# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

### GERMANO ALVES PAIVA

## Estudo do Papel de Rrp43p na Montagem e Estabilização do Complexo do Exossomo em Saccharomyces cerevisiae

Versão original da Dissertação defendida

São Paulo

Data de depósito na CPG:

02/03/2012

## **GERMANO ALVES PAIVA**

## Estudo do Papel de Rrp43p na Montagem e Estabilização do Complexo do Exossomo em Saccharomyces cerevisiae

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

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo 2012

Aos meus pais, Germano Rodrigues Paiva e Maria Inêz Alves Paiva, pelo apoio incondicional

#### **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me sustentado nos momentos mais difícies.

A Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, pela orientação, ajuda técnica nos experimentos e sobretudo por estar sempre a disposição para tirar dúvidas, mesmo as mais simples.

A toda minha família por sempre me apoiar e por compartilhar sonhos e conquistas.

As amigas Walkíria Souza, Juliana Galvão e Ana Paula pelo carinho e pela forma acolhedora como me receberam quando cheguei a São Paulo.

Ao amigo Carlos Henrique por ter sido um grande parceiro na monitoria de Biologia Molecular e pelos momentos de diversão durante o mestrado.

Aos amigos de laboratório Patrícia Coltri, Luciana Coutinho, Maurício B. Goldfeder, Rogério Lourenço e José Galeote pela ajuda técnica, os bons momentos vividos durante minha permanência no laboratório e pelas amizades construídas. Ao Maurício em especial, por ter me ensinado os princípios básicos de clonagem molecular e por ter me acompanhado inicialmente nos experimentos.

A Marcela B. Prieto por ter me ajudado bastante na disciplina de Biologia Molecular do Gene, pela ótima companhia na Reunião Anual da SBBq e pelos bons momentos de amizade vividos durante o mestrado.

A Márcia Cristina pela ajuda técnica, por ter sido uma grande amiga e companheira nesses dois anos e por ter tido tanta paciência com as minhas limitações e defeitos.

A Maíra Nagai por ter sido uma ótima parceira na disciplina de Transdução de Sinais Celulares.

A todos os colegas de pós-graduação e do bloco zero, em especial a Valquíria dos Santos, pelos momentos de descontração e amizade e por aliviarem as minhas frustrações nos vários momentos "pós-graduandos anônimos" ao longo desses dois anos.

Aos amigos de Fortaleza Amaurício Lopes, Gervina Brady, Raíssa Mesquita, Ivna Salmito, Érica Barroso, Gustavo Silveira, Rebecca Borges, Matheus Carrion, Diego Chaves, Nayane Niedja, Paulo Henrique, Duyllis Chaves, Felipe Bandeira, Ericson, Jairo, Ana Rosa, Evana Macedo e Elenita de Castro por estarem sempre presentes apesar da distância.

Aos amigos Eliezér, Jefferson, Vitória, Rafaela, Jéssica, Natália (Naty), Isabel Medeiros (Bel) e Talita Abrantes por terem sido um grande apoio nos meus momentos de fraqueza. Vocês são uma expressão do amor de Deus por mim.

Aos colegas de república Alex, Rodrigo e Douglas pela amizade e boa convivência.

A Profa. Dra. Nadja Cristhina pelas críticas pertinentes durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres por estar sempre à disposição para ouvir os alunos e por ser um intelectual capaz de inspirar os mais jovens.

A todos os funcionários do Instituto de Química que colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Melissa Jurica pela realização dos experimentos de Microscopia Eletrônica.

A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

#### **RESUMO**

Paiva, G. A. Estudo do papel de Rrp43p na montagem e estabilização do complexo do exossomo em *Saccharomyces cerevisiae*. 2012. (65p). Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O exossomo é um complexo constituído por até 11 subunidades (Rrp4p, Rrp6p, Rrp40p, Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p, Rrp45p, Rrp46p, Csl4p, Mtr3p) que possui atividade exorribonucleolítica 3'→5' e está envolvido no processamento e degradação de vários tipos de RNAs na célula eucariótica. O complexo tem sido estudado em diversos organismos, como leveduras, insetos, plantas, humanos e também em várias espécies de archaea. Apesar da conservação da estrutura do exossomo ao longo da evolução e de oito subunidades do exossomo eucariótico apresentarem domínios de RNase, apenas duas proteínas, Rrp6p e Rrp44p têm atividade catalítica. A despeito da importância do exossomo para a célula, ainda não está claro o papel de cada subunidade na atividade do complexo. Neste trabalho foram utilizados mutantes da subunidade Rrp43p a fim de avaliar como mutações pontuais nesta subunidade afetam a montagem e estabilização do complexo do exossomo de Saccharomyces cerevisiae. Ensaios de purificação do exossomo com TAP-Rrp43p revelaram que os mutantes co-purificam Mtr3p e Rrp44p menos eficientemente. Além disso, os mutantes também apresentam atividade exorribonucleolítica 3'→5' reduzida, indicando que o defeito na montagem do complexo pode afetar a sua atividade enzimática.

Palavras-chave: Exossomo, RNA, Saccharomyces cerevisiae, Rrp43p.

#### **ABSTRACT**

Paiva, G. A. The role of Rrp43p on assembly and stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* exosome complex. 2011. (65p). Master`s degree Dissertation- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The exosome is a protein complex comprised of up to eleven subunits (Rrp4p, Rrp6p, Rrp40p, Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p, Rrp45p, Rrp46p, Csl4p and Mtr3p) that has  $3 \rightarrow 5$  exoribonucleolytic activity and is involved in degradation and processing pathways of several kinds of RNA in eukaryotes. This complex has also been identified in several organisms, such as yeast, insects, plants, humans and also many species of archaea. Despite the overall structure conservation of the complex throughout evolution and eight of the eukaryotic exosome subunits displaying RNase domains, only two proteins, Rrp6p and Rrp44p have catalytic activity. Although the exosome has been shown to be involved in many different aspects of RNA metabolism, the role that each subunit plays in the activity of the complex has not yet been determined. In this work we used of TAP-purified exosome complexes to study the effect of Rrp43p mutations on the assembly and stabilization of the complex in Saccharomyces cerevisiae. Co-immunoprecipitation assays revealed that Rrp43p mutants co-purify Mtr3p and Rrp44p subunits less efficiently. Besides, Rrp43p mutants also present decreased activity, indicating that an assembly defect may affect its enzymatic activity.

**Keywords:** Exosome, RNA, Saccharomyces cerevisiae, Rrp43p.

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AU Arbitrary unit (Unidade arbitrária)

BCA Bicinchoninic Acid (Ácido bicinconínico)

bp Pares de bases

CSR Class switch recombination
CUT Cryptic unstable transcript

DNA Ácido desoxirribonucléico

DTT Ditiotreitol

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

ETS External transcribed spacer (sequência espaçadora externa)

HRP Horseradish peroxidase

ITS Internal transcribed spacer (sequência espaçadora interna)

kb Quilobase

kDa Quilodálton

LB Luria-bertani (meio de cultura para bactéria)

LiOAc Acetato de Lítio

mRNA RNA mensageiro

miRNA Micro RNA

NGD No-go decay

NMD Non-sense mediated decay

NSD Non-stop decay

OD Densidade ótica

PCR Reação de polimerase em cadeia

PEG Polietilenoglicol

PAGE Polyacrilamide gel electrophoresis

PMSF Fluoreto de fenilmetilsulfonila (inibidor de protease)

PROMPT Promoter upstream transcript

rRNA RNA ribossomal

RNP Ribonucleoproteína

rpm Rotações por minuto

rRNA RNA ribossomal

S Svedberg (coeficiente de sedimentação)

SDS Dodecil sulfato de sódio

SHM Somatic hypermutation

snRNA Small nuclear RNA

snoRNA Small nucleolar RNAs

TBS Solução salina tamponada com Tris-HCI

TE Tampão contendo tris e EDTA

TEMED Tetrametiletinelodiamina

Tris Trishidroximetilaminometano

tRNA RNA transportador

YNB Yeast nitrogen base (meio mínimo para levedura)

YPD Yeast extract peptone dextrose (meio rico para levedura)

ZRE Zinc-finger antiviral protein (ZAP) responsive elements

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do exossomo de levedura e de archaea	29
Tabela 2. Primers utilizados na amplificação de HisRRP6, HisRRP44 e HisRRP46	а
partir de DNA genômico	35
Tabela 3. Lista de plasmídeos utilizados neste estudo	36

#### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Esquema do processamento de pré-rRNA em S. cerevisiae16
<b>Figura 2.</b> Estrutura do exossomo de archaea e das enzimas bacterianas RNase PH e PNPase
Figura 3. Modelo de degradação de RNA pelo exossomo de archaea27
Figura 4. Estrutura do exossomo eucariótico (humano)28
Figura 5. Vias de degradação de RNA pelo exossomo eucariótico32
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática dos mutantes de Rrp43p utilizados neste trabalho
<b>Figura 7.</b> Amplificação dos genes RRP6, RRP44 e RRP46 fusionados ao tag de histidina (His <sub>6x</sub> )
Figura 8. Vetor pMET36 clivado com Smal42
Figura 9. Análise de restrição dos clones pMET36HisRRP6 e pMET36HisRRP4443
Figura 10. Obtenção dos clones pMET36HisRRP4644
<b>Figura 11.</b> Gel de poliacrilamida corado com prata referente as amostras purificadas após clivagem com TEV protease46
<b>Figura 12.</b> Gráficos de filtração em gel das amostras provenientes da purificação do exossomo após clivagem com TEV (RRP43 e rrp43-1) <b>47</b>
<b>Figura 13.</b> Gráficos de filtração em gel das amostras provenientes da purificação do exossomo após clivagem com TEV (rrp43-2 e rrp43-3)48
<b>Figura 14.</b> Gel de poliacrilamida corado com prata referente às amostras resultantes do primeiro pico de absorbância na gel filtração dos purificados de TEV <b>49</b>
<b>Figura 15.</b> Imagem não processada de microscopia eletrônica do exossomo selvagem (RRP43)
<b>Figura 16.</b> Western blotting α-Mtr3 do purificado com TEV do exossomo selvagem e dos três mutantes de Rrp43 <b>51</b>
<b>Figura 17.</b> Ensaio de degradação de RNA utilizando concentrações crescentes das diferentes amostras de exossomo purificado
<b>Figura 18.</b> Modelo do efeito das mutações em Rrp43p sobre a estabilidade do exossomo de <i>S. cerevisiae</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Processamento do pré-rRNA	15
1.2 Exossomo	17
1.2.1 Funções do Exossomo	17
Processamento de pequenos RNAs (snRNAs e snoRNAs)	18
Controle de qualidade de RNAs nucleares	19
Turnover e controle de qualidade de mRNAs	21
Degradação de transcritos não codificantes (CUTs e PROMPTs)	22
Outras funções	23
Co-fator enzimático	23
Proteção Viral	24
Síntese do RNA scR1	24
1.2.2 Estrutura do Exossomo	25
Mecanismos de degradação de RNA em eucariotos	31
Subunidade Rrp43p	32
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Clonagens	35
3.2 Sequenciamento de plasmídeos	36
3.3 Transformação de células competentes ( <i>E.coli</i> DH5α)	37
3.4 Transformação de levedura	37
3.5 Purificação do exossomo por cromatografia com TAP-tag	37
	38
3.6 Análise de Proteínas	
3.6 Análise de Proteínas	
	38
3.6.1 SDS-PAGE	38 39
3.6.1 SDS-PAGE	38 39
3.6.1 SDS-PAGE  3.6.2 Western blotting  3.6.3 Quantificação de proteina por BCA	38 39 39
3.6.1 SDS-PAGE  3.6.2 Western blotting  3.6.3 Quantificação de proteina por BCA  3.7 Ensaio de degradação de RNA	38 39 39 40
3.6.1 SDS-PAGE  3.6.2 Western blotting  3.6.3 Quantificação de proteina por BCA  3.7 Ensaio de degradação de RNA  4. RESULTADOS	38 39 40 41

4.4 Ensaio de microscopia eletrônica	49
4.5 Western blotting α-Mtr3	50
4.6 Ensaio de degradação de RNA	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

#### 1. INTRODUÇÃO

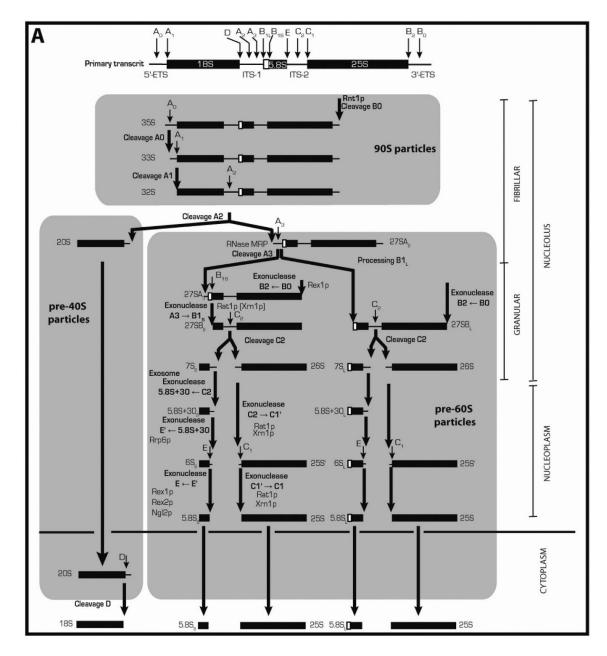
#### 1.1. Processamento do pré-rRNA

A quantidade de RNA produzida por uma célula é notável, refletindo sua importância no metabolismo celular. Diferentes tipos de RNAs participam de processos distintos e essenciais para a célula, como splicing (snRNA), modificação de rRNA (snoRNA), silenciamento gênico (miRNA) e síntese de proteínas (rRNA, mRNA e tRNA; Bartel, 2004; Houseley et al., 2006).

Todos esses tipos de RNA passam por processamento pós-transcricional antes de se tornarem funcionais. Os eventos envolvidos na maturação de mRNAs incluem adição de cap na extremidade 5`, clivagem na extremidade 3`, poliadenilação e splicing enquanto que em tRNAs ocorrem cortes nas extremidades 5` e 3`, splicing e modificação de nucleotídeos.

A formação dos RNAs ribossomais maduros ocorre em várias etapas, que envolvem modificações químicas dos nucleotídeos (metilação e pseudouridilação) e reações de clivagem, exo e endonucleolíticas (Decker, 1998).

Dos quatros rRNAs presentes no ribossomo de *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo modelo para estudos em eucariotos, três são transcritos pela RNA polimerase I (5,8S, 18S e 25S) como um precursor de 35S enquanto que o 5S é transcrito separadamente pela RNA pol III. O precursor 35S é composto por duas sequências espaçadoras externas (5`-ETS e 3`-ETS), duas sequências de espaçadores internos (ITS1 e ITS2), as sequências dos RNAs maduros e vários sítios de clivagem (Figura 1; Venema e Torllevey, 1999).



**Figura 1.** Esquema do processamento de pré-rRNA em *Saccharomyces cerevisiae* (extraído de Henras et al., 2008).

O processamento do pré-rRNA 35S se inicia com uma clivagem no sítio A<sub>0</sub> seguida por outra clivagem no sítio A<sub>1</sub>, dando origem ao pré-rRNA 32S. Posteriormente o pré-rRNA 32S é clivado no sítio A<sub>2</sub> dando origem aos pré-rRNAs 20S e 27SA<sub>2</sub>. Os passos subseqüentes na maturação do pré-rRNA 20S ocorrem no citoplasma culminando na formação do rRNA 18S através de uma clivagem no sítio D enquanto que o processamento do pré-rRNA 27SA<sub>2</sub> continua no núcleo e pode

seguir duas vias alternativas (Udem e Warner, 1973). A via principal envolve clivagem no sítio  $A_3$  em ITS1 pela RNase MRP, imediatamente seguida por degradação exonucleolítica na direção  $5^{\circ} \rightarrow 3^{\circ}$  até o sítio  $B_{1S}$  pelas exonucleases Xrn1p ou Rat1p. Na via menos frequente ocorre a clivagem direta no sítio  $B_{1L}$  gerando o pré-rRNA 27SBL. Nas duas vias, a extremidade  $3^{\circ}$  do pré-rRNA 27S é processada pela ação da exonuclease  $3^{\circ} \rightarrow 5^{\circ}$  Rex1p, que degrada o pré-rRNA 27S do sito  $B_0$  até o sítio  $B_2$ . As duas formas de 27SB são então processadas de modo idêntico através de clivagens nos sítios  $C_2$  e  $C_1$  e degradação exonucleolítica originando os rRNAs maduros 5,8S e 25S. Os rRNAs 5,8S, 25S e 5S, junto com as proteínas ribossomais, formam a subunidade maior do ribossomo (60S) enquanto o rRNA 18S participa da formação da subunidade menor (40S; Venema e Tollervey, 1999; Henras et al., 2008).

O processamento de RNA ribossomal e sua montagem em subunidades ribossômicas envolve pelo menos 200 proteínas acessórias, incluindo RNA helicases, ATPases, GTPases, chaperonas, fatores de montagem, endo- e exonucleases, assim como muitas snoRNPs (small nucleolar ribonucleoprotein particles; Kressler et al., 1999; Venema e Tollervey, 1999; Fromont-Racine et al., 2003; Strunk e Kasbstein, 2009). Um dos complexos protéicos envolvidos na maturação do rRNA é o exossomo.

#### 1.2 Exossomo

#### 1.2.1 Funções do exossomo

O exossomo é um complexo multiprotéico com atividade de exorribonuclease 3`→5` e está envolvido diretamente na degradação do espaçador 5`-ETS e na formação da extremidade 3` do rRNA 5.8S (Mitchell et al., 1997). Originalmente

identificado devido ao seu papel no processamento de pré-rRNA no núcleo de *S. cerevisiae*, o espectro de atuação do exossomo tem se expandido bastante desde sua descoberta (Andersen et al., 2009; Basu et al., 2011).

O exossomo participa da maturação e degradação de todas as classes de RNA na célula e tem sido estudado em diversos organismos, como levedura, humanos, insetos, protozoários, plantas e algumas espécies de archaea. Além de apresentar funções gerais, comuns a todos esses organismos, o exossomo também exerce funções específicas, peculiares a um organismo ou tecido em particular (Mitchell et al., 1997; Chekanova et al., 2002; Liu et al., 2006; Ramos et al., 2005; Estevez et al., 2001; Andrulis et al., 2002; Basu et al., 2011).

#### Processamento de pequenos RNAs (snRNAs e snoRNAs)

O processamento de pre-rRNA é parcialmente mediado por um conjunto de pequenos RNAs nucleolares chamados snoRNAs (small nucleolar RNA). Os snoRNAs interagem com proteínas específicas e participam de clivagens endonucleolíticas no pré-rRNA e no direcionamento de modificações químicas no RNA ribossomal, como pseudouridilação e metilação do carbono 2` da ribose de alguns resíduos de nucleotídeo (Bachellerie et al., 2002). No núcleo, um pequeno número de RNAs não-codificantes (snRNAs-small nuclear RNAs) está envolvido no splicing de pré-mRNA. De modo geral, esses RNAs (snRNAs e snoRNAs) são transcritos pela RNA polimerase II ou III e passam por modificações póstranscricionais antes de se tornarem funcionais (Perumal e Reddy., 2002).

Usualmente, a terminação da transcrição de sn/snoRNAs envolve um complexo de duas proteínas de ligação a RNA, Nrd1-Nab3 e uma RNA helicase, Sen1p. A proteína Nrd1p interage com o domínio C-terminal (CTD) da RNA pol II e,

concomitantemente, com o exossomo, acoplando a terminação da transcrição ao processamento destes RNAs (Kim et al., 2006; Steinmetz et al., 2001; Vasiljeva e Buratowski., 2006). Após a liberação desses RNAs do complexo de elongação, eles são poliadenilados pelo complexo TRAMP ou pela poli A polimerase Pap1p e em seguidas são processados pelo exossomo/Rrp6p. A interação estável de sn/snoRNAs com proteínas ou a formação de estruturas secundárias muito estáveis no RNA provavelmente regulam o processo de maturação, impedindo que o exossomo degrade completamente esses RNAs (Grzechnik e Kufel., 2008). A proteína Rrp47p também participa da formação da extremidade 3` de sn/snoRNAs ao se associar com a subunidade Rrp6p, provavelmente estimulando sua atividade (Mitchell., 2003).

#### Controle de Qualidade de RNAs nucleares

Durante a transcrição, vários tipos de defeitos podem gerar RNAs aberrantes, como mutações, terminação prematura, defeitos de splicing, falhas na poliadenilação de pré-mRNAs ou ainda modificações químicas errôneas ou ausentes em bases específicas. Todas essas falhas podem resultar no dobramento incorreto desses RNAs ou na perda da capacidade de se montarem com proteínas formando partículas de ribonucleoproteínas funcionais (RNPs). Para que a célula não seja prejudicada por esses RNAs mal formados, um sistema de controle de qualidade é responsável por eliminá-los (Vanacova e Stefl., 2007).

O exossomo e o complexo TRAMP são capazes de degradar eficientemente RNAs não funcionais e, consequentemente, contribuem para o sistema de controle de qualidade de RNAs no núcleo. O complexo TRAMP é formado por uma de duas poliadenilato polimerases, Trf4p ou Trf5p, a RNA helicase Mtr4p e uma de duas

proteínas de ligação a RNA, Air1p ou Air2p. Em leveduras, duas formas de TRAMP foram identificadas, TRAMP4 (Trf4p) e TRAMP5 (Trf5p), com provável diferença de substrato entre elas. As proteínas Air1p e Air2p parecem ter funções redundantes. (Houseley e Tollervey., 2005; Egecioglu et al., 2006).

O complexo TRAMP parece ter mais de uma função. A adição de uma cauda poli A curta torna o RNA um substrato para o exossomo, facilitando o início da degradação enquanto que a proteína Mtr4p provavelmente funciona como um cofator, estimulando a atividade do exossomo e desenovelando eventuais estruturas secundárias ou desestabilizando interações proteínas-RNA. Juntas, essas atividades do TRAMP permitem ao exossomo degradar RNAs longos, estruturados e complexos RNA-proteína de modo rápido e processivo (Houseley et al., 2006; Vanacova e Stefl., 2007).

Ainda não se sabe, entretanto, como RNAs defeituosos são identificados e distinguidos dos RNAs que devem ser apenas processados. Notavelmente, não há características comuns discerníveis na sequência ou estrutura de RNAs aberrantes, o que levou a criação de um modelo cinético de degradação desses RNAs. De acordo com esse modelo, as proteínas da maquinaria de degradação competem com as proteínas que ligam cada tipo de RNA naturalmente. Caso não haja defeito algum em um transcrito, proteínas de ligação a RNA se associam rapidamente, impedindo a interação de proteínas da maquinaria de degradação. Um defeito na transcrição, entretanto, pode acarretar um atraso na ligação de proteínas específicas ou em uma ligação menos estável, favorecendo a ligação de proteínas da maquinaria de degradação e consequente eliminação dos RNAs mal formados (Houseley et al., 2006; Vanacova e Stefl., 2007; Houseley e Tollervey., 2009).

#### Turnover e Controle de Qualidade de mRNAs

No citoplasma, o exossomo atua no "turnover" e em mecanismos de controle de qualidade de mRNA, como decaimento de mRNA mediado por mutação sem sentido (NMD-nonsense-mediated decay), decaimento "non-stop" (NSD) e "no-go" (NGD; Houseley et al., 2006).

Em eucariotos, os mRNAs são degradados após alguns ciclos de tradução em um processo denominado "turnover" ou decaimento de mRNAs. Diferenças nos níveis de degradação e transcrição ajustam a expressão gênica de acordo com as necessidades celulares. O decaimento de mRNAs se inicia com o encurtamento gradual da cauda poli A por deadenilases específicas (complexos PAN 2/3 e CCR4-NOT). Após a deadenilação, esses mRNAs podem então ser degradados na direção 3`-5` pelo exossomo ou na direção 5`-3` pelo complexo Dcp1/2 seguido de ataque pela exonuclease Xrn1p. As duas vias são redundantes e na ausência se uma delas, a outra opera normalmente (Garneau et al., 2007).

O turnover de mRNA citoplasmático também pode ser desencadeado por proteínas sequência-específicas que recrutam a maquinaria de degradação (Isken e Maquat., 2007). Esse é o caso dos mRNAs instáveis ricos em elementos AU. Essa classe de mRNAs possui sequências ricas em adenilato e uridilato que influenciam a estabilidade dos mRNAs. Algumas proteínas interagem simultaneamente com as sequências ricas em AU e componentes da maquinaria de degradação, diminuindo significativamente a meia-vida desse grupo de mRNAs. O exossomo é recrutado nessa via de decaimento ao interagir com proteínas ligantes dos elementos AU Chen et al., 2001; Mukherjee et al., 2002).

Além de contribuir para o turnover normal de mRNAs, o exossomo também exerce papel no turnover de mRNAs defeituosos. A GTPase Ski7p e o complexo Ski,

composto das proteínas Ski2p, Ski3p e Ski8p são os principais co-fatores do exossomo envolvidos no sistema de vigilância de mRNAs (Araki et al., 2001). No decaimento "non-stop", acredita-se que o co-fator Ski7p recrute o exossomo diretamente aos ribossomos que traduzem mRNAs no qual faltam códons de parada, promovendo sua degradação. Ski7p também está envolvida no recrutamento do exossomo na via de decaimento mediado por mutação semsentido. Nessa via, mRNAs que passam por eventos de terminação prematura da tradução são identificados e eliminados por proteínas da maquinaria de degradação, incluindo o exossomo (NMD; Takahashi et al., 2003; Van Hoof et al., 2002).

#### Degradação de transcritos não codificantes (CUTs e PROMPTs)

O exossomo também contribui para a supressão de RNAs produzidos a partir de unidades transcricionais "não clássicas" (Schmid e Jensen., 2008; Thiebaut et al., 2006).

Uma análise em larga escala dos alvos de Rrp6p em levedura indentificou um grupo de transcritos instáveis não-codificantes denominados de "CUTs" (CUT-Cryptic Unstable Transcripts; Wyers et al., 2005). Esses RNAs são degradados rapidamente após sua síntese e ainda não se sabe se eles exercem alguma função na célula. Os complexos TRAMP, Nrd1-Nab3 e exossomo são requeridos no processo de eliminação desses RNAs de modo parecido ao processamento de sn/snoRNAs. Assim como os sn/snoRNAs, os CUTs tem sua transcrição terminada via Nrd1-Nab3, entretanto são degradados rapidamente devido a ausência de estruturas secundárias estáveis ou a associação estável com proteínas (Arigo et al., 2006; Thiebaut etal., 2006).

Outra classe de RNAs diretamente degradada pelo exossomo são os PROMPTs (Promoter Upstream Transcripts). PROMPTs são transcritos "upstream"

do promotor, expressos em vários genes e identificados pela primeira vez em estudos de depleção do exossomo em células humanas. Assim como os CUTs, também não se sabe se esses RNAs exercem algum papel na célula (Preker et al., 2008).

#### Outras funções

Além de todas as funções descritas anteriormente, de caráter mais geral, o exossomo também exerce funções não usuais ou exclusivas de alguns organismos ou tipos celulares.

Co-fator enzimático. Em um trabalho recente, pesquisadores descreveram pela primeira vez uma função para o exossomo como co-fator de outra enzima (Basu et al., 2011). De acordo com Basu e colaboradores, o exossomo participa da geração de diversidade de anticorpos em linfócitos B ao estimular a enzima AID (Activation Induced Citidine Deaminase) nos mecanismos de recombinação de troca de classe (CSR-Class Switch Recombination) e hipermutação somática (SHM-Somatic Hypermutation). A citidina demaninase induzida por ativação (AID) é uma enzima capaz de criar mutações no DNA dos linfócitos B ao converter citosinas em uracilas pela remoção de um grupo amino. Mutações causadas por AID auxiliam na geração da diversidade de anticorpos (Milstein et al., 1998; Shen et al., 2006., Xue et al., 2006). A atividade de AID sobre o DNA requer a transcrição de regiões específicas do DNA chamadas de "regiões S". Logo no início da transcrição dessas regiões, a RNA Pol II é inibida devido à formação de estruturas secundárias ("R loops") e várias proteínas se associam a RNA pol II pausada (Nambu et al., 2003; Rajagopal et al., 2009; Wang et al., 2009).

Nesse contexto, AID e o exossomo são recrutados e ocorre a desaminação de citosinas na região de DNA que está sendo transcrita. Ainda não se sabe

exatamente o mecanismo de como o exossomo poderia estimular a atividade de AID. Uma das hipóteses é que o exossomo compete com o dúplex de DNA para ligar o transcrito nascente, desestabilizando o híbrido DNA/RNA e consequentemente, tornando a fita molde de DNA mais acessível à citidina deaminase (AID). Acredita-se que a proteína de ligação a DNA fita simples RPA estabilize o DNA nessa forma e também participe do processo (Basu et al., 2005; Chaudhuri et al., 2004).

Proteção viral. Em leveduras, a depleção de algumas subunidades do exossomo ou de alguns de seus co-fatores gera o fenótipo "super killer", o que deu origem ao termo "proteínas Ski" (Ski1p-Ski8p). O fenótipo "super killer" é caracterizado por uma capacidade maior de replicação de vírus de RNA dupla fita em cepas ski infectadas (Ridley at al., 1984). O modelo atual proposto é que Ski7p e o complexo Ski, formado pelas proteínas Ski2p, Ski3p e Ski8p recrutam o RNA viral para o exossomo, onde ele é degradado (Butler, 2002). Em mutantes ski, o processo de degradação é menos eficiente, levando ao fenótipo "super Killer". O exossomo também participa da proteção viral em células humanas, ao degradar RNAs virais que contenham sequências denominadas ZREs [Guo et al., 2007; Zinc-finger Antiviral protein (ZAP)-Responsive Elements].

**Síntese do RNA scR1**. Por fim, o exossomo, especialmente a subunidade Rrp44p/Dis3, participa da biogênese do componente de RNA (scR1) da partícula reconhecedora de sinal (SRP-Signal Recognition Particle), montada no nucléolo das células eucarióticas (Grosshans et al., 2001).

#### 1.2.2 Estrutura do exossomo

As enzimas bacterianas PNPase e RNase PH, o exossomo de archaea e o exossomo eucariótico compartilham uma arquitetura similar e altamente conservada pela evolução, apesar de apresentaram subunidades diferentes (Slomovic et al., 2008). O protótipo dessa estrutura consiste de um anel de domínios de RNase PH coberto por domínios de ligação a RNA na parte superior do anel (Figura 2).

PNPases são exorribonucleases responsáveis pela degradação de RNAs na direção 3`-5` em bactérias, mitocôndrias e cloroplastos. PNPases bacterianas são formadas por três cópias de um polipeptídeo que contém, cada um, dois domínios de RNase PH mais dois domínios adicionais de ligação a RNA (S1/KH; Figura 2A). O homotrímero forma uma estrutura semelhante a um anel e somente três, dos seis domínios de RNase têm atividade enzimática fosforolítica (Slomovic et al., 2008).

O exossomo de archaea é formado por três subunidades com atividade de RNase fosforolítica (aRrp41), três com domínios de RNase não funcionais (aRrp42) e três com domínios de ligação a RNA (aCsl4 ou Rrp4). A subunidade aRrp4 possui os domínios de ligação a RNA S1/KH enquanto que aCsl4 possui os domínios S1/zinc ribbon. Dímeros das subunidades aRrp41-aRrp42 são arranjados ao redor de uma cavidade central formando um anel hexamérico. As subunidades aRrp4 ou aCsl4 se associam na parte superior do hexâmero, formando o "cap" (Figura 2 C). O cap pode ser composto por três cópias de aRrp4, três cópias de aCsl4 ou ainda três cópias de uma combinação das duas proteínas. Acredita-se que a diferença na composição de aRrp4/aCsl4 pode afetar a afinidade do complexo por diferentes substratos (Roppelt et al., 2010).

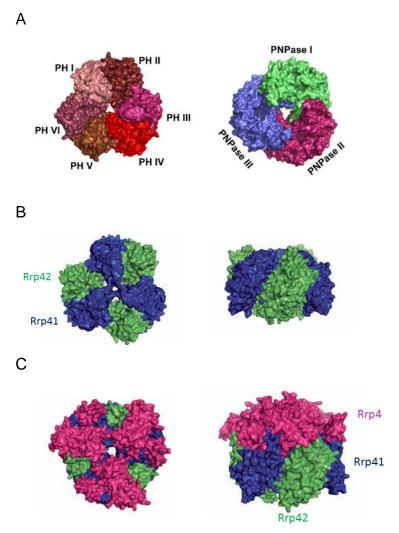
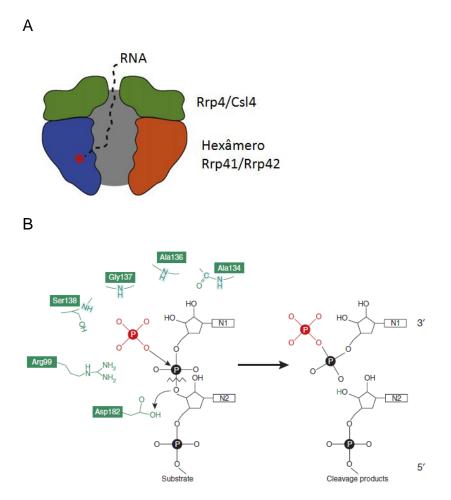


Figura 2. Estrutura do exossomo de archaea e das enzimas bacterianas RNase PH e PNPase. (A) Vista superior das enzimas RNase PH (esquerda) e PNPase (direita). A RNase PH é composta de um hexâmero de subunidades iguais que se associam, cada uma contendo um domínio de RNase. A PNPase é formada por três subunidades iguais, cada uma contendo dois domínios de RNase. Os domínios de ligação a RNA da RNase PH e PNPase se localizam na parte superior do complexo (não mostrado). (B) Vista superior (esquerda) e lateral (direita) do exossomo de archeae sem as subunidades com domínio de ligação a RNA (aRrp4 e aCsl4). As subunidades aRrp41 e aRrp42 se associam em três dímeros, formando um hexâmero. (C) Vista superior (esquerda) e lateral (direita) do exossomo de archaea com uma das subunidades com domínio de ligação a RNA (aRrp4) associadas na parte superior do complexo. (Retirado de Slomovic et al., 2008; Vanacova e Stefl., 2007).

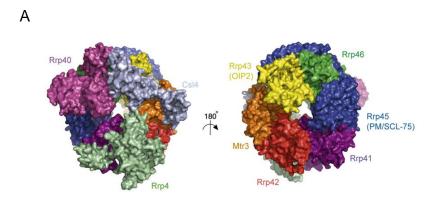
De acordo com o modelo atual de atividade do exossomo, o RNA entraria pelo poro formado pelas subunidades aRrp4/aCsl4 e seria conduzido através da cavidade central até um dos três sítios catalíticos, na região interna da interface aRrp41/aRrp42. Durante a catálise, o exossomo se move ao longo da molécula de RNA e os resíduos de ribonucleotídeos são liberados gradativamente na forma de 5`

nucleosídeo difosfato (NDP) devido ao ataque do fosfato inorgânico sobre a ligação fosfodiéster (Figura 3; Navarro et al., 2008).

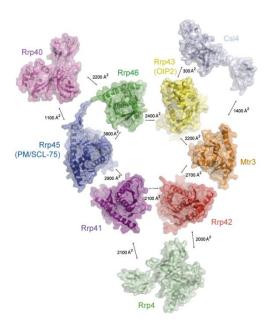


**Figura 3.** Modelo de degradação de RNA pelo exossomo de archaea. (A) Caminho percorrido pela molécula de RNA na via de degradação pelo exossomo de Archaea. (B) Modelo parcialmente hipotético mostrando o ataque fosforolítico sobre a ligação fosfodiéster e a liberação de um nucleosídio di-fosfato (NDP). Um íon Mg<sup>2++</sup> é requerido para a atividade, mas não se sabe os detalhes de sua coordenação. (Retirado de Schmid e Jensen., 2008; Wahle., 2007).

O exossomo eucariótico divergiu do exossomo de archaea ao aumentar sua complexidade, mas o protótipo permanece o mesmo. Seis diferentes subunidades com domínios de RNase PH formam o anel (Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp45p, Rrp46p e Mtr3p) e três subunidades com domínios de ligação a RNA (Rrp4p, Rrp40p e Csl4p) formam o "cap" (Liu et al., 2006, Figura 4).



В



**Figura 4.** Estrutura do exossomo eucariótico (humano). (A) Vista superior (esquerda) e inferior (direita) do exossomo humano na ausência das subunidades catalíticas (Rrp6 e Rrp44). (B) Representação da superfície do exossomo de humanos e a área de interação entre as subunidades na ausência de Rrp44 e Rrp6 (retirado de Liu et al., 2006).

Tanto em bactéria quanto em archaea, os três sítios ativos fosforolíticos estão localizados na parte interna do anel de RNases e são acessíveis somente por meio da cavidade central. Em humanos e leveduras, as seis proteínas que formam o anel perderam sua atividade fosforolítica e, portanto, são inativas. Estas subunidades apresentam um alto grau de homologia com as subunidades de archaea e são divididas como semelhantes a Rrp41 de archaea (aRrp41-like: Rrp41p, Rrp46p e Mtr3p) ou semelhantes a aRrp42 (aRrp42-like: Rrp42p, Rrp43p e Rrp45p).

Assim como em archaea, elas se associam em dímeros, alternando entre uma subunidade similar a aRrp41 e uma similar a aRrp42, formando o anel com uma cavidade central (Liu et al., 2006; Tabela 1).

**Tabela 1**: Componentes do exossomo de levedura e de archaea.

Homólogo de Escherichia coli	Subunidade do exossomo de archaea	Subunidade do exossomo de levedura	Descrição dos componentes de levedura
PNPase	aRrp41	Rrp41	Todos os componentes
		Rrp46	são partes do anel
		Mtr3	hexamérico e têm
			similaridade com
			aRrp41
	aRrp42	Rrp42	Todos os componentes
		Rrp43	são partes do anel
		Rrp45	hexamérico e têm
			similaridade com
			aRrp42
	aRrp4 ou aCsl4	Rrp4	Todos os componentes
		Rrp40	possuem domínios de
		Csl4	ligação a RNA (S1/KH)
RNase R	-	Rrp44	Possui atividade
			catalítica e está presente
			no núcleo e no
			citoplasma
RNase D	-	Rrp6	Possui atividade
			catalítica e está presente
			somente no núcleo

Em eucariotos, a atividade exorribonucleolítica 3`-5` é atribuída a duas outras subunidades que se associam ao anel, a Rrp6p e a Rrp44p. As duas subunidades têm atividade de RNase hidrolítica, a qual se baseia no ataque da extremidade 3` da molécula de RNA por uma molécula de água, liberando 5` nucleosídeos monofosfatos (NMP; Dziembowski et al., 2007; Liu et al., 2006; Carneiro et al., 2007).

A Rrp44p (ou Dis3p) é uma exorribonuclease processiva que interage com a região inferior do complexo, particularmente com o dímero Rrp41p-Rrp45p e em menor extensão, com a proteína Rrp43p. Além do domínio de exorribonuclease (RNB), a Rrp44p contém mais três domínios de ligação a RNA (CSD1, CSD2 e S1), compondo uma região de homologia a RNase II bacteriana, e um domínio de endorribonuclease (PIN).

O domínio PIN é importante não somente por conferir atividade endonucleolítica ao complexo, mas também por interagir com subunidades do hexâmero, contribuindo para a associação de Rrp44p com as subunidades que formam o anel (Wang et al., 2007).

Em humanos, dois homólogos de Rrp44p foram identificados, sendo um predominantemente nuclear (hDis3) e outro estritamente citoplasmático (hDis3L1) e desprovido de atividade endonucleolítica (Staals et al., 2010).

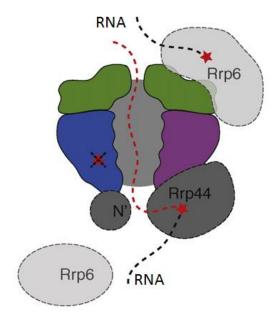
A Rrp6p é uma exorribonuclease com atividade distributiva e provavelmente se associa com a parte superior do complexo, interagindo com subunidades do "cap" (Cristodero et al., 2008). Rrp6p pertence ao grupo das nucleases "DEDD" e sua parte central é homóloga a enzima bacteriana RNase D. As nucleases pertencentes ao grupo "DEDD" são caracterizadas por pelo menos quatro resíduos ácidos conservados (DEDD) necessários para a degradação do ácido nucléico na direção 3`-5`, por meio de um mecanismo hidrolítico (Zuo e Deutscher., 2001 Steitz e Steitz., 1993). Em leveduras, Rrp6p se concentra exclusivamente no núcleo, enquanto que a proteína homóloga humana (PM/Scl-100) tem localização citoplasmática e nuclear. Essa diferença de localização provavelmente está relacionada a preferências de substrato do complexo *in vivo* (Graham et al., 2006).

Além de ter sua atividade associada ao exossomo, existem evidências que Rrp6p pode atuar de modo independente, tendo papel em alguns processos celulares, como o ciclo celular e processamento de snoRNAs (Callahan e Butler, 2008; Graham et al., 2009). Em humanos, hRrp6 (PM/Scl-100) ainda está associada a doenças auto-imunoes, como polimiosites e dermatomiosites (Mahler e Raijmakers., 2007).

#### Mecanismos de degradação de RNA pelo exossomo em eucariotos

Como apresentado acima, o mecanismo de recrutamento de RNA via uma cavidade central é bastante conservado, sendo encontrado em eucariotos, archaea e complexos bacterianos similares ao exossomo (PNPase e RNas PH). Mesmo no exossomo eucariótico, onde os domínios de RNase fosforolíticos são inativos, a molécula de RNA passa por meio da cavidade central do hexâmero até atingir o sítio ativo da Rrp44p, na parte inferior do complexo (Bonneau et al., 2009; Malet et al., 2010). Embora o caminho via um canal central, descrito acima, seja a via de recrutamento mais importante para muitos substratos, esse não é o único caminho pelo qual o exossomo eucariótico liga e degrada RNAs (Figura 5; Schaeffer et al., 2009).

O domínio PIN, responsável pela atividade endonucleolítica do exossomo, é acessível diretamente pelo solvente, o que é consistente com o fato de o exossomo ser capaz de degradar RNAs circulares, incapazes de passar pela cavidade central (Schaeffer et al., 2009).



**Figura 5.** Vias de degradação de RNA pelo exossomo eucariótico (Retirado de Schmid e Jensen., 2008).

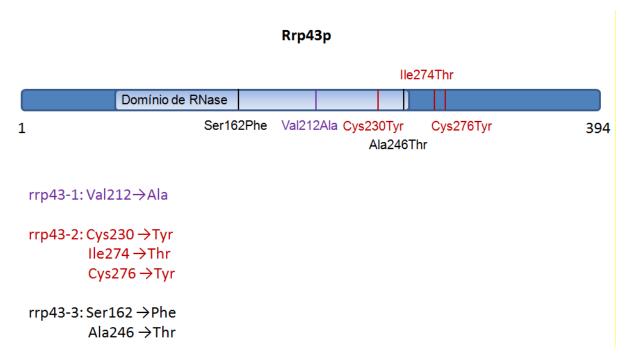
Moléculas de RNA substratos de Rrp6p provavelmente são recrutadas por outra via, própria de Rrp6, uma vez que essa subunidade se localiza na porção superior do complexo. Dessa forma, em eucariotos, existem três caminhos utilizados no recrutamento e degradação de RNAs pelo exossomo: degradação via Rrp6p, clivagem endonucleolítica pelo domínio PIN de Rrp44p, com acesso direto pelo solvente e degradação por meio do domínio RNB da Rrp44p. Na via de degradação exorribonucleolítica de Rrp44p, a molécula de RNA precisa passar por dentro da cavidade central formada pelas subunidades do anel até atingir o sítio ativo de Rrp44p. Existem muitas evidências que Rrp6p também exerça atividade independente do exossomo. (Figura 5; Bonneau et al., 2009; Malet e Lorentzen., 2011; Callahan e Butler., 2008; Graham et al., 2009).

#### Subunidade Rrp43

Apesar da importância do exossomo, ainda não está claro o papel de cada subunidade no seu funcionamento. Em um trabalho realizado em nosso laboratório,

descobriu-se que mutantes da subunidade Rrp43p (rrp43-1, rrp43-2 e rrp43-3) apresentam o fenótipo de termossensibilidade (ausência de crescimento a 37°C), além de defeitos no processamento de rRNA e aumento da meia-vida de alguns mRNAs (Oliveira et al., 2002; Figura 6).

Rrp43p é uma proteína essencial que apresenta um domínio não funcional de RNase fosforolítico e interage com a subunidade Rrp46p e mais fracamente com Mtr3p e Rrp44p. Uma vez que Rrp43p não possui atividade enzimática na degradação de RNA pelo exossomo, ainda não se sabe como mutações pontuais em Rrp43p afetam a atividade do complexo.



**Figura 6.** Representação esquemática dos mutantes de Rrp43p utilizados neste trabalho. (Baseado em Oliveira et al., 2002).

#### 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo do efeito de mutações pontuais em Rrp43p na montagem e estabilização do complexo do exossomo em Saccharomyces cerevisiae.

#### Objetivos específicos:

- Purificação do exossomo formado por RRP43, ou mutantes, a partir de extratos de levedura;
- Analisar os efeitos das mutações de Rrp43p na sua interação com outras subunidades do complexo;
- Analisar os efeitos das mutações na estabilidade do complexo;
- Determinar atividade de RNase dos complexos selvagem e mutantes;
- Analisar estrutura do exossomo por microscopia eletrônica.

#### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Clonagens

Os plasmídeos utilizados neste estudo foram criados seguindo os métodos convencionais de clonagem molecular, como descrito em Sambroock et al., 1989. Os genes *RRP6*, *RRP44* e *RRP46* foram amplificados com fusão a um tag de His<sub>6x</sub> a partir de uma reação de PCR utilizando primers "forward" e "reverse" específicos para cada gene e contendo sítios para as enzimas de restrição Smal e Xhol no início e no fim de cada sequência gênica, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Primers utilizados na amplificação de HisRRP6, HisRRP44 e HisRRP46 a partir de DNA genômico.

Subunidade	Primers
RRP6	Forward 5`-
	CCCGGGATGCATCACCATCACATGACTTCTGAAAATCC
	GGA
	Reverse 5`- CTCGAGTCACCTTTTAAATGACAGATTC
RRP44	Forward 5`-
	CCCGGGATGCATCACCATCACATGTCAGTTCCCGCTAT
	CG
	Reverse 5`- CTCGAGCTATTTTAACAATAATTCTGCC
RRP46	Forward 5`-
	CCCGGGATGCATCACCATCACATGAGCGTCCAAGCAG
	AAA
	Reverse 5`- CTCGAGCTATACAACTAGACGAGGTG

Os sítios de restrição para Smal e Xhol foram adicionados para facilitar as estratégias de clonagem. A enzima utilizada na reação de PCR para a amplificação de HisRRP6 e HisRRP44 foi a pfuUltra<sup>™</sup> High Fidelity DNA polimerase, e o planejamento da reação foi feito de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (Stratagene). O fragmento HisRRP46 foi amplificado utilizando-se a enzima Taq polimerase (Fermentas).

A estratégia de clonagem do gene HisRRP46 foi diferente daquela utilizada para os genes HisRRP6 e HisRRP44. O fragmento HisRRP46 foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T através de incubação com a enzima DNA ligase a 16°C por 18h e em seguida células de *E.coli* (DH5α) foram transformadas. Após extração de DNA de uma colônia transformada o inserto foi retirado por meio de reação com as enzimas de restrição Smal e Xhol e inserido no vetor pMET36 tratado com Smal e Xhol. Os fragmentos HisRRP6 e HisRRP44 foram inseridos diretamente no vetor pMET36 tratado com Smal. Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeo	Característica	Referência
pGEM-T	LacZ, Amp <sup>R</sup>	Promega
pMET36	URA3, Amp <sup>R</sup>	Este estudo
pMET36HisRRP6	MET25 <sup>1</sup> ::HisRRP6,URA3, Amp <sup>R</sup>	Este estudo
pMET36HisRRP44	MET25::HisRRP44,URA3, Amp <sup>R</sup>	Este estudo
pMET36HisRRP46	MET25::HisRRP46,URA3, Amp <sup>R</sup>	Este estudo
pMETRRP43-TAP	MET25::RRP43-TAP,HIS3, Amp <sup>R</sup>	Goldfeder e Oliveira,
pMETrrp43-1-TAP	MET25::rrp43-1-TAP,HIS3, Amp <sup>R</sup>	dados não publicados
pMETrrp43-2-TAP	MET25::rrp43-2-TAP,HIS3, Amp <sup>R</sup>	-
pMETrrp43-3-TAP	MET25::rrp43-3-TAP,HIS3, Amp <sup>R</sup>	

<sup>1</sup>MET25: promotor do gene MET25 (O-acetilhomoserine-O-acetil serina sulfidrilase) de *S. cerevisiae*.

#### 3.2 Sequenciamento de plasmídeos

DNA plasmidial de *E.coli* foi extraído utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e sequenciado empregando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer) de acordo com recomendações do fabricante. Foram utilizados 3,2 pmol de primer e 200ng de vetor como molde em reação consistindo de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, hibridização a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

#### 3.3 Transformação de células competentes (*E. coli*-DH5α)

Os plasmídeos foram inseridos nas bactérias pelo método de PEG (Hanahan, 1983) utilizando 20 µl da ligação, 80 µl do tampão de transformação (KCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 0,5 M, PEG 10%) e 100 µl de células competentes. As amostras foram resfriadas por 30 minutos no gelo e em seguida submetidas a um choque térmico de 10 minutos em temperatura ambiente. As células transformadas foram então incubadas por 50 minutos a 37°C em 1 ml de meio LB (Luria Bertani, composto por triptona/peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1% NaCl) e em seguida plaqueadas e meio LB contendo ampicilina (100 µg/µl). Após o crescimento das células em meio seletivo, colônias foram inoculadas em meio LB-ampicilina para a extração do DNA plasmidial (mini-prep) e posterior sequenciamento ou transformação de levedura (*S. cerevisiae*).

#### 3.4 Transformação de leveduras

Duzentos microlitros (200 $\mu$ L) de cultura de células crescidas em meio YPD (OD<sub>600</sub>~1,0) foram coletados por centrifugação a 12000rpm por 1 minuto, lavadas com 100  $\mu$ L TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH= 8,0), coletadas novamente e ressuspendidas em 100  $\mu$ L de solução de transformação (0,2 LiOAc; 40%PEG; 100mM DTT ). Após a adição do DNA plasmidial (2-5 $\mu$ g), as células foram submetidas a um choque térmico por 30 minutos a 42°C, sendo em seguida plaqueadas em meio seletivo.

#### 3.5 Purificação do complexo do exossomo por cromatografia com TAP-tag

A purificação de Rrp43p-TAP selvagem e mutantes foi realizada seguindo protocolo já descrito (Mitchell, 2001). A cepa contendo o gene Rrp43 selvagem

(RRP43) ou mutante fusionado ao TAP-tag e integrado no plasmídeo pMET foi crescida em meio mínimo YNB-glicose complementado com uracila, lisina e leucina a 30°C sob agitação até OD<sub>600</sub> ~1,0. Quatro litros de células foram coletados por centrifugação e ressuspendido em tampão TMN (10mM Tris pH 7,6, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Nonidet P40, 1mM PMSF). As células foram congeladas em nitrogênio líquido e lisadas através de agitação vigorosa em "Ball Mill". Após centrifugação, o extrato total foi incubado com 100µL de IgG-sepharose (GE Healthcare) por 2 horas a 4°C sob agitação. Em seguida, a resina de IgG-sepharose foi lavada com 40mL do mesmo tampão de lise e incubada com 120 µL do tampão lise contendo 1mM de DTT, 0,5 mM EDTA e 20U de TEV protease por 18 horas a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e submetido a ensaios de degradação de RNA e Western blotting. Para os experimentos de microscopia eletrônica o purificado com TEV foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex-75 e o primeiro pico (6-8ml) foi coletado, concentrado e enviado para os experimentos de microscopia eletrônica na Universidade da Califórnia em Santa Cruz, Estados Unidos. Ensaios de atividade foram realizados antes do envio das amostras para confirmar que o complexo ainda se matinha functional.

## 3.6 Análise de proteínas

#### **3.6.1 SDS-PAGE**

Os extratos de proteína foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com protocolo descrito em Sambrock et al., 1989.

#### 3.6.2 Western blotting

Após eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Towbin et al., 1979) em tampão de transferência gelado (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glycine; 15% metanol) por um período de 2 horas com uma corrente constante de 250 mA.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH8,0; NaCl 150 mM, 0,2% Tween20) contendo 5% de leite desnatado, sob leve agitação por duas horas a 25°C. Transcorrido este tempo, a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS-T e posteriormente incubada por 2 horas em TBS-T 5% de leite desnatado contendo o anticorpo anti-Mtr3 (GE Healthcare) na diluição de 1:500. A membrana foi lavada novamente com TBS-T e em seguida transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase; GE Healthcare) na diluição de 1:20.000 por 2 horas. A membrana foi então submetida à lavagem final com TBS-T antes da revelação.

Para a revelação do Western blot, foi utilizado o kit ECL plus (Millipore) que se baseia na conjugação do anticorpo secundário "anti-mouse" com a "horseradish peroxidase" (HRP). A peroxidase reage com o substrato ao serem adicionados os reagentes de detecção ECL, resultando em um sinal quimioluminescente, detectado por um filme de Raios X.

#### 3.6.3 Quantificação de proteínas pelo método do ácido binciconínico (BCA)

A quantificação de extratos de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Smith et al., 1985. Um mililitro de solução de 5mM CuSO<sub>4</sub> em BCA (Bicinchoninic Acido Solution, SIGMA) foi adicionado a 10µL de extrato protéico e incubado por 30 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, a absorbância

(562nm) foi medida e a concentração de proteínas determinada por comparação a uma curva padrão.

### 3.7 Ensaio de degradação de RNA

Um picomol de RNA (Oligonucleotídeo de Poli A<sub>12</sub>) marcado radioativamente foi incubado por 30 min a 37°C em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8; 0, 5 mM acetato de magnésio, 0,2% Triton-X-100, 150mM de acetato de potássio, 1mM DTT, 1mM PMSF, na presença de 9μg de snoRNP boxC/D (controle) ou 1, 3, 6 e 9μg de exossomo purificado através da metodologia TAP-tag (Tandem affinity purification) utilizando RRP43p ou mutantes (rrp43-1, rrp43-2 e rrp43-3). Para finalizar a reação, 5μL de tampão de amostra contendo formamida foram adicionados e as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 8% contendo uréia. Após a corrida, o gel foi envolvido em um filme plástico e exposto a uma tela sensível a radiação por 18 horas e a imagem foi analisada em "phosphoimager" (Molecular Dynamics).

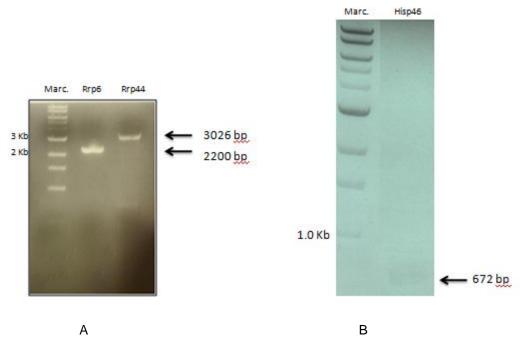
#### 4. **RESULTADOS**

### 4.1 Clonagens

Os genes das subunidades Rrp6, Rrp46 e Rrp44 foram clonados fusionados a um tag de His<sub>6x</sub> com o objetivo de verificar se existe diferença na quantidade dessas subunidades quando co-purificadas com o exossomo selvagem (RRP43) ou mutantes de Rrp43 (rrp43-1, rrp43-2 e rrp43-3).

O vetor escolhido para a clonagem dos genes RRP6, RRP44 e RRP46 foi o pMET36, no qual a expressão gênica está sob o controle do promotor MET25, um promotor constitutivo de *S. cerevisiae* (Tabela 3).

Inicialmente, os fragmentos de DNA contendo os genes RRP6, RRP44 e RRP46 fusionados ao tag de His<sub>6x</sub> foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico (Figura 7).



**Figura 7**. Amplificação dos genes RRP6, RRP44 e RRP46 fusionados a um tag de Histidina ( $His_{6x}$ ). (A) HisRRP6 e HisRRP44 amplificados por PCR. RRP6 tem o tamanho de 2200 bp e RRP44 de 3026 bp. (B) HisRRP46 amplificado por PCR. RRP6 tem o tamanho de 672 bp.

O vetor pMET36 foi clivado com Smal a fim de fazer a ligação com os fragmentos de HisRRP6 e HisRRP44 (Figura 8).

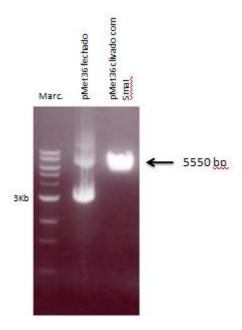
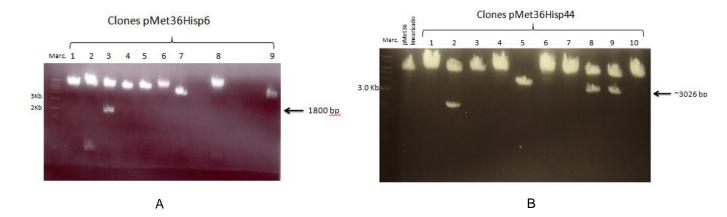


Figura 8. Vetor pMET36 clivado com Smal. O vetor pMET36 tem o tamanho de 5550 bp.

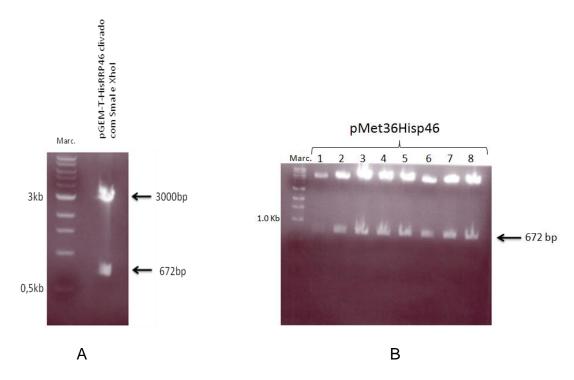
Após a ligação dos insertos HisRRP6 e HisRRP44 com o vetor clivado com Smal, células de *E.coli* (DH5α) foram transformadas e algumas colônias foram selecionadas para análise de restrição a fim de verificar em quais colônias houve a inserção eficiente dos fragmentos amplificados (Figura 9).

Como mostra a figura 9, um clone pMET36HisRRP6 e dois clones pMET36HisRRP44 estavam corretos e foram sequenciados a fim de verificar a existência de mutações. Após sequenciamento, as cepas de levedura *RRP43*, *rrp434-1*, *rrp43-2* e *rrp43-3* foram transformadas com os plasmídeos pMET36HisRRP6 e pMET36HisRRP44.



**Figura 9.** Análise de restrição dos clones pMET36HisRRP6 e pMET36HisRRP44. (A) Clivagem dos clones de pMET36HisRRP6 com BamHI. Com o inserto na direção correta um fragmento de 1800 bp é liberado. (B) Clivagem dos clones pMET36HisRRP44 com Spel e Xhol. Com o inserto na direção correta, um fragmento de 3026 bp, correspondente a HisRRP44, é liberado.

A obtenção dos clones pMET36HisRRP46 foi realizada de modo diferente. Inicialmente foi feita uma ligação do fragmento HisRRP46 com o vetor de clonagem pGEM-T e então bactérias foram transformadas com o plasmídeo recombinante pGEM-T-HisRRP46. O plasmídeo recombinante foi extraído a partir de uma colônia de bactérias selecionada e em seguida o fragmento HisRRP46 foi purificado de gel de agarose a partir da clivagem de pGEM-T-HisRRP46 com as enzimas Smal e Xhol (Figura 10 A). Após purificar o fragmento HisRRP46 do gel, foi feita uma ligação com o vetor pMET36 tratado com Smal e Xhol e novas bactérias foram transformadas com o vetor recombinante pMET36HisRRP46. O DNA de várias colônias foi extraído e em seguida foi realizada uma análise de restrição. (Figura 10 B).



**Figura 10.** Obtenção dos clones pMET36HisRRP46. (A) Clivagem do clone pGEM-T-HisRRP46 escolhido. O fragmento de 672 bp corresponde a HisRRP46 e foi liberado através de clivagem com as enzimas Smal e Xhol. A banda de 3000 bp corresponde ao vetor pGEM-T aberto. (B) Análise de restrição dos clones pMET36HisRRP46. O fragmento de HisRRP46 foi liberado através de clivagem com as enzimas Smal e Xhol.

Após o sequenciamento de pMET36HisRRP46 as cepas *RRP43, rrp43-1, rrp43-2* e *rrp43-3* foram transformadas com pMET36HisRRP46.

#### 4.2 Testes de expressão das proteínas recombinantes em levedura

As cepas de levedura transformadas com os plasmídeos codificando RRP43-TAP, rrp43-1 a rrp43-3-TAP e HisRRP46, HisRRP6 e HisRRP44 foram incubadas em 500mL e coletadas. Extratos totais foram obtidos dessas cepas e utilizados em ensaios de western blot para detecção das proteínas recombinantes com anticorpos anti-His tag. Nestes ensaios, entretanto, não foi possível detectar as respectivas

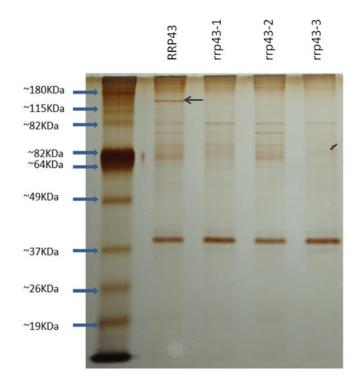
subunidades fusionadas ao tag de His<sub>6x</sub> (dados não mostrados), provavelmente porque sua expressão na célula é muito baixa.

### 4.3 Purificação do complexo

Com o objetivo de analisar diferenças em proteínas co-purificadas com o exossomo selvagem ou com os três mutantes, uma eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada com amostras dos complexos purificados. As cepas de levedura expressando RRP43-TAP e os mutantes rrp43-1 a rrp43-3 foram incubadas em 4 litros e coletadas. Em seguida, as células foram congeladas com nitrogênio líquido, lisadas em "Ball Mill" e, após centrifugação, 100 µL de resina de IgG-sepharose foram incubados por 2 horas a 4°C com 80mg de proteína total (extrato total). Após a eluição com TEV, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida e coradas com prata (Figura 11).

No gel é possível observar uma banda de aproximadamente 115 KDa no exossomo selvagem que não aparece nos mutantes (indicada pela seta). Após identificação por espectrometria de massas, foi confirmado que a banda corresponde à proteína Rrp44p/Dis3 (113,7KDa), uma das subunidades catalíticas do exossomo. Dessa forma, mutações pontuais na subunidade Rrp43 afetam a estabilidade do complexo, alterando a sua interação com a subunidade catalítica Rrp44p.

A subunidade Rrp44p é ancorada ao exossomo principalmente por meio de interações entre seus CSDs (CSD-Cold Shock Domain) e o dímero Rrp41p/Rrp45p. Rrp44p também interage com a Rrp43p, quando esta está associada ao anel de RNase PH (Wang et al., 2007).

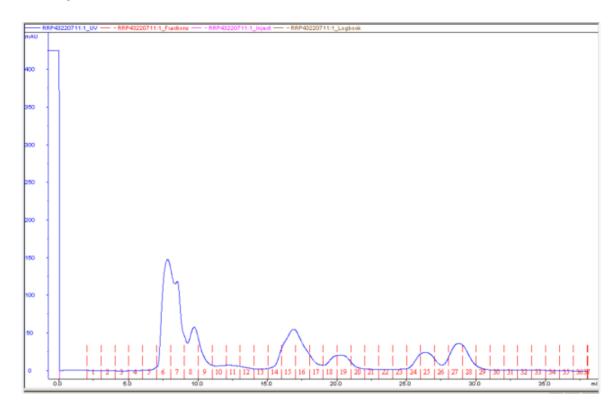


**Figura 11.** Gel de poliacrilamida corado com prata referente às amostras purificadas após clivagem com TEV protease. A seta na canaleta correspondente ao exossomo selvagem (RRP43) indica a proteína Rrp44p, identificada por espectrometria de massas.

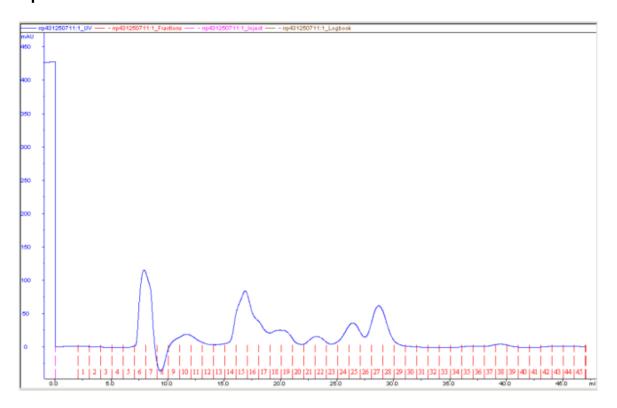
A fim de otimizar o processo de purificação e eliminar o excesso de TEV protease, uma cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) foi realizada com o purificado após a clivagem com TEV (Figuras 12, 13 e 14).

O exossomo está presente no primeiro pico da filtração em gel (6-8mL), como confirmado por western blotting  $\alpha$ -Mtr3 e ensaio de degradação de RNA (dados não mostrados).

# RRP43

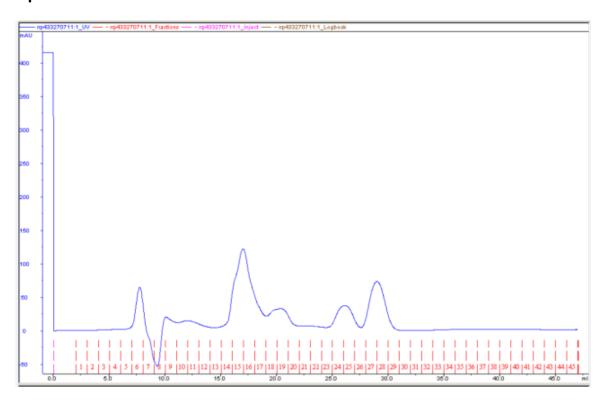


# rrp43-1

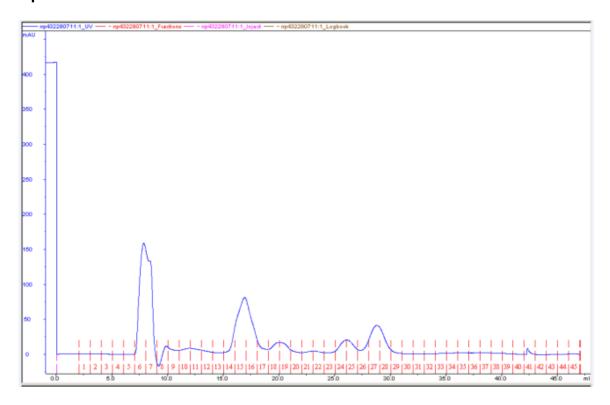


**Figura 12.** Gráficos de filtração em gel das amostras provenientes da purificação do exossomo após clivagem com TEV (RRP43 e rrp43-1). Eixo X: Volume de eluição (ml). Eixo Y: Absorbância (mAU).

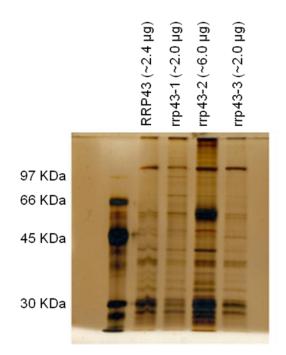
# rrp43-2



# rrp43-3



**Figura 13 (continuação).** Gráficos de filtração em gel das amostras provenientes da purificação do exossomo após clivagem com TEV (rrp43-2 e rrp43-3). Eixo X: Volume de eluição (ml). Eixo Y: Absorbância (mAU).

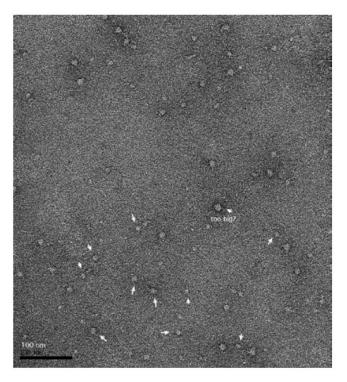


**Figura 14.** Gel de poliacrilamida corado com prata referente às amostras resultantes do primeiro pico (6-8ml) de absorbância na filtração em gel dos purificados de TEV.

#### 4.4 Ensaios de microscopia eletrônica

Com o objetivo de caracterizar as diferenças conformacionais entre o complexo do exossomo selvagem e os três mutantes de Rrp43p, resolvemos analisar os complexos por microscopia eletrônica. Os experimentos de microscopia eletrônica foram realizados na Universidade da Califórnia, Santa Cruz, pela Profa. Dra. Melissa Jurica.

O primeiro pico (6-8ml) de absorbância em cada amostra da filtração em gel foi concentrado e enviado para os EUA, mas até o momento, somente o exossomo selvagem (RRP43) foi analisado. As imagens resultantes da microscopia eletrônica, entretanto ainda não foram completamente processadas (Figura 15).



**Figura 15.** Imagem não processada de microscopia eletrônica do exossomo selvagem (RRP43). Imagem cedida por Melissa Jurica, Universidade da Califórina, Santa Cruz, EUA.

## 4.5 Western blotting $\alpha$ -Mtr3

Uma vez que as mutações em Rrp43p afetam a quantidade de Rrp44p copurificada, resolvemos avaliar o mesmo efeito sobre a subunidade Mtr3p por meio de Western blotting  $\alpha$ -Mtr3. A subunidade Mtr3p foi escolhida por interagir diretamente com Rrp43p. Dessa forma, amostras do exossomo selvagem (RRP43) e mutantes (rrp43-1, rrp43-2 e rrp43-3) purificadas por TAP-tag foram submetidas a ensaios de western blotting utilizando anticorpo  $\alpha$ -Mtr3.

A quantidade de Mtr3p co-purificada é menor nos mutantes, indicando que as mutações em Rrp43p afetam a montagem do complexo (Figura 16). A diferença na quantidade de Mtr3p entre os mutantes, entretanto, não pode ser observada.

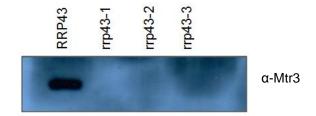


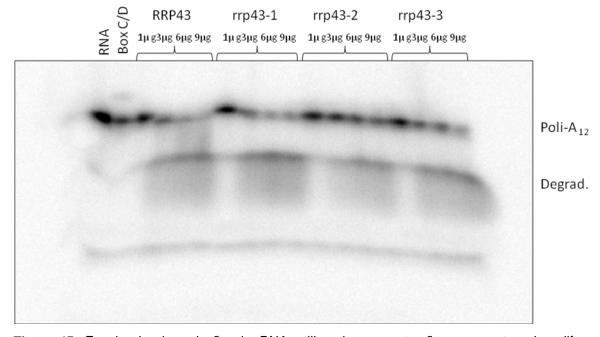
Figura 16. Western blotting  $\alpha$ -Mtr3 do purificado com TEV do exossomo selvagem (RRP43) e dos três mutantes de Rrp43 (rrp43-1, rrp43-2 e rrp43-3).

Como as mutações Rrp43p afetam a montagem do complexo, o próximo passo seria investigar se esse defeito seria capaz de afetar sua atividade enzimática.

#### 4.6 Ensaio de degradação de RNA

A fim de avaliar o efeito das mutações em Rrp43p sobre a atividade do complexo, um ensaio de degradação de RNA foi realizado utilizando como substrato um oligo de poliA<sub>12</sub> marcado radioativamente na extremidade 5` (Figura 17).

O exossomo purificado a partir da cepa selvagem (RRP43) apresentou maior atividade exorribonucleolítica, seguido dos mutantes rrp43-1, rrp43-3 e rrp43-2, respectivamente. O efeito das mutações sobre a atividade do complexo é consistente com o tipo e o número de aminoácidos substituídos em cada caso. O mutante rrp43-1 possui apenas uma mutação que consiste em uma substituição de valina por alanina, dois aminoácidos apolares e com estrutura similar, na posição 212 (Val212Ala). O mutante rrp43-3 possui duas mutações, Ser162Phe e Ala246Thr. Na primeira mutação um aminoácido polar (Ser) é substituído por um apolar (Phe) e na segunda mutação ocorre o inverso, um aminoácido apolar é substituído por um polar. O mutante que apresentou menor atividade, rrp43-2, também possui o maior número de mutações, sendo três ao todo (Cys230Tyr, Ile274Thr e Cys276Tyr).



**Figura 17.** Ensaio de degradação de RNA utilizando concentrações crescentes das diferentes amostras de exossomo purificado. Um oligo de RNA contendo uma sequência de 12 resíduos de adenosina-monofosfato foi marcado radioativamente com P<sup>32</sup> na posição 5`. Ensaio realizado com auxílio da Dra. Márcia C. T. Santos, à época doutoranda em nosso laboratório.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o exossomo de *S. cerevisiae* foi purificado a partir de cepas expressando RRP43 selvagem ou um de três mutantes, rrp43-1, rrp43-2 ou rrp43-3. As cepas mutantes de Rrp43p são termossensíveis (ausência de crescimento a 37°C), além de apresentar falhas no processamento de RNA ribossomal e aumento da meia-vida de alguns mRNA (Oliveira et al., 2002). Através dos resultados obtidos neste trabalho é possível inferir que estas características são resultantes de defeitos na estabilidade estrutural do complexo.

A proteína Rrp43p de *Saccharomyces cerevisiae* é formada por 394 aminoácidos e possui um domínio de RNase PH 1 não funcional, localizado entre os aminoácidos 48 e 245. Rrp43p interage diretamente com Rrp46p formando um dímero e mais fracamente com a subunidade catalítica Rrp44p, a proteína do "cap" Csl4 e com o dímero Mtr3p-Rrp42p, através de Mtr3p (Liu et al, 2006; Hernandez et al, 2006). Em humanos, existem contatos adicionais com Rrp45p, devido a uma extensão de 180 aminoácidos na extremidade C-terminal que encobre parte de Rrp46p e Rrp43p externamente (Liu et al., 2006).

Ensaios de purificação e western blotting mostraram que os mutantes de Rrp43 co-purificam Rrp44p e Mtr3p menos eficientemente, mas não foi possível observar diferença na quantidade dessas subunidades co-purificadas entre os mutantes de Rrp43p (Figuras 11 e 16).

Em um ensaio de degradação de RNA utilizando um oligo de poli A<sub>12</sub> marcado radioativamente, verificou-se que os mutantes de Rrp43p têm atividade enzimática menor quando comparados ao exossomo selvagem (Figura 17). O mutante que apresentou atividade mais próxima do selvagem foi o mutante rrp43-1 seguido dos mutantes rrp43-3 e rrp43-2.

De acordo com a estrutura do exossomo de humanos e o alinhamento de sequências de Rrp43p entre humanos e leveduras, é possível prever os aminoácidos provavelmente responsáveis pela interação direta entre as subunidades do exossomo em leveduras e mapear a região de Rrp43p no qual as mutações se localizam (Liu et al., 2006).

No mutante rrp43-1, no qual uma valina é substituía por alanina na posição 212 (V212A), a mutação se encontra em um aminoácido com alto grau de conservação e está próxima de quatro aminoácidos que provavelmente fazem contato com Mtr3p (Y214, K216, S221 e R222). Alanina e valina são aminoácidos apolares e de estrutura bastante similar, tendo como cadeia lateral um grupo metil e um grupo isopropil, respectivamente. Como valina e alanina possuem uma cadeia lateral bem parecida, é provável que essa mutação não cause alterações muito significativas na estrutura do complexo, o que explicaria a atividade de rrp43-1 próxima de RRP43 (Figura 17).

O mutante rrp43-2 possui três mutações, sendo duas substituições de cisteína por tirosina, uma na posição 230 (C230Y) e outra na posição 276 (C276Y), e uma substituição de isoleucina por treonina na posição 274 (I274T). A cisteína C230 é conservada em humanos e *S. cerevisiae* e está próxima de dois aminoácidos que provavelmente fazem contato com Mtr3 (S221 e R222). Apesar de pertencerem ao mesmo grupo de aminoácidos (polares), cisteína e tirosina apresentam estruturas bem distintas entre si. Tirosina possui na sua cadeia lateral um grupo hidroxila ligado a um anel aromático enquanto que cisteína possui um grupo tiol ligado a um carbono (R-CH<sub>2</sub>SH). Utilizando o software "DiANNA" (DiAminoacid Neural Network Application) é possível prever que Rrp43p possui duas

pontes dissulfeto, uma entre as cisteínas C230 e C276 e outra entre as cisteínas C144 e C306 (Ferre e Clote, 2005). Dessa forma, as duas substituições de cisteína em rrp43-2 provavelmente desfazem uma ponte dissulfeto, o que causaria uma alteração significativa na estrutura da proteína, explicando o fato de rrp43-2 apresentar a menor atividade enzimática (Figura 17). As pontes dissulfeto (R-S-S-R<sub>1</sub>) são formadas pela oxidação de grupos tiol (R-SH) das cisteínas de uma proteína e geralmente contribuem para sua estabilidade estrutural (Sevier e Kaiser, 2002).

A mutação I274 encontra-se em uma região não conservada de Rrp43 e o aminoácido mais próximo a fazer contato com outra subunidade (Rrp46; E301) está localizado a uma distância de 27 resíduos. É provável que as mutações C230Y e C276Y exerçam um papel mais crítico na baixa atividade enzimática de rrp43-2, mas ainda não é possível saber a contribuição individual de cada mutação sobre a atividade do complexo.

O mutante rrp43-3 tem duas mutações, uma substituição de serina por fenilalanina na posição 162 (S162F) e uma substituição de alanina por treonina na posição 246 (A246T). Serina e treonina são aminoácidos polares de estrutura similar enquanto que alanina e fenilalanina são apolares, porém com estruturas muito diferentes. A primeira mutação (S162F) está situada muito próxima de três aminoácidos que provavelmente fazem contato direto com a subunidade Rrp46, sendo uma histidina e uma arginina adjacentes a S162 (H161 e R163) e um resíduo de aspartato distante 5 resíduos (D157). A segunda mutação (A246T) localiza-se em uma região próxima de aminoácidos bastante conservados entre vários organismos (L243 e P244), mas que não fazem contato direto com nenhuma outra subunidade.

Mutantes de outras subunidades do exossomo já foram identificados e apresentam um fenótipo similar ao dos mutantes de Rrp43p. O mutante rrp4-1

(L136P), por exemplo, acumula formas extendidas do pré-rRNA 5.8S e tem crescimento sensível a temperatura (Mitchell et al., 1996). O mutante csl4-1 acumula vários mRNAs e é formado por uma substituição conservativa (R65K) na sua porção amino-terminal e uma substituição de glicina(G) por glutamato(E) na posição 253. A mudança G253E afeta uma glicina conservada nos homólogos de Csl4p de mamíferos, *Schizossachamoryces pombe* e plantas e é parte do domínio de ligação a RNA S1 (Van Hoof et al., 2000).

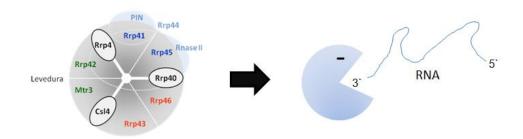
Tanto as mutações em rrp4-1 como em csl4-1 localizam-se próximas de regiões de contato entre as subunidades ou em "dobras" que provavelmente desestabilizam a proteína ao serem alteradas (Liu et al., 2006).

Um mutante da subunidade Rrp41p (rrp41-1) também já foi isolado e apresenta o mesmo fenótipo dos mutantes citados anteriormente (processamento de rRNA defeituoso, crescimento sensível a temperatura e meia-vida de mRNAs aumentada).

O mutante rrp41-1 é caracterizado por duas mutações, uma substituição de leucina por triptofano na posição 198 e uma substituição de leucina por glutamato na posição 232. A mutação L198W está localizada na interface de interação com Rrp45p enquanto L232Q encontra-se na interface de interação com Rrp4p (Houalla et al., 2006).

Este trabalho mostra que mutações em Rrp43p afetam a atividade enzimática do exossomo ao interferir na sua estabilidade estrutural. Portanto, é provável que o fenótipo observado nos mutantes de Rrp4p, Rrp41p e Csl4p também sejam resultantes de um defeito estrutural, porém estudos mais minuciosos se fazem necessários. Baseando-se nos dados obtidos, propomos um modelo para explicar o efeito das mutações em Rrp43p sobre o exossomo (Figura 18).

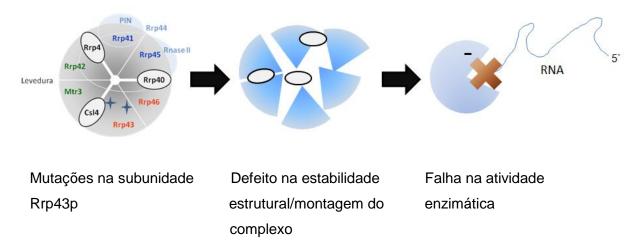
### **Exossomo selvagem (RRP43)**



Montagem correta do complexo

Atividade enzimática normal

## Exossomo com mutações em Rrp43p



**Figura 18.** Modelo do efeito das mutações em Rrp43p sobre a estabilidade do exossomo de *S. cerevisiae*.

Os experimentos de análise por microscopia eletrônica serão importantes na visualização das diferenças de conformação entre o exossomo selvagem e os mutantes de Rrp43p, permitindo a visualização direta do efeito das mutações sobre a estabilidade estrutural do complexo. Além disso, uma caracterização bioquímica mais detalhada também será necessária para quantificar as diferenças entre subunidades do exossomo, principalmente Rrp6p e Rrp44p nos mutantes de Rrp43p a fim de se compreender melhor a rede de interações entre as proteínas do complexo e como elas afetam sua função.

# 6. CONCLUSÃO

Mutações na subunidade não catalítica do exossomo de *S. cerevisiae*, Rrp43p, afetam suas interações com outras subunidades do complexo, diminuindo a estabilidade do mesmo, resultando em uma menor atividade enzimática do exossomo. Estes dados corroboram e complementam dados anteriores de análise *in vivo* destes mutantes.

#### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, S. L., Brodersen, D. E., Jensen, H. Origins and activities of the eukaryotic exosome. (2009). Journal of Cell Science 122, 1487-1494.

Andrulis, E. D., Werner, J., Nazarian, A., Erdkument-Bromage, H., Lis, J. T. (2002). The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in Drosophila. Nature 420, 837-41.

Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S. I., Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3`→5` mRNA decay in yeast. The EMBO Journal 20, 4684-4693.

Arigo, J. T., Eyler D. E., Carroll, K. L., Corden, J. L. (2006). Termination of cryptic unstable transcripts is directed by yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3. Mol Cell 23, 841-51.

Bachellerie, J. P., Cavaillé, J., Huttenhofer, A. (2002). The expanding snoRNA world. Biochimie 84, Issue 8, 775-790.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281-297.

Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. Nature 438, 508–511

Basu, U., Meng, Fei-long., Keim, C., Grinsteim, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C. R., Wesemann, D. R., Januszyk, K., Gregory, R. I., Deng, H., Lima, C.D., Alt, F. W.(2011) The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. Cell 144, 353-363.

Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., e Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. Cell 139, 547-559.

Butler, J. S. (2002). The yin and yang of the exosome. Trends in Cell Biology 12, 90-96.

Callahan, K. P., Butler, J. S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. Nucleic Acids Research 36(21), 6645-6655.

Carneiro, T., Carvalho, C., Braga, J., Rino, J., Milligan, L., Tollervey, D. e Carmo-Fonseca, M. (2007). Depletion of yeast nuclear exosome subunit Rrp6p results in accumulation of polyadenylated RNAs in a discrete domain within the nucleolus. Molecular and Cellular Biology Vol 27, No 11, 4157-4165.

Chaudhuri, J., Khuong, C., Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. Nature 430, 992–998.

Chekanova, J. A., Dutko J. A., Mian, I. S. Belostotsky, A. (2002). Arabidopsis thaliana exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3`→5` exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. Nucleic Acids Research 30, 695-700.

Chen, C. Y. et al. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. Cell 107, 451-464.

Cristodero, M., Bottcher, B., Diepholz, M., Scheffzek. E Clayton, C. (2008). The *Leishmania tarentolae* exosome: Purification and structural analysis by electron microscopy. Molecular and Biochemical Parasitology Vol 159, Issue 1, 24-29.

Decker, C. J. (1998). The exosome: A versatile RNA processing machine. Current Biology 8, R238–R240.

Ferre, F., Clote, P. (2005) DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. Nucleic Acids Research 33, W230-W232.

Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., Séraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. Nature Structural & Molecular Biology 14, 15-22.

Egecioglu, D. E., Henras, A. K., Chanfreau, G. F. (2006). Contributions of Trf4p-and Trf5p-dependent polyadenylation to the processing and degradative functions of the yeast nuclear exosome. RNA 12, 26-32.

Estevez, A. M., Kempf, T., Clayton, C. (2001). The exosome of Trypanpsoma brucei. EMBO J. 20, 3831-3839.

Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. Gene 313, 17-42.

Garneau, N. L., Wilusz, J., Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. Nature reviews Molecular Cell Biology 8, 113-126.

Graham, A. C., Kiss, D. L., Andrulis, E. D. (2009). Core exosome-independent roles for Rrp6 in Cell cycle progression. Mol. Biol. Cell. 20(8), 2242-2253.

Graham, A. C., Kiss, D. L., Andrulis, E. D. (2006). Differential distribution of exosome subunits at the nuclear lamina and in cytoplasmic foci. Mol. Bio. Cell. 17, 1399-1409.

Granato, D.C., Machado-Santelli, G., Oliveira, C.C. (2008). Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. FEBS J. 275, 4164-78.

Grosshans, H., Deinert, K. Hurt, E., Simos, G. (2001). Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. J. Cell. Biol. 153, 745-762.

Grzechnik, P., Kufel, J. (2008). Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast. Mol. Cell. 32, 247-258.

Guo, X., Ma, J., Sun, J., Gao, G. (2007). The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA. PNAS 104, no 1, 151-156.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichis coli with plasmids. J Mol Biol. 166. 577-80.

Hartung, S., Hopfner, K, P. (2007). The exosome, plugged. EMBO reports 8, 456-457.

Henras, A. K., Soudet, J., Gérus, S., Lebaron, M., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. Cell. Mol. Life. Sci 65, 2334-2359.

Houalla, R., Devaux, F., Fatica, A., Kufel, J., Barrass, D., Torchet, C., Tollervey, D. (2006) Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosme. Yeast 23, 439-54.

Houseley, J., Lacava, J., Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Cell* 7, 529-539.

Houseley, J., Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. Cell 136, 763-776.

Houseley, J., Tollervey, D. (2005). Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. EMBO Reports 7, 205-211.

Isken, O., Maquat, L. E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. Genes Dev. 21, 1833-1856.

Kim, M., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Zhelkovsky, A. Moore, C., Buratowski, S. (2006). Distinct pathways for snoRNA and mRNA termination. Mol. Cell. 24, 723-734.

Kressler, D., Linder, P., De La Cruz, J. (1999). Protein trans-Acting Factors Involved in Ribosome Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cel. Biol. 19, 7897-7912.

Likke, A. S., Tomecki, R., Jensen, T. H., Dziembowski, A. (2011). The eukaryotic exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. RNA Biology 8, 61-66.

Liu, Q., Greimann, J. C., Lima, C. D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. Cell 127, 1223-1237.

Mahler, M., Raijmakers, R. (2007). Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: Clinical, genetic and diagnostic insights. Autoimmunity Reviews 6, 432-437.

Malet, H., Lorentzen, E. (2011). Mechanisms of RNA recruitment by the exosome. RNA Biology. 8:3, 398-403.

Malet, H., Topf, M., Clare, D. K., Ebert, J., Bonneau, F., Basquin, J., Drazkowska, K., Tomecki, R., Dziembowski, A., Conti, E., Saibil, H. R. e Lorentzen, E. (2010). RNA chanelling by the exosome. EMBO reports 11, 936-942.

Milstein, C., Neuberger, M.S., Staden, R. (1998). Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8791–8794.

Mitchell, P. (2001). Purification of yeast exosome. Methods Enzymol. 342, 356-64.

Mitchell, P. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3` processing of stable RNAs. Mol. Cell Biol. 23(19), 6982-92.

Mitchell P., Petfalski E., Shevchenko A., Mann M., Tollervey D. (1997). The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases. Cell 91, 457–466.

Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D. (1996). The 3` end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. Genes and Development 10, 502-513.

Mitchell, P., Tollervey, D. (2000). Musing on the structural organization of the exosome complex. Nat. Struct. Biol. 7, 843-846.

Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J. P., Raijmakers, R., Prujin, G., Lutz, C. S., Wilusz, J. (2002). The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contains AU-rich elements. EMBO J. 21, 165-174.

Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. Science 302, 2137–2140.

Navarro, M. V., Oliveira, C. C., Zanchin, N. I. T., Guimarães, B. G. (2008). Insights into the mechanism of progressive RNA degradation by the Archaeal exosome. The Journal of Biological Chemistry. Vol 283, no 20, 14120-14131.

Oliveira, C. C., Gonzales, F. A., Zanchin, N. I. T. (2002). Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit Rrp43 show a deficiency in mRNA degradation and no longer Interact with the exosome. Nucleic Acids Research. 30, 4186-4198.

Perumal, K., Reddy, R. (2002). The 3` end formation in small RNAs. Gene Expression, Vol 10, no 1-2, 59-78.

Preker, P., Nielsen, J., Kammler, S., Lykke-Andersen, S., Christensen, M. S., Mapendano, C. K., Schierup, M. H., Jensen, T, H. (2008) RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. Science 322, 1851-1854.

Rajagopal, D., Maul, R.W., Ghosh, A., Chakraborty, T., Khamlichi, A.A., Sen, R., Gearhart, P.J. (2009). Immunoglobulin switch mu sequence causes RNA polymerase II accumulation and reduces dA hypermutation. J. Exp. Med. 206, 1237–1244.

Ramos, C. R. R., Oliveira, C. L. P., Torriani, I. L., Oliveira, C. C. (2005). The pyrococcus exosome complex structural and functional characterization. The Journal of Biological Chemistry 281, 6751-6759.

Ridley, S. P., Sommer, S. S., Wickner, R. B. (1984). Superkiller mutations in Saccharomices cerevisiae suppress exclusion of M2 double stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and L-A-HN. Mol. Cell. Biol. 4, 761-770.

Roppelt, V., Klug, G., Evguenieva-Hackenberg, E. (2010). The evolutionary conserved subunits Rrp4 and Csl4 confer different substrate specificities to the archaeal exosome. FEBS Letters. 584 (13), 2931-6.

Sambroock, J., Russel, D. W. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Vol 1-3.

Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F. P., Dastidar, E. G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C. M. e Hoof, A. V. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytolasmic mRNA decay activities. Nature Structural & Molecular Biology. Vol 16, No 1. 56-62.

Schimid, M., Jensen, T. H. (2008). The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. Trends in Biochemical Sciences 33, 501-510.

Schneider, C., Anderson, J. T., Tollervey, D. (2007). The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. Mol Cell. 27, 324-331.

Sevier, C. S., Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds. Nature Molecullar Cell Biology 3, 836-847.

Shen, H.M., Tanaka, A., Bozek, G., Nicolae, D., Storb, U. (2006). Somatic hypermutation and class switch recombination in Msh6(-/-)Ung(-/-) doubleknockout mice. J. Immunol. 177, 5386–5392.

Slomovic, S., Portnoy, V., Yehudai-Resheff, S., Bronshtein, E., Schuster, G. (2008). Polynucleotide phosphorylase and the archaeal exosome as poly (A)-polymerases. Biochimica et Biophysica Acta. 1779, 247-255.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry. Vol. 150, Issue 1, 76-85.

Staals, R. H. J., Bronkhorst, A. W., Schilders, G., Slomovic, S. Schuster, G. Heck, A. J. R., Raijmakers, R. e Prujin, G. J. M. (2010). Dis3-like1: a novel exorribonuclease associated with the human exosome. The EMBO Journal. 29, 2358-2367.

Steinmetz, E. J., Conrad, N. K., Brow, D. A., Corden, J. L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A) independent 3`-end formation of RNA polymerase II transcripts. Nature 413, 327-331.

Steitz, T. A., Steitz, J. A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 6498-6502.

Strunk, B. S., Karbstein, K. (2009). Powering through ribosome assembly. RNA journal 15, 2083-2104.

Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T., Katada, T. (2003). Interaction between Ski7p and Upf1p is required for non-sense mediated 3`→5` mRNA decay in yeast. EMBO J. 22, 3951-3959.

Thiebaut, M., Kisseleva-Romanova, E., Rougemaille, M., Boulay, J. e Libri, D. (2006). Transcription termination and nuclear degradation of cryptic unstable transcripts: a role for the nrd1-nab3 pathway in genome surveillance. Mol. Cell. 23(6), 853-64.

Towbin, H., Stachilin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS 76, 4350-4354.

Udem, S. A., Warner, J. R., (1973). The citoplasmic maturation of ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. The Journal of Biological Chemistry 248, 1412-1416.

Vanacova, S., Stefl, R. (2007). The exosome and RNA quality control in the nucleus. EMBO reports. Vol 8, no 7, 651-657.

Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. PLoS Biol. 3, e189.

Van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., Parker, R. (2002). Exosome mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codón. Science. 295, 2262-2264.

Van Hoof, A., Staples, R. R., Baker, R. E., Parker, R. (2000). Function of the ski4 (Csl4p) and Ski7p proteins in 3` to 5` degradation of mRNA . Mol Cell Biol 20, 8230-43.

Vasiljeva, L., Buratowski, S. (2006). Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3` processing of RNA polymerase II transcripts. Mol. Cell 21, 239-248.

Venema, J., Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Genet 33, 261-311.

Wahle, E. (2007). Wrong PH for RNA degradation. Nature Structural & Molecular Biology 14, 5-7.

Wang, H. W., Wang, J., Ding, F., Callahan, K., Bratkowski., Butler, J. S., Nogales, E., Ke, A. (2007). Architecture of the yeast Rrp44-exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3' end processing. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 104, 16844-16849.

Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., Kenter, A.L. (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. J. Exp. Med. 206, 1817–1830.

Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J. C., Dufour, M. E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., Libri, D., Jacquier, A. (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. Cell, Vol 121, Isssue 5, 725-737.

Xue, K., Rada, C., Neuberger, M.S. (2006). The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in msh2-/- ung-/-mice. J. Exp. Med. 203, 2085–2094.

Zuo, Y., Deutscher, M. P. (2001). Exoribonucleae superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. Nucleic Acids 47, 1017-1026.

# **SÚMULA CURRICULAR**

#### 1. DADOS PESSOAIS

Nome: Germano Alves Paiva

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Fortaleza, CE.

Data de nascimento: 17/05/1986

Endereço Residencial: Av. Teodomiro de Castro 4166, casa 20. Bairro: Álvaro

Weyne. CEP: 60336-010. Fortaleza-CE.

**Telefone:** (11) 70313436/(85) 32821706

# 2.FORMAÇÃO

### 2.1 Pós-graduação

2010-2012 Mestrado em Bioquímica

Universidade de São Paulo

Instituto de Química - Departamento de Bioquímica

São Paulo, SP.

Título: Estudo do papel de Rrp43p na montagem e estabilização

do complexo do exossomo em Saccharomyces cerevisiae.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo (FAPESP).

#### 2.2 Ensino Superior

2005-2009 Bacharel em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Ceará

Fortaleza, CE.

# 3. INICIAÇÃO CIENTÍFICA

2009-2009 Universidade Federal do Ceará

Faculdade de Medicina - Departamento de Fisiologia e

Farmacologia

Fortaleza, CE.

Projeto: Atividade antitumoral dos polissacarídeos da farinha da casca do maracujá (Passiflora sp).

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

2007-2008 Universidade Federal do Ceará

Centro de Ciências - Departamento de Bioquímica

Fortaleza, CE.

Projeto: Cálculo de estabilidade estrutural e de propriedades eletrônicas e óticas de pontos quânticos de Si oco.

Orientadora: Prof. Dr. José Alzamir Pereira da Costa

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

2006-2006 Universidade Federal do Ceará

Centro de Ciências - Departamento de Bioquímica

Fortaleza, CE.

Projeto: Purificação e caracterização de inibidores de proteases cisteínicas de raízes de *Crotalaria pallida*.

Orientadora: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

# 4. MONITORIAS E PARTICIPAÇÕES EM CURSOS

**2011-2011** PAE-Monitoria em Biologia Molecular

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

2011-2011 VI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular – Monitor

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

2007-2007 II Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

**2010-2010** Proteomics Methods and Approaches for Protein Identification

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

# 5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

**2011** XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society

Título: The role of Rrp43p on assembly and stabilization of Saccharomyces cerevisiae exosome complex.

Autores: Paiva, G. A. e Oliveira, C. C.

•

**2008** XXVII Encontro de iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará

Título: Estudo do efeito da fluoresceína sobre a atividade de uma lectina de alga marinha.

Autores: Paiva, G. A., Machado, M. M., Soraya, N. N., Nascimento, K. S., Cavada, B. S.

**2006** XXV Encontro de iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará

Título: Purificação e caracterização de quitinases de folhas de feijão de corda [Vigna unguiculata (L.) Walp.] inoculado com o fungo *Colletorichum lindemuthianum*.

Autores: Paiva, G. A e Oliveira, J. T. A.