA can be destabilized *in vitro* by the addition of AUF1 protein (Brewer, 1991; Brewer, 1999;

Brewer, 2000). Second, AUF1 not only binds directly to AREs, but the relative binding affinity of AUF1 to different ARE also correlates with the potential of these ARE to destabilize the mRNA (DeMaria and Brewer, 1996; DeMaria and Brewer, 1997). Third, an increase in AUF1 protein levels is followed by decreased levels of β_1 -adrenergic receptor mRNA (Bristow et al., 1993, Pende et al., 1996). Finally, the mRNA turnover mechanism is compromised in cells that express low levels of endogenous AUF1 (Buzby et al., 1996; Ross, 1995).

The AUF1 gene encodes four proteic isoforms that arise by alternative splicing of the AUF1 pre-mRNA (Wagner et al., 1998). According to their corresponding molecular weights the four isoforms have been denoted as p37, p40, p42 and p45. The four isoforms differ in the presence or absence of two regions “a” and “b” that flank the two central RNA-recognition motives (RRMs, Figure 1A). The specific role of the four different AUF isoforms in the regulation of the mRNA turnover of cytokine or proto-oncogene mRNAs has not been determined yet. It seems likely, that the different AUF1 isoforms have distinct mRNA targets or that they might link the mRNAs that they recognize to different degradation pathways. We speculated that the unique and isoform defining N- and C- terminal domains of AUF1 might be regions involved in protein-protein interactions with proteins that are involved in the AU-rich mRNA degradation mechanism.

Here we used AUF1p37 as a “bait” in a “Yeast two-hybrid screen” to identify interacting protein partners. We identified AUF1 itself and four other proteins that interacted with AUF1: NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2L. We demonstrate here, that all four proteins interact specifically *in vivo* and *in vitro* with AUF1 but also that they bind to an AU-rich RNA oligonucleotide. This suggests that these proteins could assemble into larger AUF1 containing protein complexes on the AU-rich RNA target. Furthermore, we found that the AUF1 interacting protein NSEP-1 has endo-ribonuclease activity *in vitro*. In summary, our data suggest the possibility that the identified AUF1 interacting proteins might be involved in the mechanism of mRNA destabilization mediated by AUF1.

Results

Identification of Proteins that Interact with AUF1

It has been suggested that AUF1 is a protein that initiates mRNA degradation and that the four proteic isoforms of AUF1 might bind distinct mRNA targets or mediate different mRNA degradation pathways. AUF1 might therefore interact with other proteins that determine the route of mRNA degradation. In order to identify proteins that interact with AUF1, we employed the yeast two-hybrid system (Hollenberg et al., 1995; Vojtek and Hollenberg, 1995) and screened a human fetal brain cDNA library. A total of $\sim 2 \times 10^6$ transformants were plated and 380 clones grew out on plates with minimal medium without histidine. About half of these colonies showed a strong blue color in the β -Galactosidase filter assay. Library plasmids were sequenced by automated sequencing. The sequencing revealed: 3 clones contain in frame the cDNA encoding the mRNA binding protein NSAP-1 (Table 1), 3 clones the NSEP-1 insert, 3 clones the AUF1 cDNA, 2 clones containing the cDNA of the ubiquitin conjugating enzyme E2I (UBCE2I), 1 clone containing the cDNA of IMP-2. Table 1 summarizes the domain organization and functional characteristics of the proteins found to interact with AUF1. The other sequenced clones represented either molecules not cloned in frame with the Gal4AD into the cloning site of pACT2 or will be described and characterized elsewhere.

Differential Interaction of AUF1 Isoforms with AUF1p37, NSAP-1, NSEP-1 and IMP-2

We found several AUF1 interacting clones whose plasmids contained inserts encoding AUF1 itself. This is in good agreement with the described fact that AUF1 can form dimers or even higher order oligomers (Wilson et al., 1999). We were interested in exploring the yeast-2-hybrid system to analyze if the AUF1-p37 can interact with all of the four isoforms (Figure 1A and B). Our analysis revealed that AUF1p37 only interacts with the AUF1 isoforms p37 and p40 but not with p42 or p45 (Figure 1B). This result suggests that the presence of the inserted region “b” (Figure 1A) in the AUF1 isoforms p42 and p45 prevents the dimerization interaction. Maybe this region “b” which consists of 49 amino acids is located in a region of AUF1 that is important for the dimerization.

In a similar approach we tested if the proteins identified to interact with AUF1 could interact with all of the four AUF1 protein isoforms or if they interact in a isoform specific manner with AUF1. Co-transformation experiments of the yeast strain L40 with pBTM116-AUF1-p37, -p40, -p42 and -p45 and pACT2-NSEP-1, pACT2-NSAP-1 and pACT2-IMP-2 (Figure 1C) demonstrated that the three RNA binding proteins NSEP-1, NSAP-1 and IMP-2 all interact only with AUF1p37 and p40 but not with p42 or p45. In contrast protein UBCE2I interacted with all four isoforms.

***In vitro* Analysis of the Interaction between AUF1 and its Interacting Proteins**

Next we performed *in vitro* pull-down assays to verify the observed interactions between AUF1 and the proteins NSAP-1, NSEP-2, IMP-2 and UBCE2I. To this end the interacting proteins were expressed in *E. coli* either as GST fusion proteins (NSEP-1, IMP-2, UBCE2I, GST as control) or as 6xHis fusion proteins (AUF1p37, NSAP-1, RACK= Receptor of Activated Kinase C as control) (Croze et al., 2000). The purified proteins were immobilized on appropriated resins and then incubated with the purified 6xHis-AUF1p37 (or unfused AUF1p37 in case of NSAP-1) fusion protein. After washing, the bound 6xHis-AUF1p37 protein was detected by Western blot using an anti-AUF1 antiserum (Figure 2). All four proteins interacted *in vitro* with AUF1p37. The interactions were specific since the control proteins GST and 6xHis-RACK did not interact with AUF1p37 *in vitro*. The immuno detection of 6xHis-AUF1p37 by the anti-AUF1 antiserum was specific, since no protein bands were detected in the Western blot when the incubation step with the 6xHis-AUF1 protein was omitted (Figure 2, nil lanes).

Mapping of Protein Domains Involved in AUF1 Binding

The three RNA-binding proteins that were identified to interact with AUF1 *in vivo* and *in vitro* are multi domain proteins (Table 1). NSAP-1 has about ~80% amino acid sequence identity with the protein hnRNP R (Harris et al., 1999; Hassfeld et al., 1998) and contains four RRM (RNA Recognition Motifs). We wanted to map which of these four RRM are involved in the interaction with AUF1 and prepared a series of cDNA constructs encoding different domains of the NSAP-1 protein (Figure 3, Table 2). The deletions were generated using the vector pACT2 and the yeast-2 hybrid method was used to identify the RRM domains that are required for the binding to AUF1. Our results show that the construction which encompasses the RRM domains 3 and 4 as

well as that which contains domains 2 and 3 both interact with AUF1p37, whereas a construction containing domains 1 and 2 did not interact. The constructions that only contain the individual domains 2 or 3 however, failed to interact with AUF1. These results show that at least two domains of NSAP1 are required for the interaction with AUF1p37 and that domain 3 alone is not sufficient for the interaction, although it is present in the two interacting constructs NSAP 2-3 and NSAP 3-4. Interestingly, it had been reported previously that the two proteins AUF1 (=hnRNP D) and NSAP-1 are also functionally coupled *in vivo* (Grosset et al., 2000). These researchers demonstrated that AUF1 and NSAP-1 are part of a multiprotein complex which is associated with the major-coding-region determinant (mCRD) of instability of the *c-fos* mRNA.

NSEP-1 is another RNA binding protein and was described in *Xenopus* (Murray et al., 1992) and man (Kolluri and Kinniburgh, 1991). It contains at its N-terminal a C domain ("Cold-shock-domain") homologous to the major *E. coli* cold-stress-response protein. The C-terminal of NSEP-1 contains four arginine-rich "basic/aromatic islands" (B/A islands) that are similar to the RNA-binding domains found for example in the Tat protein of HIV (Murray et al., 1992). All of the NSEP-1 clones that we identified to interact with AUF1 in our yeast-2 hybrid screen, lack the N-terminally ~60 % of the C domain. This indicates that this region of the NSEP-1 protein is not required for the interaction with AUF1. We generated a series of cDNA constructs containing different fragments of the NSEP-1 protein (Figure 3). However, none of the three truncated fragments of NSEP-1, which contain two adjacent of the B/A islands interacted with AUF1p37. These results suggest that more than two of the B/A islands are required for the interaction with AUF1. Two constructs which encompass three B/A island (1-2-3 and 2-3-4) were both able to interact with AUF1p37.

IMP-2 is the third RNA binding protein we found to interact with AUF1. IMP-2 is a protein that has been described to bind to the 5'-UTR of the mRNA of Insulin-like growth factor II, IGF II (Nielsen et al., 1999). IMP-2 contains two RRM domains at its N-terminal and four KH domains (hn RNP K Homology domains) further C-terminal. The IMP-2 clone we found to interact with AUF1 lacks the two N-terminal RRM domains but contains the four KH domains. This suggests that the KH domains are involved in the interaction with AUF1. We generated a series of truncation constructs for IMP-2 (Figure 3) and observed that the two constructs containing the KH domains 2 and 3 or 3 and 4 were able to interact with AUF1. However, a construct that consists only of domain 3 (present in constructs 2-3 and 3-4) failed to interact with

AUF1p37. This suggests that at least two KH-domains are necessary to interact with the two RRM domains of AUF1. The construct with KH domains 1 and 2 does not interact with AUF1.

Interactions of AUF1 and its Interacting Proteins with an AU-rich RNA Oligonucleotide

Next we tested if the proteins we found to interact with AUF1 could bind to an AU-rich target RNA. We choose the well studied AU-rich region (ARE) of the 3'-UTR from the TNF α mRNA (38-mer) and performed "gel mobility shift assays" (Figure 4) with decreasing protein concentrations. We observed that like AUF1 (Figure 4A) the proteins NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2I all bound to the ARE-oligonucleotide (Figure 4B-E). According to Carey (Carey, 1991) the binding affinity of the proteins to the target RNA can be estimated from the protein concentration that is required to bind half of the nucleic acid in the gel shift assay, if the nucleic acid concentration is negligible in comparison to the protein concentration. Using this method we were able to compare the relative affinities of the five analyzed mRNA binding proteins. We determined that the relative affinity of the proteins to the AU-rich RNA oligonucleotide increases in the following order: GST-UBCE2I (~7400 nM protein was required to shift ~half of the oligonucleotide) < GST-NSAP1 (~500 nM) < 6xHis-AUF-1 (~312 nM) $\cong$ GST-NSEP-1 (~250 nM) << GST-IMP-2 (2,7 nM). Free GST protein did not cause any detectable shift of the RNA oligonucleotide (data not shown). The estimation of the relative affinity of the protein NSEP-1 is limited by the fact that we observed a rapid degradation of the RNA oligonucleotide due to the ribonuclease activity of NSEP-1 (see below). These results demonstrate that AUF1, NSAP-1 and NSEP-1 have affinities to the AU-rich oligonucleotide that lie in the same range of magnitude. In contrast the affinity of GST-UBCE2I is more than about an order of magnitude lower and the affinity of GST-IMP-2 is about two orders of magnitude higher than that of AUF1, NSAP1 and NSEP1. It must be pointed out, that the comparison of these relative affinities is limited by the fact that the proteins are composed by different types and numbers of RNA binding domains (Table 1, Figures 1 and 4).

We also performed the gel-shift assays of the AUF1 binding proteins in the presence of a constant amount of the protein AUF1. We observed that the simultaneous incubation of the interacting proteins with AUF1 caused an intensified signal of the shifted oligonucleotide band at the lower protein concentrations analyzed (Figure 4 B-E). This suggests that AUF1 bound

simultaneously to the 38-mer RNA oligonucleotide at the lower NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2I concentrations, thereby causing an increase in the amount of shifted oligonucleotide. We did however not detect qualitative differences (e.g. supershifts) when comparing the shifts caused by the interacting proteins alone or those that occur in the presence of AUF1.

When we tested if the protein NSEP-1 could interact with the AU-rich RNA oligonucleotide (Figure 4C), we observed that the labeled oligonucleotide disappeared and gave rise to a fraction of fast migrating degradation products that appeared at the bottom of the gel. This suggested that the purified recombinant AUF1 interacting protein NSEP-1 has an RNA degrading activity. We tested a series of other nucleic acids substrates and found that NSEP-1 reproducibly degrades 25-mer poly-A, poly-C and poly-U RNA-oligonucleotides (data not shown). Although NSEP-1 bound to a 25-mer poly-G ribonucleotide (data not shown), it showed no ribonuclease activity towards it and neither bound nor degraded a single-stranded AT-rich DNA oligonucleotide (30-mer: ATTATTTATTATTTATTTATTATTTATTTA, not shown).

NSEP-1 has an endo-ribonuclease activity *in vitro*

When we incubated the AUF-1 interacting protein NSEP-1 with the AU-rich 38-mer test RNA oligonucleotide in the gel shift assay we noted that the RNA was degraded and low molecular weight degradation products appeared in the lower fraction of the gel (Figure 4C). To examine this activity in more detail we incubated a 5'-end radioactively labeled AU-rich 38-mer RNA oligonucleotide for different times with the GST-NSEP-1 protein (Figure 5A). The resulting RNA degradation fragments were resolved in a denaturing 20% polyacrylamide gel. We observed the appearance of intermediate degradation fragments of ~9 to 4 bases length, whose length progressively shortened with longer incubation times. At the longest incubation times (120 min) we detected the accumulation of oligonucleotides of ~4-1 bases length. The control protein GST did not degrade the oligonucleotide (Figure 5A). The additional lower molecular weight bands that can be seen at the zero time-points and in all GST lanes probably represent co-labeled oligonucleotide synthesis products, since they were already present prior to incubation with either protein. These results suggested that NSEP-1 either operates in the 3' to 5'-direction or that it has an endo-ribonuclease activity. If NSEP-1 would operate in the direction 5' to 3', it would have readily generated only the free mononucleotide at the running front of the electrophoresis, but

would not generate any products of intermediate molecular weight like those that can be seen in Figure 5A.

To distinguish between the possibilities that NSEP degrades the RNA in the 3' to 5'-direction or that it is rather an endo-ribonuclease we generated a 25-mer RNA oligonucleotide that is labeled radioactively at its 3'-end (see Materials and Methods), and performed another degradation assay with NSEP1 (Figure 5B). The incubation of such a 3'-labeled 25-mer ribonucleotide with NSEP-1 resulted in the appearance of intermediate degradation products of ~11-9 bases length at incubation times from 5-20 min. At longer incubation times (20 min to 120 min) shorter degradation products of ~9-4 bases were generated. Such a result is incompatible with the interpretation that the ribonuclease activity of NSEP1 operates in the 3' to 5' direction, because this would have immediately generated degradation products of 1-2 bases length after the shortest incubation times.

In summary the degradation studies with the two different ly labeled ribonucleotides suggest that NSEP1 has an endo-ribonuclease activity, since the oligonucleotides that had been labeled at both ends, yielded degradation products of intermediate size (~11 to ~6 bases) at short incubation times (up to 20 min). At longer incubation times (120 min) however, we observed the accumulation of very small degradation products: down to 1 base in case of 5'-end labeled oligonucleotide and to ~4 bases in case of the 3'-end labeled oligonucleotide.

Discussion

In mammalian cells AU-rich elements in the 3'-untranslated regions of certain mRNAs are potent *cis*-acting determinants of rapid mRNA turnover. AUF1 was the first RNA-binding protein that had been identified to bind specifically to these AU-rich elements (Zhang et al., 1993). Since AUF1 itself does not possess ribonuclease activity, it had been suggested that it rather targets other proteins to the AU-rich element. We speculated that AUF1 might be engaged in protein-protein interactions and performed a yeast-two hybrid screen with AUF1p37. Aside AUF1 itself, we identified four other proteins that interact with AUF1: NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2L.

NSAP-1 is made up of four RRM domains. The interaction between different proteins containing RRM domains has been described previously (Kim et al., 2000). Like these researchers had shown, the interactions between proteins of the RRM family, does not occur randomly but in a very specific fashion. Depending on the pair of interacting hnRNP containing multiple RRMs, one, two or three of the RRMs are involved in the interaction (Kim et al., 2000). In the interaction of AUF1 with NSAP-1 we found that pairwise combinations of specific adjacent RRMs of NSAP-1 are both necessary and sufficient for the interaction with AUF1. Interaction can also occur when more than two RRMs are present but not with single RRMs of NSAP-1. This result indicates that the affinity of single domains might be too low for detection with the yeast-2 hybrid method or that the inter-domain linker region is involved in the interaction. Kim et al. had demonstrated that interactions among hnRNPs not only occur between RRM domains, but also among KH and between KH and RRM domains (Kim et al., 2000).

The interaction of the two proteins AUF1 (=hnRNP D) and NSAP-1 has been described previously by methods other than the yeast-two hybrid method (Grosset et al., 2000). Grosset and co-workers had demonstrated that AUF1 and NSAP-1 are part of a multiprotein complex which is associated with the major-coding-region determinant (mCRD) of instability of the *c-fos* mRNA. Aside of AUF1 and NSAP1 these researchers were able to identify three other proteins in this multiprotein complex: Unr, PABP, PAIP1. They proposed that this multiprotein assembly functions as a bridging factor between the mCDR and the poly(A)tail (via PABP) and they further speculated that the transit of the ribosome might disrupt this complex and thereby cause the rapid deadenylation and decay of the *c-fos* mRNA. These findings and interpretations are in agreement with our own data that suggest that the interaction of AUF1 and NSAP1 might be of importance to the mechanism of accelerated mRNA decay.

We observed that the incubation of an AU-rich RNA oligonucleotide with the AUF1 binding protein NSEP-1, resulted in its degradation *in vitro*. A more detailed analysis of this RNA degradation process, revealed that NSEP-1 possesses a endo-ribonuclease activity. NSEP-1 is a member of the Y-Box family of proteins, which are multi-functional proteins that have a highly conserved Cold-shock domain (CSD) but rather variable C-terminal domains (Matsumoto and Wolffe, 1998; Shnyreva et al., 2000). Due to their DNA and RNA binding activities, Y-Box proteins have been functionally implicated in the regulation of transcription (Coles et al., 1996; Diamond et al., 2001) and translation (Matsumoto et al., 1996; Matsumoto and Wolffe, 1998). Our finding that the Y-Box protein NSEP-1 not only binds nucleic acids but also interacts with the human mRNA destabilizing protein AUF1 and has an endo-ribonuclease activity, suggests a additional functional context for NSEP-1. The NSEP-1 ribonuclease activity has a base preference: a poly-G ribonucleotide probe was not degraded by NSEP-1, whereas an AU-rich 38-mer ribonucleotide was efficiently degraded.

IMP-2 is another RNA binding protein that we found to interact with AUF1 p37 and p40 *in vivo* in the yeast 2-hybrid system. The interaction of the KH domain-containing protein IMP-2 with AUF1 occurs only when KH domains 2 and 3 or 3 and 4 are present. These results are also in agreement with the findings of Kim et al. (Kim et al., 2000), who had shown that a single KH domain in contrast to a single RRM domain, is not able to interact with other KH nor with RRM domains. The mapping studies of protein domains involved in protein-protein interaction among hnRNPs, suggested that the multi domain structure of the hnRNPs might have evolved not only for its interaction with RNA but also, to mediate protein-protein interactions that might be important for mRNA processing, export and degradation.

Finally, we identified the ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBCE2I) as an AUF1 interacting protein partner. This is a very interesting finding, since it had been previously demonstrated that AUF1 is involved in the control of an mRNA decay, which be linked to the heat shock-ubiquitin-proteasome pathway (Laroia et al., 1999; Laroia et al., 2002). These researchers were able to demonstrate that the degradation of AU-rich mRNAs is associated with the ubiquitination of AUF1 and its degradation in the proteasome. Heat shock, inhibition of the proteasome pathway or inactivation of the ubiquitin activating enzyme E1 resulted in the accumulation of undegraded AUF1 and was accompanied by a block of the decay of AU-rich mRNAs. These results suggested that the decay of the AU-rich mRNAs is coupled with the

ubiquitin-dependent degradation of AUF1. Our results give further support to this line of argumentation, since we identified the ubiquitin-conjugating enzyme E2I as an AUF1 interaction partner. UBCE2I interacts with AU-rich RNA (Figure 4E), however with relatively low affinity. It is tempting to speculate that the RNA binding activity might be important to ensure that only AUF1 bound to its RNA substrate is ubiquitinated.

We demonstrated here that all four AUF1 interacting proteins were able to bind to an AU-rich 38-mer RNA oligonucleotide (Figure 4B-E). When we added AUF1 protein to the AUF1-binding proteins and the RNA oligonucleotide we observed an intensified signal of the shifted bands in comparison to the conditions where AUF1 was absent. This result suggested that AUF1 and its interacting proteins bound simultaneously to the large 38-mer oligonucleotide. We did however, not detect any qualitative differences such as supershifts under these experimental conditions. This might indicate that the gel-shift method is not sensitive enough for the detection of interactions between AUF1 and its interacting proteins in the presence of the oligonucleotide. Therefore we also employed the UV cross-linking technique (Gao et al, 2001), in order to analyze if qualitative changes in the shift patterns would occur, when AUF1, its interacting proteins and an AU-rich 11-mer ribo-oligonucleotide are incubated and crosslinked (data not shown). Now we could observe that three of the four AUF1 interacting proteins (NSAP1, IMP-2 and UBCE2I) when incubated together with AUF1 caused a supershift when compared to AUF1 incubated alone with the 11-mer ribo-oligonucleotide. The supershifts were most pronounced at the highest interacting protein concentrations tested. These results seem to suggest that the interacting proteins had been crosslinked and that their covalent coupling had caused a reduced electrophoretic mobility of the bound AU-rich 11-mer oligonucleotide. It is noteworthy, that the 11-mer oligonucleotide is too short to accomodate more than one of the proteins, since a RNA binding protein that contains two RRM domains like AUF1 makes contact to ~8 bases (Moraes et al., 2002). The fact that the supershift in the UV-crosslink assay occurred only in the presence of both AUF1 and its interacting protein partners suggests that these proteins can interact when bound to the 11-mer oligonucleotide. Future experiments will address the detailed mode of these interactions.

We found that the AUF1 interacting proteins, with the exception of UBCE2I, interact only with AUF1 p37 and p40. Both of these isoforms do not contain the 49 amino acid insertion “b” (Figure 1A), that is encoded by its own exon. This insertion might be located in a region of AUF1

which is involved in its interaction with IMP-2, NSEP-1 and NSAP-1, since its presence abrogates the interactions. One other group had performed a yeast-two hybrid screen with the protein AUF1p45 as a “bait” (Arao et al., 2000). These researchers studied the isoforms p42 and p45 that both contain the region “b” (Figure 1A) and found an interesting interacting protein partner: the nuclear matrix-associated factor SAF-B, which is involved in gene regulatory functions (Stief et al., 1989). The observation of this interaction, explained the long known fact that the AUF1 p37/p40 isoforms are more located in the cytoplasm, whereas p42/p45 are rather located in the nucleus (Arao et al., 2000). AUF1 p42/p45 are probably retained in the nucleus, because they are engaged in interaction with the nuclear protein SAF-B. The specific distribution of the AUF1 isoforms between cytoplasm and nucleus, suggests that they perform distinct functions in these two compartments. It is possible that the nuclear AUF1 isoforms p42 and 45 are involved in mRNA processing and/or export, and the cytoplasmic isoforms in the regulation of the mRNA degradation. The identification of AUF1 isoform-specific interacting proteins reported here, might prove to be an insightful finding in the steadily ongoing analysis of AUF1’s manifold functions in gene regulatory events.

Materials and Methods

Plasmid Constructions and Antibodies

Plasmids pcDNA3.1 (Invitrogen™) containing insert DNAs encoding AUF1 p37, p40, p42 and p45, were kindly provided by Dr. R. Schneider, New York (New York University), and served as the template DNA in the PCR reactions. AUF1 protein p37 cDNA was amplified by PCR (Pet-s: 5'AGG AAT TCC ATA TGC ACC ATC ATC ACC ATC ACA AGC; Pet-as: 5'ATG GAT CCT TAT TAG TAT GGT TTG TAG CTA TTT TG), and subcloned into bacterial expression vector pET3c (Stratagene™). For the yeast two hybrid analysis, AUF1-p37 cDNA was PCR amplified (pBTM-s: C GGG ATC CGT ATG TCG GAG GAG CAG TTC GGC; pBTM-as: TA TGC GCT GAC TTA GTA TGG TTT GTA GCT ATT TTG) and inserted into the yeast “bait” expression vector pBTM116 (Bartel and Fields, 1995; Vojtek and Hollenberg, 1995; Durfee et al., 1993). Equal strategies were employed to insert also the cDNAs encoding the other three isoforms of AUF1 (p40, p42 and p45) into the yeast expression vector pBTM116 and the cDNA of AUF1p37 into the yeast expression vector pACT2 (Clontech, “prey” vector), which encodes the Gal4 Activation domain (Gal4 AD). To express the AUF1 interacting proteins NSEP-1, IMP-2, and UBE2I as fusion proteins with Glutathione S-transferase (GST), their DNAs were subcloned from the pACT2 library plasmids into the bacterial expression vector pGEX-2TK (Amersham Pharmacia). In a similar way NSAP-1 was sub-cloned into the plasmid pET-28 and expressed as a 6xHis fusion protein. The following oligonucleotides were used to amplify the cDNAs encoding the proteins NSEP-1 (sense: 5'GC GGA TCC AAG AAG AAT AAC CCC AGG AAG TAC C 3'; anti-sense: 5'TCC CCC GGG TTA CTC AGC CCC GCC CTG CTC AGC 3'), NSAP-1 (sense: 5' CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC C 3'); anti-sense: 5' TCT CCC GGG TTA CCC TCG ACC TCT TGT TGG AGG GGG 3'), IMP-2 (sense: 5' GC GGA TCC ACC ATA AAG AAC ATC ACT AAG CAG 3'; anti-sense: 5'CG GAA TTC TCA CTT GCT GCG CTG TGA GGC GAC 3'), and UBE2I (sense: 5' GC GGA TCC CTC GCC CAG GAG AGG AAA GCA TGG 3'; anti-sense: 5' CG GAA TTC TTA GGG CGC AAA CTT CTT GGC 3'). For the generation of the deletion mutants for the proteins NSAP-1, NSEP-1 and IMP-2 as utilized in the yeast-2 hybrid system the oligonucleotides shown in Table 2 were utilized. A specific rabbit anti-AUF1 immunoserum was obtained by eight successive immunizations of a rabbit with 1 mg of recombinant 6xHis-AUF1p37 protein in intervals of two weeks.

Yeast Two-Hybrid Screen and Interaction Analysis

AUF1-p37-pBTM116 (lexA DNA binding domain fusion) was co-transformed in the yeast reporter strain L40 (Bartel and Fields, 1995) together with a human fetal brain cDNA library (Clontech) cloned C-terminal to the Activation Domain of Gal4 in plasmid pACT2 (Durfee et al., 1993). A total of $\sim 2 \times 10^6$ transformants were plated on synthetic minimal medium (MM) lacking tryptophan, leucine and histidine but supplemented with adenine. After 5 days the 380 grown clones were restreaked on MM plates and tested by a β -galactosidase filter-assay. Yeast DNA was isolated from LacZ⁺ clones, and the library plasmids were rescued into *E. coli* strain HB101 (Promega). After re-transformation into L40 together with LexA-AUFp37, 35 clones were confirmed to be His⁺, LacZ⁺. The DNA inserts of the library plasmids were sequenced by automated sequencing (ABI PRISMTM 377).

Bacterial Expression and Purification

E. coli strain BL-21 was transformed with recombinant expression vectors: AUF1p37 in pET-3c, the AUF1 interacting proteins NSEP-1, UBE2I, or IMP-2 in frame with a N-terminal GST (in pGEX-2TK) and NSAP-1 with a N-terminal 6xHis fusion tag (in pET-28a). Recombinant bacteria were induced with isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) for 3 hours at 37 °C. Cells were lysed by the addition of lysozyme (1 mg/ml), incubation for 30 min at RT and four subsequent freeze-thaw cycles. DNA was digested by addition of DNase (1 μ g/ml). The bacterial lysate was centrifugations at 14.000 x g for 20 min and the supernatant containing soluble 6xHis or GST fusion proteins were applied to the appropriate columns. The 6xHis fusions were applied to a Ni-NTA column (Qiagen). Column washing and elution were performed according to the manufacturers instructions. The cell lysates containing the GST fusion proteins were applied to a Glutathione Sepharose[®] 4B column (Amersham Biosciences). Column was washed and eluted according to manufacturers instructions. 5 μ l aliquots of fractions were analyzed by SDS-PAGE.

***In-vitro* Binding Assay and Western Blot Analysis**

Equal amounts of free GST or GST fusion proteins were allowed to bind to glutathione Sepharose 4B resin (Amersham Pharmacia) in 1 ml of PBS for 2 hours at 4 °C. After incubation, the resin-bound samples were washed three times with PBS. 0.2 μ g recombinant 6xHis-AUF1p37

fusion protein were added to the resins and incubated in 1 ml PBS, 0.2% Triton X-100, pH 8.0 for two hours at 4 °C to allow for protein-protein interaction. This incubation was performed in the presence of 10 µg of RNase A, to remove possible contaminating RNA and therefore rule out that the interactions could occur indirectly through the presence of minor amounts of contaminating RNA. The resin was then washed three times with 0.6 ml PBS and the resin-bound proteins were resolved in a SDS-10% polyacrylamide gel. After electrophoresis the proteins were transferred to a PVDF membrane by semi-dry electroblotting for two hours. After saturation with unspecific protein (*Blotto*: PBS with 10% non fat dry milk) the membrane was incubated with an rabbit anti-AUF1 antiserum (1:20, in *Blotto*) for 1 h. After 3 washes with PBS / 0.05% Tween-20 it was incubated with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1 : 5.000; Santa Cruz Biotech.) for 1 h and washed again 3 times. Finally, the membrane was developed by chemiluminescence (Luminol reagent, Santa Cruz Biotech.). In case of NSAP-1 the 6xHis-NSAP-1 fusion protein was coupled to a Ni-NTA-sepharose resin (Qiagen) and 6xHis-RACK coupled to the same resin served as control protein. To prevent unspecific interaction of 6xHis-AUF1 fusion-protein with the Ni-NTA-sepharose the recombinant protein was digested with thrombin to remove the 6xHis-tag fusion part of the protein. Re-purified AUF1 was then incubated with the beads as above.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) and RNA degradation assays

EMSA was essentially performed as described (Moraes et al., 2002; Rui et al., 2001). Briefly, an AU-rich RNA oligonucleotide (38-mer: GUGAUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAG), representing a region of the 3'-portion of the human TNF- α mRNA, was 5'-labeled with [γ -³²P]-dATP using T4 polynucleotide kinase. The radiolabeled probe was column purified and aliquots of 30 fmol (~10.000 cpm) were used in each binding reaction. The oligonucleotide probe and the proteins were incubated in a final reaction volume of 25 µl, containing 100 mM potassium acetate, 10 mM Tris (pH 7.5), 5 mM magnesium acetate, 20% Glycerol, 0,1 ng/µl BSA, 80 ng/ml ssDNA, at 4 °C for 20 min (Moraes et al., 2002). The RNA-protein complexes were run out on a non-denaturing 6% polyacrylamide gel in 0.5 x TBE buffer with constant water-cooling. Dried gels were exposed for 12 h to X-ray films at -80 °C with an intensifying screen.

The NSEP-1 degradation assay (Figure 5) was essentially performed as follows: proteins and AU-rich RNA (38-mer, 5'-labeled with ^{32}P as above, 600 fmol) were incubated at RT for the times indicated in Figure 5A. The degradation products were run out on a denaturing 20% polyacrylamide gel in the presence of 7M urea. A 3'-labeled AU-rich RNA oligonucleotide was generated in the following fashion: two DNA oligonucleotides encoding a T7 RNA polymerase binding site (T7AU-S: CCCGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTATTATTTATTATTATTTACCC, T7AU-AS: GGTAAATAATAAATAAATAAATAACCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGGG) were annealed and used for an *in vitro* transcription with T7 polymerase (SP6/T7 Transcription Kit, ROCHE) in the presence of [γ - ^{32}P]-CTP (procedure as recommended by the manufacturer). This generated a RNA oligonucleotide of 25 nucleotides length, that is labeled only at its 3'-end with two terminal ^{32}P -CTPs (GGUUAUUAUUUAUUUAUUUAUUUA[^{32}P]C[^{32}P]C). This RNA oligonucleotide was subsequently incubated with NSEP-1 and GST in the degradation assay (Figure 5B) and the resulting degradation products were run out on a denaturing (7M urea) 20% polyacrylamide gel and analyzed by autoradiography. For the determination of the approximate size of the degradation fragments a radioactively labeled 'base marker' was generated by the labeling procedure described above. Six oligonucleotides of 38, 25, 18, 11, 9 and 6 bases length were utilized and free ATP was added to mark the one base running front.

Acknowledgements

This work is supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP; through the projects SmolbNet, CEPID and 98/05891-9 as well as by fellowships to K.C.M.M. and A.J.C.Q.) and the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). K. M. received a short-term DAAD fellowship (D/00/28158). We acknowledge support from members of the CEBIME DNA-sequencing team: Dr. Carlos H. I. Ramos and Luciana R. Camillo. Thanks to Maria Eugenia R. Carmargo for technical assistance, to Dr. Rogério Meneghini for review of the manuscript, to Dr. R. J. Schneider (NYU, New York) for providing AUF1 plasmids, to Dr. Nilson Zanchin for vectors and to the student Ricardo Garcez (LNLS summer school 2001) for his valuable contribution to the initial experiments with UBCE2I.

References

- Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., and Kato, S. (2000). A Nuclear Matrix-Associated Factor, SAF-B, Interacts with Specific Isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 228-236.
- Bartel, P.L. and Fields, S. (1995). Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* 254, 241-263.
- Bernstein, P., Peltz, S.W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell Biol.* 9, 659-670.
- Bernstein, P.L., Herrick, D.J., Prokipcak, R.D., and Ross, J. (1992). Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev.* 6, 642-654.
- Bohjanen, P.R., Petryniak, B., June, C.H., Thompson, C.B., and Lindsten, T. (1992). AU RNA-binding factors differ in their binding specificities and affinities. *J. Biol. Chem.* 267, 6302-6309.
- Brewer, G. (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol. Cell Biol.* 11, 2460-2466.
- Brewer, G. (1999). Evidence for a 3'-5' decay pathway for c-myc mRNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 274, 16174-16179.
- Brewer, G. (2000). Regulation of c-myc mRNA Decay in vitro by a TPA-Inducible, Ribosome-Associated Component in Differentiating Megakaryoblasts. *J. Biol. Chem.* 275, 33336-45.
- Bristow, M.R., Minobe, W.A., Raynolds, M.V., Port, J.D., Rasmussen, R., Ray, P.E., and Feldman, A.M. (1993). Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J. Clin. Invest* 92, 2737-2745.
- Buzby, J.S., Lee, S.M., Van Winkle, P., DeMaria, C.T., Brewer, G., and Cairo, M.S. (1996). Increased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA instability in cord versus adult mononuclear cells is translation- dependent and associated with increased levels of A + U-rich element binding factor. *Blood* 88, 2889-2897.
- Carey, J. (1991). Gel retardation. *Methods Enzymol.* 208, 103-117.
- Coles, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M.A., and Shannon, M.F. (1996). Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter. *Nucleic Acids Res.* 24, 2311-2317.
- Croze, E., Usacheva, A., Asarnow, D., Minshall, R.D., Perez, H.D., and Colamonici, O. (2000). Receptor for activated C-kinase (RACK-1), a WD motif-containing protein, specifically associates with the human type I IFN receptor. *J. Immunol.* 165, 5127-5132.

- DeMaria, C.T. and Brewer, G. (1996). AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J. Biol. Chem.* 271, 12179-12184.
- DeMaria, C.T. and Brewer, G. (1997). Cell-free systems for analysis of cytoplasmic mRNA turnover. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 18, 65-91.
- Diamond, P., Shannon, M.F., Vadas, M.A., and Coles, L.S. (2001). Cold shock domain factors activate the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in stimulated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 276, 7943-7951.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H., and Elledge, S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7, 555-569.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* 17, 3448-3460.
- Gao, M., Wilusz, C. J., Peltz, S. W., Wilusz, J. (2001). A novel mRNA-decapping activity in HLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* 20, 1134-1143.
- Grosset, C., Chen, C.Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., and Shyu, A.B. (2000). 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.
- Hamilton, B.J., Nagy, E., Malter, J.S., Arrick, B.A., and Rigby, W.F. (1993). Association of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and C proteins with reiterated AUUUA sequences. *J. Biol. Chem.* 268, 8881-8887.
- Harris, C.E., Boden, R.A., and Astell, C.R. (1999). A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.* 73, 72-80.
- Hassfeld, W., Chan, E.K.L., Mathison, D.A., Portman, D., Dreyfuss, G., Steiner, G., and Tan, E.M. (1998). Molecular definition of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R) using autoimmune antibody: immunological relationship with hnRNP P. *Nucleic Acids Res.* 26, 439-445.
- Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F., and Weintraub, H. (1995). Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell Biol.* 15, 3813-3822.
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hofmann, E., Wallach, D., Malinin, N.L., Cooper, J.A., Resch, K., and Kracht, M. (1999). Induction of Interleukin-8 synthesis integrates on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6742-6753.

- Katz, D.A., Theodorakis, N.G., Cleveland, D.W., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1994). AU-A, an RNA-binding activity distinct from hnRNP A1, is selective for AUUUA repeats and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Nucleic Acids Res.* 22, 238-246.
- Kiledjian, M., DeMaria, C., Brewer, G., and Novick, K. (1997). Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the α -globin mRNA stability complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4870-4876.
- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M., and Jang, S.K. (2000). Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 298, 395-405.
- Kolluri, R. and Kinniburgh, A.J. (1991). Full length cDNA sequence encoding a nuclease-sensitive element DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* 19, 4771.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 284, 499-502.
- Laroia, G., Sarkar, B., and Schneider, R.J. (2002). Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1842-1846.
- Lee, W.M., Lin, C., and Curran, T. (1988). Activation of the transforming potential of the human *fos* proto-oncogene requires message stabilization and results in increased amounts of partially modified fos protein. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5521-5527.
- Levine, T. D., Gao, F., King, H. K., Andrews, L. G., and Keene, J. D. (1993). Hel-N1: an Autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3494-3504.
- Matsumoto, K., Meric, F., and Wolffe, A.P. (1996). Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *J. Biol. Chem.* 271, 22706-22712.
- Matsumoto, K. and Wolffe, A.P. (1998). Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* 8, 318-323.
- Moraes, K.C.M., Lee, W.H., and Kobarg, J. (2002). Analysis of the structural determinants for the RNA binding of the human protein AUF1/hnRNP D. *Biol. Chem.* 383, 831-837.
- Murray, M.T., Schiller, D.L., and Franke, W.W. (1992). Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 11-15.
- Nakagawa, J., Waldner, H., Meyer-Monard, S., Hofsteenge, J., Jeno, P., and Moroni, C. (1995). AUH, a gene encoding an AU-specific RNA binding protein with intrinsic enoyl-CoA hydratase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 2051-2055.

- Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A.H., Wewer, U.M., and Nielsen, F.C. (1999). A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol. Cell Biol.* 19, 1262-1270.
- Pende, A., Tremmel, K.D., DeMaria, C.T., Blaxall, B.C., Minobe, W.A., Sherman, J.A., Bisognano, J.D., Bristow, M.R., Brewer, G., and Port, J. (1996). Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the beta- adrenergic receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 8493-8501.
- Robinow, S., Campos, A.R., Yao, K.M., and White, K. (1988). The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science* 242, 1570-1572.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* 59, 423-450.
- Rui, E., Moura, P.R. and Kobarg, J. (2001). Expression of deletion mutants of the hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of their RNA binding activities, *Virus Res.* 74, 59-73.
- Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y., and Bomsztyk, K. (2000). Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 15498-15503.
- Stief, A., Winter, D.M., Stratling, W.H., and Sippel, A.E. (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position- independent gene activity. *Nature* 341, 343-345.
- Vojtek, A.B. and Hollenberg, S.M. (1995). Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* 255, 331-342.
- Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G.M., and Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48, 195-202.
- Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Seufert, W., Taguchi, T., Testa, J.R., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Welsh, D., Shenk, T., and Deuel, T.F. (1996). Molecular cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human ubiquitin-conjugating enzyme 9. *J. Biol. Chem.* 271, 24811-24816.
- Wilson, G.M., Sun, Y., Lu, H., and Brewer, G. (1999). Assembly of AUF1 oligomers on U-rich RNA targets by sequential dimer association. *J. Biol. Chem.* 274, 33374-33381.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wihelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K., and Holtmann, H. (1999). The MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 18, 4969-4980.
- Xu, N., Chyi-Ying, A.C., and Shyu, A.B. (2001). Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol. Cell Biol.* 21, 6960-6971.

Zhang, J.Y., Chan, E.K., Peng, X.X., and Tan, E.M. (1999). A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Med.* *189*, 1101-1110.

Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L., and Brewer, G. (1993). Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 7652-7665.

Table 1: Characteristics of the AUF1-p37 interacting proteins as identified by the Yeast 2-hybrid system

Protein interacting with AUF1	Insert length (bp)	Protein residues	Domain composition (native protein)	Function	References
AUF1 (hnRNP-D0)	1300	1 - 300	2 RRM domains	selective mRNA degradation	(Zhang et al., 1993)
NSAP-1	1600	1 - 370	4 RRM domains	regulation of mRNA splicing and transport	(Harris et al., 1999b)
NSEP-1	1500	80 - 323	C domain ^a , 4 "basic/ aromatic" – islands	mRNA binding (transcription and translation regulation)	(Murray et al., 1992) (Kolluri and Kinniburgh, 1991)
IMP-2	3500	194 – 557	2 RRM ^b , 4 KH domains	mRNA binding, translation repression	(Zhang et al., 1999; Nielsen et al., 1999)
Ubiquitin-conjugating enzyme UBCE2I	1200	9 – 159	-	protein degradation	(Wang et al., 1996)

^a The NSEP-1 clone found to interact with AUF1 is missing approximately the N-terminal half of the C-domain (residues 1 – 79).

^b The IMP-2 clone found to interact with AUF1 does not contain the two N-terminal two RRMs (residues 1-193).

Table 2: PCR primer sets used to generate NSAP-1, NSEP-1 and IMP-2 truncations.

Protein, domain range (amino acid range)	PCR primer sets
NSAP-1, 2-3-4 (121-398)	T AGA ATT CAG GCA AAA ATT AAG GCA CTC TT TGT CTC GAG CCT TTT CTG ATC TGG TGG CTT GGC
NSAP-1, 1-2 (1-233)	TGA ATT CAG AAG AAT AAC CCC AGG AAG TAC GTT CTC GAG ATG TTT TCC AGA ACG AAT TTC ATG
NSAP-1, 2-3 (121-324)	T AGA ATT CAG GCA AAA ATT AAG GCA CTC TT GTT CTC GAG ATC AGC CCA TTC AAC AGT TCC
NSAP-1, 3-4 (216-398)	T AGA ATT CCA GCT CAG GAG GCT GTT AAA C TGT CTC GAG CCT TTT CTG ATC TGG TGG CTT GGC
NSAP-1, 2 (121-233)	T AGA ATT CAG GCA AAA ATT AAG GCA CTC TT GTT CTC GAG ATG TTT TCC AGA ACG AAT TTC ATG
NSAP-1, 3 (216-324)	T AGA ATT CCA GCT CAG GAG GCT GTT AAA C GTT CTC GAG ATC AGC CCA TTC AAC AGT TCC
NSEP-1, 1-2 (92-237)	TGA ATT CAG AAG AAT AAC CCC AGG AAG TAC TGT CTC GAG CCC GAT ACA TAT CTGCCT C
NSEP-1, 3-4 (208-322)	T AGG ATC CCC AAC CCT CCT GTG CAG GG GGT CTC GAG CTC AGC CCC GCC CTG C
NSEP-1, 2-3 (153-274)	A TGA AAT CGT CCT CCA CGC AAT TAC CAG GGT CTC GAG TGG CTG CTG ACC TTG GGT C
NSEP-1, 2-4 (153-322)	A TGA AAT CGT CCT CCA CGC AAT TAC CAG GGT CTC GAG CTC AGC CCC GCC CTG C
NSEP-1, 1-3 (92-274)	TGA ATT CAG AAG AAT AAC CCC AGG AAG TAC GGT CTC GAG TGG CTG CTG ACC TTG GGT C
IMP-2, 1-2 (216-386)	T AGA ATT CCC ATA AAG AAC ATC ACT AAG CA GCT CTC GAG AAT CTC CTG CTG CTC TGG ATA AG
IMP-2, 3-4 (331-556)	T AGA ATT CAG GTT GAG GCC TGT GCC AG CCT CTC GAG CTT GCT GCG CTG TGA GGC
IMP-2, 2-3 (248-467)	T AGA ATT CCC CCA GAG GGG ACT TCT G GCT CTC GAG CAG CTT CAC TTC TTC TTT GG
IMP-2, 2 (248-386)	T AGA ATT CCC CCA GAG GGG ACT TCT G GCT CTC GAG AAT CTC CTG CTG CTC TGG ATA AG
IMP-2, 3 (331-467)	T AGA ATT CAG GTT GAG GCC TGT GCC AG GCT CTC GAG CAG CTT CAC TTC TTC TTT GG

Figure Legends

Fig. 1. Differential interactions of the 4 AUF1 isoforms with the proteins AUF1p37, NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2I.

A. Schematic representation of human AUF1 isoforms fused either in frame to the activating domain of Gal4 in plasmid pACT2 ("prey"; p37) or fused to the lexA DNA-binding domain in plasmid pBTM116 ("bait"; p37, p40, p42, p45). B. Interaction among AUF1 isoforms. Bait and prey AUF1-plasmids were co-transformed into yeast strain L40 and protein-protein interactions were evaluated by the ability of the cells to grow on minimal medium (MM) lacking H. C. Test of interaction of the four AUF1 isoforms with the identified AUF1p37 interacting proteins. The identified AUF1 interacting proteins NSEP-1, NSAP-1, IMP-2 and UBCE2I are fused in frame to the Gal4 DNA-binding domain in plasmid pACT2 ("prey"-vector). AUF1 isoform bait plasmids and prey plasmids were co-transformed into yeast strain L40 and protein-protein interaction were evaluated by the ability of the co-transformed cells to grow on MM agar plates that are selective for the interaction (-W, -L, -H). The presence of both plasmids in the L40 cells was verified by growth on plates that contain H but lack W and L (not shown).

Fig. 2. *In vitro* pull-down assay.

Proteins were as GST or 6xHis fusions in *E. coli* and purified. GST fusion proteins were bound to glutathione sepharose (NSEP-1, IMP-2, UBCE2I) and 6xHis-NSAP1 and 6xHis-RACK (control) to Ni-NTA-Sepharose. After washing, samples were or were not incubated with 6xHis-AUF1, or unfused AUF1 in the case of the 6xHis-NSAP-1. Free GST and 6xHis-RACK respectively, served as controls. After washing, resin-bound proteins were resolved on a SDS / 10% polyacryamide gel and subsequently transferred to a PVDF-membrane. Western blot was performed with anti-AUF1 serum. The corresponding SDS gels in the upper panels demonstrate comparable protein loading of the lanes.

Fig. 3. Mapping of domains of the RNA binding proteins involved in AUF1 binding.

AUF1p37 cDNA fused in frame to the lexA DNA-binding domain in plasmid pBTM116 ("bait", see Figure 1A) and the indicated deletion mutants of the AUF1 interacting proteins NSAP-1, NSEP-1 and IMP-2 were fused in frame to the Gal4 DNA-activating domain in plasmid pACT2

("prey"). Bait and prey plasmids were co-transformed into yeast strain L40 and protein-protein interaction were evaluated by the ability of the co-transformed cells to grow on plates containing minimal medium selective for interaction (MM -W, -L, -H). The presence of both plasmids in the cells was verified by growth on plates that contain H but lack W and L (not shown). The construct that have been evaluated with "no growth" (Interaction with AUF1: "-") showed no signs of growth.

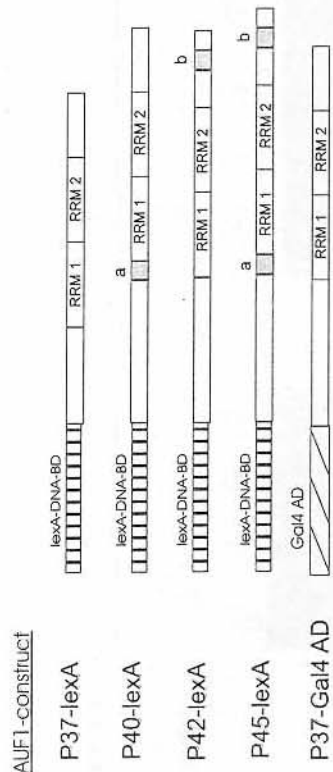
Fig. 4. Binding of the proteins AUF1, NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 and UBCE2I to an AU-rich RNA oligonucleotide (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA).

An 38-mer AU-rich oligonucleotide was radioactively labeled with ^{32}P . EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) of the different proteins and an AU-rich 38-mer RNA oligonucleotide. Free oligonucleotide (nil, nil) served as a control. A. Binding of 6xHis-AUF1 to the AU-rich RNA oligonucleotide. B. Binding of 6xHis-NSAP-1 to the AU-rich RNA oligonucleotide. C. Binding of GST-NSEP-1 to the AU-rich RNA oligonucleotide. D. Binding of GST-IMP-2 to the AU-rich RNA oligonucleotide. E. Binding of GST-UBCE2I to the AU-rich RNA oligonucleotide. B-E: Binding of the interacting proteins both in the absence (nil) and presence of 52 nM 6xHis-AUF1p37.

Fig. 5. *In vitro* RNA oligonucleotide degrading assay.

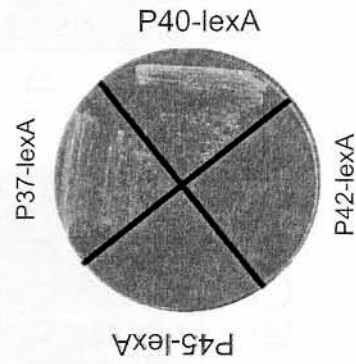
A. GST-NSEP-1 (0,25 μM) was incubated with the 5'-end ^{32}P -labeled AU-rich RNA oligonucleotide (AU-rich 21-mer: 5'-[^{32}P]UUAUUAUUUAUUUAUUAUUUA-3', 600 fmol) for the indicated times at 37 °C. GST (0,25 μM) served as a control and was incubated with the RNA oligonucleotide as indicated. After the incubation reactions the RNA degradation products were resolved on a denaturing (7M urea) 20% polyacrylamide gel and the gel was exposed to an X-ray film. B. Degradation of an 3'-end labeled AU-rich (5'-GGUUAUUAUUUAUUUAUUAUUUA[^{32}P]C[^{32}P]C-3', 600 fmol). See details in Material and Methods.

A



B

AUF1p37-Gal4AD



C

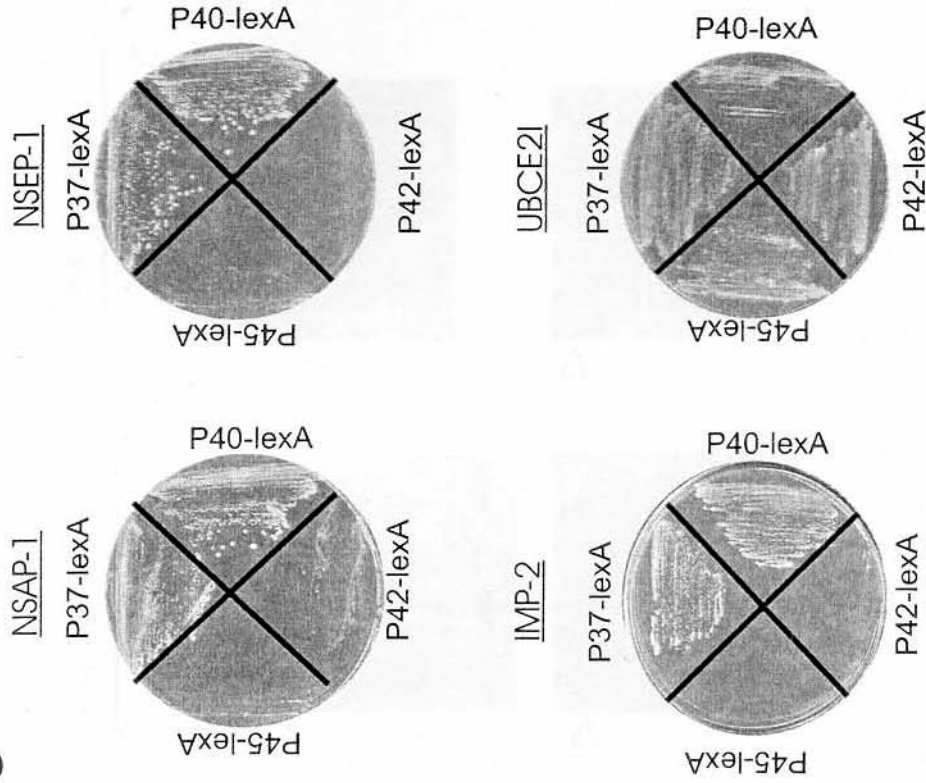


Fig 1

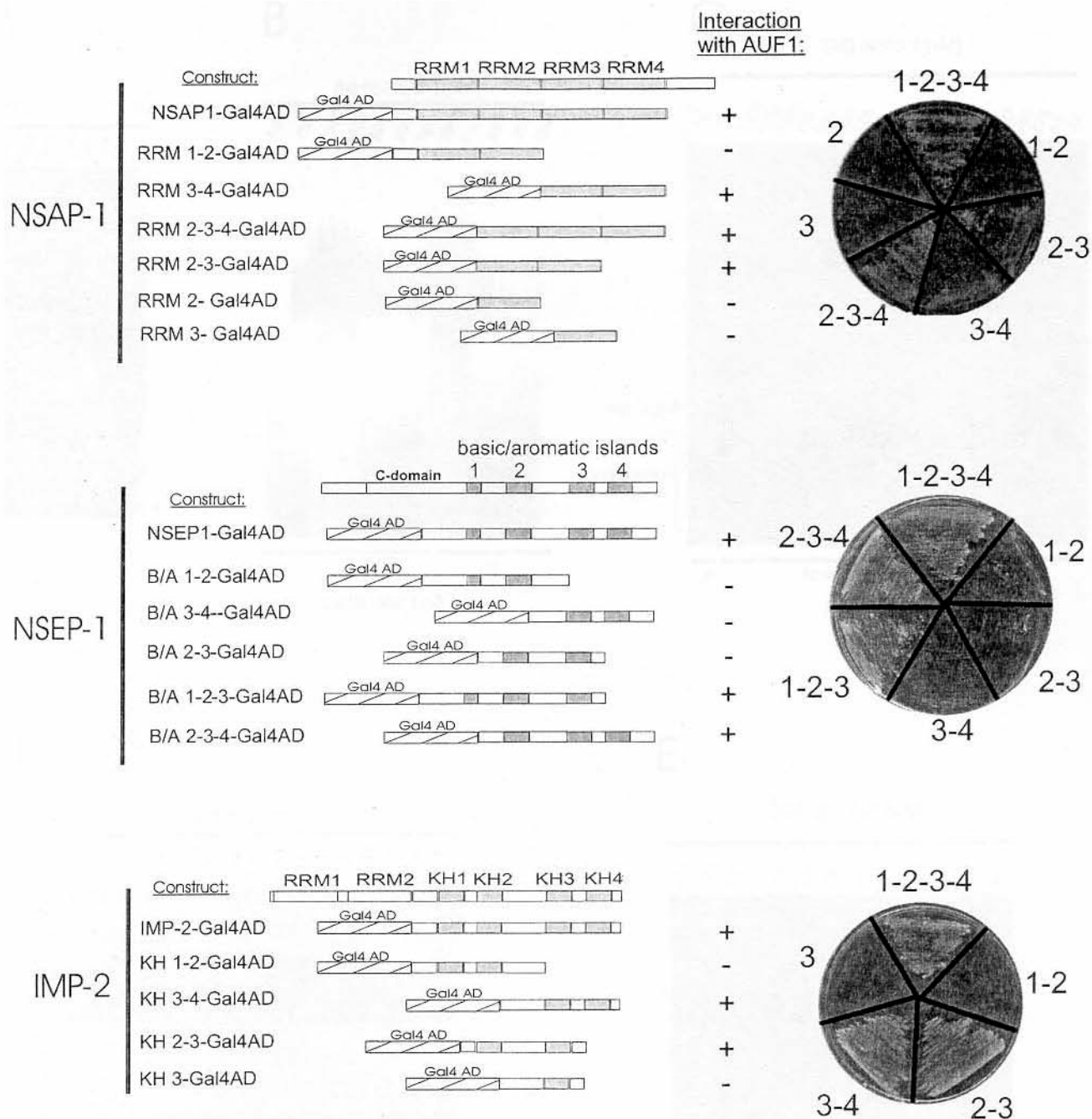


Fig 3

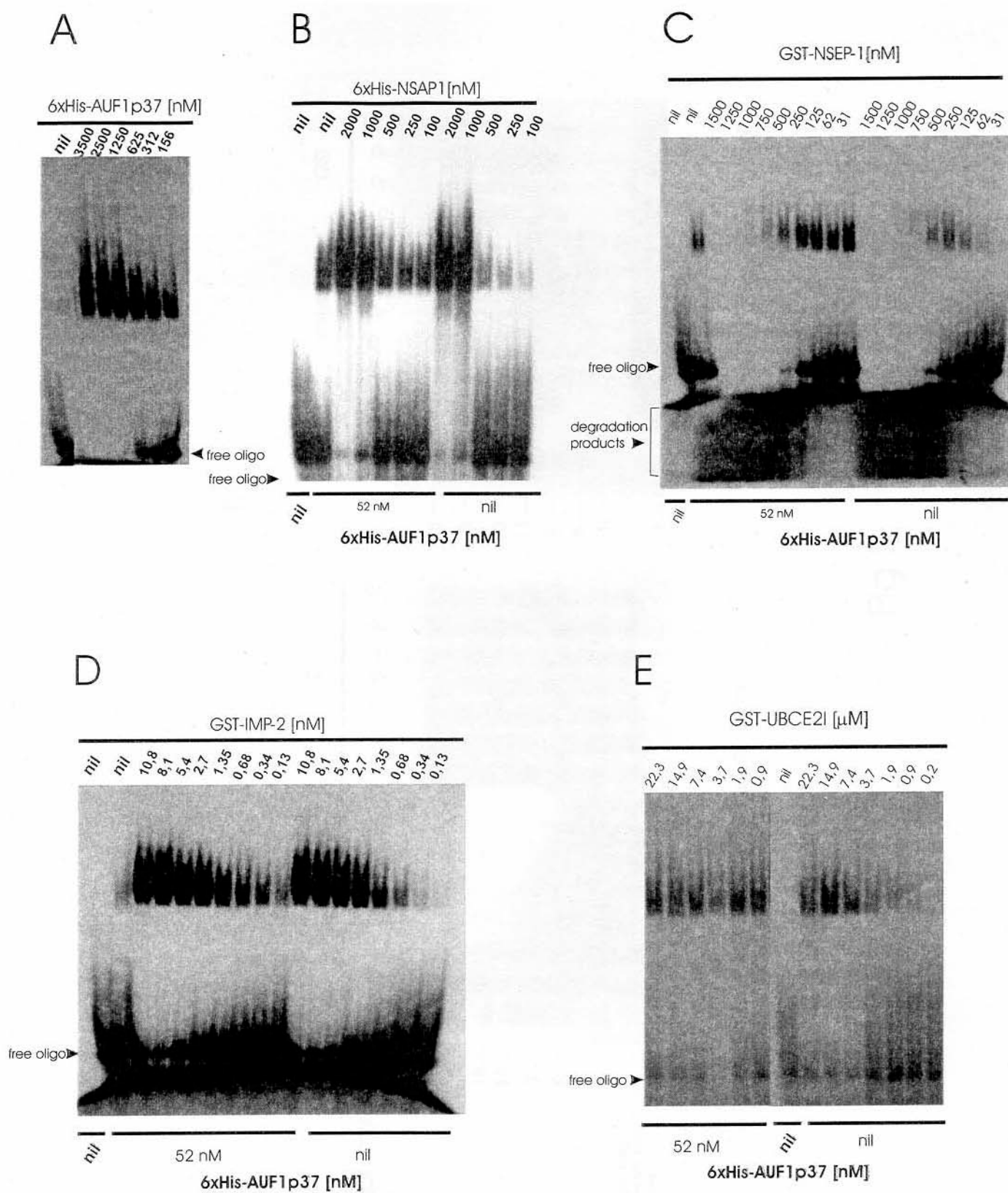


Fig 4

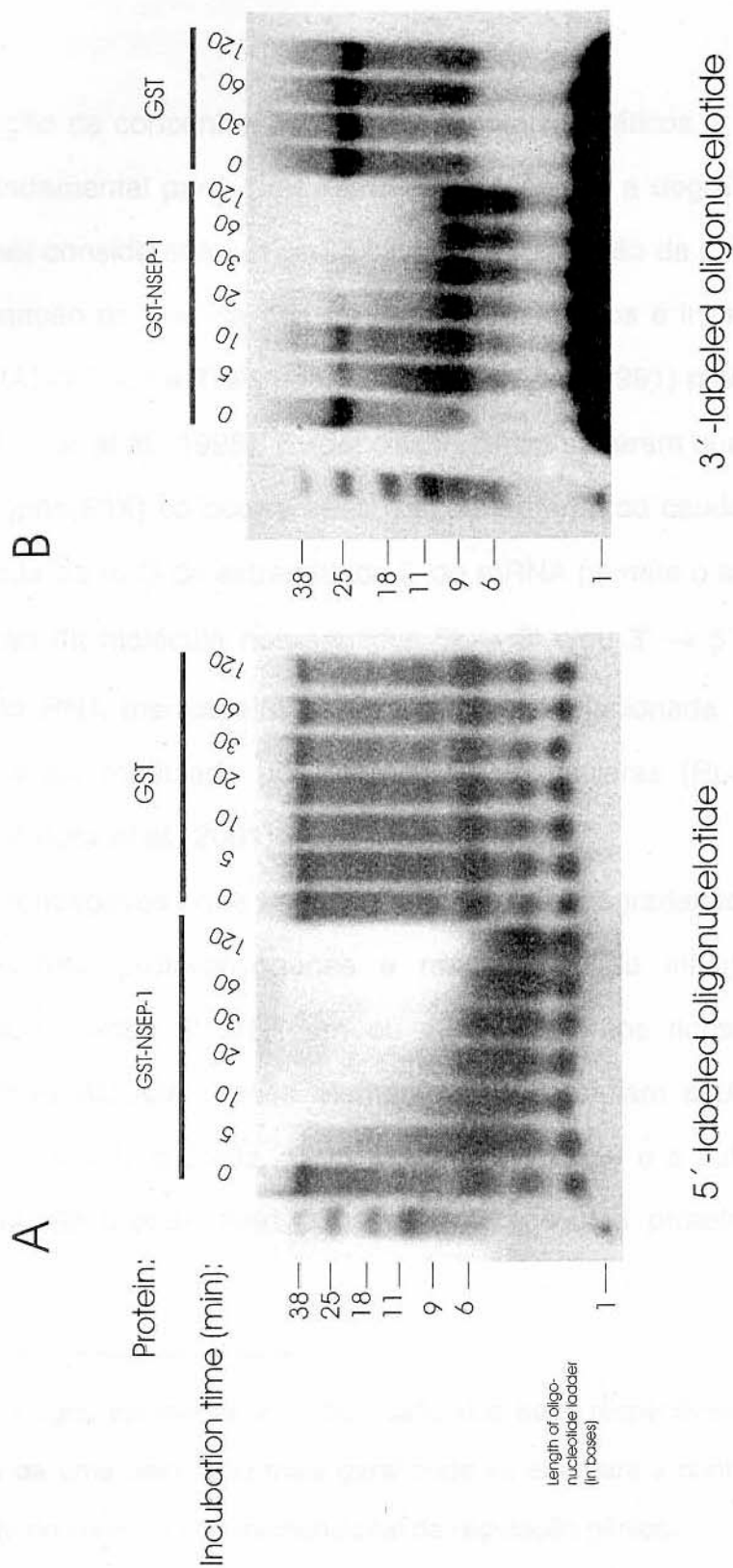


Fig 5

A regulação da concentração de mRNAs citoplasmáticos é um processo altamente regulado e fundamental para o equilíbrio celular. Assim, a degradação de moléculas de mRNA pode ser considerada um ponto central na regulação da expressão gênica.

A degradação da maioria dos mRNAs de mamíferos é iniciada pelo encurtamento da cauda poli(A) (Wilson e Treisman, 1988; Shyu *et al.*, 1991) mediada por exonucleases específicas (Korner *et al.*, 1998). Evidências indiretas sugerem que a retirada da estrutura 5'-cap ($m^7G(5)ppp(5')X$) só ocorre após o encurtamento da cauda poli(A) (Couttet *et al.*, 1997). A retirada da m^7G da extremidade 5' do mRNA permite o acesso de exonucleases e a degradação da molécula nos sentidos $5' \rightarrow 3'$ e/ou $3' \rightarrow 5'$. Entretanto, a taxa de degradação do RNA mensageiro está diretamente relacionada à função da molécula, podendo ainda ser modulada por estímulos extracelulares (Ross, 1995; Caponigro e Parker, 1996; Wilusz *et al.*, 2001).

RNAs mensageiros que apresentam rápida degradação como aqueles que codificam citocinas, proto-oncogenes e mediadores de inflamação freqüentemente contêm em sua porção 3' UTR um ou mais elementos ricos em AU, baseado na sequência motivo AUUUA. Esses elementos *cis* controlam a deadenilação (Wilson e Treisman, 1988; Voeltz e Steitz, 1998; Ford *et al.*, 1999) e a subsequente clivagem do corpo do mRNA (Shyu *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1997). Várias proteínas que se ligam a

*Cada um dos artigos apresenta uma discussão dos seus respectivos resultados. Assim, essa seção constará de uma discussão mais geral onde se abordará a contribuição destes trabalhos no entendimento do controle pós-transcricional da regulação gênica.

essas regiões ricas em AU (AUBP - AU *binding proteins*) vem sendo identificadas desde a clonagem do fator AUF1 (Zhang *et al.*, 1993). Essas proteínas são descritas como elementos de atuação *trans*, envolvidas na modulação da reciclagem desses mRNAs.

Desde sua descoberta, evidências apontam o envolvimento da proteína AUF1 nos mecanismos de degradação de mRNAs que possuem regiões ricas em AU. Uma vez que AUF1 não possui atividade de ribonuclease é sugerido que outros elementos AUBPs estejam envolvidos na degradação. Entretanto, os mecanismos pelos quais as proteínas AUBPs modulam a reciclagem de mRNAs ainda não são totalmente conhecidos. Dados sugerem que quando as proteínas se acoplam a regiões ricas em AU na porção 3' UTR de mRNAs existe uma alteração na conformação espacial da molécula favorecendo primeiro a deadenilação, seguida da retirada da estrutura 5'-cap e da subsequente a degradação do mRNA (Gao *et al.*, 2001).

Um dos artigos apresentados como corpo da tese, *Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D)*, compila os resultados de um trabalho desenvolvido a partir do pressuposto de que AUF1 estaria associada a um complexo protéico. Dependentemente das proteínas acopladas a AUF1, a atividade dessa proteína nos mecanismos de reciclagem de mRNAs seria modulada.

A análise do duplo híbrido de levedura, utilizando como isca a proteína AUF1-p37, identificou cinco proteínas que interagem com AUF1: a própria proteína AUF1-p37 e as proteínas NSAP-1 (*Non Structural Associated Protein 1*; Harris *et al.*, 1999), NSEP-1 (*Nuclease sensitive element binding protein 1*; Murray *et al.*, 1992, Kolluri e Kinniburg, 1991), IMP-2 (*Insuline-like growth factor II mRNA-binding protein*, Nielsen *et al.*, 1999) e UBCE21 (*Ubiquitin-conjugating enzyme*, Wang *et al.*, 1996) (Figura 1 e Tabela 1, artigo 2). A identificação da própria proteína AUF1 como alvo de ligação concorda com resultados

anteriormente descritos, que evidenciam a capacidade da proteína AUF1 em formar dímeros e/ou oligômeros de maneira ordenada (Wilson *et al.*, 1999).

Além das interações *in vivo*, todas as proteínas identificadas por interagirem com AUF1 mostram *in vitro* a capacidade de interação com a proteína AUF1 (Figura 2, Artigo 2) e também com um oligonucleotídeo de RNA rico em adenina e uracila (Figura 4, Artigo 2). Três das proteínas identificadas (NSAP-1, NSEP-1 e IMP-2) apresentam domínios de ligação a mRNAs (RRM, KH e ilhotas aromáticas/básicas). Esses dados reforçam nossa hipótese de que a atividade da proteína AUF1 é mediada por um complexo protéico.

A interação entre diferentes proteínas contendo domínios RRM foi previamente descrita por Kim *et al.*, (2000). Os autores demonstraram que esse tipo de interação ocorre de maneira ordenada e específica. A proteína NSAP-1 apresenta 4 domínios RRM e possui aproximadamente 80% de identidade com a sequência de aminoácidos da proteína hnRNP R (Harris *et al.*, 1999; Hassfeld *et al.*, 1998). Nossos resultados evidenciam que pelo menos dois domínios são necessários para que a interação entre as proteínas NSAP-1 e AUF1 possa ser identificada no sistema do duplo híbrido (Figura 3, Tabela 1, Artigo 2). Grosset *et al.*, (2000) já haviam identificado a presença de AUF1 e NSAP-1 como parte de um complexo multiprotéico, que se associa a regiões determinantes de instabilidade no mRNA de c-fos (mCDR = *major-coding-region determinant*). Provavelmente o acoplamento dessas duas proteínas juntamente com PABP, Unr (Hunt *et al.*, 1999) e PAIP1 (*PABP-interacting protein 1*, Craig *et al.*, 1998) num complexo multiprotéico está envolvido com a aceleração da deadenilação e subsequente degradação da molécula de mRNA.

Dentro do contexto da regulação pós-transcricional, a identificação da proteína NSEP-1 como proteína que se acopla a AUF1 é de grande relevância. NSEP-1 é uma proteína da família das *Y-box-binding proteins*, que são proteínas multifuncionais. Várias proteínas dessa família já foram identificadas e parecem exercer diversas funções tais

como ativação e repressão transcricional (Davidova *et al.*, 1997; Ansari, *et al.* 1999), replicação e reparo de DNA (Koike *et al.*, 1996; Ise *et al.*, 1999), regulação da tradução, estocagem e distribuição de moléculas de mRNAs (Stenina *et al.*, 2000; Bouvet *et al.*, 1995; Ranjan *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2000). Estudos apontam que a multifuncionalidade das proteínas Y-box relaciona-se à capacidade destas em modular estruturas secundárias de moléculas de DNA e RNA (Skabkin *et al.*, 2001).

Assim como outras proteínas da família das Y-box, NSEP-1 (Kolluri e Kinninburgh, 1991) possui três domínios: um domínio N-terminal rico em glicina, um domínio CSD (*Cold Shock Domain*) homólogo a principal proteína de resposta ao estresse em *E. coli* e um domínio C-terminal que possui quatro ilhas aromáticas ricas em aminoácidos básicos. Alguns estudos apontam essas ilhas como responsáveis pela interação das proteínas Y-box com moléculas de mRNA, assim como pelas interações proteína-proteína (Ansari *et al.*, 1999; Bouvet *et al.*, 1995; Shnyreva *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2002 - Artigo 2). Nosso clone de NSEP-1 identificado no sistema do duplo híbrido possui aproximadamente 40% da extensão do domínio CSD, reforçando os dados de que as ilhas aromáticas/básicas são as regiões responsáveis pelas interações RNA-proteína e proteína-proteína. Entretanto, nossas análises evidenciam que três das quatro ilhas aromáticas/básicas precisam estar presentes para que a interação entre as proteínas AUF1 e NSEP-1 possa ser identificada no sistema do duplo híbrido (Figura 3, Tabela 1, Artigo 2).

A identificação da atividade de endorribonuclease associada à proteína NSEP-1 foi um dos dados mais surpreendentes e intrigantes do trabalho desenvolvido. A proteína recombinante produzida a partir do clone isolado da biblioteca de levedura apresentou além da capacidade de interagir com o fator AUF1, a capacidade de se ligar a oligonucleotídeos de RNA e de degradá-los (Figura 4C - Artigo 2), sugerindo uma função adicional à NSEP-1 até então não descrita na literatura. Essas evidências reforçam

também a hipótese de que um complexo protéico associado à AUF1 esteja envolvido na regulação da estabilidade de mRNAs.

A proteína IMP-2, também identificada por interagir com AUF1, é uma proteína de localização citoplasmática, cuja concentração é dependente do tipo e do estágio de desenvolvimento celular. IMP-2 pode ser detectada principalmente em tecidos embrionários (Nielsen *et al.*, 1999) e a sua interação com a proteína AUF1 sugere que os mecanismos de degradação de mRNAs possam ser modulados ao longo do desenvolvimento de um organismo. Experimentos de co-sedimentação identificaram proteínas da família IMP associadas a polissomos e mRNPs (*messenger RNA of ribonucleoproteins*) não traduzidos (Nielsen *et al.*, 1999), sugerindo o envolvimento dessa proteína no controle das concentrações de mRNAs.

IMP-2 se caracteriza como uma proteína que se liga a RNA e como tal contém domínios de ligação RRM e KH (Tabela 1, Artigo 2). A presença de vários domínios de ligação a RNA assegura uma maior afinidade de ligação entre moléculas de RNA e a própria proteína IMP-2, além de permitir que essa proteína se acople a diferentes moléculas simultaneamente (Nielsen *et al.*, 1999). Em nosso clone IMP-2 somente os quatro domínios KH foram identificados (Figura 3 - Artigo 2). Mesmo assim, a proteína apresentou a maior afinidade relativa de ligação ao oligonucleotídeo de RNA utilizado nos ensaios de retardamento em gel (Figura 4 - Artigo 2). Nossas análises evidenciam também que o domínio KH 3 está envolvido diretamente na interação proteína-proteína e que pelo menos dois domínios KH são necessários para a interação com dois domínios RRM presentes em AUF1 (Figura 3 - Artigo 2). Esses dados corroboram os resultados obtidos por Kim *et al.*, (2000), que afirmam que mais de um domínio KH é necessário para que ocorra a interação com outros domínios KH ou RRM. As análises de mapeamento dos domínios protéicos envolvidos na interação proteína-proteína sugerem ainda que uma estrutura complexa contendo vários domínios possa estar envolvida na

interação com moléculas de RNA e nas interações proteína-proteína, importantes para o processamento, transporte núcleo-citoplasma e degradação de mRNAs.

Finalmente, entre as proteínas identificadas por interagirem com AUF1 no sistema do duplo híbrido, inclui-se a enzima conjugadora de ubiquitina E2I (UBCE2I). Tem sido demonstrado que as proteínas do sistema de ubiquitinização estão envolvidas com a degradação seletiva de proteínas que apresentam meia-vida curta. Mais recentemente, Laroia *et al.* (1999; 2002) demonstraram que a regulação da degradação de mRNAs ricos em AU mediada pela proteína AUF1, é dependente da ubiquitinização dessa proteína e de sua degradação pela via proteassômica. Em condições de estresse celular as proteínas Hsp (*Heat shock protein* = proteínas do choque térmico) inibem a via proteassômica de degradação ou inativam a enzima ativadora da ubiquitinização E1, resultando num acúmulo de AUF1 e diminuindo a degradação de mRNAs. A identificação da proteína UBCE2I em nossas análises reforça essa linha de argumentação. Além disso, UBCE2I foi a única proteína que apresentou interação com as quatro isoformas AUF1 (Figura 1 - Artigo 2). As demais proteínas identificadas somente interagiram com as isoformas AUF1-p37 e AUF1-p40, que são citoplasmáticas e que não possuem uma região de 49 aminoácidos na porção C-terminal presente nas isoformas AUF1-p42 e AUF1-p45 (Figura 4). Provavelmente esse fragmento se localize numa região de AUF1 envolvida na interação com as proteínas NSAP-1, NSEP-1 e IMP-2. Interessantemente, Arao *et al.* (2000) realizaram a análise do duplo híbrido utilizando como isca a porção C-terminal da proteína AUF1 comum às isoformas p42 e p45. Esses pesquisadores demonstraram que as isoformas p42 e p45 interagem com o fator SAF-B (*scaffold attachment factor B*) que está associado à matriz nuclear e que está envolvido com funções de regulação da expressão gênica (Stief *et al.*, 1989). A especificidade da distribuição das isoformas AUF1 entre citoplasma e núcleo sugere que elas estejam envolvidas em funções distintas nesses dois compartimentos. É possível que as isoformas nucleares estejam envolvidas no processamento de mRNA e no transporte

núcleo-citoplasmático dessas moléculas, enquanto as isoformas citoplasmáticas estejam envolvidas na regulação da degradação de mRNAs.

A identificação dessas quatro proteínas que interagem com AUF1 e que se correlacionam com os mecanismos de regulação das concentrações de mRNA na célula, reforça nossa hipótese de que AUF1 esteja associada a um complexo multi-protéico. Mais do que isso, trabalhos relacionados à identificação de proteínas envolvidas com a degradação de mRNAs em células de mamíferos e à compreensão das vias de atuação de tais enzimas, identificaram um complexo protéico homólogo ao de levedura e denominado exossomo. Essa estrutura é composta de pelo menos 10 proteínas (Mitchell *et al.*, 1997; Chekanova *et al.*, 2000; Brouwer *et al.*, 2001) e é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma. Estudos apontam um papel de destaque para esse complexo no processamento de RNAs (Mitchell *et al.*, 1997; Briggs *et al.*, 1998; Zanchin e Goldfarb 1999; Allmang *et al.*, 2000; Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000) Essas evidências sugerem que o exossomo coordena diversos processos no metabolismo de RNA, mas a maneira pela qual essa estrutura distingue os substratos precisa ser ainda elucidada. Algumas evidências apontam que proteínas AUBPs estejam envolvidas no recrutamento do exossomo (Chen *et al.*, 2001) e a proteína AUF1 é apontada como uma dessas proteínas (Chen *et al.*, 2001, Gao *et al.*, 2001). Os mecanismos envolvidos nessa interação ainda precisam ser elucidados. Sendo assim, cabe aqui uma nova especulação: Estariam as proteínas que interagem com AUF1 (algumas das quais identificadas nesse trabalho) organizadas em um suposto complexo, e esse complexo interagindo com a estrutura do exossomo? Uma investigação mais detalhada responderá essa pergunta.

Um segundo artigo também apresentado como corpo da tese, *Analysis of the structural determinants for RNA binding of the human protein AUF1/ hnRNP D*, é resultado de uma análise dos determinantes estruturais da proteína AUF1 que estão envolvidos no reconhecimento de motivos ricos em AU (seqüência consenso

UUAUUUAU). Entender como uma proteína que se liga a RNA interage especificamente com sua molécula alvo, para a formação de um complexo funcional, é o ponto central para a elucidação dos mecanismos de ação dessa proteína.

Sendo AUF1 uma proteína que se liga a mRNAs ricos em AU (AUBP), ela possui dois motivos de reconhecimento de RNA (RRM), que são responsáveis pela interação com a região rica em AU (DeMaria *et al.*, 1996). O interesse crescente no detalhamento dos mecanismos envolvidos na reciclagem de mRNAs e as evidências do importante papel da proteína AUF1 dentro desse contexto direcionaram parte do nosso trabalho na elucidação dos mecanismos da interação AUF1-RNA.

Embora a cristalização da proteína não tenha sido bem sucedida, um modelo molecular do motivo RRM2 da proteína AUF1 foi construído. Esse modelo viabilizou a análise dos elementos estruturais envolvidos na interação proteína-RNA.

Inicialmente foi realizado um alinhamento entre as seqüências de motivos RRM2 da proteína AUF1 e de outras proteínas da família das hnRNPs, que já possuíam estrutura resolvida e disponível em bancos de dados (Figura 1 - Artigo 1). Um bom alinhamento pode ser considerado a etapa mais importante do trabalho de modelagem. Dentre as proteínas analisadas, a proteína UP1 (hnRNP A1; Ding *et al.*, 1999) foi a escolhida para a construção do nosso modelo devido à alta porcentagem de identidade com a seqüência correspondente da proteína AUF1. Assim, utilizando os dados da proteína UP1 e o programa MODELLER (Sali e Blundell, 1993), modelos do domínio RRM2 de AUF1 foram gerados. Esses modelos foram submetidos a novas análises computacionais em relação à sua estereoquímica. O modelo escolhido tinha os melhores parâmetros da análise de Ramachandran.

Criado o modelo, analisamos uma suposta interação molecular entre o domínio AUF1 e uma molécula de RNA. Para isso a estrutura modelada do domínio RRM2 da proteína AUF1 foi sobreposta à estrutura do mesmo domínio da proteína PABP (Deo *et al.*, 1999). A proteína PABP teve sua estrutura resolvida complexada a um

oligonucleotídeo de RNA contendo 11 bases de adenina. As análises de uma suposta interação de AUF1 com esse oligonucleotídeo de RNA poli A mostraram que a maioria das interações com as bases de adenina seriam realizadas pelo empilhamento de anéis de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (interações do tipo *stacking*), o que não confere especificidade de ligação. Somente duas posições na sequência de RNA apresentaram restrições base-específicas (Figuras 2 e 3 - Artigo 1). Considerando-se essas restrições, a sequência consenso UUAUUUAU, que é descrita como alvo de reconhecimento pela proteína AUF1, passa a ser UUUAUU. Nossas análises teóricas sobre os determinantes estruturais envolvidos na interação AUF1-RNA foram feitas com a utilização de programas computacionais e foram subsequenteiramente confirmadas pelos ensaios de retardamento em gel (EMSA - *elektrophoretic mobility shift assay*), corroborando a viabilidade do modelo (Figura 4 - Artigo 1). Mais do que isso, a análise computacional de uma possível interação entre o domínio RRM1 da proteína AUF1 (Nagata *et al.*, 1999) e uma molécula de RNA poli A apontam, aproximadamente, os mesmos tipos de interações envolvendo aminoácidos com cadeias laterais aromáticas.

Pela análise do nosso modelo, vemos que a proteína AUF1 reconhece moléculas de mRNA com baixa seletividade. Quando da comparação da sequência de aminoácidos do domínio RRM2 da proteína AUF1 com a sequência do mesmo domínio de outras proteínas hnRNPs, observamos que os aminoácidos envolvidos em interações do tipo de empilhamento de anéis aromáticos (*stacking*) são conservados nessa família de proteínas (Figura 1 - Artigo 1). Entretanto, somente os poucos aminoácidos envolvidos no reconhecimento específico de bases de RNAs são altamente variáveis nessas sequências. Considerando essa baixa seletividade das proteínas pertencentes à família das hnRNPs, acreditamos que *in vivo* essa seletividade seja regulada por outros fatores. Possivelmente a alta afinidade e seletividade com a qual a proteína AUF1 interage com as sequências ricas em AU é modulada pela presença de cátions divalentes como o Mg^{2+} (Wilson *et al.*, 2001), pela oligomerização altamente ordenada da proteína (Wilson *et al.*,

1999) e pela associação a outras proteínas (Henics *et al.*, 1999; Laroia *et al.*, 1999; Grosset *et al.*, 2000). Todos esses dados reforçam ainda mais a nossa hipótese de que a atividade da proteína AUF1 é modulada por um complexo protéico, cuja composição e dinamismo alteram o destino dos mRNAs acoplados (Sirenko *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998; Laroia *et al.*, 1999; Grosset *et al.*, 2000). Além disso, há fortes evidências de que o controle da reciclagem dos mRNAs esteja ligado a alterações ambientais (Laroia *et al.*, 1999; Gallouzi *et al.*, 2000), hormonais (Pende *et al.*, 1996) e pelo próprio estágio de desenvolvimento celular (Buzby *et al.*, 1999). Um detalhamento maior sobre as proteínas que se complexam a AUF1 e a maneira pela qual elas que estas modulam a interação com a molécula de mRNA, bem como a estabilidade da mesma é pertinente.

Os trabalhos apresentados como corpo desta tese de doutoramento se complementam e abrem novas possibilidades para a elucidação dos mecanismos envolvidos na degradação e reciclagem de mRNA. O crescente interesse pela determinação das funções de moléculas de RNA e proteínas que se associam a elas em muitos processo biológicos, tem despertado o interesse comercial na busca da síntese de novos fármacos. Num futuro próximo, a compreensão dos mecanismos de degradação de mRNAs poderá permitir uma modulação da estabilidade dessas moléculas e assim regular a expressão gênica.

- I. AUF1 não atua na degradação de mRNAs de maneira isolada. As interações observadas sugerem a formação de um complexo protéico ordenado com o mRNA alvo;
- II. As quatro proteínas identificadas *in vivo* por interagirem com AUF1 se relacionam com o metabolismo de mRNA (NSAP-1, NSEP-1, IMP-2 e UBCE2I) e três dessas proteínas possuem domínios de acoplamento a mRNA (NSAP-1, NSEP-1 e IMP-2). Embora possuindo diferentes afinidades, todas essas proteínas também interagem *in vitro* com RNAs ricos em AU;
- III. Todas as proteínas identificadas interagem com as isoformas citoplasmáticas da proteína AUF1 (p37/p40). Somente a proteína UBCE2I interage também com as isoformas nucleares (p42/p45). Essas diferentes afinidades na interação entre as proteínas identificadas no sistema do duplo híbrido e as isoformas AUF1 sugerem funções específicas para cada uma das quatro isoformas;
- IV. A proteína NSEP-1 identificada por interagir com AUF1 apresentou atividade de endorribonuclease nos ensaios de retardamento em gel. NSEP-1 pertence à família das proteínas Y-box, que além da capacidade de ligação a DNA e RNA estão funcionalmente envolvidas na regulação da transcrição. As características da proteína NSEP-1 sugerem um contexto funcional adicional à mesma;

- V. O mapeamento dos domínios de interação mostrou que para a interação com AUF1 no sistema do duplo híbrido pelo menos dois domínios RRM (NSAP1), dois domínios KH (IMP-2) ou três ilhas aromáticas básicas (NSEP-1) devem estar presentes;
- VI. A identificação da proteína conjugadora de ubiquitina, UBCE2I, como proteína que se liga a AUF1, reforça as evidências de que a degradação de mRNAs poderá estar associada à via proteassômica;
- VII. Nossos dados de modelagem mostraram que a proteína AUF1 reconhece moléculas de mRNA com especificidade de sequência limitada, uma vez que a interação é baseada predominantemente em interações de empilhamento de aminoácidos aromáticos com as bases e esse tipo de interação não confere base especificidade;
- VIII. Os aminoácidos de AUF1 envolvidos em interações envolvendo o empilhamento de anéis aromáticos são conservados nas seqüências de outras proteínas hnRNPs;
- IX. Aminoácidos envolvidos no reconhecimento de RNAs com base especificidade são variáveis nos RRM's de outras proteínas da família das hnRNPs;
- X. A limitação da especificidade da seqüência no acoplamento de AUF1 a mRNAs sugere que *in vivo* outros parâmetros modulem a ligação específica de AUF1 a sua molécula alvo, tais como a oligomerização, a concentração de cátions Mg^{2+} e a interação da proteína a um complexo protéico.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J.D.** (1994). In: Molecular Biology of The Cell. Third Edition. Garland Publishing , Inc., New York.
- Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E. e Tollervey, D.** (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by exosome. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1684-1691.
- Ansari, S.A., Safak, M, Gallia, G.L., Sawaya, B.E., Amini, S. e Khalili, K.** (1999). Interaction of YB-1 with human immunodeficiency virus type 1 Tat and TAR RNA modulates viral promoter activity. *J. Gen. Virol.* **80**, 2629-2638.
- Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F. e Kato, S.** (2000). A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**, 228-236.
- Babich, A., Nevins, J.R. e Darnell, J.E.** (1980). Early capping of transcripts from the adenovirus major late transcription unit. *Nature* **287**, 246.
- Beelman, C.A. e Parker, R.** (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* **81**, 179-183.
- Bernstein, P. e Ross, J.** (1989). Poly (A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 373-377.
- Bernstein, P., Peltz, S.W. e Ross, J.** (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 659-670.
- Bernstein, P.L., Herrick, D.J., Prokipcak, R.D. e Ross, J.** (1992). Control of c-myc mRNA half-life *in vitro* by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev.* **6**, 642-654.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C. e Tollervey, D.** (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**, 765-775.
- Bouvet, P., Matsumoto, K. e Wolffe, A.P.** (1995). Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins: an essential role for the cold shock domain. *J. Biol. Chem.* **24**, 28297 - 28303.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T. e Buttler, J.S.** (1998). Rrp6p, the yeast homolog of the human PM-Sc1 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 13255-13263.
- Brawerman, G** (1976). Characteristics and significance of the polyadenylate sequence in mammalian messenger RNA. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **17**, 117-148.

- Breathnach, R. e Chambon, P.** (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383.
- Brewer, G.** (1991). An A+U rich element RNA-binding factor regulates *c-myc* mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell. Biol* **11**, 2460-2466.
- Brewer, G.** (1999). Evidence for a 3' - 5' decay pathway for c-myc mRNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 16174-16179.
- Brouwer, R., Allmag, C., Raijmakers, R., van Aarssen, Y., Egberts, W.V., Petfalski, E. van Venrooij, W.J., Tollervey, D e Prujin, G.J.** (2001). Three novel components of the human exosome. *J. Biol. Chem.* **276**, 6177-6184.
- Buzby, J.S., Lee, S.M., Van Winkle, P., DeMaria, C.T., Brewer, G. e Cairo, M.S.** (1996). Increased GM-CSF mRNA instability in cord vs. adult mononuclear cells is translation dependent and associated with increased levels of A+U-rich element binding factor. *Blood* **88**, 2889-2897.
- Buzby, J.S., Brewer, G. e Nugent, D.J.** (1999). Developmental regulation of RNA transcript and destabilization by A+U rich elements is AUF1 dependent. *J. Biol. Chem.* **274**, 33973-33978.
- Caponigro, G. e Parker, R.** (1996). Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **60**, 233-249.
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brow-Shimer, S. e Cerami, A.** (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1670-1674.
- Chekanova, J.A., Shaw, R.J., Wills, M.A. e Belostotsky, D.A.** (2000). Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* rescues 5.8S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast *ski6* mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 33158-33166.
- Chen, C.-Y.A., Chen, T.-M. e Shyu, A.-B.** (1994). Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich elements specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 416-426.
- Chen, C.Y. e Shyu, A.-B.** (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465-470.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Andersen, J.S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H.D., Mann, M. e Karin, M.** (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* **14**, 1236-1248.

- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Prujin, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M. e Karin, M. (2001).** AU-binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451-464.
- Cleveland, D.W. e Yen, T.J. (1989).** Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability. *New Biol.* **1**, 121-126.
- Cole, M.D. (1986)** The *myc* oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Gent.* **20**, 361-384.
- Cosman, D. (1987).** Control of messenger RNA stability. *Immunol. Today* **8**, 16-17.
- Cortes, P., Flores, O. e Reinberg, D. (1992).** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor II. *J. Mol. Cell. Biol.* **12**, 413-421.
- Coulombe, B. Killen, M. Liljelund, P., Honda, B., Xiao, H., Ingles, C.J. e Greenblatt, J. (1992).** Identification of three mammalian proteins that bind to the yeast TATA box protein TFIID. *Gene Expr.* **2**, 99-110.
- Couttet, P., Fromont-Racine, M., Steel, D., Pictet, R. e Grange, T. (1997).** Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5628-5633.
- Craig, A.W., Haghighat, A., Yu, A.T. e Sonenberg, N. (1998).** Interaction of polyadenilate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**, 520-523.
- Culbertson, M.R. (1999).** RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* **15**, 74-80.
- Curran, T. e Franza, B.R.J. (1988).** *Fos* and *Jun*: the AP-1 connection. *Cell* **55**, 395-397.
- Davidova, E.K., Evdokimova, V.M., Ovchinnikov, L.P. e Hershey, J.W.B. (1997).** Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2911-2916.
- DeMaria, C.T. e Brewer, G. (1996).** AUF1 binding affinity to A+U rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J. Biol. Chem.* **271**, 12179-12184.
- DeMaria, C.T., Sun, Y., Wagner, B.J., Long, L. e Brewer, G.A. (1997).** Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A+U-rich elements. *J. Biol. Chem.* **272**, 27635-27643.
- Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N. e Burley, S. (1999).** Recognition of polyadenylated RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**, 835-845.

- Ding, J., Hayashi, M.K., Zhang, Y., Manche, L., Krainer, A.R. e Xu, R.M.** (1999). Crystal structure of the two RRM domains of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev.* **13**, 1102 -1115.
- Dreyfuss, G.** (1986). Structure and function of nuclear and cytoplasmatic ribonucleoprotein particles. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **2**, 459.
- Edmonds, M. Vaughn, M.H., Jr. e Nakazato, H.** (1971). Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly labeled poly-ribosomal RNA of Hela cells: Possible evidence for a precursor relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1336.
- Edmonds, M. e Winters, M.A.** (1976). Polyadenilate polymerases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **17**, 149.
- Edmonds, M.** (1982). In: *The Enzymes* (P. Boyer Ed.), Vol. **15**, p. 217. Academic Press, New York.
- Fan, X. C. e Steitz, J.A.** (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmatic shuttleling protein, increases the *in vivo* stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* **17**, 3448-60.
- Ford, L.P. Watson, J. Knee, J.D. e Wiluz, J.** (1999). ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev.* **13**, 188-201.
- Furuichi, Y., LaFiandra, A. e Shatkin, A.J.** (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**, 235.
- Gallouzi, I-E., Brennan, C.M., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Eversole, A., Maizels, N. e Steitz, J.A.** (2000). HuR binding to cytoplasmatic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3073-3078.
- Gao, M. Wilusz, C.J., Peltz, S.W. e Wilusz, J.** (2001). A novel mRNA-decapping activity in Hela cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* **20**, 1134 -1143.
- Gillis, P. e Malter, J.S.** (1991). The adenosine-uridine binding factor recognizes the AU-rich elements of cytokine, lymphokine and oncogene mRNAs. *J. Biol. Chem.* **266**, 3172-3177.
- Greenberg, M.E. e Ziff, B.E** (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* **311**, 433-438.
- Grosset, C., Chen, C.-Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemim-Sablon, H. e Shyu, A.-B.** (2000). A mechanism for translation coupled mRNA turnover: interaction between the poly-A tail and a *c-fos* RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* **103**, 29-40.
- Gueydan, C., Droogmans, L., Chalon, P., Huez, G., Caput, D. e Kruys, V.** (1999). Identification of TIAR as a protein binding to the translation regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor- α -mRNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 2322-2326.

- Harris, C.E., Boden, R.A. e Astell, C.R.** (1999). A novel heterogenous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.* **73**, 72-80.
- Hassfeld, W., Chan, E.K. L. Mathison, D.A., Portman, D., Dreyfuss, G., Steiner, G. e Tan, E.M.** (1998). Molecular definition of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R) using autoimmune antibody: immunological relationship with hnRNAP P. *Nucleic Acids Res.* **26**, 439-445.
- Henics, T. Nagy, E., Oh, H.J., Csermely, P., von Gabin, A. e Subject, J.R.** (1999). Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind in RNA motifs involved in mRNA stability. *J. Biol. Chem.* **274**, 17318-17324.
- Hill, S.H. e Treisman, R.** (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanism and specificity. *Cell* **80**, 199-211.
- Hilleren, P. e Parker, R.** (1999). Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 229-260.
- Hunt, S.L., Hsuan, J.J., Totty, N. e Jackson, R.J.** (1999). Unr, a cellular cytoplasmatic RNA-binding protein with five cold shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* **15**, 437-438.
- Hunter, T. e Karin, M.** (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**, 375-387.
- Ise, T. Nagatani, G., Imamura, T. Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. e Kohno, K.** (1999). Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res.* **59**, 342-346.
- Jones, T.R. e Cole, M.D.** (1987). Rapid cytoplasmatic turnover of *c-myc* mRNA: requirement of 3' untranslated sequences. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4513-4521.
- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M. e Jang, S.K.** (2000). Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleous and cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **298**, 395 - 405.
- Koike, K., Abe, T., Hisano, T., Kubo, T., Wada, M., Kohno, K. e Kuwano, M.** (1996). Overexpression of multidrug resistance protein gene in human cancer cell lines selected for drug resistance to epipodophyllotoxins. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**, 765-772.
- Kolluri, R. e Kinninburgh, A.J.** (1991). Full length cDNA sequence encoding a nuclease sensitive element DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4771.
- Korner, C.G. e Wahle, E.** (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A) especific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* **272**, 10448-10456.

- Korner, C.G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E. e Whale, E.** (1998). The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **17**, 5427-5437.
- Latchman, D.S.** (1997). Transcription factors: an overview. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **12**, 1305-1312.
- Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennington, E.A., Phillips, R.S. e Blackshear, P.J.** (1999). Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor- α mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4311-4323.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G. e Schneider, R.J.** (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasomes pathway. *Science* **284**, 499-502.
- Laroia, G., Sarkar, B. e Schneider, R.J.** (2002). Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1842-1846.
- Lewin, B.** (Ed.). (1994). In: *Gene V*. Oxford University Press Inc., New York.
- Lewin, B.** (Ed.). (1997). In *Genes VI*. Oxford University Press Inc., New York.
- Lim, L. e Cannelaski, E. S.** (1970). Adenine-rich polymer associated with rabbit reticulocyte messenger RNA. *Nature* **277**, 710.
- Lodish, H.F. e Small, B.** (1976). Different lifetimes of reticulocyte messenger RNAs. *Cell* **7**, 59-65.
- Maldonado, E. e Reinberg, D.** (1995). News on initiation and elongation of transcription by RNA polimerase II. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 352-361.
- Marcu, K.B., Bossone, S.A. e Patel, A.J.** (1992). *c-myc* function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 809-860.
- Mayer, V.E., Fan, X.C. e Steitz, J.** (1997). Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **16**, 2130-2139.
- Mitchell, P. Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. e Tollervey, D.** (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' $\rightarrow$ 5' exorribonucleases. *Cell* **91**, 457-466.
- Moraes, K.C.M., Lee, W.H. e Kobarg, J.** (2002). Analysis of the structural determinants for RNA binding of the human protein AUF1/hnRNP D. *Biol. Chem.* **383**, 831-837.
- Moraes, K.C.M., Quaresma, A.J.C., Maehnss, K. e Kobarg, J.** (2003). Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D). *Biol. Chem.* **384**, in press.

- Mount, S.M.** (1982). A catalog of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**, 459-472.
- Mukherjee, D., Gao, M., Oconnor, J.P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S. e Wilusz, J.** (2002). The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* **21**, 165-174.
- Murray, M.T., Schiller, D.L. e Franke, W.W.** (1992). Sequence analysis of cytoplasmatic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of mRNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 11-15.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J. e Evans, P.R.** (1990). Crystal structure of the mRNA binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* **348**, 515-520.
- Nagata, T., Kurihara, Y., Matsuda, G., Saeki, J-I., Kohno, T., Yanagida, Y., Ishikawa, F., Uesugi, S. e Katahira, M.** (1999). Structure and interactions with RNA of the N-terminal UUAG-specific RNA-binding domain of hnRNP D0. *J. Mol. Biol.* **287**, 221-237.
- Nielsen, J. Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A.H., Werner, U.M. e Nielsen, F.C.** (1999). A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1262-1270.
- Pandis, N., Jin, Y., Gorunova, L., Peterson, C., Bardi, G., Idvall, I., Johnsson, B., Ingvar, C., Mandahl, H., Mitelman, F. e Heim, S.** (1995). Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* **12**, 173-185.
- Pende, A., Mitchusson, K.D., DeMaria, C.T., Blaxall, B.C., Minobe, W.A., Sherman, J.S., Bristow, M.R., Brewer, G. e Port, J.D.** (1996). Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the β -adrenergic receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 8493-8501.
- Peng, S.S.-Y., Chen, C.-Y.A., Xu, N. e Shyu, A-B.** (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR an ELAV protein. *EMBO J.* **17**, 3461-3470.
- Piecyk, M., Wax, S., Beck, A.R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Krusys, V., Streuli, M. e Anderson, P.** (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J.* **19**, 4154-4163.
- Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, L., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L. e Duvoisin, R.C.** (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* **274**, 1197-1199.

- Ptushkina, M., Von der Haar, T., Karim, M.M., Hughes, J.M. e McCarthy, J.E.** (1999). Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *EMBO J.* **18**, 4068-4075.
- Ranjan, M., Tafuri, S.R. e Wolffe, A.P.** (1993). Masking mRNA from translation in somatic cells. *Gene Dev.* **7**, 1725.
- Roeder, R.G.** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 327-335.
- Ross, J.** (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological Review* **59**, 423-450.
- Ross, J., Kobs, G. Brewer, G. e Peltz, S.** (1987). Properties of the exonuclease activity that degrades H4 histone mRNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 9374-9381.
- Sachs, A.** (1990). The role of poli(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr. Opinion Cell Biol.* **2**, 1092-1098.
- Sali, A. e Blundell, T.L.** (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815.
- Serizawa, H., Conaway, J.W. e Conaway, R.C.** (1994). Transcription initiation by mammalian RNA polymerase II. In: *Transcription Mechanisms and Regulation*. Conaway R.C. & Conaway J.W. ed., Raven Press, NY., p. 27-43.
- Shamoo, Y., Krueger, U., Rice, L.M., Williams, K.R. e Steitz, T.A.** (1997). Crystal structure of the two RNA binding domains of human hnRNP A1 at 1.75 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* **4**, 215-222.
- Shaw, G. e Kamen, R.** (1986). A conserved AU sequence from the 3'- untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659-667.
- Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y. e Bomsztyk, K.** (2000). Interaction of two multifunctional proteins: heterogenous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 15498-15503.
- Shyu, A-B., Belasco, J.G. e Greenberg, M.E.** (1991). Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.* **5**, 221-231.
- Sirenko, O.I., Lofquist, A.K., DeMaria, C.T., Moris, J.S., Brewer, G. e Haskill, J.S.** (1997). Adhesion-dependent regulation of an A+U-rich element-binding activity associated with AUF1. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3898-3906.
- Skabkin, M.A., Evdokimova, V., Thomas, A.A.M. e Ovchinnikov, L.P.** (2001). The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strands annealing. *J. Biol. Chem.* **48**, 44841- 44847.

- Stenina, O.I., Poptic, E.J. e DiCorleto, P.E.**, (2000). Thrombin activates a Y-box binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **106**, 579 - 587.
- Stief., A., Winter, D.M., Stratling, W.H. e Sippel, A.E.** (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* **341**, 343-345.
- Swartwout, S.G. e Kinniburgh, A.J.** (1989). *c-myc* RNA degradation in growing and differentiating cells: possible alternative pathways. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 288-295.
- Tijan, R.** (1995). Molecular machines that control genes. *Scientific American* **272**, 38-45.
- Tijan, R e Maniatis, T.** (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**, 5-8.
- Voeltz, G. e Steitz, J.A.** (1998). AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7537-7545.
- Volloch, V. e Housman, D.** (1981). Stability of globin mRNA in terminally differentiating murine erythroleukemia cells. *Cell* **23**, 509-514.
- Wagner, B.J., DeMaria, T.C., Sun, Y., Wilson, G.M. e Brewer, G.** (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* **48**, 195-202.
- Wagner, S. e Green, M.R.** (1994). DNA-binding domains: targets for viral and cellular regulators. *Curr. Opin. Cell. Biol* **6**, 410-414.
- Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Seufert, W., Taguchi, T., Testa, J.R., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Welsh, D., Shenk, T. e Deuel, T.F.** (1996). Molecular cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human ubiquitin-conjugating enzyme 9. *J. Biol. Chem.* **271**, 24811-24816.
- Wang, Z. e Kiledjian, M.** (2000). Identification of an erythroid-enriched endoribonuclease activity involved in specific mRNA cleavage. *EMBO J.* **19**, 295-305.
- Wang, Z. e Kiledjian, M.** (2001). Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* **107**, 751-762.
- Wilson, T. e Treisman, R.** (1988). Removal of poly(A) and consequent degradation of *c-fos* mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* **336**, 396-399.
- Wilson, G.M. e Brewer, G.** (1999). The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **62**, 257-291.
- Wilson, G.M., Sun, Y., Lu, H. e Brewer, G.** (1999). Assembly of AUF1 oligomers on AU-rich RNA targets by sequential dimer association. *J. Biol. Chem.* **47**, 33374-33381.

- Wilson, G.M., Sutphen, K., Chuang, K. e Brewer, G.** (2001). Folding of A+U-rich RNA elements modulates AUF1 binding. Potential roles in regulation of mRNA turnover. *J. Biol. Chem.* **276**, 8695-9704.
- Wilusz, C.J., Wormington, M. e Peltz, S.W.** (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **17**, 4611-4621.
- Xu, N., Chen, C.Y. e Shyu, A.-B.** (1997). Modulation of the fate of cytoplasmatic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4611-4621.
- Zanchin, N.I. e Goldfarb, D.S.** (1999). The exosome subunit Rrp43 is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1283-1288.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K. e Brewer, G.A** (1993). Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7652-7665.
- Zubiaga, A.M., Belasco, J.G. e Greenberg, M.E.** (1995). The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2219-2230.