

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica)

GLAUCIA FREITAS MENINO

**Estudo do Exossomo de Archaea e de sua Interação com a
Proteína Reguladora PaNip7**

Versão Corrigida da Dissertação Defendida

SÃO PAULO

Data do depósito na SPG:

15 / 12 / 2015

GLAUCIA FREITAS MENINO

**Estudo do Exossomo de Archaea e de sua Interação com a
Proteína Reguladora PaNip7**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

SÃO PAULO
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Menino, Glaucia Freitas

M545e Estudo do exossomo de Archaea e de sua interação com a
proteína reguladora PaNip7 / Glaucia Freitas Menino. -- São
Paulo, 2015.

71p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Oliveira, Carla Columbano de

1. Expressão gênica 2. RNA : Metabolismo 3. Proteína :
Estrutura 4. Cromatografia 5. Peptídeos : Síntese I. T. II.
Oliveira, Carla Columbano de, orientador.

574.88

CDD

Dedicatória

*Aos meus pais, Maria Isabel e Gilvan, porto seguro,
pelo amor e apoio incondicionais.*

*Aos meus irmãos, Alan e Ivan, pelo carinho,
incentivo e companheirismo.*

Amo vocês...

Agradecimentos

A Deus, a Nossa Senhora e a São Judas Tadeu por sempre me protegerem e guiarem, sobretudo nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, Maria Isabel, que por sua infinita sabedoria e seu dom materno admirável tem a capacidade de ouvir meu silêncio, me fortalecer e me ensinar, diariamente, o que realmente importa.

Ao meu pai, Gilvan, pelo seu grande exemplo de vida, garra, persistência, planejamento e realização.

Aos meus irmãos, Alan e Ivan, pela inestimável amizade e ajuda desde muito pequenos.

Especial agradecimento à Luci Deise Navarro por realizar seu ofício com tamanha dignidade e respeito.

À Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira pela oportunidade do projeto e da colaboração que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Maria Terêsa Machini pela enriquecedora colaboração que muito acrescentou no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Marana pelas valiosas sugestões durante o curso de pós-graduação.

À Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano que sob sua excelente orientação me inseriu no caminhar científico e desde então, a tenho como exemplo de ética e profissionalismo.

Especial agradecimento à Dóris Araújo pela magia de falar e fazer o que foi preciso para transformar o dia a dia para melhor.

A todos colegas de laboratório (LCPTEG e LQP) e do IQ pela oportunidade de compartilhar o entusiasmo de alguns resultados e a decepção de outros, informações conceituais e técnicas, pela ajuda mútua e pelos felizes momentos de descontração que geraram grandes benefícios.

Especial agradecimento à Leila Bonadio pelas revisões bibliográficas e pela constante espontaneidade em ajudar.

Ao Instituto de Química e à Universidade de São Paulo por todos os serviços prestados.

Ao CNPQ e à FAPESP pelo apoio financeiro.

*“Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.”*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

MENINO, G.F. **Estudo do exossomo de Archaea e de sua interação com a proteína reguladora PaNip7**. 2015. 71p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

O exossomo é um complexo multiproteico conservado evolutivamente de archaea a eucariotos superiores que desempenha funções celulares essenciais tais como: atividade exoribonucleolítica 3'→5', regulação dos níveis de mRNA, maturação de RNAs estruturais e controle de qualidade de RNAs durante os vários estágios do mecanismo de expressão gênica. Em Archaea, o exossomo é composto por até quatro subunidades diferentes, duas com domínios de RNase PH, aRrp41 e aRrp42, e duas com domínios de ligação a RNAs, aCsl4 e aRrp4. Três cópias das proteínas aRrp4 e/ou aCsl4 se associam com o núcleo hexamérico catalítico do anel de RNase PH e completam a formação do complexo. A proteína PaNip7 é um cofator de regulação do exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi* e atua na inibição do complexo enzimático ligando-se simultaneamente ao exossomo e a RNAs. Neste projeto, a reconstituição *in vitro* do exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi* formado pela proteína de topo PaCsl4 foi obtida. Para tanto foram realizadas análises de interação proteica usando as técnicas de cromatografia de afinidade, gel filtração e SDS-PAGE. Em adição à formação da isoforma PaCsl4-exossomo, um fragmento peptídico correspondente à região C-terminal da PaNip7 foi sintetizado pelo método da fase sólida, purificado por RP-HPLC e o purificado foi caracterizado por LC/ESI-MS almejando realizar futuros experimentos de interação com o exossomo.

Palavras-chave: expressão gênica, metabolismo de RNA, exossomo de archaea, PaNip7, estrutura de proteína, purificação de proteína, cromatografia, síntese de peptídeo.

ABSTRACT

MENINO, G.F. **Study of Archaeal exosome and its interaction with the PaNip7 regulatory protein**. 2015. 71p. Dissertation (Master's degree) – Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The exosome is a multiprotein complex evolutionarily conserved from archaea to higher eukaryotes that performs essential cellular functions such as: 3' → 5' exoribonucleolytic activity, regulation of mRNA levels, maturation of structural RNAs and quality control of RNAs during the various stages of the gene expression mechanism. In Archaea, the exosome is composed of up to four different subunits, two with RNase PH domains, aRrp41 and aRrp42, and two with RNAs binding domains, aCsl4 and aRrp4. Three copies of the aRrp4 and/or aCsl4 proteins associate with the hexameric catalytic core of the RNase PH ring and complete the formation of the complex. The PaNip7 protein is a regulating cofactor of the *Pyrococcus abyssi* archaeal exosome and acts in the inhibition of the enzyme complex by binding simultaneously to the exosome and RNAs. In this project, the reconstitution *in vitro* of the *Pyrococcus abyssi* archaeal exosome formed by the PaCsl4 top protein was achieved. To this end protein interaction analyses were performed using affinity chromatography, gel filtration and SDS-PAGE techniques. In addition to the formation of the PaCsl4-exosome isoform, a peptide fragment corresponding to the C-terminal region of PaNip7 was synthesized by solid-phase method, purified by RP-HPLC and the purified peptide was characterized by LC/ESI-MS aiming to perform future binding experiments with the exosome.

Keywords: gene expression, RNA metabolism, archaeal exosome, PaNip7, protein structure, protein purification, chromatography, peptide synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arquitetura molecular do exossomo eucariótico.....	19
Figura 2. Arquitetura molecular do exossomo de archaea	20
Figura 3. Vista de topo das duas isoformas do exossomo de archaea	20
Figura 4. Ligação de RNA ao exossomo de <i>Pyrococcus abyssi</i>	23
Figura 5. Mecanismo de processamento de RNA pelo exossomo de <i>P. abyssi</i>	24
Figura 6. Estruturas terciária, secundária e primária da proteína PaNip7	27
Figura 7. Estrutura da resina CLEAR amida.....	31
Figura 8. Perfil cromatográfico das proteínas PaRrp41 e PaRrp42 e análise por SDS-PAGE	44
Figura 9. Perfil cromatográfico das proteínas PaRrp42 e PaCsl4 e análise por SDS-PAGE	46
Figura 10. Perfil cromatográfico da proteína PaNip7 e análise por SDS-PAGE no primeiro estágio de purificação.....	48
Figura 11. Perfil cromatográfico da proteína PaNip7 e análise por SDS-PAGE no segundo estágio de purificação	50
Figura 12. Análise relativa volumétrica por SDS-PAGE	51
Figura 13. Perfil cromatográfico de purificação do PaCsl4-exossomo e análise por SDS-PAGE.....	53
Figura 14. Perfil cromatográfico de reconstituição do PaCsl4-exossomo e análise por SDS-PAGE.....	54
Figura 15. Fórmula estrutural do peptídeo sintetizado	57
Figura 16. Análise do peptídeo bruto.....	57
Figura 17. Perfil de RP-HPLC analítica do peptídeo bruto	58
Figura 18. Análise do peptídeo purificado	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas componentes do exossomo em diferentes organismos.....	18
Tabela 2 - Cepa de <i>E. coli</i> utilizada neste projeto.....	30
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados neste projeto.....	30
Tabela 4 - Derivados de aminoácidos e acopladores utilizados neste projeto.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	acetil
ACN	acetonitrila
AU	unidade arbitrária
Boc	<i>t</i> -butiloxicarbonil
CLEAR Amida	forma amidada da resina acrilada com ligações cruzadas de etoxilato
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonil
GS	grau de substituição
HOBt	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactosídeo
KDa	quilodáton
LB	Luria-Bertani, meio de cultura da bactéria <i>Escherichia coli</i>
LC/ESI-MS	cromatografia líquida em interface com espectrometria de massas de ionização por electrospray
mRNA	RNA mensageiro
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
OBu^t	éster <i>t</i> -butílico
OD	densidade óptica
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilmetano-6-sulfonil
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNase PH	ribonuclease fosforolítica
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
rRNA	RNA ribossomal
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
SPFS	síntese de peptídeos em fase sólida
TFA	ácido trifluoracético
TIC	cromatograma de íons totais
TIS	triisopropilsilano
Tris-HCl	solução tamponada com tris(hidroximetil)aminometano e ácido clorídrico
tRNA	RNA transportador

Código de uma e três letras para os vinte aminoácidos usuais

A	Ala	alanina	M	Met	metionina
C	Cys	cisteína	N	Asn	asparagina
D	Asp	ácido aspártico	P	Pro	prolina
E	Glu	ácido glutâmico	Q	Gln	glutamina
F	Phe	fenilalanina	R	Arg	arginina
G	Gly	glicina	S	Ser	serina
H	His	histidina	T	Thr	treonina
I	Ile	isoleucina	V	Val	valina
K	Lys	lisina	W	Trp	triptofano
L	Leu	leucina	Y	Tyr	tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Processamento de RNA.....	15
1.2 Complexo do Exossomo	16
1.2.1 Descrição geral de estrutura e função	16
1.2.2 Conservação evolutiva.....	17
1.2.3 Exossomo de Archaea	19
1.2.4 Proteína reguladora PaNip7.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Materiais.....	30
3.2 Preparação de células BL21 competentes de <i>E. coli</i> com CaCl ₂	32
3.3 Transformação das células BL21 competentes de <i>E. coli</i>	33
3.3.1 Transformação com os DNAs plasmidiais PaRrp41 (pET29 – Kan ^R) e PaRrp42 (pAE – Amp ^R)	33
3.3.2 Transformação com os DNAs plasmidiais PaRrp42 (pAE – Amp ^R) e PaCsl4 (pET28 – Kan ^R)	34
3.3.3 Transformação com o DNA plasmidial PaNip7 (pCYTEX – Amp ^R).....	34
3.4 Indução de expressão das proteínas recombinantes.....	35
3.4.1 Indução das proteínas PaRrp41 e PaRrp42	35
3.4.2 Indução das proteínas PaRrp42 e PaCsl4	35
3.4.3 Indução da proteína PaNip7	35
3.4.4 Coleta das células transformadas.....	36

3.4.5	Análise de indução das proteínas	36
3.5	Lise das células transformadas (Prensa Francesa)	37
3.6	Tratamento térmico do lisado	37
3.7	Purificação das proteínas recombinantes	38
3.7.1	Co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42	38
3.7.2	Co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4.....	38
3.7.3	Purificação da proteína PaNip7	39
3.8	Quantificação das proteínas recombinantes	39
3.9	Reconstituição do Pa-exossomo <i>in vitro</i>	40
3.10	Síntese, clivagem e desproteção total, purificação e caracterização química do fragmento peptídico da proteína PaNip7	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42	43
4.2	Co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4.....	45
4.3	Purificação da proteína PaNip7.....	47
4.4	Reconstituição do Pa-exossomo <i>in vitro</i>	51
4.5	Síntese, clivagem e desproteção total, purificação e caracterização química do fragmento peptídico da proteína PaNip7	55
5.	CONCLUSÕES	62
6.	REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processamento de RNA

Toda a surpreendente diversidade de tipos de RNAs em células vivas conhecidas até o momento (sendo os mais abundantes: mRNA, tRNA, rRNA, snRNA e snoRNA) passa por diversas etapas de processamento para sua maturação, as quais precisam ser reguladas para o controle da expressão gênica.

A descoberta e caracterização de novos tipos de RNAs ao longo das últimas décadas permitiram, simultaneamente, a descrição e proposição de diferentes mecanismos de regulação destes transcritos (BOUSQUET-ANTONELLI; PRESUTTI; TOLLERVEY, 2000; BRANTL, 2007; DULEBOHN et al., 2007; VASUDEVAN; PELTZ, 2003). O nome *RNA surveillance*, comumente utilizado, é dado ao conjunto desses mecanismos regulatórios que identificam vários pontos de regulação celular dos níveis de RNAs e da expressão gênica (HOUSELEY; LACAVAL; TOLLERVEY, 2006; RAIJMAKERS; SCHILDERS; PRUIJN, 2004).

A transcrição de RNAs é apontada como um desses pontos de regulação, sendo o mecanismo de regulação mais bem caracterizado o dos pré-mRNAs, em eucariotos, os quais passam por etapas de processamento pós-transcricional no núcleo celular antes de se tornarem maduros e funcionais e serem exportados para o citoplasma. Os passos envolvidos na maturação dos pré-mRNAs incluem a adição de *cap* na extremidade 5' (CHO et al., 1997; MCCRACKEN et al., 1997), poliadenilação na extremidade 3' (CHRISTOFORI; KELLER, 1988; MANLEY, 1988) e *splicing* (MISTELI; CÁCERES; SPECTOR, 1997; MISTELI; SPECTOR, 1999).

Quando os RNAs sofrem processamentos incorretos, a literatura mostra que os sistemas celulares possuem mecanismos de degradação dos RNAs aberrantes sem, contudo, destruir os RNAs funcionais, através de mecanismos finamente

regulados de controle de qualidade (LEBRETON; SÉRAPHIN, 2008; MAKINO; HALBACH; CONTI, 2013; PORRUA; LIBRI, 2013; VANACOVA; STEFL, 2007).

A degradação de tais RNAs é realizada por ribonucleases celulares (RNases) as quais são classificadas em dois grupos, as exoribonucleases que processam RNAs a partir de suas extremidades 3' ou 5' (CHLEBOWSKI et al., 2013; LIU; GREIMANN; LIMA, 2006; MATHY et al., 2007; XIANG et al., 2009) e as endoribonucleases que clivam internamente RNAs (HAMMARLÖF et al., 2015; PANNUCCI et al., 1999). Algumas RNases possuem ambas as atividades de exo e endoribonuclease (LEBRETON et al., 2008; SCHAEFFER et al., 2009).

O complexo do exossomo foi identificado como uma RNase com atividade principal exoribonucleolítica a partir da extremidade 3' do RNA (RAIJMAKERS; SCHILDERS; PRUIJN, 2004; SCHMID; JENSEN, 2008; TOLLERVEY, 2015).

1.2 Complexo do Exossomo

1.2.1 Descrição geral de estrutura e função

O exossomo é um complexo multiproteico constituído por subunidades que apresentam domínios estruturais de uma família conservada de RNases fosforolíticas (RNases PH) e desempenha papéis fundamentais na degradação e biogênese de um grande número de tipos de RNA (LORENTZEN; CONTI, 2005; RAIJMAKERS; SCHILDERS; PRUIJN, 2004).

Realiza funções celulares essenciais como o correto processamento de RNAs e regulação de seus níveis (BOUSQUET-ANTONELLI; PRESUTTI; TOLLERVEY, 2000; CHEN et al., 2001; MUKHERJEE et al., 2002), maturação de RNAs estruturais e controle de qualidade de RNAs nos vários passos de suas vias de maturação no processo de expressão gênica (ALLMANG et al., 1999; BRIGGS; BURKARD;

BUTLER, 1998; MITCHELL et al., 1997; MITCHELL; PETFALSKI; TOLLERVEY, 1996; VAN HOOF et al., 2002).

Este complexo foi primeiramente identificado em levedura por seu envolvimento no processamento de RNAs ribossomais (MITCHELL et al., 1997) e posteriormente também caracterizado em archaea, tripanossoma, planta e humano (CHEKANOVA et al., 2002; ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001; EVGUENIEVA-HACKENBERG et al., 2003; KOONIN; WOLF; ARAVIND, 2001; RAIJMAKERS et al., 2002).

O exossomo é o principal responsável pela degradação de RNAs aberrantes como mRNAs que sofreram a retirada da cauda poli(A) e do *cap*, bem como daqueles que não apresentam códons de terminação (DECKER, 1998; KILCHERT; VASILJEVA, 2013; VAN HOOF et al., 2002). Somado a isso, ele está envolvido no processamento 3' de snRNAs e snoRNAs (ALLMANG et al., 1999) e também foi descrito seu papel de degradação de rRNA e snoRNAs que são marcados para degradação mediante adição de uma pequena cauda poli(A) nas suas extremidades 3'(LACAVA et al., 2005; WYERS et al., 2005).

1.2.2 Conservação evolutiva

O arranjo macromolecular do exossomo é conservado evolutivamente, de archaea a eucariotos superiores, apesar do aumento na complexidade da composição das suas subunidades formadoras – até quatro subunidades diferentes em archaea e onze subunidades em *Saccharomyces cerevisiae* e humano (Tabela 1).

Tabela 1 - Proteínas componentes do exossomo em diferentes organismos

Domínios de homologia a <i>E. coli</i>	Archaea	<i>S. cerevisiae</i>	Humano
<i>Núcleo do complexo</i>			
RNase PH	aRrp41	Rrp41p	hRrp41
RNase PH	aRrp42	Rrp42p	hRrp42
RNase PH		Rrp43p	hRrp43
RNase PH		Rrp45p	hRrp45
RNase PH		Rrp46p	hRrp46
RNase PH		Mtr3p	hMtr3
S1, KH		Rrp4p	hRrp4
S1, KH		Rrp40p	hRrp40
S1, Fita-Zn		Csl4p	hCsl4
<i>Proteínas associadas ao núcleo</i>			
S1, KH	aRrp4		
S1, Fita-Zn	aCsl4		
RNase R		Rrp44p	hDis3, hDis3L
RNase D		Rrp6p	hRrp6

Em eucariotos, das onze subunidades diferentes formadoras do exossomo, seis contêm domínios inativos de RNase PH (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 e Mtr3) (Tabela 1) e interagem formando um anel hexamérico (Figura 1a). Três subunidades contêm domínios de ligação a RNA (Rrp4, Rrp40 e Csl4) (Tabela 1) e se ligam a um dos lados do anel de RNase completando a formação do *core* do exossomo (Figura 1a). As duas subunidades ativas do exossomo, Rrp44 e Rrp6 (Tabela 1), ligam-se ao *core* em lados opostos (Figura 1b).

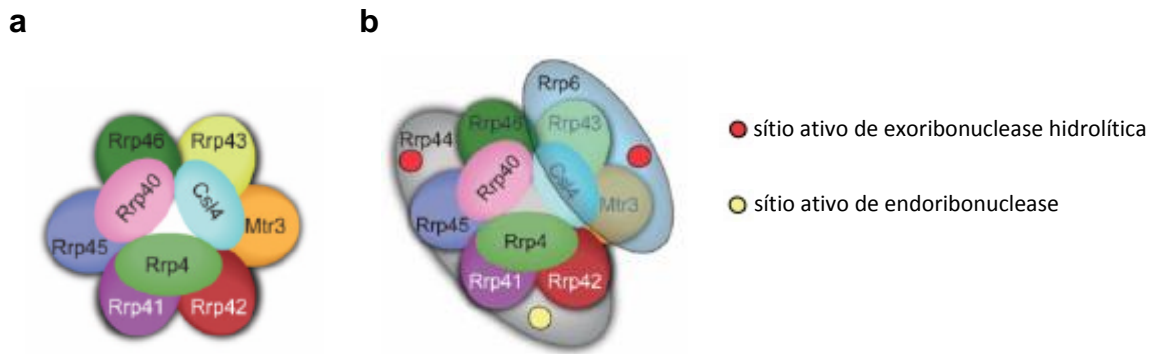


Figura 1. Arquitetura molecular do exossomo eucariótico. (a) Representação esquemática do núcleo do exossomo. (b) Representação esquemática da forma nuclear do exossomo eucariótico (JANUSZYK; LIMA, 2014).

1.2.3 Exossomo de Archaea

O exossomo de archaea apresenta até quatro subunidades diferentes, duas contendo domínios de RNase PH, aRrp41 e aRrp42, e outras duas contendo domínios de ligação a RNA, aCsl4 e aRrp4 (Tabela 1) (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; HARTUNG; HOPFNER, 2009; LORENTZEN; BASQUIN; CONTI, 2008; LORENTZEN et al., 2005; NAVARRO et al., 2008; RAMOS et al., 2006).

O núcleo hexamérico do complexo enzimático, ativo cataliticamente, apresenta a forma de anel com um canal central e é composto por três cópias das subunidades aRrp41 e aRrp42, as quais interagem entre si de modo a formar um trímero de heterodímeros aRrp41 – aRrp42 (Figura 2a).

Três moléculas das proteínas de ligação a RNA, aRrp4 e/ou aCsl4, se ligam no topo da estrutura central do exossomo, junto às subunidades aRrp41 e aRrp42, e completam a formação do complexo enzimático (Figura 2b). Elas se apresentam como uma extensão do túnel de entrada dos substratos de RNAs, presumivelmente restringindo o acesso e guiando-os para a degradação (AUDIN et al., 2013; BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; JENSEN, 2010; LU; DING; KE, 2010; NAVARRO et al., 2008; RAMOS et al., 2006).

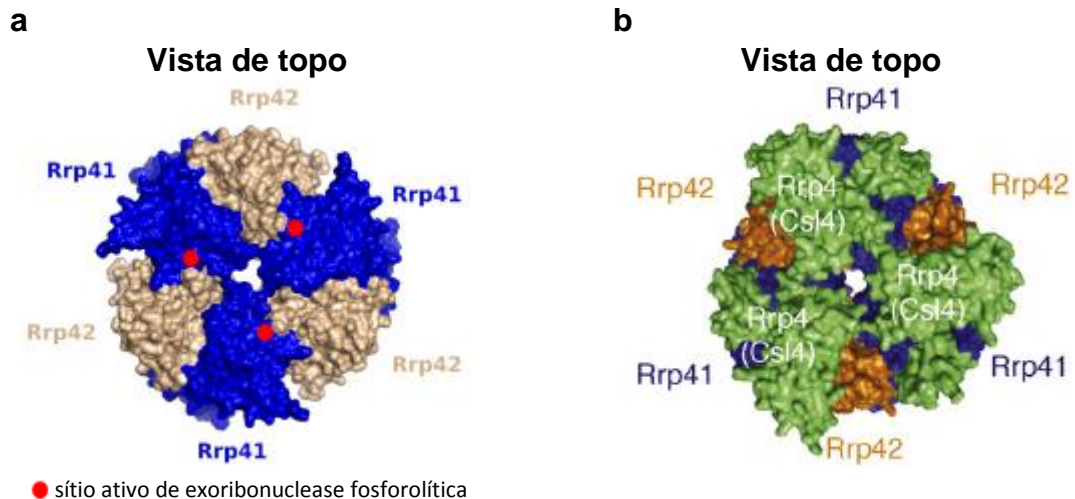


Figura 2. Arquitetura molecular do exossomo de archaea. (a) Representação de superfície do núcleo do exossomo de *Pyrococcus abyssi* (adaptado de NAVARRO et al., 2008). (b) Representação de superfície da estrutura completa do complexo enzimático (SCHMID; JENSEN, 2008).

O arranjo estrutural das três proteínas de topo, também chamado anel de ligação a RNA, possui múltiplos domínios com capacidade de ligação a RNA: aRrp4 possui os domínios de ligação a RNA S1 e KH, enquanto aCsl4, S1 e Fita-Zn (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; JENSEN, 2010) (Figura 3).

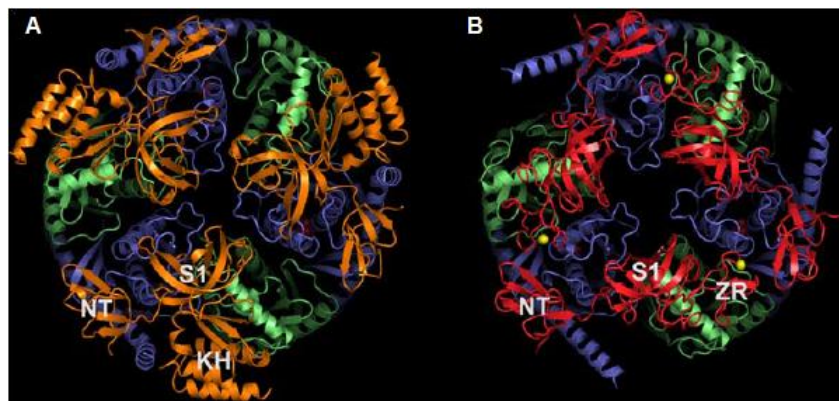


Figura 3. Representação em fita da vista de topo das duas isoformas do exossomo de archaea. Em ambas as isoformas as subunidades aRrp41, em azul, e as aRrp42, em verde, formam o núcleo catalítico. (A) Disposição dos domínios N-terminal (NT), S1 e KH da isoforma aRrp4-exossomo. (B) Disposição dos domínios N-terminal (NT), S1 e Fita-Zinco (ZR) mais os três íons de zinco, em amarelo, da isoforma aCsl4-exossomo (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005).

As subunidades Rrp4 e Csl4 conservadas no exossomo de archaea e em eucariotos (Tabela 1), pela presença dos diferentes domínios KH e Fita-Zn, sugerem diferentes e importantes papéis destas proteínas quanto à especificidade de recrutamento dos substratos, ao modo e velocidade de degradação e na regulação alostérica do núcleo catalítico (HARTUNG et al., 2010; JENSEN, 2010; LEE et al., 2010; ROPPELT; KLUG; EVGUENIEVA-HACKENBERG, 2010).

Estudos mostraram que apesar do núcleo do exossomo de archaea ser o suficiente para a degradação de RNAs, a presença das proteínas de topo aumenta enormemente a especificidade e o recrutamento deles – a isoforma aRrp4-exossomo contribui para a degradação preferencial de RNAs poli(A) enquanto a isoforma aCsl4-exossomo, de RNAs heteropoliméricos – e conseqüentemente, aumenta a eficiência de degradação, permitindo às isoformas a capacidade de se apresentar ora como uma enzima processiva e rápida e ora como uma enzima distributiva e lenta (HARTUNG et al., 2010; LEE et al., 2010; ROPPELT; KLUG; EVGUENIEVA-HACKENBERG, 2010).

Comparação das estruturas cristalinas das duas isoformas do exossomo de archaea revela que, em ambos os casos, elas estão ancoradas ao anel catalítico pelos seus domínios N-terminais e os domínios S1 estão localizados no centro do complexo originando um poro de entrada de 15Å de largura, no caso da isoforma aRrp4-exossomo, e de 18Å, no caso da aCsl4-exossomo. Além disso, elas conferem ao exossomo a capacidade de mudar a forma e o tamanho do canal central de seu núcleo, indicando participação no mecanismo de regulação alostérica (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; JENSEN, 2010).

Não há evidência de variação conformacional para o núcleo do exossomo que se mostra uma estrutura rígida (AUDIN et al., 2013), mas dados estruturais dos

domínios S1 e KH de ligação a RNA mostraram flexibilidade da região S1/KH da aRrp4 (AUDIN et al., 2013; LU; DING; KE, 2010; RAMOS et al., 2006). Análises em solução do exossomo de *Pyrococcus* por meio de SAXS revelaram que as três moléculas da subunidade aRrp4 são ligadas ao anel de RNase PH, possivelmente pelo domínio N-terminal, como “*extended and flexible arms*” (RAMOS et al., 2006, p.6751) que muito provavelmente indicam ser os domínios S1 e KH (JENSEN, 2010).

Os três sítios fosforolíticos idênticos encontrados no exossomo de archaea são formados pela interface entre as subunidades aRrp41 e aRrp42. Ambas as subunidades que formam o anel estão envolvidas na ligação ao substrato, mas os resíduos aminoacídicos carregados positivamente que contribuem para a ligação com os grupos fosfatos nucleofílicos dos substratos encontram-se exclusivamente nas subunidades aRrp41 e por isso, são elas os fatores de processamento de RNAs, as subunidades aRrp42 são cataliticamente inertes, desempenham papel estrutural, proporcionando uma plataforma para a formação do anel, e de auxílio na ligação de substratos (LORENTZEN; BASQUIN; CONTI, 2008; LORENTZEN et al., 2005; NAVARRO et al., 2008) (Figura 4).

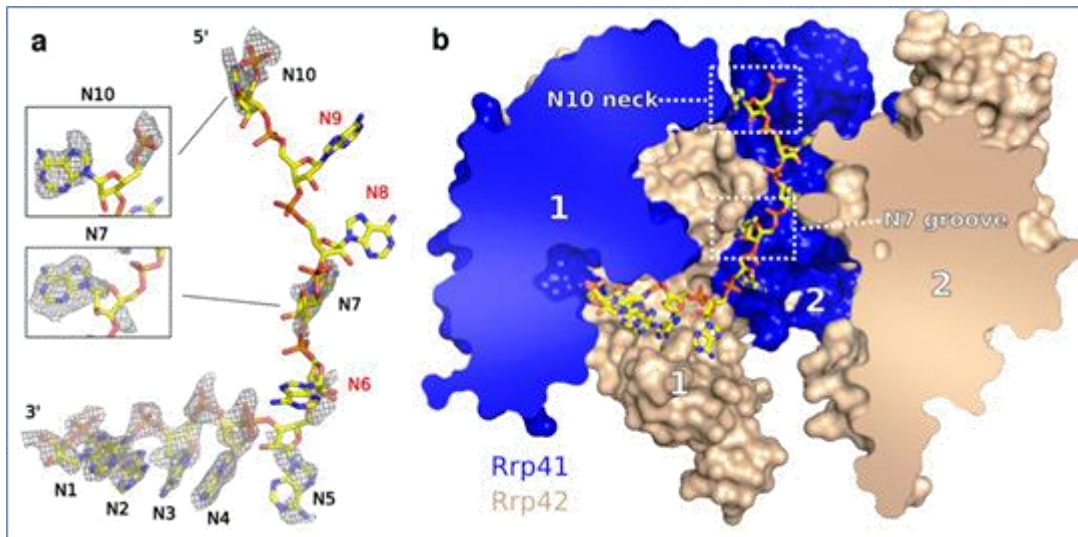


Figura 4. Ligação de RNA composto por 10 resíduos de adenosina ao exossomo de *Pyrococcus abyssi*. (a) Mapa de densidade eletrônica da extremidade do RNA modelo. Em evidência as bases N7 e N10 e seus respectivos sítios de ligação. (b) Estrutura do núcleo do exossomo acomodando o substrato para a degradação. As subunidades Rrp41 e Rrp42 estão coloridas, respectivamente, nas cores azul e marrom, formam um heterodímero marcado com o mesmo número (heterodímero 1 ou 2) e três heterodímeros formam o anel de RNase PH (NAVARRO et al., 2008).

O processo de degradação de RNAs não depende da sequência nucleotídica do substrato, pois as interações eletrostáticas entre as cadeias laterais de arginina, presentes nas subunidades aRrp41, se dão com os grupos fosfatos do esqueleto ribose-fosfato e não com as bases ou com as riboses dos nucleotídeos (LORENTZEN; CONTI, 2005, 2012).

O mecanismo de recrutamento de RNAs pelo exossomo de archaea inicia-se através de interações do substrato com as superfícies de ligação a RNA presentes no topo da estrutura. As superfícies laterais e a de fundo do complexo são negativamente carregadas, o que exclui a interação das moléculas negativas de RNAs com essas regiões, ao passo que as superfícies do poro de entrada e do canal central até os sítios catalíticos são carregadas positivamente (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005).

Através dessas interações, o substrato é direcionado para dentro do canal central onde encontra uma constrição de 8-10Å (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; JENSEN, 2010; LORENTZEN; CONTI, 2005), formada por alças das subunidades aRrp41, responsável por permitir que somente uma fita simples de RNA passe de cada vez, alcance um dos três sítios fosforolíticos e seja degradada (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; LORENTZEN et al., 2007; MALET; LORENTZEN, 2011).

Os sítios ativos das subunidades aRrp41 são formados por dois resíduos conservados de arginina e um resíduo de ácido aspártico. No exossomo de *Pyrococcus abyssi*, os sítios fosforolíticos das subunidades aRrp41 são formados pelos resíduos de arginina Arg⁹⁷ e Arg¹³⁷ e pelo resíduo catalítico Asp¹⁸⁰ (NAVARRO et al., 2008).

A degradação de RNA pelo exossomo de archaea ocorre quando os dois nucleotídeos terminais presentes na extremidade 3' do substrato, N1 e N2 (Figura 5), são ligados diretamente a um dos três sítios ativos e a ligação fosfodiéster entre eles é clivada fosforoliticamente liberando um nucleosídeo difosfato, NDP:

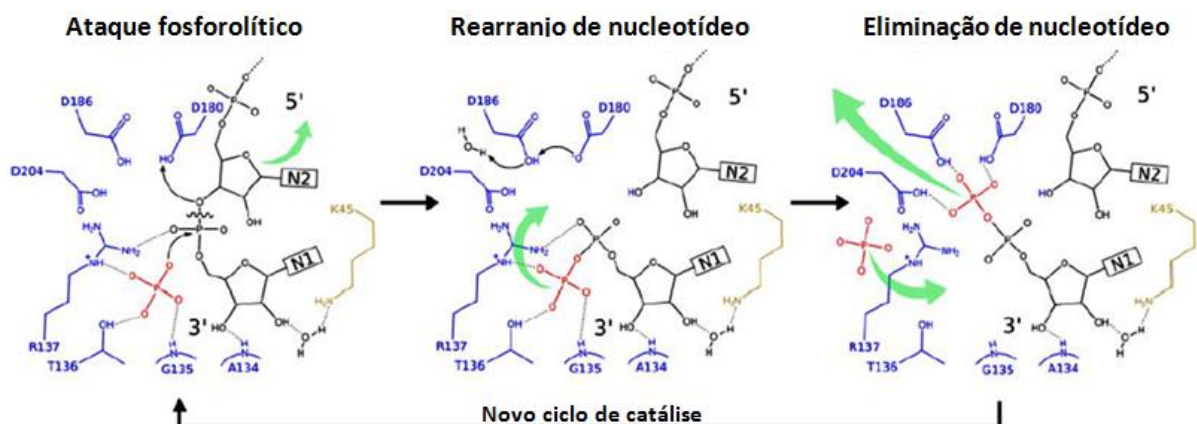
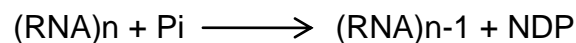


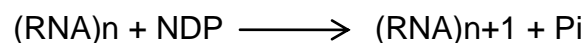
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de processamento de RNA pelo exossomo de *Pyrococcus abyssi*. Pi está colorido em vermelho e as setas verdes indicam o rearranjo estrutural putativamente envolvido no mecanismo (NAVARRO et al., 2008).

A ativação do fosfato inorgânico para o ataque nucleofílico da ligação fosfodiéster terminal é realizada por meio de metal que também é proposto realizar papel estrutural (JENSEN, 2010; LORENTZEN; CONTI, 2012; LORENTZEN et al., 2007).

O produto NDP não é liberado simplesmente por difusão, mas uma mudança conformacional no sítio de ligação de N1 permite um desprendimento controlado do produto através de um canal lateral de cerca de 20Å de comprimento e 12-18Å de largura que conecta o sítio de ligação de N1 com o solvente, por onde simultaneamente é permitida a entrada de um íon fosfato inorgânico (BÜTTNER; WENIG; HOPFNER, 2005; JENSEN, 2010; LORENTZEN; CONTI, 2005; NAVARRO et al., 2008).

Com a liberação do nucleotídeo terminal da extremidade 3' do substrato (N1), o processo de degradação segue com a translocação do substrato no sentido de posicionar o nucleotídeo anterior (N2), que agora passa a ser o terminal, no sítio de ligação a N1. E assim, a degradação prossegue sucessivamente, até restar uma molécula de RNA de quatro a cinco nucleotídeos que perde estabilidade com o sítio catalítico e é liberada do complexo (HARTUNG et al., 2010; LORENTZEN; BASQUIN; CONTI, 2008; NAVARRO et al., 2008).

Em reação reversa à fosforólise, o exossomo de archaea polimeriza pequenas caudas de RNAs sem, contudo, precisar de um molde, e a polimerização segue os mesmos passos descritos acima nos mesmos sítios catalíticos, mas na direção oposta (LEE et al., 2010; PORTNOY; SCHUSTER, 2006; SLOMOVIC et al., 2008). Assim, a reação de polimerização é dependente de NDP:



O mecanismo de regulação das duas funções do exossomo de archaea ainda não está esclarecido, sugere-se que a relação entre os níveis celulares locais de Pi, íon metálico divalente e NDP contribua para determinar se a reação de degradação ou de polimerização prevalecerá em um dado momento, uma vez que mudanças nesses níveis modulam sua atividade *in vitro* (EVGUENIEVA-HACKENBERG et al., 2008; JENSEN, 2010; LEE et al., 2010; RAMOS et al., 2006).

1.2.4 Proteína reguladora PaNip7

Ainda que o mecanismo de regulação das duas atividades do complexo do exossomo de archaea não seja conhecido, sabe-se que suas funções celulares de degradação e polimerização são moduladas pela associação de fatores proteicos adicionais. E, embora pouco se saiba sobre as proteínas reguladoras ou cofatores do exossomo de archaea, existe dentre alguns candidatos plausíveis, a proteína PaNip7, uma proteína monomérica da archaea *Pyrococcus abyssi*, que se liga simultaneamente ao exossomo e a RNAs, preferencialmente em sítios ricos de resíduos de uridina e uridina-adenosina, inibindo fortemente a atividade do complexo enzimático (COLTRI et al., 2007; LUZ et al., 2010).

Nip7 é uma proteína conservada evolutivamente, foi primeiramente identificada em leveduras no complexo pré-60S ribossomal (BASSLER et al., 2001) e posteriormente, também identificada em archaea e humanos (COLTRI et al., 2004; MORELLO et al., 2011). Esta proteína é essencial para a viabilidade celular e é requerida para a eficiente biogênese da subunidade ribossômica 60S em *Saccharomyces cerevisiae* (ZANCHIN et al., 1997). Em humanos, NIP7 é essencial para a biossíntese acurada de rRNAs e a diminuição de sua expressão afeta a proliferação celular (MORELLO et al., 2011).

O estudo estrutural de PaNip7 mostrou que seu domínio alfa-beta C-terminal composto por folhas β , β 8 a β 12, uma α -hélice e uma hélice 3_{10} corresponde ao domínio conservado chamado PUA. Este domínio foi inicialmente descrito em enzimas modificadoras de tRNA e, atualmente, é proposto mediar interações proteína-RNA (COLTRI et al., 2007).

Através de ensaios de interação com RNA, foi confirmado que Nip7 de levedura e a proteína ortóloga PaNip7 da archaea *Pyrococcus abyssi* possuem a habilidade de se ligar aos grupos fosfatos dos esqueletos de ribose-fosfato de RNAs pelo domínio PUA. Em PaNip7, essa interação é feita através de resíduos aminoacídicos carregados positivamente, arginina e lisina, localizados na sua porção C-terminal (Figura 6), enquanto que em Nip7 de eucariotos, em posições equivalentes, estes resíduos são substituídos por aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas (COLTRI et al., 2007).

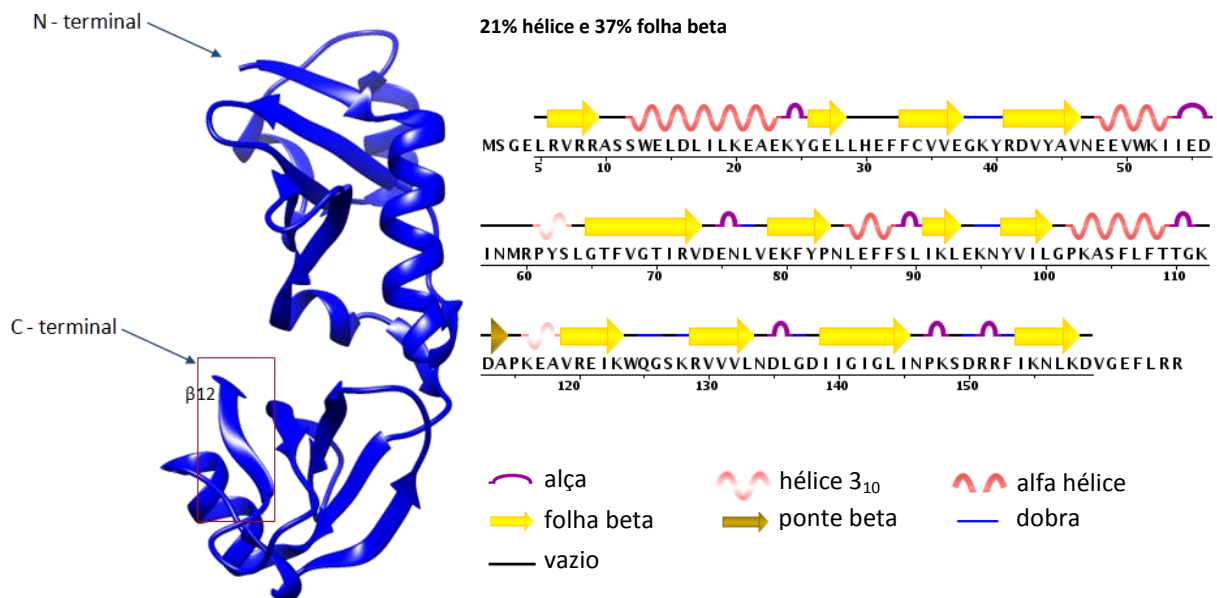


Figura 6. Estruturas terciária (imagem molecular criada usando Chimera, PETERSEN et al., 2004), secundária e primária da proteína PaNip7 (PDB 2P38).

PaNip7 inibe a atividade do complexo de exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi* formado tanto pela proteína de topo PaCsl4 quanto pela PaRrp4, mas inibe mais fortemente o complexo composto pela proteína PaCsl4 indicando que as proteínas de topo podem ser a superfície de interação da PaNip7 no Pa-exossomo (LUZ et al., 2010).

2. OBJETIVOS

Diante da importância biológica e científica do exossomo, o presente projeto teve como objetivo principal estudá-lo por meio da literatura e de técnicas experimentais bioquímicas e de biologia molecular, fazendo-se uso do modelo presente na archaea *Pyrococcus abyssi* e da sua proteína reguladora PaNip7.

Objetivos específicos

Sabendo-se da habilidade de ligação simultânea de PaNip7 a RNAs e ao Pa-exossomo e da maior inibição da isoforma PaCsl4-exossomo pela PaNip7 quando comparada à isoforma PaRrp4-exossomo, este projeto teve como objetivos específicos:

- ▶ análise de interação proteica das proteínas formadoras da isoforma PaCsl4-exossomo e de PaNip7;
- ▶ síntese na sua forma amidada e acetilada, purificação e caracterização química de um fragmento peptídico da região C-terminal de PaNip7 visando futuros estudos de interação com o PaCsl4-exossomo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Material utilizado nos itens de 3.2 a 3.9

Os meios de cultura e soluções foram preparados seguindo protocolos específicos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A cepa de bactéria e os plasmídeos utilizados neste projeto estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Cepa de *E. coli*

Cepa	Genótipo	Fonte
BL21 – Codon – Plus (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B F-ompT hsdS (r _B -m _B ⁻) dcm +Tet ^r gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]*	Stratagene

Tabela 3 - Plasmídeos

Plasmídeos	Características	Fonte
pET28-PaCsl4	PaCsl4, Kan ^R	(LUZ et al., 2010)
pET29-PaRrp41	PaRrp41, Kan ^R	(LUZ et al., 2010)
pAE-PaRrp42	His::PaRrp42, Amp ^R	(LUZ et al., 2010; RAMOS et al., 2004)
pCYTEX-PaNip7	PaNip7, Amp ^R	(COLTRI et al., 2004)

- Material utilizado no item 3.10

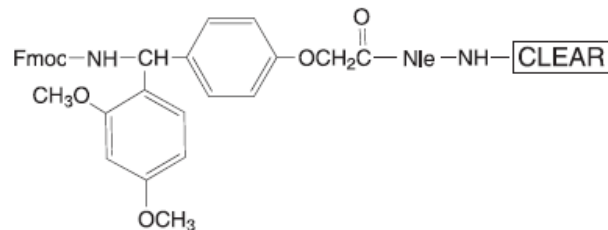
Os derivados de aminoácidos e os reagentes acopladores utilizados na síntese do fragmento peptídico da proteína PaNip7 estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Derivados de aminoácidos e acopladores

Derivados de aminoácidos / Acopladores	Fonte
Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Advanced Chem Tech
Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn-OH	Bachem California (Inc., EUA)
Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH,	Peptide International (Inc., EUA)
Fmoc-Phe-OH	Peptide Institute
DIC, HOBT	Sigma Chemical Co. (EUA)

A resina CLEAR amida (GS = 0,39mmol/g; 100 a 200mesh) utilizada na síntese do peptídeo, baseada no polietilenoglicol formado por ligações cruzadas de acrilato e etoxilato, foi adquirida da Peptide International, Inc., EUA (Figura 7).

A) Resina CLEAR amida



B) CLEAR

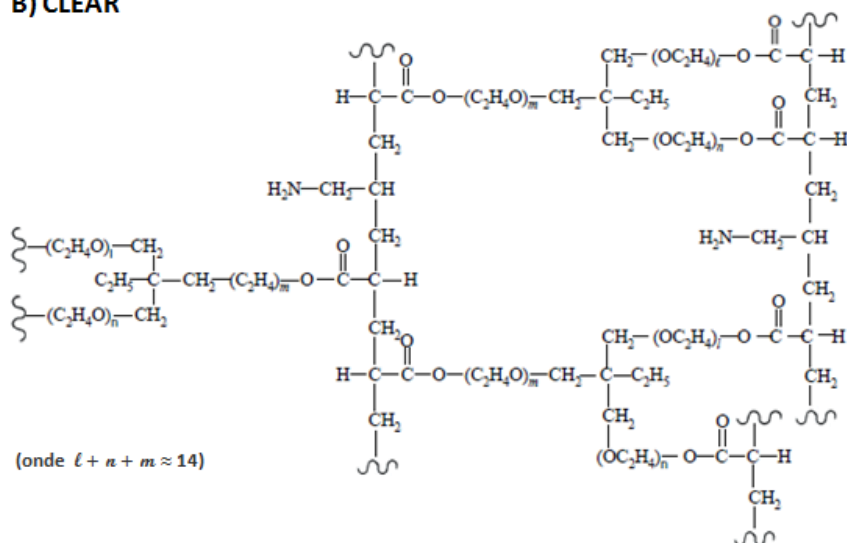


Figura 7. (A) Estrutura da resina CLEAR amida protegida com o grupo Fmoc. (B) Estrutura da CLEAR resultante da copolimerização de etoxilato de trimetilolpropano com metacrilato de polietilenoglicol-etil-éter.

Os solventes DMSO, NMP, isopropanol, DMF, piperidina, anidrido acético, TFA, TIS e éter diisopropílico eram de grau analítico ou de síntese, provenientes da Merck KgaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA) ou da Applied Biosystems (EUA), empregados na síntese, clivagem e precipitação do peptídeo sem qualquer tratamento prévio.

Para monitoramento dos acoplamentos e das desproteções foram empregadas as misturas comerciais da Applied Biosystems (EUA) de grau síntese: fenol/etanol 76% (v/v), cianeto de potássio/piridina 0,0002M e ninidrina/etanol 0,28M.

Na preparação dos eluentes para RP-HPLC e LC/ESI-MS foram utilizados ACN da Vetec Química Fina Ltda e TFA da Merck KGaA (Alemanha) ambos de grau espectroscópico.

3.2 Preparação de células BL21 competentes de *E. coli* com CaCl₂

Uma colônia isolada da bactéria foi inoculada em 2mL de meio de cultura LB, mantida em agitação constante e incubada por um período de 12 a 16h a 37°C para formar o pré-inóculo. Passado esse período, 1mL do pré-inóculo foi adicionado a 100mL de meio de cultura LB e as células foram mantidas nessa cultura nas mesmas condições de agitação e temperatura, por aproximadamente 2h, até atingirem uma OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 quando foram transferidas para tubos de centrifuga e incubadas no gelo por 10min.

Em seguida, as células foram submetidas à centrifugação a 4000rpm por 10min a 4°C, o sobrenadante foi descartado, os tubos de centrifuga foram vertidos em folhas de papel por 1min para retirada do meio de cultura restante e as células coletadas foram ressuspensas em 50mL de solução 0,1M CaCl₂ recém-preparada, esterilizada e gelada. Nova incubação no gelo foi realizada por 1h, seguida de

centrifugação e ressuspensão das células em 5mL de solução recém-preparada, esterilizada e gelada contendo 0,1M CaCl₂ e 15% de glicerol. Então, as células foram divididas em alíquotas de 50 e 100µL, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Para testar a eficiência das células BL21 competentes recém-preparadas, uma alíquota de 50µL das células foi submetida à transformação bacteriana, por choque térmico, utilizando 10ng do DNA plasmidial da proteína PaNip7 e outra alíquota, de igual volume de células, foi submetida às mesmas condições experimentais de transformação, sem que a ela tenha sido adicionado o DNA plasmidial. Ambas as alíquotas foram espalhadas em placas de LB/ágar que continham os antibióticos cloranfenicol e ampicilina e reservadas à temperatura ambiente por um período de 12 a 16h (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Por comparação das placas pôde-se observar o crescimento bacteriano na placa com o DNA plasmidial e a ausência de crescimento bacteriano na placa sem o DNA, indicando a eficiência da bactéria em receber o DNA plasmidial e sobreviver ao meio rico em antibiótico.

3.3 Transformação das células BL21 competentes de *E. coli*

3.3.1 Transformação com os DNAs plasmidiais PaRrp41 (pET29 – Kan^R) e PaRrp42 (pAE – Amp^R)

Uma alíquota de 100µL das células competentes foi homogeneizada com 10ng do plasmídeo PaRrp41 (pET29 – Kan^R) e 10ng do plasmídeo PaRrp42 (pAE – Amp^R) e incubada no gelo por 30min. Em seguida, foi transferida para uma temperatura de 42°C por 2min e, portanto, submetida a choque térmico.

Após o choque térmico, foi adicionado 1mL de meio de cultura LB e as células cresceram por 1h a 37°C, quando foram transferidas diretamente para o volume de 10mL de LB contendo os antibióticos cloranfenicol (C = 170µg/mL), ampicilina (C = 50µg/mL) e kanamicina (C = 50µg/mL) para a seleção das bactérias transformantes e formação do pré-inóculo por 12 a 16h (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3.2 Transformação com os DNAs plasmidiais PaRrp42 (pAE – Amp^R) e PaCsl4 (pET28 – Kan^R)

Uma alíquota de 100µL das células competentes foi homogeneizada com 10ng do plasmídeo PaRrp42 (pAE – Amp^R) e 10ng do plasmídeo PaCsl4 (pET28 – Kan^R) e incubada no gelo por 30min. Em seguida, foi transferida para uma temperatura de 42°C por 2min para ser submetida a choque térmico.

Após o choque térmico, foi adicionado 1mL de meio de cultura LB e as células cresceram por 1h a 37°C, quando foram transferidas diretamente para o volume de 10mL de LB contendo os antibióticos cloranfenicol (C = 170µg/mL), ampicilina (C = 50µg/mL) e kanamicina (C = 50µg/mL) para a seleção das bactérias transformantes e formação do pré-inóculo por 12 a 16h (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3.3 Transformação com o DNA plasmidial PaNip7 (pCYTEX – Amp^R)

Uma alíquota de 100µL das células competentes foi homogeneizada com 20ng do plasmídeo PaNip7 (pCYTEX – Amp^R) e incubada no gelo por 30min. Em seguida, foi transferida para uma temperatura de 42°C por 2min para ser submetida a choque térmico.

Após o choque térmico, foi adicionado 1mL de meio de cultura LB e as células cresceram por 1h a 30°C, quando foram transferidas diretamente para o volume de 10mL de LB contendo os antibióticos cloranfenicol (C = 170µg/mL) e ampicilina (C = 50µg/mL) para a seleção das bactérias transformantes e formação do pré-inóculo por 12 a 16h (adaptado de: COLTRI et al., 2004; SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.4 Indução de expressão das proteínas recombinantes

3.4.1 Indução das proteínas PaRrp41 e PaRrp42

O pré-inóculo obtido a partir da co-expressão das proteínas PaRrp41 e PaRrp42 em células de *E. coli* BL21 foi utilizado para inocular 2L de LB. As células foram, então, crescidas a 37°C até atingir OD₆₀₀ = 0,5, quando foram induzidas por adição de 0,5mM IPTG e colocadas sob agitação constante por 4h (adaptado de LUZ et al., 2010).

3.4.2 Indução das proteínas PaRrp42 e PaCsl4

O pré-inóculo obtido a partir da co-expressão das proteínas PaRrp42 e PaCsl4 em células de *E. coli* BL21 foi utilizado para inocular 2L de LB. As células foram, então, crescidas a 37°C até atingir OD₆₀₀ = 0,5, quando induzidas por adição de 0,5mM IPTG e colocadas sob agitação constante por 4h (adaptado de LUZ et al., 2010).

3.4.3 Indução da proteína PaNip7

O pré-inóculo obtido a partir da expressão isolada da proteína PaNip7 em células de *E. coli* BL21 foi utilizado para inocular 2L de LB. As células foram, então,

crescidas a 30°C até atingir $OD_{600} = 0,5$, quando induzidas por aumento de temperatura a 42°C e colocadas sob agitação constante por 12 a 16h (adaptado de COLTRI et al., 2004).

3.4.4 Coleta das células transformadas

Após o período de indução de todas as proteínas descrito acima, as células foram submetidas à centrifugação a 10000rpm por 10min a 4°C, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em água Milli-Q autoclavada e submetidas a nova centrifugação a 4000rpm por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram coletadas.

3.4.5 Análise de indução das proteínas

Em todos os processos de indução acima descritos, após atingir $OD_{600} = 0,5$ e antes da indução das proteínas, foi recolhida uma alíquota de 1mL de células que serviu como parâmetro de não indução; e, após o período de indução, novamente foi medida a OD_{600} e recolhida outra alíquota de 1mL de células que serviu como parâmetro de indução.

A análise de indução de todas as proteínas foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, em condição redutora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Todos os géis foram preparados com 15% de poliacrilamida. A quantidade de células aplicadas no gel foi a mesma para ambas as amostras de indução e não indução, calculada a partir dos respectivos valores de OD_{600} .

3.5 Lise das células transformadas (Prensa Francesa)

As células foram ressuspensas em 10mL das respectivas soluções tampão descritas abaixo, requeridas na posterior etapa de purificação, contendo 1mg de lisozima. Após ressuspensão, as células foram mantidas em gelo por 1h e então, lisadas por prensa mecânica.

❖ Solução tampão utilizada na co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42:
Tampão A = 30mM Tris-HCl pH = 8,0, 500mM NaCl, 5mM β -mercaptoetanol e 5mM imidazol (adaptado de LUZ et al., 2010).

❖ Solução tampão utilizada na co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4:
Tampão A.

❖ Solução tampão utilizada no primeiro estágio de purificação da proteína PaNip7:
Tampão B = 10mM Tris-HCl pH = 7,0, 50mM NaCl, 10mM EDTA e 1mM PMSF (adaptado de COLTRI et al., 2004).

3.6 Tratamento térmico do lisado

Por ser tratar de proteínas provenientes de organismo hipertermófilo, a primeira estratégia empregada para suas purificações foi aquecer o extrato bruto para desnaturar as proteínas de *E. coli* sem contudo, danificar as proteínas recombinantes de interesse.

As células lisadas que continham as proteínas PaRrp41, PaRrp42 e PaCsl4 foram colocadas por 30min, em banho-maria previamente aquecido a 80°C, e as células que continham a proteína PaNip7 foram colocadas por igual período, em banho-maria previamente aquecido a 65°C. Após o período de aquecimento, todas as células lisadas foram mantidas em gelo por 15min.

Em seguida, as células foram submetidas à centrifugação a 15000rpm por 30min a 4°C para que o material bacteriano desnaturado pudesse ser separado das proteínas da archaea que estavam solúveis no sobrenadante.

Logo após, o sobrenadante foi coletado e filtrado para ser usado na posterior etapa de purificação, e o precipitado, descartado. Do sobrenadante filtrado, foi separada uma alíquota de 100µL que serviu como parâmetro de comparação, extrato proteico total, na técnica de SDS-PAGE, frente às outras soluções proteicas coletadas após etapa de purificação.

3.7 Purificação das proteínas recombinantes

3.7.1 Co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42

As proteínas PaRrp41 e PaRrp42 foram co-purificadas em sistema FPLC de cromatografia (*Fast Protein Liquid Chromatography* – AKTA) utilizando uma coluna de afinidade Hi Trap Chelating HP (GE Healthcare) niquelada, equilibrada com tampão A. A eluição foi obtida com gradiente de 0, 8, 50 e 100% de 500mM imidazol e fluxo de 1mL/min. O resultado da purificação foi analisado pelo perfil cromatográfico e através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, em condição redutora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.7.2 Co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4

As proteínas PaRrp42 e PaCsl4 foram co-purificadas e analisadas utilizando procedimento, solução tampão e equipamento anteriores de co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42.

3.7.3 Purificação da proteína PaNip7

A proteína PaNip7 foi purificada em dois estágios utilizando o sistema FPLC de cromatografia. Primeiramente, por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna Hi Trap Heparin HP (GE Healthcare) equilibrada em tampão B. A eluição foi obtida com gradiente linear de 0-1M de NaCl e fluxo de 0,7mL/min. O resultado da purificação foi analisado pelo perfil cromatográfico e através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, em condição redutora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

O segundo estágio de purificação foi realizado por cromatografia de exclusão por tamanho, utilizando uma coluna Superdex 75 HR26/60 (Amersham Biosciences) pré-equilibrada com 150mM NaCl e 10mM Tris-HCl pH = 7,0, com fluxo de 0,7mL/min e analisado por comparação de seu perfil cromatográfico de purificação com o de marcadores de baixa massa molecular do kit de calibração para gel filtração da Amersham Biosciences e através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, em condição redutora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.8 Quantificação das proteínas recombinantes

As proteínas foram quantificadas em triplicata pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) com medida de absorbância a 595nm. BSA (Amresco), albumina sérica bovina, e as respectivas soluções tampão usadas na etapa de purificação foram utilizadas para construção das curvas padrão.

3.9 Reconstituição do Pa-exossomo *in vitro*

Para reconstituir o exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi* foram misturados 4mL ($C_{total} = 1,7\text{mg/mL}$) da amostra purificada referente às proteínas PaRrp41 e PaRrp42 com 4mL ($C_{total} = 4,0\text{mg/mL}$) da amostra purificada referente às proteínas PaRrp42 e PaCsl4. O processo de incubação das proteínas foi realizado por período de 30 min, à temperatura ambiente.

Após incubação, foi realizada purificação do complexo em sistema FPLC de cromatografia utilizando uma coluna de afinidade Hi Trap Chelating HP (GE Healthcare) niquelada, equilibrada com tampão A. A eluição de 8mL da solução proteica resultante foi obtida com gradiente de 0, 8, 50 e 100% de 500mM imidazol e fluxo de 1mL/min. O resultado da purificação foi analisado pelo perfil cromatográfico e através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, em condição redutora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Seguida à purificação do complexo por cromatografia de afinidade, foi realizada sua eluição por cromatografia de exclusão por tamanho em sistema FPLC de cromatografia utilizando uma coluna Superose 6 HR10/300 (GE Healthcare) pré-equilibrada em tampão 50mM Tris-HCl pH = 8,0 e 150mM KCl, com 300 μL da amostra anteriormente purificada e fluxo de 0,3mL/min. O resultado da formação do complexo foi analisado por comparação do perfil cromatográfico do complexo com o de marcadores de baixa e alta massas moleculares do kit de calibração para gel filtração da Amersham Biosciences e através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, em condição redutora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.10 Síntese, clivagem da resina e desproteção total, purificação e caracterização química do fragmento peptídico da proteína PaNip7

A obtenção do fragmento peptídico de interesse, desde sua síntese até sua purificação e caracterização química, foi realizada com a colaboração da Profa. Dra. Maria Terêsa Machini – Laboratório de Química de Peptídeos, LQP – IQ USP.

O fragmento peptídico localizado na porção C-terminal, correspondente à posição 149-161 (SDRRFIKNLKDVG) da sequência da proteína reguladora PaNip7 (Figura 6) foi sintetizado na sua forma acetilada e amidada, passo a passo, manualmente, pelo método de SPFS utilizando a estratégia Fmoc e com aquecimento convencional a 60°C (LOFFREDO et al., 2009; VARANDA; MIRANDA, 1997). Uma vez acoplado e desprotegido o último resíduo de aminoácido (N-terminal da sequência desejada) foi realizada reação de acetilação por 5min em solução 50% anidrido acético/(20%DMSO-80%NMP) e, após drenagem da solução reacional e lavagens da peptidil-resina para teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) que confirmou êxito na acetilação, a peptidil-resina acetilada foi seca por 2h sob vácuo, pesada para averiguar o ganho de massa e estocada a 4°C.

A massa total de 275mg de peptidil-resina foi colocada em 2,75mL de solução de clivagem composta por 95%TFA/2,5%TIS/água. A mistura foi colocada a 60°C por 2-3h a 400-450rpm. Após precipitação do peptídeo do meio reacional com éter diisopropílico gelado foi feita a solubilização do mesmo, a solução obtida foi liofilizada e a massa sólida pesada.

O peptídeo bruto foi analisado por RP-HPLC utilizando um sistema da Waters composto por duas bombas (Waters 510), um detector UV (Waters 486), um injetor de amostras manual (Rheodyne 7125), um controlador de gradiente automatizado, um integrador (Waters 745B Data Module) e uma coluna C18 Vydac (5µm, 300Å,

0,45cm x 25cm). As condições de análise foram: 25µL da solução peptídica 1mg/mL, 0,1%TFA/água como solvente A, 40%ACN/0,09%TFA/água como solvente B, gradiente de 5 a 95%B em 30min, coluna C18 analítica, λ de 210nm e fluxo de 1mL/min.

O peptídeo bruto foi purificado por RP-HPLC utilizando um sistema da Waters composto por uma bomba quaternária (Waters Delta 600), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado, um registrador (Kipp & Zonen SE 124) e uma coluna C18 Vydac (10µm, 300Å, 2,2cm x 25cm) a partir de 28,5mL de amostra peptídica 1,5mg/mL usando os solventes A e B citados acima, gradiente de 30 a 70%B em 90min, coluna C18, λ de 210nm e fluxo de 10mL/min.

A caracterização do peptídeo purificado foi realizada em um sistema de RP-HPLC Shimadzu, acoplado a espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray. Os espectros foram analisados quanto às suas massas molares esperadas pelo software da *Peptide Companion*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As etapas anteriores à purificação das proteínas (preparo de meios de cultura e soluções; preparação e transformação das células BL21 competentes de *E. coli*; indução de expressão das proteínas recombinantes; lise das células transformadas e tratamento térmico do lisado) foram realizadas seguindo as respectivas metodologias descritas nos itens de 3.1 a 3.6.

4.1 Co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42

Através da tecnologia do DNA recombinante foi possível a incorporação de resíduos de histidina consecutivos (cauda de His) na porção N-terminal da proteína PaRrp42 conferindo a ela possibilidade de purificação por cromatografia de afinidade com íons metálicos. Esta cauda fornece à proteína a capacidade de interação multipontos dos nitrogênios aromáticos dos grupos imidazóis dos resíduos de histidina com os íons metálicos Ni^{2+} imobilizados na fase estacionária e conseqüentemente, facilidade de purificação (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

A escolha pelo processo de co-purificação das proteínas formadoras do anel de RNase PH foi feita levando-se em consideração a estável interação entre elas (NAVARRO et al., 2008; RAMOS et al., 2006) e a especificidade de interação de PaRrp42 à coluna niquelada.

Dessa maneira, a Figura 8 mostra o perfil de eluição no processo de co-purificação das proteínas PaRrp41 e PaRrp42 formadoras do anel PH e posterior análise por SDS-PAGE, conforme procedimento descrito em 3.7.1.

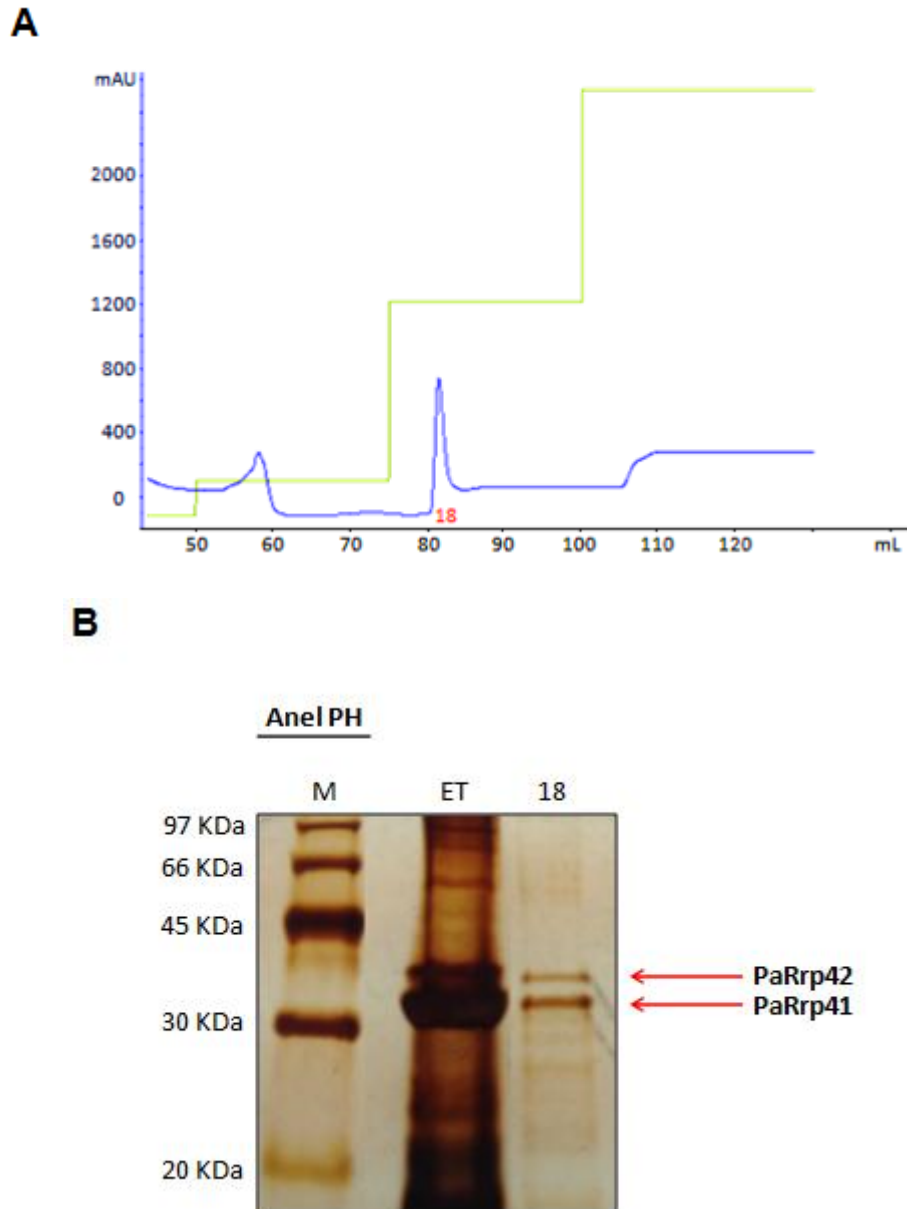


Figura 8. (A) Perfil cromatográfico das proteínas PaRrp41 e PaRrp42 registrado em coluna de níquel e solução tampão 30mM Tris-HCl pH = 8,0, 500mM NaCl, 5mM β -mercaptoetanol e 5mM imidazol. Eluição com gradiente 0, 8, 50 e 100% de 500mM imidazol (—), $\lambda = 280\text{nm}$ (—), fração coletada (—) e fluxo = 1,0mL/min. **(B)** Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Análise da fração 18 por SDS-PAGE em condição redutora. M = marcador de massa molecular e ET = extrato proteico total.

A Figura 8A mostrou que os dímeros que compõem o anel do exossomo foram totalmente eluídos no patamar que corresponde ao gradiente de 50% de imidazol e eficientemente co-purificados; a eficiência de co-purificação foi

evidenciada em uma única etapa e resultou em alto grau de pureza. A análise da fração 18 da Figura 8B, por SDS-PAGE, confirmou que as proteínas isoladas correspondiam às proteínas de interesse, uma vez que a proteína PaRrp41 é composta por 249 resíduos de aminoácidos totalizando massa teórica de 27,4KDa e a proteína PaRrp42 por 277 resíduos aminoacídicos que constroem uma estrutura de massa teórica de 30,5KDa.

A concentração proteica da solução resultante purificada dos dímeros, de 4mL, foi igual a 1,7mg/mL, medida segundo procedimento descrito em 3.8. Assim, com o procedimento experimental adotado foi possível obter, no total, 6,8mg das proteínas PaRrp41 e PaRrp42 a partir de 2L de cultura celular, confirmando a eficiência de co-expressão e co-purificação das proteínas formadoras do anel da RNase PH (LUZ et al., 2010; NAVARRO et al., 2008; RAMOS et al., 2006).

4.2 Co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4

Diante das mesmas características de estabilidade proteica das proteínas formadoras do anel de RNase PH e especificidade de interação de PaRrp42 à coluna de níquel, também foi escolhido realizar o processo de co-purificação para as proteínas PaRrp42 e PaCsl4 através de cromatografia de afinidade.

A Figura 9 mostra o perfil de eluição no processo de co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4 e posterior análise por SDS-PAGE, conforme método descrito em 3.7.2.

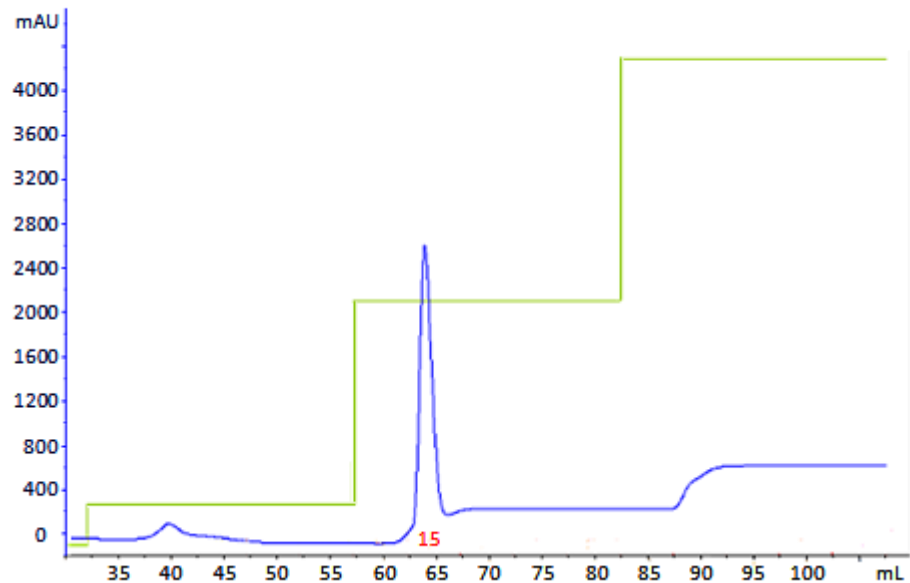
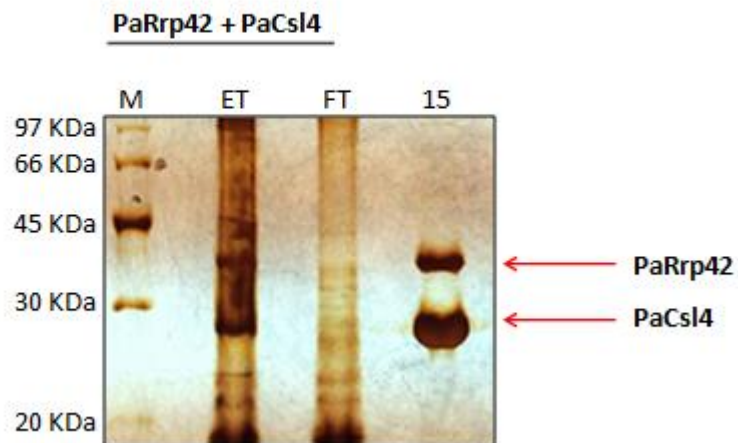
A**B**

Figura 9. (A) Perfil cromatográfico das proteínas PaRrp42 e PaCsl4 registrado em coluna de níquel e solução tampão 30mM Tris-HCl pH = 8,0, 500mM NaCl, 5mM β -mercaptoetanol e 5mM imidazol. Eluição com gradiente 0, 8, 50 e 100% de 500mM imidazol (—), $\lambda = 280\text{nm}$ (—), fração coletada (—) e fluxo = 1,0mL/min. (B) Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Análise da fração 15 por SDS-PAGE em condição redutora. M = marcador de massa molecular, ET = extrato proteico total e FT = material não ligado à coluna.

Os dados da Figura 9A mostraram que as proteínas PaRrp42 e PaCsl4 foram totalmente eluídas no patamar que corresponde a 50% do gradiente de imidazol,

eficientemente co-purificadas em uma única etapa resultando em solução proteica de alto grau de pureza, assim como ocorreu com as proteínas PaRrp41 e PaRrp42.

As duas bandas encontradas na Figura 9B, referentes à análise por SDS-PAGE da fração 15 da Figura 9A, confirmaram que as proteínas isoladas correspondiam às proteínas de interesse, visto que a proteína PaCsl4 apresenta 199 resíduos de aminoácidos em sua constituição caracterizando estrutura de massa teórica de 21,9KDa e, que a proteína PaRrp42, como já mencionado, constituída por 277 resíduos aminoacídicos, totaliza estrutura de 30,5KDa. Vale ressaltar a comparação entre a banda do ET com a do FT, da Figura 9B, que não deixa dúvidas quanto à eficiente adsorção de PaRrp42 à coluna de níquel de forma associada à PaCsl4 e sua posterior dessorção por agente competidor, indicando ser positiva a condição experimental adotada.

A quantificação da solução obtida após co-purificação de PaRrp42 e PaCsl4, de 4mL, segundo descrito em 3.8, resultou em 4,0mg/mL. Portanto, observa-se que a proteína PaCsl4 co-expressa com a proteína PaRrp42 apresentou elevado nível de expressão e que a partir de 2L de cultura celular foi possível obter, no total, 16mg destas proteínas. Assim, do mesmo modo que a anterior, a co-purificação das proteínas PaRrp42 e PaCsl4 também foi eficiente e resultou em significativa quantidade proteica.

4.3 Purificação da proteína PaNip7

Sabendo-se que PaNip7 apresenta o domínio PUA de interação proteína-RNA, o método escolhido para sua purificação foi o de cromatografia de afinidade com uso de coluna de heparina, devido ao alto conteúdo de grupos sulfatos aniônicos presentes na fase estacionária que mimetizam a estrutura polianiônica do

ácido nucleico e, portanto, confere à coluna capacidade de interação com proteínas de ligação a ácidos nucleicos.

A Figura 10 mostra o perfil de eluição na primeira etapa de purificação da proteína PaNip7 e posterior análise por SDS-PAGE, conforme método descrito no item 3.7.3.

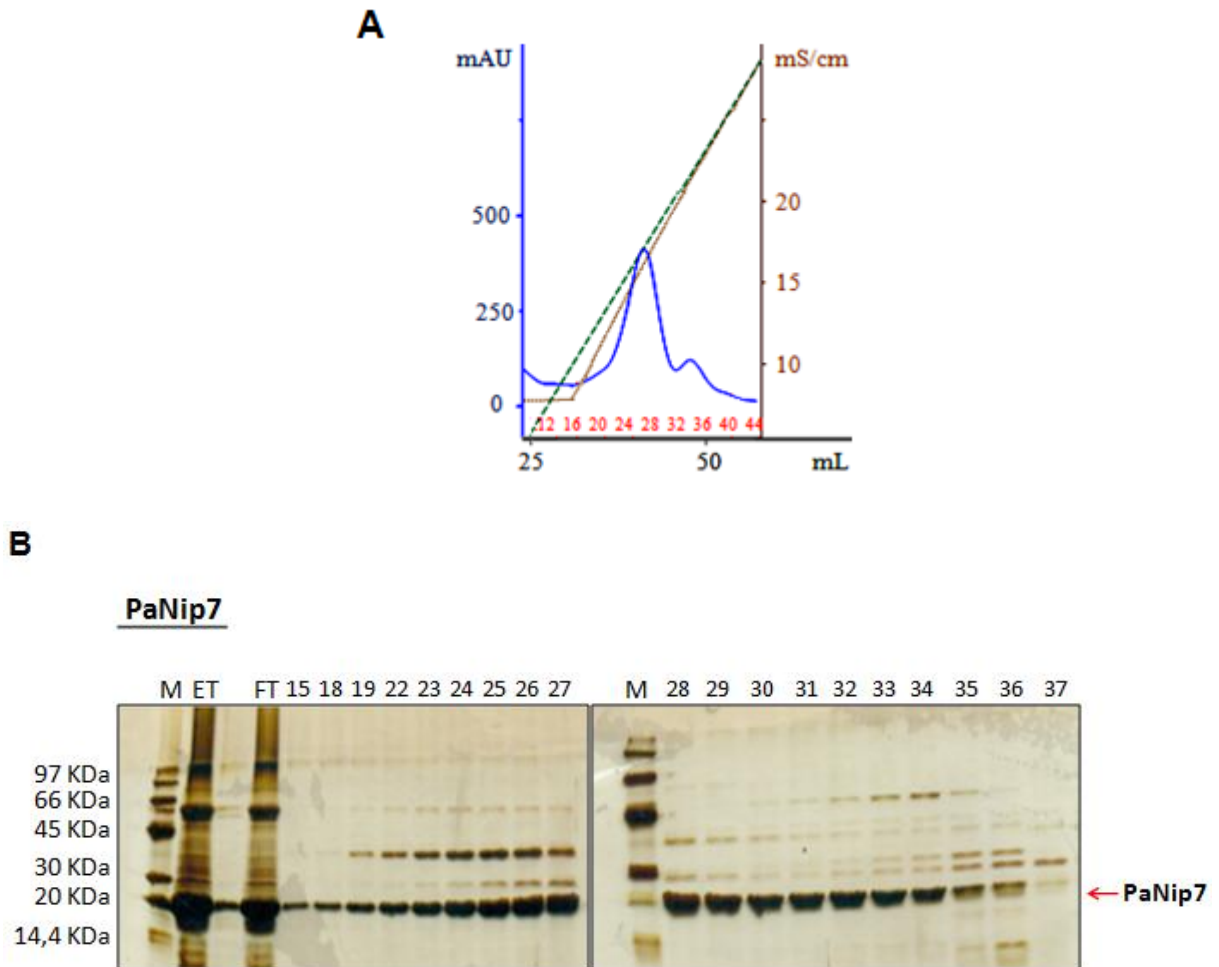
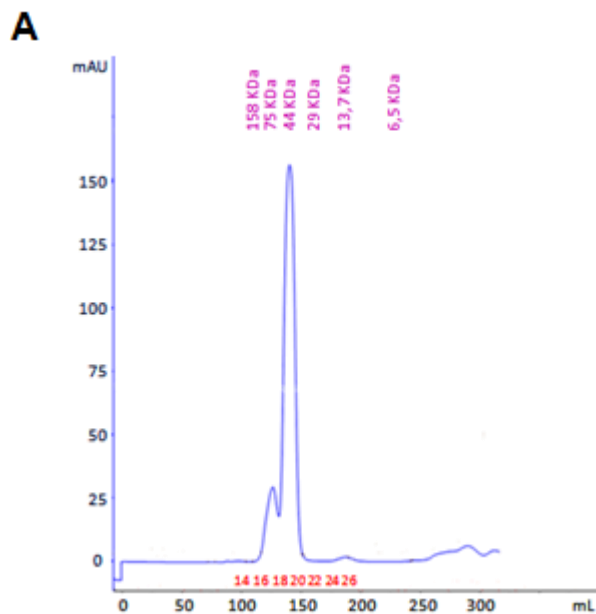


Figura 10. (A) Perfil cromatográfico da proteína PaNip7 registrado em coluna de heparina e solução tampão 10mM Tris-HCl pH = 7,0, 50mM NaCl, 10mM EDTA, 1mM PMSF. Eluição com gradiente linear 0–1M NaCl (—), $\lambda = 280\text{nm}$ (—), frações coletadas(—), condutância (—) e fluxo = 0,7mL/min. (B) Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Análise das frações 15, 18-19, 22-37 por SDS-PAGE em condição redutora. M = marcador de massa molecular, ET = extrato proteico total e FT = material não ligado à coluna.

Na Figura 10B foi observada a presença de bandas condizentes com o valor de massa molecular teórica de 19.291,38Da apresentada para PaNip7 (COLTRI et al., 2004), indicando obtenção de satisfatória purificação da proteína com as condições experimentais adotadas.

Contudo, para alcançar melhores medidas qualitativas, o processo de purificação de PaNip7 seguiu com a tentativa de um segundo estágio de purificação. Então, foram reunidos e reprocessados no segundo ensaio de purificação os volumes das frações 22-33, frações que simultaneamente indicavam ter maior conteúdo da proteína PaNip7 e menor conteúdo de outras proteínas contaminantes.

A Figura 11 mostra o perfil de eluição no segundo estágio de purificação da proteína PaNip7 e posterior análise por SDS-PAGE, conforme método descrito no item 3.7.3.



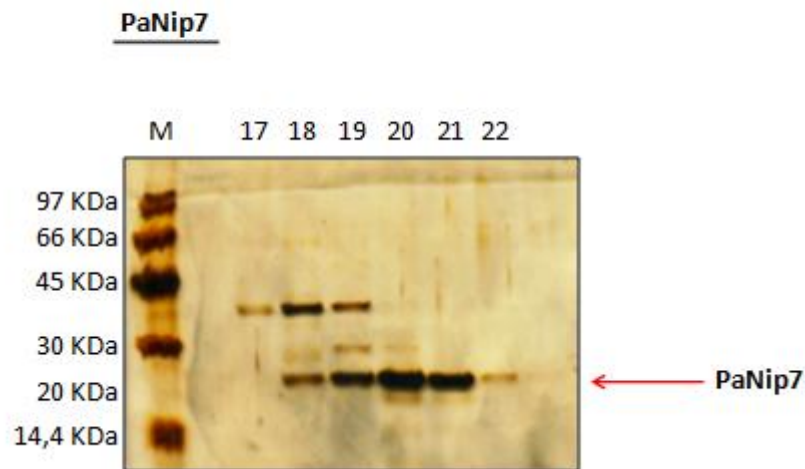
B

Figura 11. (A) Perfil cromatográfico da proteína PaNip7 registrado em coluna Superdex 75 HR26/60 e solução tampão 10mM Tris-HCl pH = 7,0 e 150mM NaCl. $\lambda = 280\text{nm}$ (—), frações coletadas (—) e fluxo = 0,7mL/min. As massas moleculares dos padrões de calibração estão na parte superior do gráfico e indicam respectivamente: aldolase, 158KDa; conalbumina, 75KDa; ovalbumina, 44KDa; anidrase carbônica, 29KDa; ribonuclease A, 13,7KDa e aprotinina, 6,5KDa. (B) Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Análise das frações 17-22 por SDS-PAGE em condição redutora. M = marcador de massa molecular.

Os dados da Figura 11 mostraram obtenção de melhor purificação da proteína PaNip7 a partir do segundo estágio de purificação. A comparação da faixa de volume de eluição da proteína PaNip7 com as correspondentes faixas de eluição do marcador industrial na Figura 11A mostrou que a amostra proteica apresentou massa molecular próxima ao padrão de 44KDa, possivelmente devido à ocorrência de uma dimerização, já que dentre a sequência dos 166 resíduos de aminoácidos da PaNip7 (Figura 6) existe resíduo de cisteína capaz de formar ligação dissulfeto.

Ao final, foram obtidos 2mL totais de solução proteica purificada de concentração igual a 1,1mg/mL, medida segundo procedimento descrito em 3.8. A expressão em 2L de cultura resultou 2,2mg de proteína de elevado grau de pureza,

indicando eficiente purificação e satisfatória quantidade da proteína reguladora PaNip7.

4.4 Reconstituição do Pa-exossomo *in vitro*

Com a tentativa de reconstituir o exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi*, previamente foi realizada análise de quantificação relativa, por SDS-PAGE em condição redutora, entre as soluções proteicas purificadas das subunidades formadoras do PaCsl4-exossomo, uma vez que tais proteínas foram co-quantificadas pelo método de Bradford resultando em valores de concentração do conjunto proteico e não de cada proteína isolada. A Figura 12 mostra a análise relativa volumétrica realizada por SDS-PAGE.

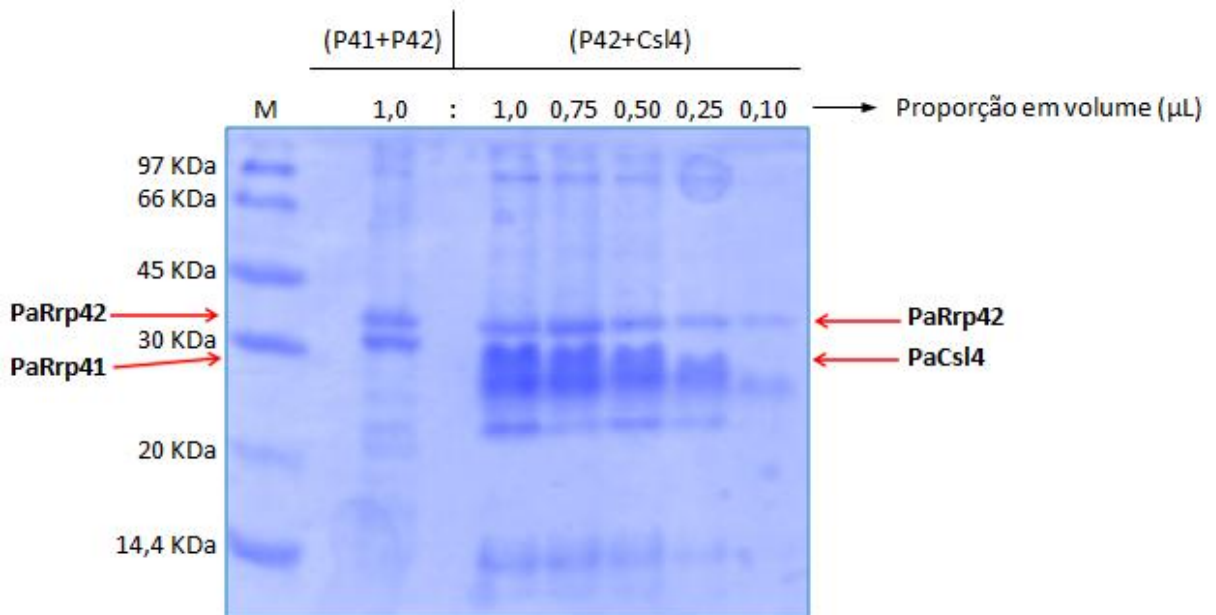


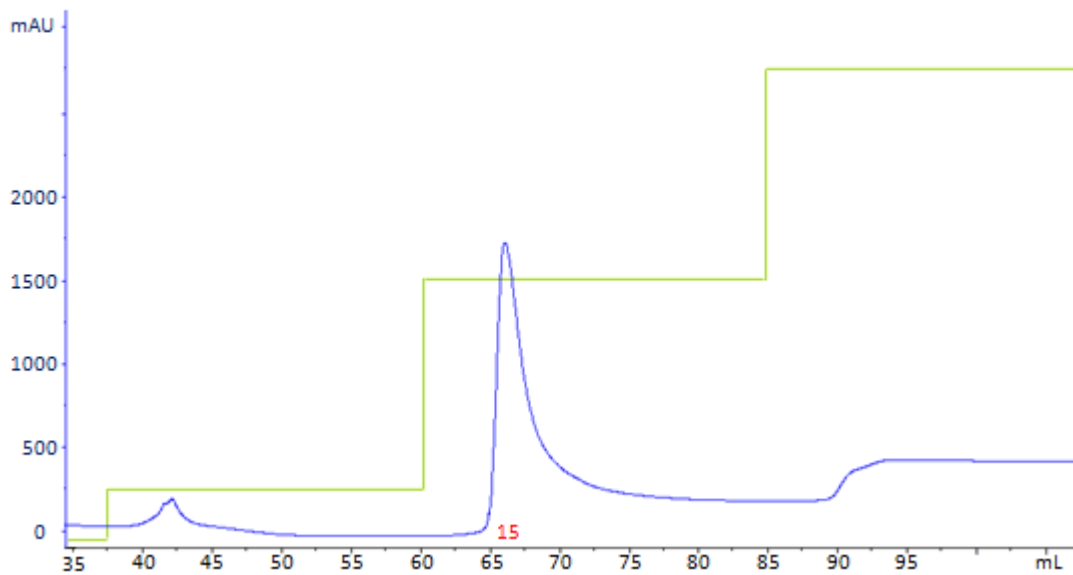
Figura 12. Análise relativa por SDS-PAGE em condição redutora entre as soluções proteicas purificadas das subunidades formadoras do PaCsl4-exossomo. Gel de poliácridamida 15% corado com coomassie blue. M = marcador de massa molecular.

Baseando-se na comparação de intensidade e tamanho da banda de PaRrp41 com as de PaRrp42 na Figura 12, optou-se por juntar volumes iguais das

soluções proteicas co-purificadas para a tentativa de formação *in vitro* do PaCsl4-exossomo, já que a proporção 1:1 (v/v) indicou intensidade e tamanho semelhantes destas bandas e portanto, quantidades equivalentes destas proteínas, configurando condição adequada para formação do anel PH, além de excesso de PaCsl4, assegurando quantidade suficiente da proteína de topo e formação do complexo.

Os dados de estabilidade das proteínas formadoras do complexo e de especificidade de ligação de PaRrp42 à coluna de níquel também foram considerados no estudo de metodologia de reconstituição do complexo.

A Figura 13 mostra o perfil de purificação do PaCsl4-exossomo e posterior análise por SDS-PAGE, conforme método descrito em 3.9.

A

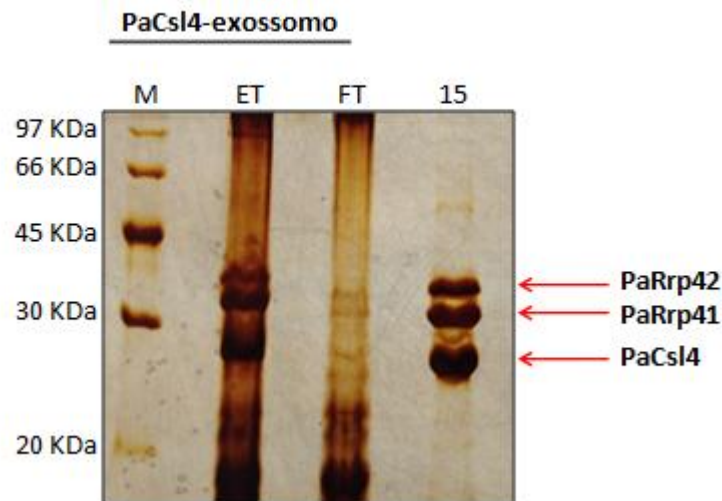
B

Figura 13. (A) Perfil cromatográfico de purificação do PaCsl4-exossomo registrado em coluna de níquel e solução tampão 30mM Tris-HCl pH = 8,0, 500mM NaCl, 5mM β -mercaptoetanol e 5mM imidazol. Eluição com gradiente 0, 8, 50 e 100% de 500mM imidazol (—), λ = 280nm (—), fração coletada (—) e fluxo = 1,0mL/min. (B) Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Análise da fração 15 por SDS-PAGE em condição redutora. M = marcador de massa molecular, ET = extrato proteico total e FT = material não ligado à coluna.

A presença bem definida das três bandas de proteína, em intensidade e tamanho equivalentes na Figura 13B, mostrou que somada à opção satisfatória pela incubação de volumes iguais das soluções proteicas, as proteínas formadoras do PaCsl4-exossomo foram totalmente eluídas na fração 15 da Figura 13A, correspondente ao patamar de 50% do gradiente de imidazol, reforçando ser apropriado o uso da técnica de pull-down para suas purificações, assim como ocorreu anteriormente em seus processos de co-purificação, e portanto, indicando ser eficiente a condição experimental adotada.

Para confirmar se houve a formação do complexo *in vitro* por este procedimento foi registrado na Figura 14 o perfil cromatográfico por gel filtração da

fração 15 da Figura 13A e a posterior análise por SDS-PAGE, conforme método descrito em 3.9.

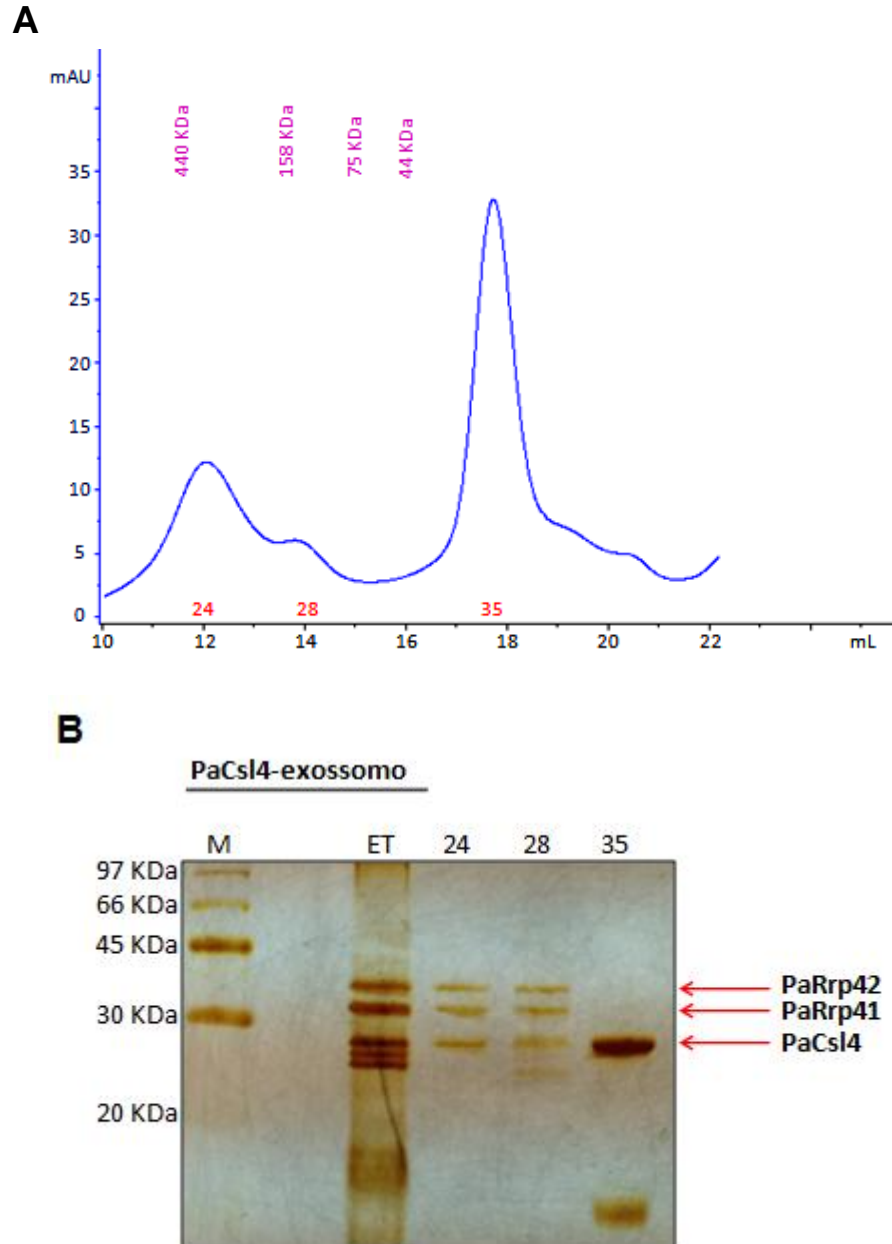


Figura 14. (A) Perfil cromatográfico de reconstituição do PaCsl4-exossomo registrado em coluna Superose 6 HR10/300 e solução tampão 50mM Tris-HCl pH = 8,0 e 150mM KCl. $\lambda = 280\text{nm}$ (—), frações coletadas (—) e fluxo = 0,3mL/min. As massas moleculares dos padrões de calibração estão na parte superior do gráfico e indicam respectivamente: ferritina, 440KDa; aldolase, 158KDa; conalbumina, 75KDa e ovalbumina 44KDa. (B) Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Análise das frações 24, 28 e 35 por SDS-PAGE em condição redutora. M = marcador de massa molecular e ET = extrato proteico total obtido na purificação anterior.

A análise da Figura 14B mostrou as subunidades proteicas do PaCsl4-exossomo presentes na fração 24 com alto grau de pureza e na fração 28 com menor grau de pureza, além de excesso de PaCsl4 na fração 35. De maneira qualitativa, a comparação da faixa de volume de eluição da fração de maior pureza com as faixas de volume de eluição do marcador industrial mostrou que o complexo eluiu entre os padrões de calibração ferritina e aldolase, indicando formação de um complexo de massa molecular maior que 158kDa e menor que 440KDa, condizente com o valor aproximado de 239,4KDa esperado do PaCsl4-exossomo. A massa molecular aparente do complexo também foi analisada quantitativamente por curva semilogarítmica construída com os logaritmos das massas moleculares dos padrões de calibração e os respectivos valores de razão de eluição, evidenciando massa de 239,4KDa para o complexo formado.

Desta maneira, infere-se que foi estabelecido protocolo alternativo ao publicado em literatura de reconstituição *in vitro* do PaCsl4-exossomo que consistiu na incubação de volumes iguais das subunidades formadoras do complexo previamente co-purificadas em coluna de níquel (6,8mg de proteínas dos dímeros PaRrp41/PaRrp42 e 16mg das proteínas PaRrp42/PaCsl4), por 30min, à temperatura ambiente, purificação do complexo formado por cromatografia de afinidade com uso de coluna de níquel em tampão A e sua posterior eluição por gel filtração com tampão 50mM Tris-HCl pH = 8,0 e 150mM KCl em 40min.

4.5 Síntese, clivagem da resina e desproteção total, purificação e caracterização química do fragmento peptídico da proteína PaNip7

Para elucidar se ocorre interação entre proteínas e quais são as porções das mesmas envolvidas na suposta interação, é possível usar peptídeos sintéticos. Com

base nas estruturas já resolvidas de Pa-exossomo e PaNip7 (COLTRI et al., 2004; NAVARRO et al., 2008) e, visto que trabalhos anteriores mostraram que a proteína de regulação PaNip7 é capaz de interagir simultaneamente com RNA através, principalmente, dos resíduos aminoacídicos R151, R152, K155 e K158 presentes na sua porção C-terminal (COLTRI et al., 2007) e com exossomo em região ainda não definida, mas apontada com potencial para as proteínas de topo, já que inibe mais fortemente a isoforma PaCsl4-exossomo (LUZ et al., 2010), o projeto prosseguiu com a tentativa de responder se a região de interação de PaNip7 com o RNA igualmente está envolvida na interação com o exossomo.

Para isso, o fragmento peptídico correspondente à posição 149-161 da região C-terminal da PaNip7 (Figura 6), que contém os resíduos de arginina e lisina responsáveis pela interação com o substrato, foi escolhido e sintetizado na sua forma acetilada e amidada (Ac-SDRRFIKNLKDVG-NH₂). A escolha do fragmento também levou em consideração o seu tamanho (13 resíduos de aminoácidos), pois para experimentos de interação não são indicados fragmentos peptídicos pequenos, e a incorporação da glicina como resíduo C-terminal, que por não ser quiral, não racemiza ao ser ligada à resina.

A síntese manual da peptidil-resina desejada ocorreu a 60°C e não houve necessidade de reacoplamentos. Tal abordagem sintética tem sido amplamente estudada no Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP (LOFFREDO et al., 2009; REMUZGO et al., 2014; VARANDA; MIRANDA, 1997).

As Figuras 15 e 16 mostram, respectivamente, a fórmula estrutural do peptídeo sintetizado e os resultados de análise do peptídeo bruto.

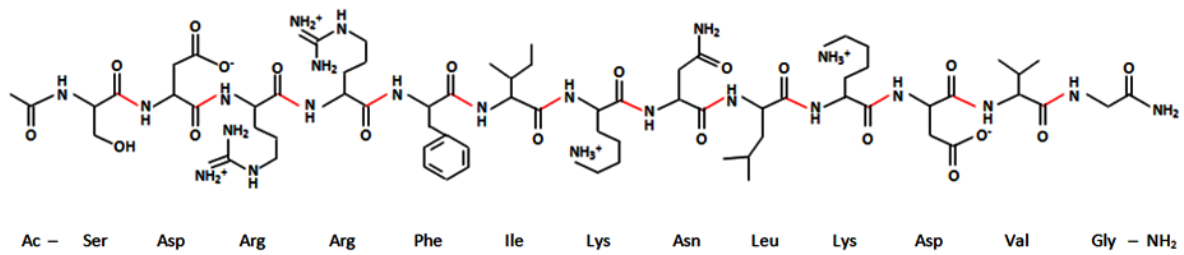
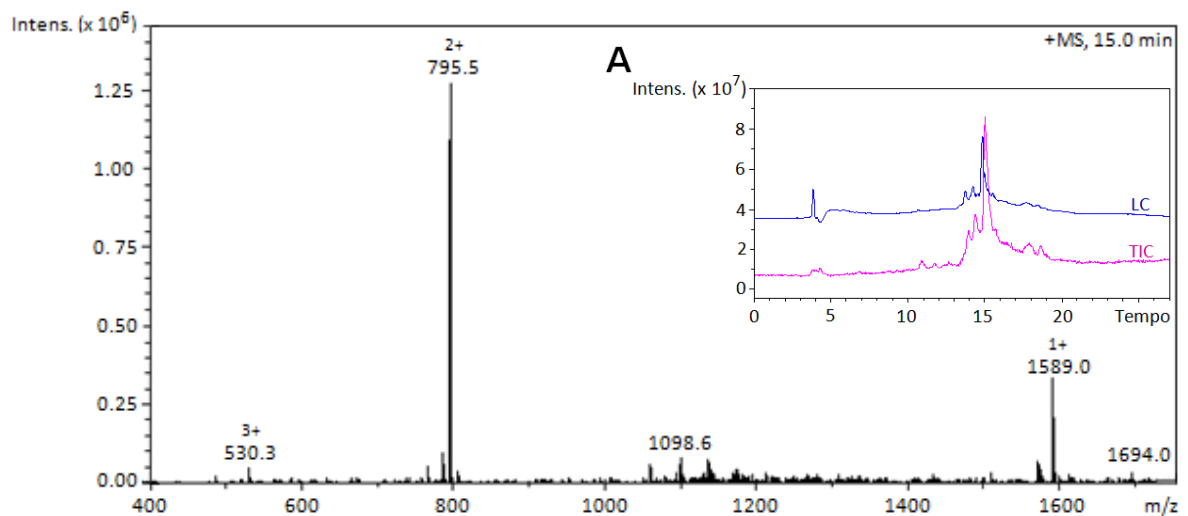


Figura 15. Fórmula estrutural do peptídeo acetilado, amidado e desprotegido em suas cadeias laterais. M.M. = 1588,84g/mol.

B



C

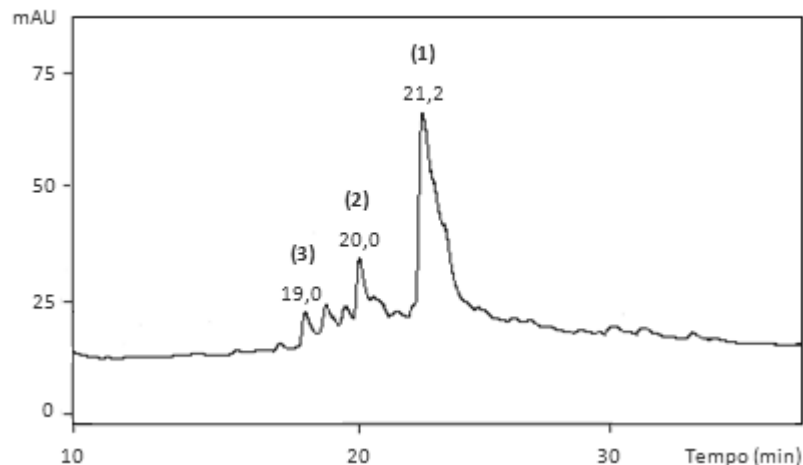


Figura 16. Análise do peptídeo bruto. (A) Perfis de LC/ESI-MS e de TIC. Solvente A = 0,1%TFA/água, solvente B = 40%ACN/0,09%TFA/água, gradiente = 5-95%B em 30min, $\lambda = 210\text{nm}$ e fluxo = 1mL/min. (B) Espectro do material eluído em 15min. M.M. = 1588,84g/mol; $[M+H]^+ = 1589,84$; $[M+2H]^+ = 795,42$; $[M+3H]^+ = 530,61$. (C) Perfil de RP-HPLC registrado nas mesmas condições do de LC/ESI-MS.

A análise das Figuras 16A e 16B confirmaram obtenção do peptídeo desejado e sucesso na metodologia escolhida para sua síntese. O ganho de massa sobre a resina CLEAR amida foi de 75mg, a partir de 200mg inicialmente utilizados (ganho de massa de 37,5%). A massa de peptídeo bruto obtida foi de 51mg e, portanto, rendimento bruto de 68% do peptídeo sintetizado. A Figura 16C mostrou, com maior resolução, a presença de três componentes principais (1), (2) e (3), sendo o composto majoritário (1) o peptídeo desejado. Foram obtidos 3,7mg de peptídeo final purificado.

Foram realizadas várias análises da amostra peptídica bruta por RP-HPLC analítica, em diferentes condições experimentais de gradiente, tempo de corrida, etc., com a finalidade de planejar e definir as melhores condições experimentais de purificação do peptídeo por RP-HPLC semi-preparativa (dados não mostrados).

Com base na análise da Figura 17, que demonstrou a eluição do peptídeo em torno de 54,2% de solvente B usando gradiente de 30-70%B, foi definida a melhor condição experimental de purificação.

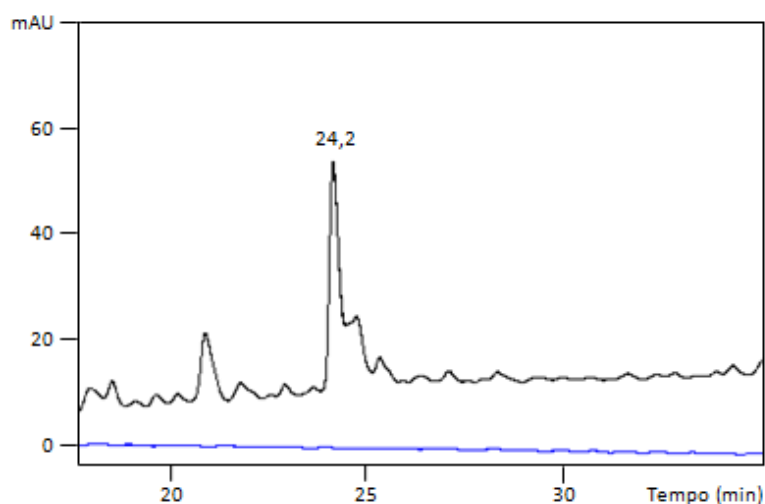
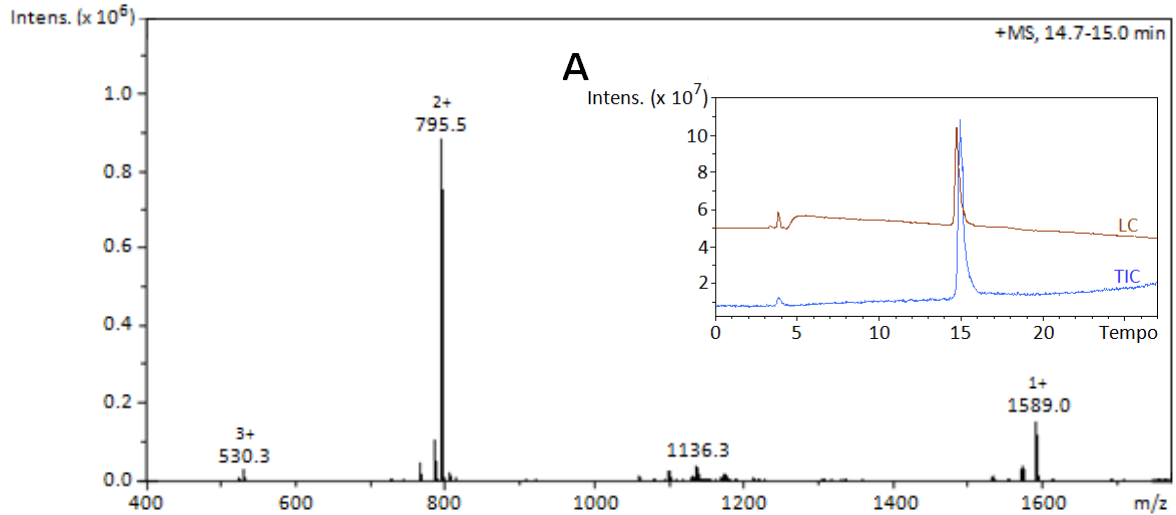


Figura 17. Perfil de RP-HPLC analítica do peptídeo bruto. Concentração amostra = 1mg/mL, volume amostra = 10 μ L, gradiente = 30-70%B em 40min, solvente A = 0,1%TFA/água, solvente B = 40%ACN/0,09%TFA/água, coluna = C18 analítica, λ = 210nm e fluxo = 1mL/min.

A Figura 18 mostra os resultados de análise do peptídeo purificado conforme procedimento descrito em 3.10.

B



C

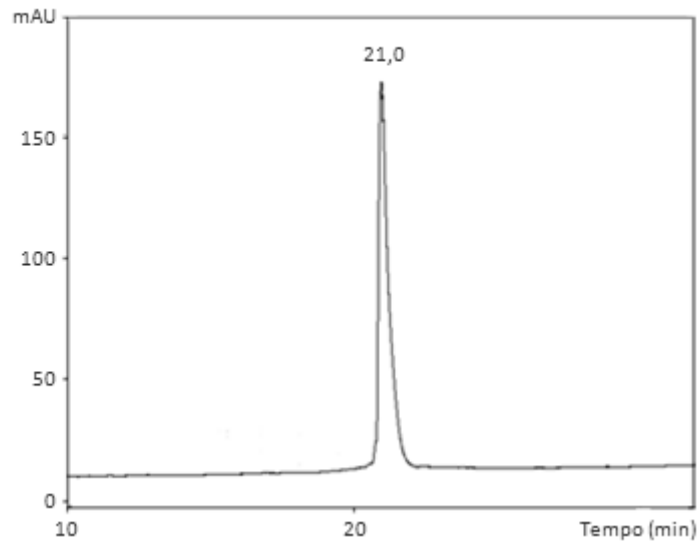


Figura 18. Análise do peptídeo purificado. (A) Perfis de LC/ESI-MS e de TIC. Solvente A = 0,1%TFA/água, solvente B = 40%ACN/0,09%TFA/água, gradiente = 5-95%B em 30min, $\lambda = 210\text{nm}$ e fluxo = 1mL/min. (B) Espectro do material eluído em 14,7-15min. M.M. = 1588,84g/mol; $[M+H]^{+1} = 1589,84$; $[M+2H]^{+2} = 795,42$; $[M+3H]^{+3} = 530,61$. (C) Perfil de RP-HPLC registrado nas mesmas condições do de LC/ESI-MS.

As Figuras 18A e 18B confirmaram a identidade e a homogeneidade química do peptídeo purificado e a Figura 18C, a alta pureza alcançada. A determinação do conteúdo peptídico por hidrólise total seguida de análise de aminoácidos do hidrolisado está sendo realizada.

A seleção de fragmento peptídico da região C-terminal de PaNip7 visando futuros estudos de interação com PaCsl4-exossomo e a síntese química de um deles na forma amidada e acetilada é uma nova abordagem de estudo do exossomo a ser acrescentada às já consolidadas nessa área de pesquisa. Espera-se que ele faça a interação desejada visto que os grupos de interação química desse peptídeo são os internos e as cargas das extremidades não afetam o resultado de tais interações.

O peptídeo de 13 resíduos aminoacídicos obtido neste projeto poderá se apresentar longo o suficiente para interagir tanto com o RNA quanto com o exossomo, bloquear a atividade catalítica e, contribuir com respostas à compreensão, por exemplo, da habilidade simultânea de ligação de PaNip7 ao RNA e ao exossomo, da localização da superfície de ligação de PaNip7 às proteínas de topo, da hipótese de estabilização de interação de PaNip7 com o complexo ser mediada pelo RNA, do número de cópias de PaNip7 que interagem com PaCsl4, das possíveis mudanças conformacionais e estruturais do exossomo causadas por essa interação e portanto, do entendimento da eficiência e mecanismo de inibição de PaNip7 no PaCsl4-exossomo.

Proposta de mecanismo de inibição do Pa-exossomo pela PaNip7

Uma proposta mecanística para a inibição do Pa-exossomo a ser considerada é a de que PaNip7 ao interagir simultaneamente com RNA e com o exossomo possa desmembrar o complexo enzimático e dessa forma, inibir sua atividade catalítica. Esta hipótese é sustentada pela literatura a qual afirma que para haver a catálise, o núcleo do exossomo tem que estar formado e que nenhuma subunidade isolada apresenta atividade catalítica *in vitro* (LORENTZEN et al., 2005; RAMOS et al., 2006). Como já visto, as proteínas de topo quando no complexo aumentam o recrutamento e seleção dos substratos e, portanto, a sua eficiência de processamento (HARTUNG et al., 2010; ROPPELT; KLUG; EVGUENIEVA-HACKENBERG, 2010). Mas, se ausentes, o anel PH do complexo é condição necessária e suficiente para realizar a degradação dos substratos.

5. CONCLUSÕES

- As proteínas formadoras do complexo foram obtidas por co-expressão em *E. coli* e suas análises de purificação por cromatografia de afinidade e SDS-PAGE demonstraram capacidade de co-purificação evidenciada em uma única etapa, forte interação e alta estabilidade proteica reforçando os dados literários apresentados de dependência da estrutura quaternária para função enzimática e aumento de sua eficiência.
- A proteína recombinante PaNip7, de forma semelhante, foi obtida por expressão em *E. coli* e suas análises de purificação por cromatografia de afinidade, gel filtração e SDS-PAGE demonstraram sua obtenção em alto grau de pureza.
- O elevado nível de expressão, o alto grau de pureza e as concentrações da ordem de mg/mL apresentados pelas proteínas formadoras de PaCsl4-exossomo bem como pela PaNip7 indicaram ser eficientes os procedimentos adotados para reconstituição de PaCsl4-exossomo e para obtenção de PaNip7.
- A reconstituição *in vitro* da isoforma PaCsl4-exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi* foi alcançada e proporcionou protocolo alternativo ao publicado em literatura.
- De forma complementar, os procedimentos para a síntese do fragmento peptídico da região C-terminal da proteína reguladora PaNip7, clivagem dele da resina e desproteção total de suas cadeias laterais, precipitação e extração, bem com sua purificação por RP-HPLC e caracterização química por LC/ESI-MS foram bem sucedidos, pois o peptídeo teve confirmadas a sua identidade e elevada pureza química. Ele poderá auxiliar na obtenção de respostas referentes ao mecanismo de inibição de PaNip7 no PaCsl4-exossomo.

6. REFERÊNCIAS

- ALLMANG, C.; KUFEL, J.; CHANFREAU, G.; MITCHELL, P.; PETFALSKI, E.; TOLLERVEY, D. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. **EMBO Journal**, v.18, n.19, p.5399-5410, 1999.
- AUDIN, M.J.C.; DORN, G.; FROMM, S.A.; REISS, K.; SCHÜTZ, S.; VORLÄNDER, M.K.; SPRANGERS, R. The archaeal exosome: identification and quantification of site-specific motions that correlate with cap and RNA binding. **Angewandte Chemie, International Edition**, v.52, n.32, p.8312-8316, 2013.
- BASSLER, J.; GRANDI, P.; GADAL, O.; LESSMANN, T.; PETFALSKI, E.; TOLLERVEY, D.; LECHNER, J.; HURT, E. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. **Molecular Cell**, v.8, n.3, p.517-529, 2001.
- BOUSQUET-ANTONELLI, C.; PRESUTTI, C.; TOLLERVEY, D. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. **Cell**, v.102, n.6, p.765-775, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.
- BRANTL, S. Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.2, p.102-109, 2007.
- BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1288-1296, 2009.
- BRIGGS, M.W.; BURKARD, K.T.; BUTLER, J.S. Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8S rRNA 3' end formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.21, p.13255-13263, 1998.

- BÜTTNER, K.; WENIG, K.; HOPFNER, K.-P. Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in RNA processing. **Molecular Cell**, v.20, n.3, p.461-471, 2005.
- CHEKANOVA, J.A.; DUTKO, J.A.; MIAN, I.S.; BELOSTOTSKY, D.A. *Arabidopsis thaliana* exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3' → 5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.3, p.695-700, 2002.
- CHEN, C.-Y.; GHERZI, R.; ONG, S.-E.; CHAN, E.L.; RAIJMAKERS, R.; PRUIJN, G.J.M.; STOECKLIN, G.; MORONI, C.; MANN, M.; KARIN, M. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. **Cell**, v.107, n.4, p.451-464, 2001.
- CHLEBOWSKI, A.; LUBAS, M.; JENSEN, T.H.; DZIEMBOWSKI, A. RNA decay machines: the exosome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1829, n.6/7, p.552-560, 2013.
- CHO, E.-J.; TAKAGI, T.; MOORE, C.R.; BURATOWSKI, S. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. **Genes & Development**, v.11, n.24, p.3319-3326, 1997.
- CHRISTOFORI, G.; KELLER, W. 3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors *in vitro* requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP. **Cell**, v.54, n.6, p.875-889, 1988.
- COLTRI, P.P.; GUIMARÃES, B.G.; GRANATO, D.C.; LUZ, J.S.; TEIXEIRA, E.C.; OLIVEIRA, C.C.; ZANCHIN, N.I.T. Structural insights into the interaction of the Nip7 PUA domain with polyuridine RNA. **Biochemistry**, v.46, n.49, p.14177-14187, 2007.
- COLTRI, P.P.; GUIMARÃES, B.G.; OLIVEIRA, C.C.; ZANCHIN, N.I.T. Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Pyrococcus abyssi* protein homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p. **Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography**, v.D60, pt.10, p.1925-1928, 2004.

- DECKER, C.J. The exosome: a versatile RNA processing machine. **Current Biology**, v.8, n.7, p.R238-R240, 1998.
- DULEBOHN, D.; CHOY, J.; SUNDERMEIER, T.; OKAN, N.; KARZAI, A.W. *Translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay.* **Biochemistry**, v.46, n.16, p.4681-4693, 2007.
- ESTÉVEZ, A.M.; KEMPF, T.; CLAYTON, C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **EMBO Journal**, v.20, n.14, p.3831-3839, 2001.
- EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; ROPPELT, V.; FINSTERSEIFER, P.; KLUG, G. Rrp4 and Csl4 are needed for efficient degradation but not for polyadenylation of synthetic and natural RNA by the archaeal exosome. **Biochemistry**, v.47, n.50, p.13158-13168, 2008.
- EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; WALTER, P.; HOCHLEITNER, E.; LOTTSPREICH, F.; KLUG, G. An exosome-like complex in *Sulfolobus solfataricus*. **EMBO Reports**, v.4, n.9, p.889-893, 2003.
- HAMMARLÖF, D.L.; BERGMAN, J.M.; GARMENDIA, E.; HUGHES, D. Turnover of mRNAs is one of the essential functions of RNase E. **Molecular Microbiology**, v.98, n.1, p.34-45, 2015.
- HARTUNG, S.; HOPFNER, K.-P. Lessons from structural and biochemical studies on the archaeal exosome. **Biochemical Society Transactions**, v.37, n.1, p.83-87, 2009.
- HARTUNG, S.; NIEDERBERGER, T.; HARTUNG, M.; TRESCH, A.; HOPFNER, K.-P. Quantitative analysis of processive RNA degradation by the archaeal RNA exosome. **Nucleic Acids Research**, v.38, n.15, p.5166-5176, 2010.
- HOUSELEY, J.; LACAVA, J.; TOLLERVEY, D. RNA-quality control by the exosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, n.7, p.529-539, 2006.
- JANUSZYK, K.; LIMA, C.D. The eukaryotic RNA exosome. **Current Opinion in Structural Biology**, v.24, p.132-140, 2014.

- JENSEN, T.H. **RNA Exosome**. New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, 2010. p.1-38. (Advances in Experimental Medicine and Biology, v.702).
- KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v.34, n.2, p.595-598, 1970.
- KILCHERT, C.; VASILJEVA, L. mRNA quality control goes transcriptional. **Biochemical Society Transactions**, v.41, n.6, p.1666-1672, 2013.
- KOONIN, E.V.; WOLF, Y.I.; ARAVIND, L. Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. **Genome Research**, v.11, n.2, p.240-252, 2001.
- LACAVA, J.; HOUSELEY, J.; SAVEANU, C.; PETFALSKI, E.; THOMPSON, E.; JACQUIER, A.; TOLLERVEY, D. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. **Cell**, v.121, n.5, p.713-724, 2005.
- LEBRETON, A.; SÉRAPHIN, B. Exosome-mediated quality control: substrate recruitment and molecular activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1779, n.9, p.558-565, 2008.
- LEBRETON, A.; TOMECKI, R.; DZIEMBOWSKI, A.; SÉRAPHIN, B. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. **Nature**, v.456, n.7224, p.993-996, 2008.
- LEE, G.; HARTUNG, S.; HOPFNER, K.-P.; HA, T. Reversible and controllable nanolocomotion of an RNA-processing machinery. **Nano Letters**, v.10, n.12, p.5123-5130, 2010.
- LIU, Q.; GREIMANN, J.C.; LIMA, C.D. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. **Cell**, v.127, n.6, p.1223-1237, 2006.

- LOFFREDO, C.; ASSUNÇÃO, N.A.; GERHARDT, J.; MIRANDA, M.T.M. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60°C: alternative conditions with low enantiomerization. **Journal of Peptide Science**, v.15, n.12, p.808-817, 2009.
- LORENTZEN, E.; BASQUIN, J.; CONTI, E. Structural organization of the RNA-degrading exosome. **Current Opinion in Structural Biology**, v.18, n.6, p.709-713, 2008.
- LORENTZEN, E.; CONTI, E. Crystal structure of a 9-subunit archaeal exosome in pre-catalytic states of the phosphorolytic reaction. **Archaea**, v.2012, n.721869, p.1-7, 2012.
- LORENTZEN, E.; CONTI, E. Structural basis of 3' end RNA recognition and exoribonucleolytic cleavage by an exosome RNase PH core. **Molecular Cell**, v.20, n.3, p.473-481, 2005.
- LORENTZEN, E.; DZIEMBOWSKI, A.; LINDNER, D.; SÉRAPHIN, B.; CONTI, E. RNA channelling by the archaeal exosome. **EMBO Reports**, v.8, n.5, p.470-476, 2007.
- LORENTZEN, E.; WALTER, P.; FRIBOURG, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; KLUG, G.; CONTI, E. The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.12, n.7, p.575-581, 2005.
- LU, C.; DING, F.; KE, A. Crystal structure of the *S. solfataricus* archaeal exosome reveals conformational flexibility in the RNA-binding ring. **PLoS ONE**, v.5, n.1, art.e8739, p.1-8, 2010.
- LUZ, J.S.; RAMOS, C.R.R.; SANTOS, M.C.T.; COLTRI, P.P.; PALHANO, F.L.; FOGUEL, D.; ZANCHIN, N.I.T.; OLIVEIRA, C.C. Identification of archaeal proteins that affect the exosome function *in vitro*. **BMC Biochemistry**, v.11, n.22, p.1-14, 2010.

- MAKINO, D.L.; HALBACH, F.; CONTI, E. The RNA exosome and proteasome: common principles of degradation control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.14, n.10, p.654-660, 2013.
- MALET, H.; LORENTZEN, E. Mechanisms of RNA recruitment by the exosome. **RNA Biology**, v.8, n.3, p.398-403, 2011.
- MANLEY, J.L. Polyadenylation of mRNA precursors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.950, n.1, p.1-12, 1988.
- MATHY, N.; BÉNARD, L.; PELLEGRINI, O.; DAOU, R.; WEN, T.; CONDON, C. 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. **Cell**, v.129, n.4, p.681-692, 2007.
- MCCRACKEN, S.; FONG, N.; ROSONINA, E.; YANKULOV, K.; BROTHERS, G.; SIDEROVSKI, D.; HESSEL, A.; FOSTER, S.; AMGEN EST PROGRAM; SHUMAN, S.; BENTLEY, D.L. 5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. **Genes & Development**, v.11, n.24, p.3306-3318, 1997.
- MISTELI, T.; CÁCERES, J.F.; SPECTOR, D.L. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. **Nature**, v.387, n.6632, p.523-527, 1997.
- MISTELI, T.; SPECTOR, D.L. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites *in vivo*. **Molecular Cell**, v.3, n.6, p.697-705, 1999.
- MITCHELL, P.; PETFALSKI, E.; SHEVCHENKO, A.; MANN, M.; TOLLERVEY, D. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. **Cell**, v.91, n.4, p.457-466, 1997.
- MITCHELL, P.; PETFALSKI, E.; TOLLERVEY, D. The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. **Genes & Development**, v.10, n.4, p.502-513, 1996.

- MORELLO, L.G.; HESLING, C.; COLTRI, P.P.; CASTILHO, B.A.; RIMOKH, R.; ZANCHIN, N.I.T. The NIP7 protein is required for accurate pre-rRNA processing in human cells. **Nucleic Acids Research**, v.39, n.2, p.648-665, 2011.
- MUKHERJEE, D.; GAO, M.; O'CONNOR, J.P.; RAIJMAKERS, R.; PRUIJN, G.; LUTZ, C.S.; WILUSZ, J. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. **EMBO Journal**, v.21, n.1/2, p.165-174, 2002.
- NAVARRO, M.V.A.S.; OLIVEIRA, C.C.; ZANCHIN, N.I.T.; GUIMARÃES, B.G. Insights into the mechanism of progressive RNA degradation by the archaeal exosome. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.20, p.14120-14131, 2008.
- PANNUCCI, J.A.; HAAS, E.S.; HALL, T.A.; HARRIS, J.K.; BROWN, J.W. RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.14, p.7803-7808, 1999.
- PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v.25, n.13, p.1605-1612, 2004.
- PORRUA, O.; LIBRI, D. RNA quality control in the nucleus: the angels' share of RNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1829, n.6/7, p.604-611, 2013.
- PORTNOY, V.; SCHUSTER, G. RNA polyadenylation and degradation in different Archaea; roles of the exosome and RNase R. **Nucleic Acids Research**, v.34, n.20, p.5923-5931, 2006.
- RAIJMAKERS, R.; EGBERTS, W.V.; VAN VENROOIJ, W.J.; PRUIJN, G.J.M. Protein-protein interactions between human exosome components support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered PNPase-like ring. **Journal of Molecular Biology**, v.323, n.4, p.653-663, 2002.

- RAIJMAKERS, R.; SCHILDERS, G.; PRUIJN, G.J.M. The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. **European Journal of Cell Biology**, v.83, n.5, p.175-183, 2004.
- RAMOS, C.R.R.; ABREU, P.A.E.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.8, p.1103-1109, 2004.
- RAMOS, C.R.R.; OLIVEIRA, C.L.P.; TORRIANI, I.L.; OLIVEIRA, C.C. The *Pyrococcus* exosome complex: structural and functional characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.10, p.6751-6759, 2006.
- REMUZGO, C.; OEWEL, T.S.; DAFFRE, S.; LOPES, T.R.S.; DYSZY, F.H.; SCHREIER, S.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; MACHINI, M.T. Chemical synthesis, structure-activity relationship, and properties of shepherin I: a fungicidal peptide enriched in glycine-glycine-histidine motifs. **Amino Acids**, v.46, n.11, p.2573-2586, 2014.
- ROPPELT, V.; KLUG, G.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. The evolutionarily conserved subunits Rrp4 and Csl4 confer different substrate specificities to the archaeal exosome. **FEBS Letters**, v.584, n.13, p.2931-2936, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3v.
- SCHAEFFER, D.; TSANOVA, B.; BARBAS, A.; REIS, F.P.; DASTIDAR, E.G.; SANCHEZ-ROTUNNO, M.; ARRAIANO, C.M.; VAN HOOFF, A. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.16, n.1, p.56-62, 2009.
- SCHMID, M.; JENSEN, T.H. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. **Trends in Biochemical Sciences**, v.33, n.10, p.501-510, 2008.

- SLOMOVIC, S.; PORTNOY, V.; YEHUDAI-RESHEFF, S.; BRONSZTEIN, E.; SCHUSTER, G. Polynucleotide phosphorylase and the archaeal exosome as poly(A)-polymerases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1779, n.4, p.247-255, 2008.
- TOLLERVEY, D. RNA surveillance and the exosome. **RNA**, v.21, n.4, p.492-493, 2015.
- VAN HOOFF, A.; FRISCHMEYER, P.A.; DIETZ, H.C.; PARKER, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. **Science**, v.295, n.5563, p.2262-2264, 2002.
- VANACOVA, S.; STEFL, R. The exosome and RNA quality control in the nucleus. **EMBO Reports**, v.8, n.7, p.651-657, 2007.
- VARANDA, L.M.; MIRANDA, M.T.M. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. **Journal of Peptide Research**, v.50, n.2, p.102-108, 1997.
- VASUDEVAN, S.; PELTZ, S.W. Nuclear mRNA surveillance. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.3, p.332-337, 2003.
- WYERS F.; ROUGEMAILLE, M.; BADIS, G.; ROUSSELLE, J.-C.; DUFOR, M.-E.; BOULAY, J.; RÉGNAULT, B.; DEVAUX, F.; NAMANE, A.; SÉRAPHIN, B.; LIBRI, D.; JACQUIER, A. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. **Cell**, v.121, n.5, p.725-737, 2005.
- XIANG, S.; COOPER-MORGAN, A.; JIAO, X.; KILEDJIAN, M.; MANLEY, J.L.; TONG, L. Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. **Nature**, v.458, n.7239, p.784-788, 2009.
- ZANCHIN, N.I.T.; ROBERTS, P.; DESILVA, A.; SHERMAN, F.; GOLDFARB, D.S. *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n.9, p.5001-5015, 1997.