



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Covilhã | Portugal

***PURIFICAÇÃO DE RNA POR  
CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE  
COM HISTIDINA IMOBILIZADA***

**Ana Rita Nunes Martins**

**Covilhã, 2009**

**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**

**PURIFICAÇÃO DE RNA POR  
CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE  
COM HISTIDINA IMOBILIZADA**

Dissertação apresentada na Universidade da Beira Interior para a  
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Tese orientada pela Professora Doutora Fani Sousa e co-orientada  
pelo Professor Doutor João Queiroz

**Ana Rita Nunes Martins**

**Covilhã, 2009**

---

# *AGRADECIMENTOS*

---

Desejo agradecer a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta tese de mestrado, especialmente à minha orientadora, Professora Doutora Fani Sousa, pelo seu profissionalismo e dedicação que me encorajaram a trabalhar na purificação de ácidos nucleicos e por todos os conhecimentos que me transmitiu. Por acreditar em mim, por todo o incentivo, apoio e, sobretudo pela sua Amizade, o meu Muito Obrigado.

Ao senhor Reitor João Queiroz pela sua amizade e disponibilidade, bem como pelos valiosos conhecimentos científicos que me transmitiu e contribuíram para a concretização do objectivo proposto.

A todos os meus colegas de laboratório pelo bom ambiente de trabalho e pelos momentos de entajuda e partilha de conhecimentos. Desejo-lhes muitas felicidades nos seus projectos de investigação e nas suas vidas futuras. Foi um prazer trabalhar com todos eles.

Às técnicas do laboratório, que contribuíram para a organização das tarefas laboratoriais e pela prontidão que atendiam a todos os meus pedidos.

Por último, gostaria de agradecer de uma forma muito especial e sentida à minha família, pelo amor, confiança, estímulo e apoio incondicional que sempre me deram. O exemplo de trabalho demonstrado pelo meu pai é um exemplo para mim e um sólido incentivo na concretização dos meus objectivos profissionais e pessoais. À minha mãe, nunca conseguirei agradecer o suficiente por toda a dedicação e afecto que, mesmo de longe, me conseguem encorajar a seguir em frente. À minha irmã e ao meu namorado, pela compreensão e paciência, bem como todo o seu carinho e por estarem sempre presentes em todas as fases da minha vida.

# ÍNDICE

---

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A história dos ácidos nucleicos.....	2
1.2. A hipótese do RNA como molécula central na origem da vida.....	5
1.3. A bioquímica dos ácidos nucleicos .....	6
1.3.1. O polímero de DNA .....	7
1.3.2. Os polímeros de RNA.....	9
1.3.3. Estringência – Condições que influenciam a estrutura dos ácidos nucleicos	10
1.4. Biossíntese das moléculas de RNA.....	13
1.5. Os diferentes tipos de RNA .....	16
1.5.1. RNAs de baixo peso molecular .....	20
1.6. Estratégias de isolamento do RNA.....	25
1.7. A cromatografia nos processos de purificação .....	28
1.8. A histidina como ligando na cromatografia de afinidade .....	34
2. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJECTIVOS .....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1. Material.....	37
3.2. Crescimento bacteriano .....	37
3.3. Isolamento do RNA total.....	37
3.4. Separação do mRNA, rRNA e sRNA .....	38
3.5. Obtenção dos diferentes lisados celulares .....	39
3.6. Cromatografia Preparativa.....	39
3.7. Electroforeses de agarose e de poliacrilamida .....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Optimização dos protocolos de extracção de RNA.....	41
4.2. Perfil cromatográfico das várias espécies de RNA .....	47
4.2.1. sRNA .....	48
4.2.2. Estratégia para a purificação do RNA 6S .....	52

4.2.3. rRNA.....	56
4.3. Ensaio preliminar com lisados de <i>E. coli</i> .....	59
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66
7. ANEXOS.....	71

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1 - O dogma central da biologia molecular. ....	4
Figura 2 – Representação esquemática de um nucleótido.....	6
Figura 3 - Representação da estrutura das purinas e pirimidinas. ....	6
Figura 4 - A. Diferenças estruturais entre a ribose e a desoxirribose. B. Representação das ligações fosfodiéster na estrutura covalente do DNA. ....	7
Figura 5 – A. Representação esquemática da dupla hélice do DNA proposta por Watson e Crick com as diferentes depressões que se formam e as respectivas dimensões. B. Estrutura dos pares de bases formados.....	8
Figura 6 – Estruturas secundárias típicas dos RNAs. ....	10
Figura 7 - Processo de transcrição em <i>E. coli</i> . ....	15
Figura 8 - Estrutura geral do tRNA.....	18
Figura 9 – mRNAs A. monocistrónico e B. policistrónico de procariontes.....	19
Figura 10 – Formação do transcripto primário e o seu processamento durante a maturação do mRNA numa célula eucariótica. ....	20
Figura 11 -Estrutura secundária do RNA 6S.....	23
Figura 12 -Modelo de interacção dinâmica entre o RNA 6S, o promotor de DNA e a holoenzima $\sigma^{70}$ durante diferentes fases do crescimento bacteriano. ....	24
Figura 13 – Etapas cromatográficas num processo de afinidade.....	28
Figura 14 - Representação das técnicas cromatográficas de purificação. ....	33
Figura 15 – Electroforese com os tipos de RNAs resultantes da extracção e separação, aplicando o protocolo descrito na literatura. ....	41
Figura 16 – Electroforese de agarose das amostras de rRNA e sRNA isolados a partir do método de precipitação com sal a baixa temperatura. ....	43

Figura 17 - Esquemas gerais dos processos usados na separação do rRNA e sRNA. ....	45
Figura 18 - Esquema geral do processo otimizado para a extracção do RNAt e separação do rRNA e sRNA. ....	46
Figura 19 – Electroforese desnaturante com amostras de sRNA. ....	48
Figura 20 – Perfil cromatográfico dos sRNA com diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e respectivas electroforeses em gel de poliacrilamida desnaturante. ....	50
Figura 21- Perfil cromatográfico dos sRNAs com eluição em gradiente de linear e respectiva electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. ....	52
Figura 22 – Separação cromatográfica do RNA 6S e respectiva electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. ....	53
Figura 23 – Caracterização do RNA 6S pelo crescimento bacteriano. ....	54
Figura 24 – Perfil cromatográfico dos rRNA com diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e respectivas electroforeses em gel de poliacrilamida desnaturante. ....	57
Figura 25- Cromatograma dos rRNAs com eluição em gradiente de três passos e respectiva electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.. ....	58
Figura 26 - Perfil cromatográfico do lisado de <i>E. coli</i> obtido por lise alcalina, em histidina-agarose e respectiva electroforese de agarose. ....	59
Figura 27 - Perfil cromatográfico do lisado de <i>E. coli</i> obtido em condições desnaturantes, em histidina-agarose e respectivas electroforeses de agarose (A) e poliacrilamida (B). ....	61
Figura 28 - Perfil cromatográfico do lisado de <i>E. coli</i> obtido por lise enzimática, em histidina-agarose e respectivas electroforeses de agarose e poliacrialmida. ....	62

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 – Componentes das diferentes subunidades ribossômicas em células procarióticas e eucarióticas. ....	17
Tabela 2 - Propriedades gerais dos sRNAs em <i>E. coli</i> .....	22
Tabela 3 – Tipos de cromatografias baseadas nas características próprias de cada biomolécula. ....	33
Tabela 4 – Quantidades de RNAs obtidos nos diferentes métodos utilizados. ....	44

## RESUMO

---

O recente desenvolvimento da terapia génica surge como uma nova abordagem para o potencial tratamento de doenças consideradas incuráveis. Apesar destas estratégias se terem iniciado com DNA, investigações recentes tem avaliado o potencial interesse terapêutico do RNA. No entanto, os protocolos disponíveis para o isolamento do RNA são limitados, morosos e requerem o uso de solventes tóxicos, o que tornam estes procedimentos inadequados para recuperar o produto a ser biologicamente aplicado.

O principal objectivo deste estudo é investigar a aplicabilidade da cromatografia de afinidade com histidina imobilizada no isolamento do RNA. Uma vez que o RNA, tal como o DNA, tem a capacidade de se ligar à matriz de histidina-agarose, esta interacção pode ser explorada para purificar especificamente os diferentes RNAs, atendendo às suas propriedades estruturais. Para concretizar o objectivo, o RNA total foi isolado da *Escherichia coli DH5α* usando a extracção com tiocianato de guanidina-fenol/clorofórmio e a separação do RNA ribossómico (rRNA) e do RNA de baixo peso molecular (sRNA) foi promovida por precipitação com 2M de sulfato de amónio a 4°C. Os estudos dos perfis cromatográficos das espécies de sRNA e de rRNA na matriz de histidina-agarose com diferentes concentrações de sulfato de amónio revelaram que para os dois tipos de RNA, as elevadas concentrações de sal promoviam a ligação do RNA à matriz, e a diminuição da força iónica promovia a sua eluição.

Com este estudo foi possível desenvolver uma estratégia para a purificação do RNA 6S aplicando um gradiente decrescente de sulfato de amónio por passos. Após a ligação dos sRNAs à matriz de histidina, a diminuição da concentração de sal permite a separação de outros tipos de RNA e a remoção do sal na eluição promove a recuperação do RNA 6S. Este tipo de RNA foi recentemente identificado como estando envolvido no processo de transcrição, pelo que a purificação é uma mais valia para a sua caracterização estrutural e funcional.

### **Palavras chaves:**

Afinidade; cromatografia; histidina; RNA; RNA 6S.

# ABSTRACT

---

Severe diseases that currently remain untreatable are strong candidates to novel gene-based treatments. Although the gene-based therapeutic strategies started to be developed using DNA, a large number of studies are in progress in which the therapeutic potential of RNA is evaluated. However, the available protocols for isolation of RNA are limited, time-consuming and require the use of toxic solvents. All these reasons make these procedures not adequate to recover a product to be biologically applied and motivate the research for an efficient, tolerable and scalable process to purify RNA.

The main purpose of this study is the investigation of the applicability of a recently established method based on affinity chromatography with amino acids as specific ligands, to isolate RNA species. As the histidine-agarose support is able to bind the RNA, this interaction can be exploited to specifically purify different RNAs, considering their structural particularities.

Total RNA was isolated from *Escherichia coli DH5a* by guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction and ribosomal RNAs (rRNAs) and small RNAs (sRNAs) were obtained by ammonium sulphate precipitation at 4°C. The different RNAs were then applied to a histidine-agarose support with different ammonium sulphate concentrations in order to understand their retention pattern. In both RNA classes, the higher salt concentrations promoted RNA binding to histidine-agarose matrix, while lower ionic strength caused its elution. In this study, we were also able to establish a strategy for the purification of the 6S RNA, using a decreasing stepwise elution gradient. The higher salt concentrations promoted sRNAs binding to the histidine support, and the decrease of ammonium sulphate concentration caused the elution of some RNA species. Finally, the removal of ammonium sulphate from the elution buffer allowed the recovery of 6S RNA. This type of RNA was recently recognized in the transcription process and its purification is of great importance for further structural and functional studies.

**Keywords:**

Affinity; chromatography; histidine; RNA; 6S RNA

# *ABREVIATURAS*

---

A, adenina

ATP, adenosina trifosfato

bp, pares de bases

C, citosina

cDNA, DNA complementar

celulose oligo(dT), celulose oligo(dioxitimidina)

DEPC, dietilpirocarbonato

DNA, ácido desoxiribonucleico

DO<sub>600</sub>, densidade óptica a 600nm

dsRNA(s), RNA(s) de dupla cadeia

*E. coli*, *Escherichia coli*

etOH, etanol

Gl, glaciador

G, guanina

gDNA, DNA genómico

Gg, glicogénio

HIC, cromatografia de interacção hidrofóbica

iRNA, RNA de interferência

IsopOH, isopropanol

kb, quilobases

min, minuto

miRNA(s), micro RNA(s)

mRNA(s), RNA(s) mensageiro(s)

NaAc, acetato de sódio

ND, não determinados

nm, nanómetro

nt, nucleótidos

oc, circular aberto

OH, grupo hidroxilo

pDNA, DNA plasmídico

pp, precipitação

pRNA(s), RNA(s) “*de novo*”

RNA, ácido ribonucleico

RNases, ribonucleases

rpm, rotações por minuto

rRNA(s), RNA(s) ribossómicos

S, Sevedbergs

Sarcosyl, *N*-laurilsarcosina

sc, superenrolado

SDS, dodecil sulfato de sódio

SEC, cromatografia de exclusão molecular

T, timina

TB, Terrific Broth

T<sub>m</sub>, temperatura de fusão

tRNA(s), RNA(s) de transferência

U, uracilo

UV, ultravioleta

V, volt

# 1. INTRODUÇÃO

---

A descoberta de que a informação genética está codificada ao longo da cadeia de uma molécula polimérica composta por quatro tipos de unidades monoméricas marcou o início de uma nova era nas ciências biológicas. O DNA (ácido desoxiribonucleico), como foi designada essa molécula, é detentor de toda a informação genética da qual dependem todas as características estruturais e funcionais de cada organismo vivo. A capacidade do DNA para se autoduplicar assegura a conservação do património genético próprio de cada espécie [1].

O DNA está organizado em genes, as unidades fundamentais da informação genética. Para serem activos, os genes têm que ser expressos, ou seja, a informação contida nas sequências específicas de bases na molécula de DNA precisa ser codificada. Numa primeira fase, os genes são transcritos em moléculas de RNA (ácido ribonucleico), no núcleo, sendo que algumas moléculas de RNA, nomeadamente o RNA ribossómico (rRNA) e o RNA de transferência (tRNA) são activas por si só, enquanto outras como o RNAs mensageiro (mRNA) são transportadas para o citoplasma e utilizadas como molde para a síntese proteica [1].

A investigação constante na biologia molecular tem produzido uma série de novas tecnologias conhecidas como DNA recombinante, biotecnologia, ou engenharia genética. Apesar de estas metodologias estarem apenas no início da sua aplicação à medicina, o sucesso já é evidente dado o vasto número de doenças já diagnosticadas, e os seus promotores identificados, mesmo antes do nascimento [2]. Devido ao recente desenvolvimento da terapia génica, doenças que durante décadas foram consideradas fatais são agora potencialmente curáveis. Apesar destas estratégias génicas se terem iniciado com DNA, investigações recentes tem avaliado o potencial interesse terapêutico do RNA. Actualmente, já existem importantes pesquisas no tratamento do cancro e das doenças neurodegenerativas que envolvem a aplicação do mRNA, tRNA e iRNA [3, 4].

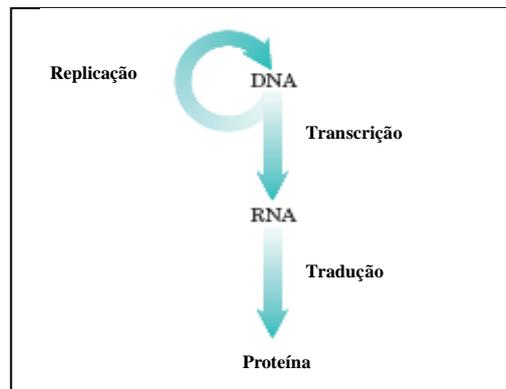
## ***1.1. A história dos ácidos nucleicos***

Em 1871, o biólogo suíço Friedrich Miescher, estudante interessado na química das células, publica o seu trabalho sobre a nucleína, uma substância que verificou estar presente maioritariamente no núcleo das células do pus. A nucleína apresentava quantidades relativas dos elementos hidrogénio, carbono, oxigénio e azoto diferentes das encontradas em proteínas. Várias foram as resistências quanto à real existência da nova substância descrita por Miescher e só foram superadas por volta de 1889, quando Richard Altmann obteve preparações altamente purificadas de nucleína, sem nenhuma contaminação por proteínas. Devido ao facto da substância apresentar carácter ácido, o que já havia sido detectado por Miescher, Altmann sugeriu que ela fosse chamada de ácido nucleico em vez de nucleína [5].

Em 1910, o fisiólogo alemão Albrecht Kossel alcançou o Prémio Nobel em Fisiologia ou Medicina pelas suas investigações em biologia celular, principalmente em ácidos nucleicos e proteínas, nas quais contempla a descoberta do aminoácido histidina (1986). Nos seus estudos com a nucleína, Kossel detectou dois tipos de bases azotadas já conhecidas, a adenina e a guanina. Em 1893, identificou uma nova base azotada, que era libertada pela degradação de nucleína das células do timo e por isso denominou-a de timina. De seguida, verificou que a nucleína continha um quarto tipo de base azotada, a qual denominou citosina. Em 1894, o grupo de Kossel constatou que um outro produto da degradação dos ácidos nucleicos era um glúcido com cinco átomos de carbono, uma desoxirribose. O fósforo estava presente na forma de um derivado do ácido fosfórico, fosfato. Sabia-se até ao momento que o ácido nucleico era composto por bases azotadas (púricas e pirimídicas), uma pentose e fosfato [6]. Pelo ano de 1890 já tinha sido descoberto, em levedura, um outro tipo de ácido nucleico que continha uracilo em vez de timina e uma ribose em vez da desoxirribose. Dessa forma, foram caracterizados dois tipos de ácidos nucleicos, de acordo com a pentose que possuíam: o ácido ribonucleico (RNA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA). Em 1933, Phoebus Levene e Walter Jacobs concluíram que a estrutura dos ácidos nucleicos era composta por um componente básico que se constituía numa base azotada ligada a uma pentose e esta por sua vez ligada a um fosfato. Esta unidade foi denominada de nucleótido [7]. Um ácido nucleico seria então uma molécula composta por vários nucleótidos unidos entre si, ou seja, um polinucleótido [8]. Os estudos dos ácidos nucleicos continuaram por muitos anos sem que os cientistas soubessem da sua importância como material hereditário.

A identificação da estrutura helicoidal do DNA, macromolécula linear em cadeia dupla constituída por sequências nucleotídicas complementares e antiparalelas, que culminou em 1953 com os trabalhos de James Watson e Francis Crick, foi um dos maiores sucessos científicos [9]. Foi a partir deste momento que se tornou possível abordar a questão de como na natureza se encontra codificado o programa que comanda as características estruturais e funcionais próprias de cada célula e de cada espécie e como essa informação é conservada e transmitida de geração em geração, mantendo as respectivas características genéticas. O modelo molecular da dupla hélice permitiu a Francis Crick enunciar, em 1958, o princípio universal que designou por dogma central da biologia molecular [10]. Baseado na observação do emparelhamento obrigatório das bases dos nucleótidos que compõem o DNA, adenina (A)-timina (T), guanina (G)-citosina (C) e no dado entretanto adquirido das respectivas proporções constantes características de cada espécie, Francis Crick avançou a hipótese de que o DNA genómico de uma célula contém em si a capacidade de se autoduplicar. A síntese de duas novas cadeias polinucleotídicas, também complementares e antiparalelas às cadeias constituintes da molécula original, resulta na formação de duas moléculas filhas, rigorosamente idênticas à molécula original. Desta forma e através da replicação do DNA, cada célula ao dividir-se dá origem a duas células, cujo conteúdo genético é idêntico ao da célula original. Com estas descobertas Crick sugeriu que as proteínas deveriam ser efectivamente os produtos biológicos activos dos genes. Esta hipótese considerou a existência de moléculas intermediárias, capazes de veicular a informação contida em cada gene, presente na totalidade do genoma celular, para a produção do seu produto final, a proteína. A informação contida em cada gene é assim transcrita em RNA obedecendo, tal como no caso a replicação, ao princípio da complementaridade estrutural das bases heterocíclicas constituintes dos nucleótidos [11]. A síntese de uma molécula de RNA a partir do DNA é um processo muito complexo que envolve várias proteínas entre as quais um grupo de enzimas, as RNA polimerases. A iniciação, alongação e a terminação são os passos gerais necessários para a síntese do transcripto primário. Os RNA mensageiros, mRNA, portadores da informação contida nos genes, dirigem a síntese das proteínas cuja especificidade resulta do encadeamento dos resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. A transferência da informação dos genes, faz-se, então, passando de um linguagem tetranucleotídica, comum ao DNA e RNA para uma linguagem de 20 aminoácidos, presente nas proteínas [12]. O dogma

central da biologia molecular resume, pois, conceitos fundamentais e universais válidos para toda a escala dos seres vivos.



**Figura 1 - O dogma central da biologia molecular.**

A imagem indica as vias gerais da transmissão da informação genética: replicação, transcrição e tradução. O termo “dogma” foi introduzido por Francis Crick na época em que poucas evidências suportavam estas considerações. Actualmente, o “dogma” é um princípio bem estabelecido [13].

## ***1.2. A hipótese do RNA como molécula central na origem da vida***

Em 1981, Tom Cech e os seus colaboradores descreveram que numa experiência *in vitro* com um transcrito primário de rRNA do protozoário ciliado *Tetrahymena*, este teve a capacidade de remover um intrão (sequências não codificantes de um gene) com 413 nucleótidos sem a adição de nenhuma enzima. Subsequentemente, outros intrões demonstraram também serem dotados de propriedades auto-catalíticas. A descoberta de Cech foi considerada um marco na biologia, pois foi a primeira vez que uma molécula biológica, que não uma proteína, catalisava uma reacção [14].

A proposição o "Mundo do RNA" (*RNA world*) foi feita por Walter Gilbert em 1986, em comentário às recentes observações das propriedades catalíticas das várias formas de RNA. Considerada pela maioria dos cientistas a etapa mais conhecida no campo da origem da vida, e talvez a única em que se tenha claramente ultrapassado o domínio da especulação, a hipótese do mundo do RNA supõe que antes das células actuais, o RNA era a molécula portadora da informação genética e era ele o catalisador das reacções químicas nas células primitivas. Só, posteriormente, o DNA se tornou o material genético e as proteínas os maiores componentes estruturais e catalisadores presentes nas células. Esta hipótese é reforçada pela grande similaridade entre o RNA e o DNA, pela descoberta das ribozimas, moléculas de RNA que possuem actividade catalítica e participam em importantes reacções celulares, e pelos viróides e virusóides, agentes infecciosos de plantas cujo o material genético é um RNA circular pequeno (200 nucleótidos), de cadeia simples, não codificante que, através da maquinaria de transcrição da célula hospedeira, é capaz de se auto-replicar [15]. A hipótese do "mundo do RNA", se verdadeira, tem importantes implicações para a própria definição de vida. Após a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick, a vida foi considerada como sendo largamente definida em termos de DNA e proteínas como as moléculas dominantes nos organismos vivos e o RNA a molécula intermediária. Desta forma, esta hipótese mais recente coloca o RNA como a molécula central da origem da vida.

### 1.3. A bioquímica dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são macromoléculas constituídos por unidades monoméricas, os nucleótidos, que se ligam entre si através ligações covalentes denominadas ligações fosfodiéster. Os nucleótidos são estruturalmente constituídos por uma base azotada (anel heterocíclico de átomos de carbono e azoto), uma pentose (açúcar com cinco carbonos) e um grupo fosfato (molécula de fósforo composta por quatro oxigénios) (figura 2). As bases azotadas são classificadas em dois tipos: as purinas, constituídas pela combinação de dois anéis de cinco e seis átomos, das quais fazem parte a adenina e a guanina (G) e as pirimidinas que são constituídas por um único anel de seis átomos, como a timina (T), citosina (C) e uracilo (U) (figura 3) [16].

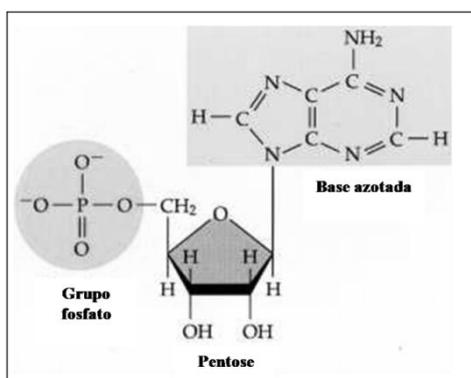


Figura 2 – Representação esquemática de um nucleótido.

A pentose apresentada é uma ribose [17].

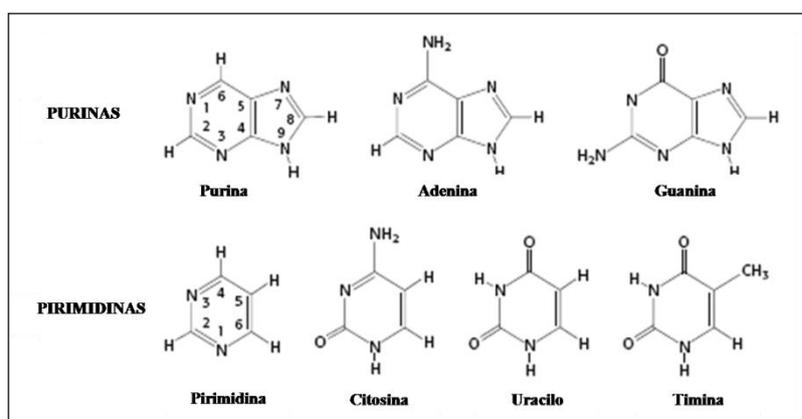


Figura 3 - Representação da estrutura das purinas e pirimidinas.

A timina é utilizada pelo DNA enquanto que o RNA apresenta o uracilo na sua constituição [9].

### 1.3.1. O polímero de DNA

O DNA constitui o suporte universal de toda a informação genética que define as características de cada organismo vivo. Essa informação encontra-se codificada nas sequências nucleotídicas que caracterizam unicamente um ácido nucleico. Para além da base azotada e do grupo fosfato, cada nucleótido do DNA apresenta uma desoxirribose na sua constituição. Este prefixo indica que o carbono 2 deste açúcar não contém um átomo de oxigénio como a ribose (figura 4.A). Na polimerização das cadeias deste ácido nucleico, o grupo hidroxilo da extremidade 3' da desoxirribose de um nucleótido é esterificado a um grupo fosfato que por sua vez, se une ao grupo hidroxilo da extremidade 5' do açúcar adjacente (Figura 4.B). O facto de que cada ligação fosfodiéster ter carga negativa diminui a susceptibilidade do DNA à hidrólise comparativamente com os outros ésteres. A carga negativa do fosfato tem a capacidade de repelir espécies nucleofílicas como o ião hidróxido. Esta resistência é crucial para a manutenção da integridade da informação armazenada nos ácidos nucleicos. Para além disto, a estabilidade do DNA é também garantida pelo facto dos seus açúcares serem desoxirribose, pois também eles aumentam a sua resistência à hidrólise. Estes dados contribuíram, provavelmente, para que actualmente seja aceite o DNA, em vez do RNA, como o material hereditário em todas as células e em muitos vírus [18].

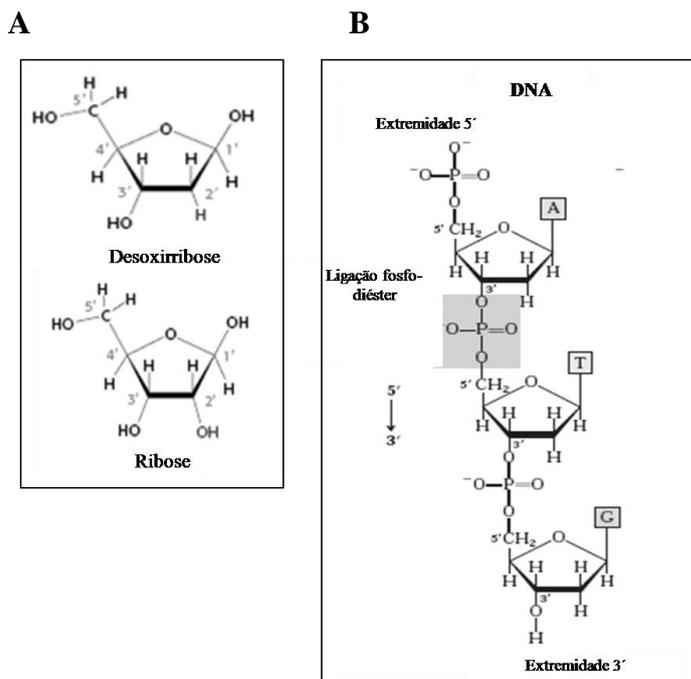
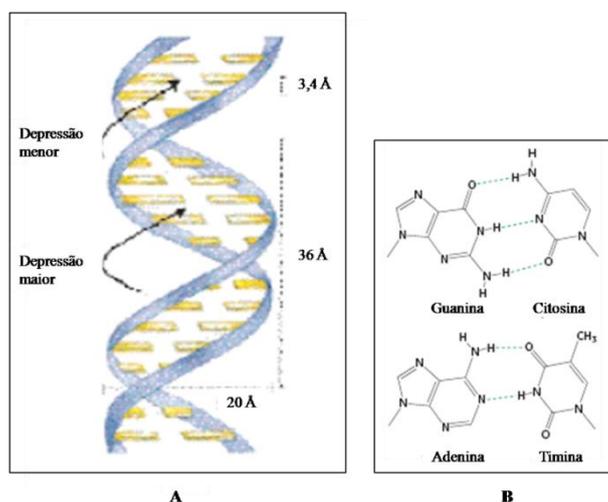


Figura 4 - A. Diferenças estruturais entre a ribose e a desoxirribose [14]. B. Representação das ligações fosfodiéster na estrutura covalente do DNA.

As ligações de fosfato unem as unidades nucleotídicas sucessivas [9].

Como originalmente foi proposto por Watson e Crick, o DNA é composto por duas cadeias que formam uma hélice dupla e onde exteriormente se encontram ligações fosfato-açúcar-fosfato e no seu interior, em plano perpendicular à hélice, as bases azotadas. As bases azotadas de cada cadeia interagem com as bases azotadas na outra cadeia para formarem pares de bases (figura 4). A chave para esta estrutura organizacional é a complementaridade entre as cadeias devido às ligações de hidrogénio que se estabelecem entre as bases azotadas púricas-pirimídicas (A-T; G-C) e as interações hidrofóbicas de van der Waals entre as bases “empilhadas”. Cada guanina pode formar três ligações de hidrogénio com a citosina, ao passo que a adenina forma apenas duas ligações de hidrogénio com a timina. São estas pontes de hidrogénio as responsáveis pela grande estabilidade que a dupla hélice apresenta.

Na estrutura tridimensional do DNA, a relação espacial entre as duas cadeias cria um ligeiro deslocamento dos esqueletos de pentose e fosfato do centro da hélice. Formam-se assim duas depressões de tamanhos e características diferentes (figura 5). A depressão maior, mais aberta, permite uma maior exposição dos pares de bases do DNA enquanto que a depressão menor, mais estreita, é parcialmente bloqueada pelas pentoses que ligam os pares de bases. A ligação das proteínas ocorre frequentemente na depressão maior [19].



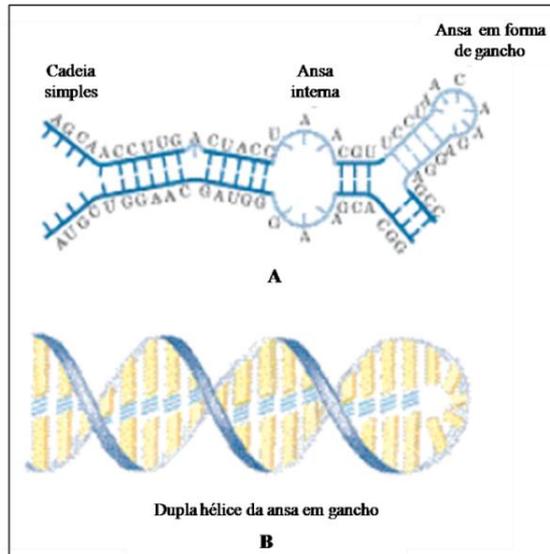
**Figura 5 – A. Representação esquemática da dupla hélice do DNA proposta por Watson e Crick com as diferentes depressões que se formam e as respectivas dimensões. B. Estruturas dos pares de bases formados [9, 14].**

### ***1.3.2. Os polímeros de RNA***

Os RNAs são constituintes universais de todas as células vivas onde existem em concentrações muito superiores às do DNA. Enquanto a quantidade de DNA genómico é igual em todas as células somáticas de um mesmo organismo, por corresponder sempre ao genoma haplóide idêntico em todas elas, a concentração de RNA celular varia substancialmente, estando sempre relacionado com a maior ou menor actividade metabólica do tecido em causa [1].

Apesar de quimicamente apresentar grande semelhança com o DNA, estruturalmente o RNA possui algumas diferenças por ser produzido em procariontes e eucariontes como moléculas de cadeia simples, porque a base azotada timina é substituída por uracilo e a pentose é uma ribose, que contém o grupo hidroxilo no carbono 2 que a desoxiribose não tem. Deste facto resulta que para além das ligações das extremidades 3' e 5' há a possibilidade de se estabelecerem ligações 2' e 5' que são bastante importantes na remoção dos intrões e na união dos exões para a formação do RNA funcional [18, 20].

Embora a maioria dos RNAs sejam de cadeia simples, eles exibem estruturas secundárias que são importantes para a sua função [21, 22]. Uma das mais comuns é um estrutura dobrada sobre si mesma, em ansa (*“hairpin loop”*), que resulta do emparelhamento intramolecular dos pares de bases complementares de uma única molécula de RNA (figura 6) [22]. Estruturalmente, estas ansas podem ocorrer em diferentes posições em diferentes tipos de RNA diferindo no tamanho da ansa e da dobra, no número das bases desemparelhadas e na sequência nucleotídica.



**Figura 6 – Estruturas secundárias típicas dos RNAs.**

A) Dobra interna e dobra em forma de ansa. B) Dupla hélice das ansas. As regiões emparelhadas apresentam, normalmente, uma hélice dextra [9].

Estes parâmetros proporcionam extrema variabilidade permitindo interacções específicas com as proteínas. Funcionalmente, eles podem regular a expressão génica em *cis* ou *trans*, ou seja, um gancho numa molécula de RNA pode regular só essa molécula (*cis*) ou pode induzir efeitos em outros RNAs ou em outras vias celulares (*trans*). Estas estruturas dobradas servem de locais de ligação para uma variedade de proteínas, actuam como substratos em reacções enzimáticas e ainda exibem actividades enzimáticas intrínsecas [23].

### ***1.3.3. Estringência – Condições que influenciam a estrutura dos ácidos nucleicos***

As cadeias individuais dos ácidos nucleicos de dupla cadeia são estruturas dinâmicas que podem ser manipuladas em laboratório. São vários os factores que afectam a capacidade das duas cadeias simples dos ácidos nucleicos para formar pontes de hidrogénio estáveis entre as suas bases complementares. No laboratório é muitas vezes essencial que se promova ou previna a formação de moléculas de dupla cadeia, ou por vezes é mesmo necessário alternar entre as formas de dupla cadeia e cadeia simples no decorrer de uma experiência. Os biólogos moleculares adoptaram o termo estringência para descrever um conjunto de condições que interfere na associação das cadeias de

ácidos nucleicos. A estringência é uma medida da probabilidade em que uma dupla cadeia se dissocia nas cadeias simples que a constituem, sendo também uma medida da capacidade da cadeia simples de uma molécula de ácido nucleico para distinguir entre as moléculas que partilham um elevado grau de complementaridade e as que apresentam menor complementaridade. Desta forma, a estringência refere-se ao comportamento da complementaridade de uma molécula de ácido nucleico sob condições adversas. Na prática, condições de elevada estringência favorecem uma hibridação estável apenas entre moléculas de ácidos nucleicos com elevado grau de homologia. No caso específico do RNA, previne a auto-hibridação, ou seja a formação de dobras na sua estrutura. À medida que a estringência baixa, é favorecido, proporcionalmente, o aumento da hibridação não específica [13, 24].

As variáveis que são normalmente manipuladas para promover ou prevenir a hibridação *in vitro* incluem o pH, força iónica, temperatura [25] e a presença de formamida [26]. No entanto, estas variáveis extrínsecas são condicionadas pelas qualidades intrínsecas dos ácidos nucleicos, como o tamanho da molécula e o grau de complementaridade, que influenciam a estabilidade das ligações a qualquer nível de estringência.

O efeito do sal na estringência passa pela neutralização da repulsão electrostática natural que previne duas cadeias complementares, carregadas negativamente de emparelhar as bases. As concentrações moderadas dos catiões monovalentes, sódio, potássio ou lítio, contribuem com a sua carga positiva para minimizar a tendência natural da repulsão electrostática entre os dois esqueletos fosfodiéster carregados negativamente. Em baixas concentrações ou na ausência de sal, as repulsões electrostáticas facilmente excedem a força das ligações de hidrogénio existente entre as bases complementares, resultando na dissociação das moléculas de dupla cadeia [27, 28]. Na célula, as proteínas catiónicas intracelulares actuam, pelo menos em parte, para neutralizar a carga negativa dos ácidos nucleicos, prevenindo deste modo, a desnaturação.

O pH, por sua vez, influencia o grau de ionização dos ácidos nucleicos. Ao pH fisiológico, a hibridação ocorre naturalmente e a pH ácido dá-se a neutralização dos fosfatos condensando as moléculas, o que *in vitro* com pH inferior a 5 se pode traduzir na depurinação e portanto degradação dos ácidos nucleicos. Acima do pH fisiológico, um pH mais alcalino aumenta a ionização dos grupos fosfato resultando na dissociação das cadeias [25].

Quanto à temperatura, o seu efeito é geralmente oposto ao da concentração de sal. A estabilidade termodinâmica das cadeias duplas é uma função não só do número de nucleótidos que participam na formação das cadeias, mas também do seu conteúdo de G e C, devido ao conteúdo em ligações de hidrogénio. A temperatura necessária para criar um ambiente de elevada estringência é, por vezes, tão alta que a estabilidade química do RNA e do DNA pode ser comprometida. Para evitar esta situação é frequentemente utilizada a formamida para criar condições de elevada estringência a temperaturas baixas. A função da formamida é baixar a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos pares de bases interferindo com as pontes de hidrogénio [26].

## ***1.4. Biossíntese das moléculas de RNA***

Qualquer que seja o tipo ou a função fisiológica que desempenham, os RNAs são sempre sintetizados por cópia de regiões específicas e bem delimitadas do DNA, obedecendo a sua síntese ao princípio de complementaridade de bases. Este fenómeno, em que a informação contida nos segmentos do DNA genómico é transferida para uma molécula da mesma natureza que reflectem a própria sequência nucleotídica dos genes, é que se designa por transcrição.

A transcrição é um processo bioquímico de síntese das moléculas de RNA que constitui o mecanismo fundamental da expressão génica e que se traduz em última análise, na síntese de proteínas, agentes directos de todas as funções biológicas e determinantes das características de cada espécie viva. Os mecanismos moleculares de transcrição são universais, obedecendo a princípios gerais e exigências inerentes à estrutura polinucleotídica das moléculas, comuns às cadeias de DNA e RNA. No entanto, a transcrição dos genes eucariontes reveste-se de uma maior complexidade, que deriva em primeiro lugar da organização supramolecular do DNA genómico em cromatina, e da sua compartimentalização no núcleo da célula, inexistentes nos procariontes.

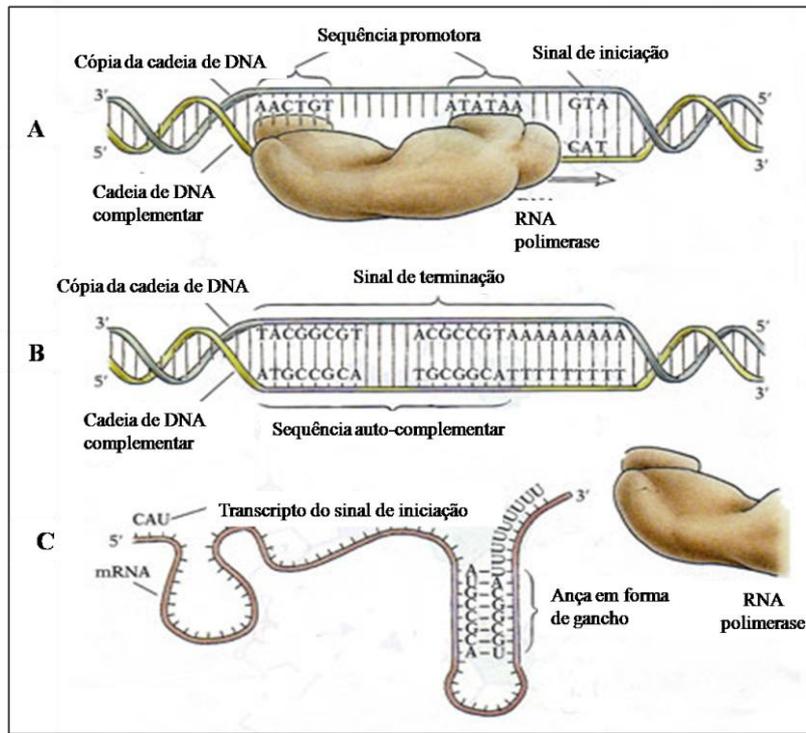
Cada região do DNA genómico que codifica uma proteína é designada por um gene, da mesma forma que as sequências que servem de matriz à transcrição dos rRNA e dos tRNA se chamam genes ribossomais e genes de RNA de transferência. A transcrição dos genes é um processo assimétrico, já que apenas uma das cadeias do DNA molde é copiada em RNA. Convencionou-se a designação de cadeia (-) *antisense* a que serve de molde à síntese do RNA e cuja sequência é portanto complementar do produto, e cadeia (+) ou *sense*, a cadeia de DNA não transcrita cuja sequência nucleotídica é idêntica à do RNA transcripto, produto directo do gene.

A transcrição dos genes processa-se sob acção de enzimas, designados por RNA polimerases dependentes do DNA, que catalisam a condensação orientada e sequencial dos nucleótidos. A reacção ocorre entre o grupo 3'OH do resíduo da ribose do primeiro nucleótido trifosfato precursor e o grupo 5' fosfato do nucleótido trifosfato seguinte, com formação de uma ligação fosfodiéster, resultando no crescimento da cadeia de RNA nascente na direcção 5' → 3'OH. Nas células procarióticas, a transcrição de todos os genes é operada por uma única enzima que tem a propriedade de reconhecer os sítios do DNA genómico correspondentes ao início de cada gene, catalisando em

seguida a reacção de polimerização. Nos organismos superiores existe uma maior diversidade de RNA polimerases, verificando-se que cada classe de genes é reconhecida por um tipo específico de RNA polimerase, designando-se por RNA polimerase I, II e III as enzimas responsáveis pela síntese do rRNA, mRNA e tRNA, respectivamente. Nas células eucarióticas existe ainda uma RNA polimerase mitocondrial, a RNA mitocondrial IV que, à semelhança da polimerase bacteriana, transcreve todos os genes constituintes do genoma mitocondrial [14, 29].

As RNA polimerases são normalmente constituídas por duas subunidades de alto peso molecular e várias pequenas subunidades, todas necessárias para que ocorra uma transcrição perfeita dos genes. A RNA polimerase da *Escherichia coli* (*E. coli*) é a polimerase de que melhor se conhece a constituição. Esta enzima bacteriana, contém quatro subunidades, duas subunidades  $\alpha$  (35 kDa), uma subunidade  $\beta$  (155 kDa) e uma subunidade  $\beta'$  (165 kD), que interagem para formar o cerne da enzima capaz de sintetizar inespecificamente o RNA. Esta enzima adquire especificidade e é capaz de se ligar e iniciar a transcrição nos locais de iniciação no DNA quando uma quinta subunidade, o factor  $\sigma$ , se junta ao complexo formando uma holoenzima. A *E. coli* possui inúmeros factores  $\sigma$  que quando unidos ao complexo da polimerase, conferem especificidade para a transcrição de determinadas classes de genes, contribuindo para a actividade reguladora neste processo [16].

O fenómeno da transcrição compreende três etapas: a iniciação, quando se dá o reconhecimento de cada gene no seio da totalidade do DNA genómico, a elongação que compreende os fenómenos de ligação dos nucleótidos e a terminação que corresponde à síntese completa de cada molécula de RNA transcritas (figura 7) [7].



**Figura 7 - Processo de transcrição em *E. coli*.**

A. A RNA polimerase liga-se à região do DNA nas seqüências indicadas na figura. Uma vez ligada, a transcrição inicia-se com o sinal GTA e o processo continua até que seja encontrado um sinal de terminação. (B) O sinal de terminação consiste numa seqüência auto-complementar de quatro a oito adeninas. (C) Neste ponto, o mRNA forma uma pequena dobra em gancho e a RNA polimerase pára de sintetizar [30].

### ***1.5. Os diferentes tipos de RNA***

Como se verificou, os RNAs existem nas células como produtos directos dos genes que codificam para diferentes tipos de RNAs, desempenhando funções fisiológicas distintas e bem caracterizadas e constituindo essencialmente três grandes classes: o RNA ribossómico (rRNA), o RNA de transferência (tRNA) e o RNA mensageiro (mRNA). Estes estão obrigatoriamente presentes em todos dos seres vivos, representando o rRNA 80-90% do RNA celular, o tRNA 10-15% e o mRNA raramente mais do que 2% do total [1]. Cada um destes RNAs é muitas vezes descrito e identificado pela velocidade de sedimentação (S, Svedbergs) ou pelos seus números de bases (nt, nucleótidos, ou kb, quilobases).

Os rRNAs são os componentes centrais do ribossoma, o complexo estrutural onde se realiza a síntese proteica. A função destes RNAs é promover um mecanismo para a tradução do mRNA em proteínas. Nos eucariontes, os rRNAs são sintetizados como um único transcripto de RNA com uma dimensão de 45S e cerca de 13 kb. Este transcripto primário é processado em rRNAs de 28S, 18S, 5.8S e 5S. O 28S e 5.8S associam-se com as proteínas ribossomais para formar a chamada subunidade grande do ribossoma. O rRNA 18S liga-se a outras proteínas específicas e forma a subunidade pequena do ribossoma. A subunidade grande com as proteínas e o RNA tem o tamanho característico de 60S que interage com a subunidade pequena para formar um ribossoma funcional cujas dimensões são 80S [31]. Os rRNAs procariontes interactivam de forma semelhante de modo a formar as subunidades ribossomais, no entanto apresentam dimensões menores [31, 32]. A tabela seguinte mostra essa diferença.

**Tabela 1 – Componentes das diferentes subunidades ribossômicas em células procarióticas e eucarióticas.**

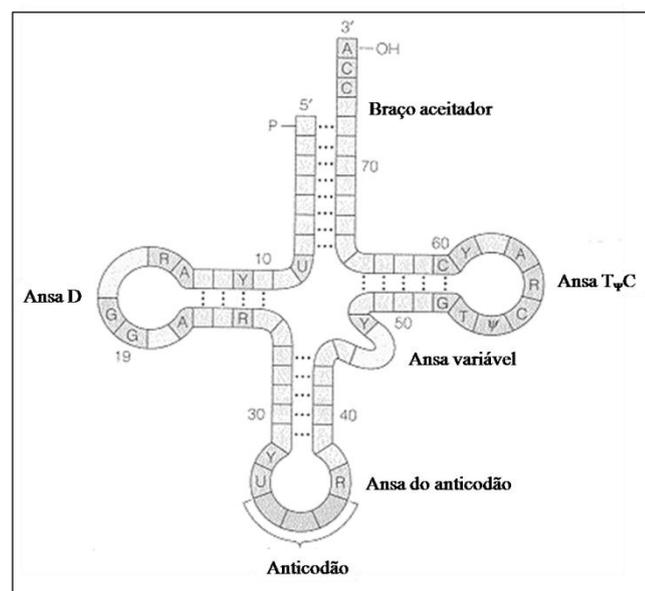
<b>Tipo celular</b>	<b>rRNA</b>	<b>Subunidade grande</b>	<b>Subunidade pequena</b>	<b>Tamanho</b>
PROCARIOTES	23S, 5S 16S	50S (5S, 23S)	30S (16S)	70S
EUCARIOTES	28S, 5.8S 18S	60S (5S, 5.8S, 28S)	40S (18S)	80S

Funcionalmente, as duas subunidades ribossomais parecem apresentar diferentes funções na síntese proteica. A subunidade menor está responsável pela descodificação enquanto a subunidade maior realiza as funções catalíticas. Devido ao seu importante envolvimento na síntese proteica, os ribossomas têm sido sujeitos a estudos intensivos nas últimas décadas e o objectivo final é elucidar os mecanismos da formação da ligação peptídica e a sua especificidade na tradução. Nos últimos anos, várias estruturas cristalinas das subunidades ribossômicas, bem como todo o ribossoma, foram caracterizadas [33-36], demonstrando em detalhe a organização espacial dos rRNAs e as suas interacções com as proteínas.

A investigação dos ribossomas é também importante do ponto de vista terapêutico, uma vez que existem diversos antibióticos que se ligam a ambas as subunidades ribossomais em locais específicos, interferindo com vários aspectos das suas funções. As estruturas cristalinas das subunidades ribossomais, dos seus componentes e dos ribossomas no seu todo em ligação com os antibióticos são, assim, cruciais para interferir nos mecanismos de acção e selectividade da droga [37, 38].

Os RNAs de transferência, as moléculas mais pequenas das três principais espécies de RNAs, têm cerca de 74 e 95 nucleótidos, perfazem cerca de 15% dos RNAs na célula [39] e transferem um aminoácido específico activo para uma cadeia polipeptídica em crescimento no ribossoma, durante a tradução [40]. Existe pelo menos um tipo específico de tRNA para cada um dos 20 aminoácidos frequentemente encontrados nas proteínas.

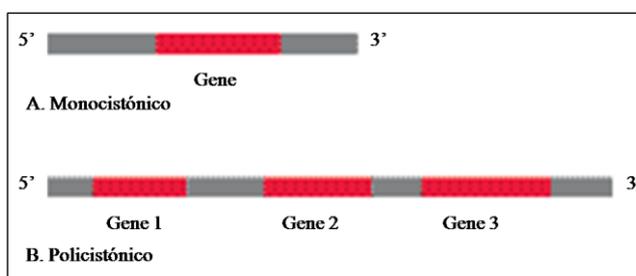
A determinação da estrutura dos tRNAs foi um passo importante na elucidação do código genético, pois definiu estes pequenos RNAs como moléculas adaptadoras que traduziam as sequências nucleotídicas do mRNA nas sequências de aminoácidos nas proteínas. Os tRNAs apresentam uma estrutura secundária muito característica e contêm diversos nucleótidos que diferem dos habituais quatro devido a várias modificações químicas. Todos os tRNAs têm uma organização conformacional com quatro ansas distintas, apelidada de trevo (figura 8). A ansa D contém várias bases modificadas, nomeadamente metilações na citosina e dihidrouridinas. A ansa designada por anticodão é a estrutura responsável pelo reconhecimento do codão complementar de uma molécula de mRNA e esta interacção específica é devida à complementariedade dos pares de bases entre as duas sequências trinucleótídicas. A dobra variável de 3-21 bp (pares de bases) de comprimento existe na maioria dos tRNAs mas a sua função é ainda desconhecida. Por último, existe a ansa T $\psi$ C que apresenta uma base modificada com o nome de pseudouridina. Uma outra estrutura proeminente encontrada em todos os tRNAs é o braço aceitador formado pelo pareamento de bases entre os nucleótidos do terminal 5' e do terminal 3'. As últimas três bases encontradas na extremidade 3' permanecem desemparelhadas e têm sempre a mesma sequência: 5'-CCA-3'. O terminal 3' do braço aceitador é o ponto onde um aminoácido se liga através de uma ligação éster entre o grupo 3' hidroxilo da adenosina e o grupo carboxilo do aminoácido [40-42].



**Figura 8 - Estrutura geral do tRNA [43].**

Os RNAs mensageiros são a classe de RNAs que transportam a informação genética do DNA para o citosol, onde é utilizada como modelo para a síntese proteica. O mRNA tem despertado actualmente bastante interesse como alvo terapêutico, pois sendo ele o responsável por passar a informação que está no gene, pode ser prevenida a transcrição de uma determinada proteína associada a uma doença [3].

O mRNA compreende apenas 2% do RNA total e é o tipo de RNA mais heterogéneo em termos de tamanho. Relativamente ao tipo de células em que é encontrado, este RNA apresenta características bastante distintas. Nas células procarióticas, uma única molécula de mRNA pode ter a capacidade de codificar múltiplas proteínas (policistrónico), enquanto nos eucariontes, o mRNA transporta a informação para codificar uma única proteína (figura 9) [2, 39].



**Figura 9 – mRNAs (A) monocistrónico e (B) policistrónico de procariontes.**

Os segmentos vermelhos representam RNAs codificantes e os segmentos cinza representam sequências não-codificantes. No transcripto policistrónico, o RNA não-codificante separa os três genes [13].

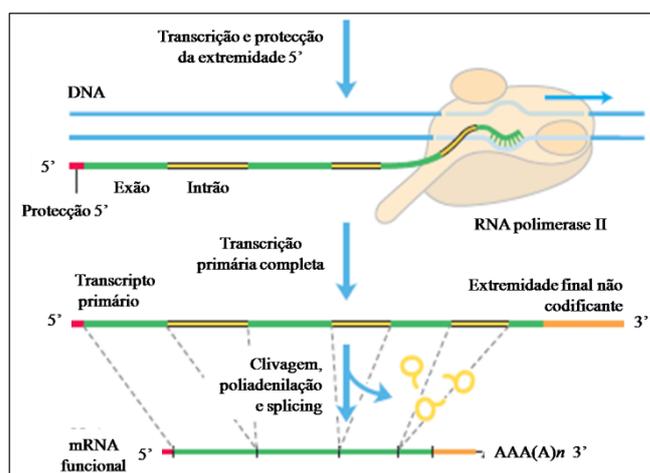
Nas células eucarióticas o transcripto primário é significativamente modificado após a transcrição. Essas modificações químicas únicas nestas células incluem a protecção da extremidade 5', a adição da cadeia polyA e a remoção dos intrões (figura 10) [16, 18, 39].

A protecção da extremidade 5' é um processo de incorporação de um agente protector, a 7-metil-guanosina, através de uma ligação trifosfato à extremidade 5' do mRNA seguido da metilação desse terminal de guanina. A adição desta 7-metilguanósina através da invulgar ligação trifosfato 5'-5' parece facilitar a iniciação da tradução e ajuda na estabilização do mRNA.

A cadeia polyA é uma sequência de cerca de 40 a 200 nucleótidos de adenina que se liga à extremidade da maioria dos mRNAs. Esta cadeia, adicionada após a transcrição

ajuda também a estabilizar os mRNAs e facilitam a sua saída do núcleo e após o RNA entrar no citosol esta sequência vai sendo reduzida.

Os intrões são sequências do transcripto do mRNA que não codificam proteínas e a sua remoção dá-se no processo de maturação do mRNA. As sequências codificantes que permanecem, os exões, são unidas para formar o mRNA funcional.



**Figura 10 – Formação do transcripto primário e o seu processamento durante a maturação do mRNA numa célula eucariótica.**

A protecção 5' (a vermelha) é adicionada antes da síntese do transcripto primário estar completo. O “splicing” pode ocorrer antes ou depois da clivagem e dos passos de poliadenilação. Todos os processos esquematizados ocorrem no núcleo [13].

### ***1.5.1. RNAs de baixo peso molecular***

Nas células eucarióticas e procarióticas existem também RNAs designados de RNAs de baixo peso molecular (sRNAs), devido precisamente ao seu peso molecular. Durante as últimas três décadas, devido ao desenvolvimento da electroforese em géis de poliacrilamida, foi possível identificarem-se muitos sRNAs com pesos moleculares entre os 70 e os 300 nucleótidos, nos quais também se inserem o tRNA e o RNA 5S [44, 45].

O RNA 5S é o componente mais pequeno da subunidade grande do ribossoma, presente em quase todos os tipos de ribossomas. Durante muitos anos, o 5S foi usado como modelo nos estudos sobre a estrutura do RNA e nas interacções RNA-proteína, e como marcador filogenético. Estes dados levaram a uma grande acumulação de

informação sobre a sua sequência nucleotídica [46]. A função precisa deste pequeno rRNA no ribossoma ainda não é completamente conhecida. Com base nos resultados de experiências de ligações cruzadas, sugeriu-se que ele poderá contribuir como tradutor de sinal entre o centro do peptidiltransferase e o domínio II responsável pela translocação, [47] ou ser uma molécula determinante na estabilidade da grande subunidade ribossômica [48]. A sua importância na síntese proteica na *E. coli* foi também demonstrada, pelo facto de se verificar que a deleção de um ou mais genes do RNA 5S influenciava a taxa de crescimento [49].

Nas células eucarióticas, existem também sRNAs com sequências de 20-30 nucleótidos que foram apenas recentemente descobertos. Devido ao seu baixo peso molecular, eles não são facilmente observados em análises bioquímicas e não são inativados pelas ferramentas da genética clássica. Relativamente à sua função biológica, regulam vários processos biológicos, interferindo frequentemente no processo de tradução ao nível do mRNA. Existem centenas de sRNAs, mas devido à sua caracterização evidenciam-se os RNAs de interferência (iRNAs) e os micro RNAs (miRNAs). Os dois primeiros miRNAs a serem descobertos, *lin-4* e *let-7*, foram identificados na década de 90 em experiências genéticas no verme *Caenorhabditis elegans*. Mais tarde, iRNAs foram identificados em animais, plantas e fungos como moléculas efectoras que medeiam o processo de silenciamento de genes [50].

Os sRNAs eucariontes derivam de RNAs de dupla cadeia (dsRNAs) através do processamento mediado pela enzima RNase III. Os miRNAs são formados a partir da região dobrada do dsRNA enquanto os iRNAs são produtos da longa cadeia de dsRNA. As suas funções de silenciamento génico são mediadas por pelo menos quatro mecanismos diferentes: i) clivagem endonucleotídica dos mRNAs, (ii) repressão transcriptional, (iii) repressão transcripcional pela modificação do DNA e/ou histonas e (iv) eliminação do DNA pela modificação das histonas [50].

Devido à sua elevada especificidade e eficiência, o iRNA tem sido alvo de intensa investigação como poderosa técnica para silenciamento de genes. A ligação que parece existir entre sRNAs e as doenças humanas faz com que muitas empresas estejam a testar as modificações químicas dos iRNA de modo a introduzi-los na clínica. Está neste momento claro que os iRNA se podem tornar uma estratégia efectiva para o tratamento de cancros [50] ou infecções virais, como a síndrome respiratória viral ou a hepatite [4], desde que as limitações de estabilidade e de entrega do RNA nas células possam ser contornados.

Nas células procariontes, nomeadamente na *E. coli*, pela sua extensa investigação, são conhecidos, para além do tRNA e do rRNA 5S, outros sRNAs: 4.5S, tm, RNAse P, spot 42, 6S, CsrB, OxyS, MicF, DicF e o DsrA. A tabela seguinte indica as propriedades gerais destes sRNAs [51].

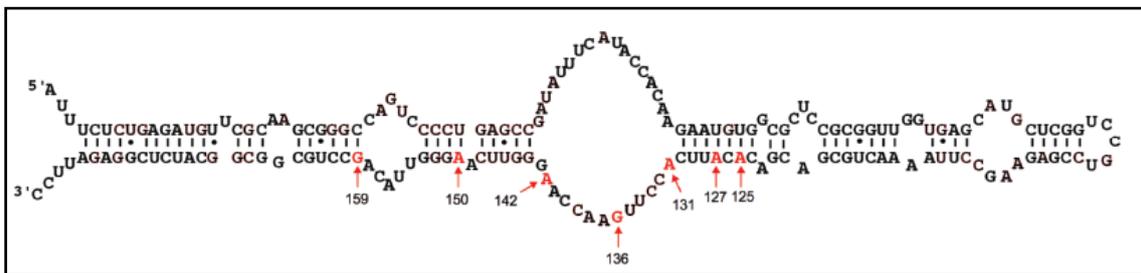
**Tabela 2 - Propriedades gerais dos sRNAs em *E. coli* [51]. (ND – não determinados)**

<b>RNA</b>	<b>GENE</b>	<b>COMPRIMENTO (nt)</b>	<b>BIOGÊNESE</b>	<b>ABUNDÂNCIA</b>
4,5S	<i>ffs</i>	114	Processado do transcripto primário RNase P (extremidade 5')	0,13 - 0,28
tmRNA	<i>ssrA</i>	363	Processado do transcripto primário RNase P (extremidade 5') RNase III (extremidade 3')	0,10 – 0,26
RNase P	<i>rnpB</i>	377	Processado do transcripto primário RNase E (extremidade 3')	ND
Spot 42	<i>spf</i>	109	Transcripto primário	0,01
6S	<i>ssrS</i>	184	Processado a partir de transcripto dicistrónico por mecanismo desconhecido	0,20 – 0,30
CsrB	<i>csrB</i>	369	Desconhecido	ND
OxyS	<i>oxyS</i>	109	Transcripto primário	0,09
MicF	<i>micF</i>	93	Transcripto primário	ND
DicF	<i>dicF</i>	53	Processado a partir de transcripto poliistrónico RNase E (extremidade 5') RNase III (extremidade 3')	ND
DsrA	<i>dsrA</i>	87	Transcripto primário	ND

Estes sRNAs exercem a sua actividade funcional através de interacções RNA:RNA e RNA:proteína, mas também através das suas actividades intrínsecas, no entanto existem ainda alguns tipos de RNA cuja função ainda não está bem definida [52].

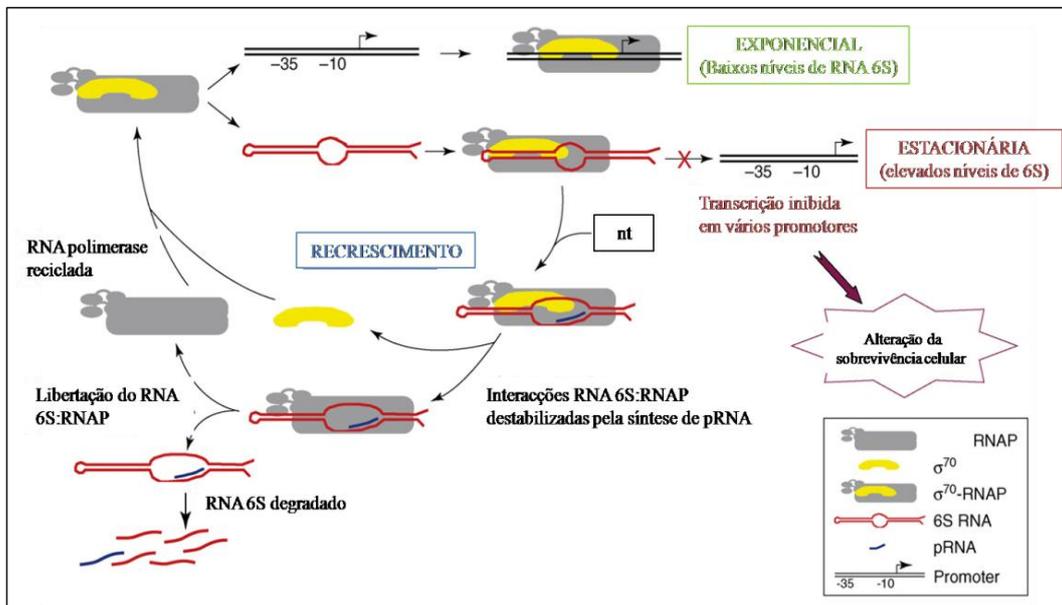
Recentemente, foi identificado o envolvimento do RNA 6S na actividade transcripcional da *E. coli* [53]. A estrutura secundária do 6S apresenta uma grande

similaridade com a estrutura do promotor de DNA que se liga ao centro da subunidade  $\sigma$  na RNA polimerase (figura 11). Desta forma, o RNA 6S compete com o promotor para o local de ligação da enzima visando a sua inibição. Esta actividade inibitória revela-se importante a nível celular, pois este tipo de sRNA que é maioritariamente expresso na fase estacionária do crescimento bacteriano contribuiu para a viabilidade celular na falta de um ambiente nutritivo [51, 53]. Para além desta acção regulatória, foi ainda proposto que este RNA seria utilizado pela enzima como molde para a síntese directa de RNA, gerando produtos de RNA “*de novo*” (pRNAs) [51, 53]. Esta reacção de síntese parece ser o mecanismo responsável pela libertação da RNA polimerase da inibição do RNA 6S, uma vez que foram encontrados complexos 6S:pRNA quando as células da fase estacionária reentram em crescimento. Desta forma, verificou-se que o RNA 6S cuja função foi desconhecida durante muitos anos representa um RNA não codificante que exhibe um mecanismo regulatório importante na transcrição, com implicações metabólicas e fisiológicas.



**Figura 11 -Estrutura secundária do RNA 6S.**

A estrutura consiste numa região central caracterizada por uma dobra interna de cadeia simples, que é seguida de uma dupla cadeia longa e irregular, descontinuada por pequenas dobras. Na figura estão assinaladas as posições dos nucleótidos que interagem com a holoenzima  $\sigma^{70}$  [54].



**Figura 12 -Modelo de interação dinâmica entre o RNA 6S, o promotor de DNA e a holoenzima  $\sigma^{70}$  durante diferentes fases do crescimento bacteriano.**

A forma predominante da holoenzima  $\sigma^{70}$  parece estar ligada ao RNA 6S ou ao promotor de DNA dependendo da abundância celular do RNA 6S. Durante a fase estacionária, os níveis deste RNA estão elevados e o complexo 6S:holoenzima  $\sigma^{70}$  predomina; durante a fase exponencial, a holoenzima está maioritariamente ligada ao DNA. Quando as células estão expostas a um ambiente rico em nutrientes, elas entram numa fase de recrescimento (*outgrowth*) onde as concentrações de NTP aumentam significativamente e o RNA 6S é utilizado como molde para a síntese de pRNA, resultando na liberação e degradação do RNA e reciclagem da holoenzima [51].

## ***1.6. Estratégias de isolamento do RNA***

Todas as funções celulares são reguladas, em última análise, pela expressão génica e desta forma, as razões que levam à eleição do estudo da modulação do RNA como um parâmetro da bioquímica celular podem ser tão diversas como a própria população de RNA intracelular. De um modo geral, a caracterização do RNA é quase sempre relacionada com a transcrição. A investigação em biologia molecular envolvendo o RNA circula, geralmente, em torno de um ou mais aspectos fundamentais, tais como: (i) a medição da acumulação final do RNA na células, ou num compartimento celular, tal como o núcleo ou o citoplasma; (ii) medição da taxa de transcrição de uma sequência de genes ou a via de processamento de RNA; (iii) mapeamento das moléculas de RNA, incluindo as extremidades 5' e 3' e o tamanho e a localização dos intrões; (iv) transcrição *in vitro* de mRNA purificado e síntese de DNA complementar (cDNA) [24].

O RNA é química e biologicamente mais lábil que o DNA, principalmente a temperaturas elevadas (>65°C) e na presença de pH alcalino. Estas limitações à sua manipulação são ainda ampliadas pelas actividades endonucleolíticas e exonucleolíticas de uma variedade de ribonucleases (RNases), pelo que o isolamento do RNA de uma fonte biológica enriquecida por RNases é um grande desafio. Estes factores exigem que a recuperação do RNA seja rápida e sem contaminações com RNases. [24].

Actualmente, existem várias metodologias para que o isolamento do RNA seja rapidamente concretizado [55]. De um modo geral, com estes métodos obtém-se um extracto de RNAs citoplasmáticos, nucleares, ou uma mistura de ambos, vulgarmente conhecido como RNA celular. Os protocolos para o isolamento do RNA iniciam-se com a lise celular, utilizando tampões que se dividem em duas categorias, os que consistem de agentes caotrópicos, tais como os sais de guanidina [56], dodecil sulfato de sódio (SDS) [57], *N*-laurilsarcosina (sarcosyl), ureia, fenol, ou clorofómio, que rompem a membrana plasmática e os organelos subcelulares, e que simultaneamente inactivam as RNases, e aqueles que solubilizam gentilmente a membrana plasmática enquanto mantêm a integridade nuclear [58]. Os restos celulares são depois removidos por centrifugação diferencial. A segurança e eficiência destes métodos é, muitas vezes, dependente da introdução de inibidores de nucleases nos tampões de lise e do manuseamento e armazenamento adequado do RNA purificado.

O RNA obtido com maior qualidade é normalmente resultado da extracção efectuada com os tampões de lise caotrópicos, e os contendo guanidina estão entre os mais eficazes [58, 59]. Como foi descrito anteriormente, estes procedimentos tem a vantagem de destruir os componentes celulares completamente e de forma rápida, inactivando simultaneamente a actividade das RNases, mesmo quando estão presentes em grande abundância [60].

Os métodos originais eram baseados nas diferenças de densidades do RNA e do DNA, pelo que se tornavam laboriosos devido aos passos de ultracentrifugação para a sua separação [61]. Em 1987, Chomczynski and Sacchi [59] descreveram o isolamento e a purificação do RNA através do tratamento das células com tiocianato de guanidina mas sem a necessidade das ultracentrifugações subsequentes com cloreto de céσιο (CsCl) [61]. Neste procedimento, o RNA é isolado em pouco tempo através da sua extracção celular com sais de guanidina, uma solução fenólica ácida e a posterior adição de clorofórmio para facilitar a compartimentação do material aquoso e orgânico. Aquando da separação, o RNA é retido na fase aquosa enquanto o DNA e as proteínas estão repartidos entre a fase orgânica e uma interface de proteína formada. De seguida, o RNA é recuperado por precipitação com isopropanol e recolhido por centrifugação [59].

Os tampões de guanidina causam a perda de conformações das proteínas e desta forma, ao distorcer a estrutura terciária das moléculas de RNases o seu poder de clivagem é inibido [62]. Este efeito é reforçado pela introdução do detergente iónico, sarcosyl e assim não é necessário incluir mais inibidores de RNases. Devido à capacidade caotrópica destes tampões, a lise dos organelos é também acompanhada pela ruptura da membrana plasmática. Este acontecimento faz com que se liberte também o RNA nuclear heterogéneo e o gDNA do núcleo e o DNA e RNA mitocondrial, sendo que todos são copurificados com o RNA plasmático [24].

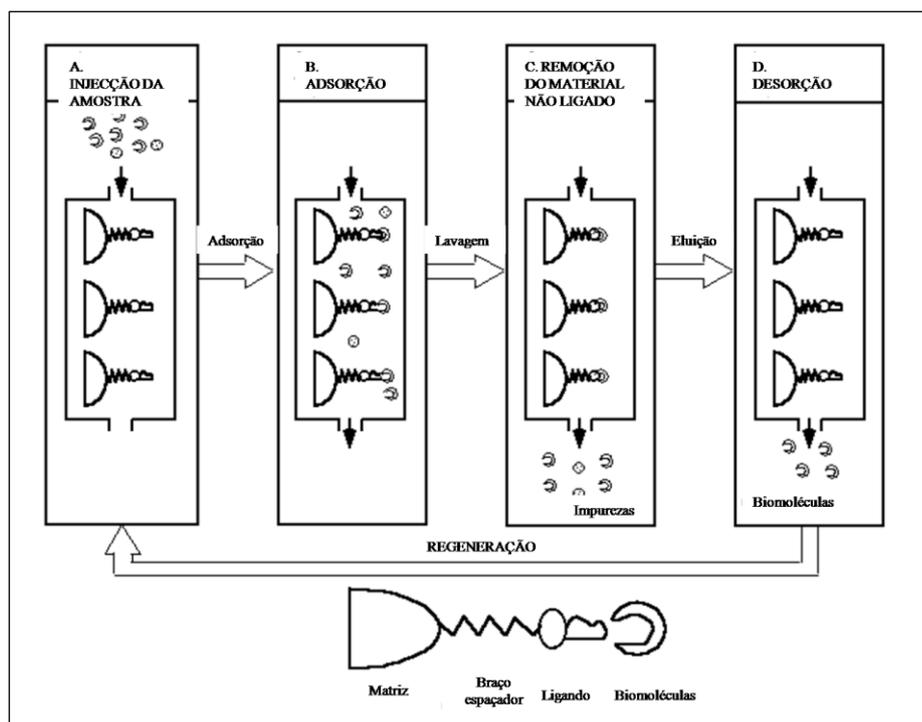
O passo de precipitação com isopropanol é o método reconhecido como mais versátil para concentrar ácidos nucleicos, combinado muitas vezes com sal. Os ácidos nucleicos e o sal que promove a sua precipitação, formam complexos que apresentam solubilidade muito reduzida em etanol e isopropanol. A taxa de precipitação utilizando várias combinações de sais e álcool é dependente da temperatura. Ao contrário da precipitação do DNA genómico, a precipitação do RNA é muito mais favorecida quando este é incubado a -20°C por longos períodos, para que desta forma se assegure a recuperação completa. Este fenómeno é uma função directa do tamanho do genoma e da

complexidade que o organismo exhibe, comparado com a complexidade relativamente baixa do RNA celular. Outros procedimentos para a concentração de amostras de ácidos nucleicos incluem o uso de dispositivos de concentração disponíveis comercialmente, nomeadamente de diálise e centrifugação por vácuo, não sendo tão amplamente utilizados devido ao custo e ao facto de não superarem a simplicidade da precipitação [24].

Seleccionar as melhores condições de armazenamento para as amostras de RNA purificadas é um passo muito importante devido ao carácter lábil deste ácido nucleico, uma vez que um armazenamento impróprio irá resultar na degradação da amostra a curto prazo. O RNA purificado apresenta maior estabilidade se armazenado quando precipitado com etanol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Com estas condições, o RNA pode ser mantido vários meses ou até mais tempo, pois o tempo de semi-vida do RNA é directamente proporcional à fonte biológica. Se a amostra for utilizada dentro de uma semana, o RNA também se mantém estável em etanol, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O RNA armazenado em água estéril deverá ser mantido em gelo durante o manuseamento. A acção mais prudente neste caso seria determinar a concentração do RNA e depois armazená-lo em alíquotas a  $-80^{\circ}\text{C}$  [24]. Uma outra opção para o armazenamento a longo prazo passa pela utilização da formamida [63]. O RNA é estável até cerca de dois anos a  $-20^{\circ}\text{C}$  e pode ser depois usado directamente em electroforeses desnaturantes.

## 1.7. A cromatografia nos processos de purificação

A cromatografia é um termo colectivo para uma variedade de técnicas de separação de misturas, que é baseado na partição de uma amostra entre uma fase móvel e uma fase estacionária. O facto das moléculas presentes na amostra apresentarem diferentes propriedades físicas, fazem com que se distribuam diferentemente entre as duas fases e, desta forma, as moléculas que estão fortemente ligadas à fase estacionária serão retardadas ou retidas relativamente às restantes, resultando na sua separação. Na generalidade, um processo cromatográfico compreende cinco etapas: (i) o equilíbrio das fases, de modo a ajustar as fases móvel e estacionária às condições de ligação; (ii) aplicação da amostra; (iii) lavagem ou remoção do material não ligado; (iv) eluição da biomolécula, por alteração da força e/ou composição da fase móvel e (v) regeneração/limpeza da coluna, onde ocorre a desorção/eluição e lavagem de impurezas da fase estacionária [64].



**Figura 13 – Etapas gerais de um processo cromatográfico.**

A) Injecção da amostra na coluna de cromatografia previamente equilibrada; B) ligação das moléculas que interagem com o ligando; C) eluição das moléculas não retidas; D) eluição das moléculas que interagiram com o ligando, por manipulação da composição da fase móvel [65].

Através da escolha apropriada de uma fase móvel e/ou de uma fase estacionária, é possível obter separações efectivas de moléculas, mesmo que estas apresentem grandes semelhanças. Esta flexibilidade permitiu o avanço da tecnologia cromatográfica, da qual resultam constantemente novas colunas que proporcionam uma melhor resolução, elevada capacidade e estabilidade física.

A história da cromatografia começa nos finais do século XIX, no entanto a sua designação e a primeira utilização foi na primeira década do século XX para a separação de pigmentos das plantas, nomeadamente as clorofilas. A cromatografia desenvolveu-se substancialmente como resultado do trabalho dos químicos Archer Martin e Richard Synge nos anos 1940 e 1950. Eles estabeleceram os princípios e as técnicas básicas da cromatografia em partição e os seus trabalhos encorajaram o rápido desenvolvimento dos vários tipos de métodos cromatográficos [66].

Actualmente, é generalizadamente reconhecido que a cromatografia é o método de separação mais eficaz no que diz respeito à resolução e versatilidade, apresentando um poder de resolução superior à centrifugação e ultracentrifugação e capaz de isolamentos em larga escala [66]. Esta técnica é apropriada para quase todas as situações de separação em biotecnologia e pode ser dividida em cromatografia de partição e cromatografia de adsorção dependendo no tipo de interacção que ocorra entre a fase estacionária e os componentes. Na cromatografia de partição, a fase estacionária pode ser um solvente, um líquido, um sólido imobilizado como o papel ou mesmo uma matriz de gel como a sephadex, mas as interacções específicas entre os componentes a serem separados e as fases estacionárias são mínimas. Contrariamente, na cromatografia de adsorção, a fase estacionária consiste numa matriz granular fina ou em esferas que é empacotada numa coluna. Neste tipo cromatográfico, a matriz empacotada é equilibrada com o tampão desejado e a amostra, contendo uma mistura de componentes, é adicionada ao topo da coluna e é permitida a sua difusão. Assim que amostra entra em contacto com as partículas da matriz, estabelecem-se interacções distintas com o tampão e com a matriz, levando ao fraccionamento das várias espécies da amostra. Devido à sua importância metabólica, as biomoléculas são os alvos preferenciais dos estudos cromatográficos, pois explorando as suas diferentes propriedades físico-químicas é possível obterem-se eficientes purificações para vastas aplicabilidades [67].

Existem, basicamente, quatro tipos de técnicas cromatográficas: a cromatografia de filtração em gel, troca iónica, interacção hidrofóbica e a cromatografia de afinidade. Todas elas exploram determinada característica específica da biomolécula, seja ela o

tamanho, a carga ou a hidrofobicidade ou no caso da cromatografia de afinidade, pode abranger quaisquer características particulares da biomolécula, estando apenas dependente do tipo de ligando que é acoplado à matriz.

Estas técnicas são passíveis de automatização e o papel principal do equipamento cromatográfico é iniciar, monitorizar e controlar correctamente o processo de separação, conduzindo ao máximo proveito da separação que ocorre na coluna.

### ***1.7.1. Cromatografia de filtração em gel***

A cromatografia de filtração em gel, também conhecida por cromatografia de exclusão molecular (SEC), permite alcançar uma rápida separação das moléculas baseando-se no seu tamanho molecular. A fase estacionária desta cromatografia consiste numa rede de poros de tamanho controlado, nos quais as moléculas, cujas dimensões não ultrapassem o tamanho máximo dos poros, conseguem penetrar. A entrada das biomoléculas nos poros da matriz depende da sua forma e do seu peso molecular, pelo que, a separação selectiva dependerá da diferente capacidade das várias moléculas entrarem nesses poros. Na prática, quando a amostra a purificar é aplicada na coluna, as moléculas maiores, que não conseguem atravessar os poros da matriz, são as primeiras a serem excluídas enquanto as moléculas mais pequenas entram nos poros do gel, movendo-se mais lentamente. Desta forma, as moléculas são eluídas por ordem decrescente do seu tamanho molecular [68].

Actualmente, uma variedade de matrizes está disponível para a separação das diferentes biomoléculas usando esta estratégia, e algumas das mais comuns consistem em oligossacáridos de ligações cruzadas, tais como a agarose e o dextrano, e acrilamida de ligações cruzadas. A cromatografia em gel pode ser usada para separar espécies com pesos moleculares entre os  $10^2$  e  $10^6$  Daltons [64].

### ***1.7.2. Cromatografia de interacção hidrofóbica***

A cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC) é uma técnica que se baseia nas propriedades hidrofóbicas das biomoléculas para as separar. O aparecimento desta técnica baseou-se em observações relacionadas com a interacção forte de algumas proteínas com as cadeias espaçadoras usadas em outros tipos de cromatografia. O efeito

hidrofóbico é considerado como sendo o factor mais importante e fundamental na estrutura e estabilidade tridimensional das proteínas e o seu grau de hidrofobicidade depende, numa primeira análise, da sua sequência de aminoácidos. No entanto, o número, o tamanho e a distribuição de pequenas regiões com diferente carácter hidrofóbico são característicos de cada proteína e são assim usados para a sua purificação.

O fenómeno da interacção hidrofóbica em que se baseia esta cromatografia refere-se à agregação de moléculas não polares, que o fazem quando expostas a um solvente polar. A molécula apolar fica rodeada pelas moléculas polares do solvente parcialmente ordenadas o que causa uma diminuição de entropia. Para minimizar o decréscimo entrópico, as moléculas apolares tendem a agregar decrescendo, assim, a superfície de contacto na qual as moléculas polares se ordenam. Numa coluna de HIC, a fase estacionária é usualmente um material inerte acoplado a grupos hidrofóbicos funcionais, tais como o etil, propil, butil, hexil, octil e fenil. Uma amostra pode ser aplicada à coluna com um tampão altamente polar, como por exemplo, o sulfato de amónio, o que proporciona interacções hidrofóbicas entre as biomoléculas e a fase estacionária. A eluição das biomoléculas retidas é promovida por aplicação de um tampão não polar, diminuindo a força iónica [67, 68].

### ***1.7.3. Cromatografia de troca iónica***

A cromatografia de troca iónica separa as moléculas com base na ionização dos seus grupos, o que permite uma interacção electrostática com a carga oposta da fase estacionária, que lhe é conferida por ligandos ou grupos funcionais. Estes grupos encontram-se associados reversivelmente a contra-íões móveis. As moléculas a serem separadas competem com estes contra-íões para se ligarem aos grupos da fase estacionária e são, assim, retidos com base na sua carga. Diferentes tipos de moléculas irão ligar-se à matriz com intensidades de interacção que dependem das condições usadas e do tipo e do número de grupos carregados individualmente, o que leva à resolução dos vários tipos de moléculas por cromatografia de troca iónica. Num processo típico de cromatografia, uma mistura é aplicada à coluna e após a eluição das moléculas que não ligam, as condições podem ser gradualmente ajustada pelo simples

aumento da concentração de um contra-íão ou alterando o pH, para libertar a molécula de interesse.

A cromatografia de troca iónica é assim designada devido à permuta do contra-íão, pelo que quando a fase estacionária tiver carga positiva e o íão para troca é um anião, o processo é referido como cromatografia de troca aniónica, mas se a fase estacionária apresentar carga negativa, o que significa que o íão a trocar é um catião, a cromatografia é de troca catiónica [64, 68].

#### ***1.7.4. Cromatografia de afinidade***

A cromatografia de afinidade é um método cromatográfico único que, utilizando um ligando específico, permite analisar e purificar biomoléculas, com base na sua função fisiológica ou na estrutura química individual. Este método tem por base a interacção reversível entre a biomolécula de interesse e o seu ligando específico, que se encontra acoplado a uma matriz cromatográfica. Os processos de eluição podem ser efectuados específicos, usando agentes competitivos, ou não-específicos, manipulando as condições da fase móvel por alteração de pH, força iónica ou polaridade, dependendo da matriz utilizada e das características químicas das biomoléculas[68]. As interacções que ocorrem entre os ligandos e a biomolécula de interesse podem resultar de interacções electrostáticas, interacções hidrofóbicas, forças de *van der Waals* e/ou pontes de hidrogénio. A natureza específica das interacções subjacentes é a maior vantagem desta cromatografia, pois resulta num processo de elevada selectividade e resolução. Desta maneira, num único passo, a purificação por afinidade pode oferecer grandes vantagens sobre outros processos menos selectivos, mais dispendiosos e morosos [69, 70].

Na prática, a fase estacionária contém uma molécula imobilizada que se liga com elevada especificidade a uma proteína ou um pequeno número de proteínas similares, a ácidos nucleicos ou outras moléculas.

A tabela seguinte estabelece um ponto de comparação entre as várias técnicas cromatográficas, referindo as propriedades das biomoléculas em que a cromatografia se baseia para promover a separação, as características e as suas aplicações na purificação.

Tabela 3 – Tipos de cromatografias baseadas nas características próprias de cada biomoléculas.

PROPRIEDADE	TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS	APLICAÇÃO
Tamanho	Cromatografia de exclusão molecular	Resolução moderada para o fracionamento. Boa técnica na troca de tampão e dessalinização. Capacidade relativamente baixa para proteínas, mas elevados caudais com algumas matrizes.	O fracionamento é melhor nos últimos estágios de purificação. Tampão pode ser trocado em qualquer altura.
Hidrofobicidade	Cromatografia de interação hidrofóbica	Boa capacidade e resolução. Velocidade elevada.	Pode ser aplicada em qualquer estágio de purificação, mas é mais útil quando a força iónica é elevada. Possibilidade de desnaturação; Pode envolver compostos orgânicos durante a eluição.
Carga	Cromatografia por troca iónica	A resolução pode ser muito elevada; Capacidade é elevada. Velocidade pode ser elevada, dependendo da matriz.	Método amplamente utilizado. Adequada para compostos ionizáveis. É mais eficiente nas fases iniciais de purificação.
Bioreconhecimento (especificidade do ligando)	Cromatografia de afinidade	A selectividade pode ser muito elevada. Capacidade é elevada, dependendo do ligando. Velocidade alta.	Pode ser usada em qualquer passo na purificação. Estabelece estratégias de purificação rápidas e eficientes

A figura 13 ilustra os acontecimentos que ocorrem entre a biomolécula e a fase estacionária nas várias cromatografias.

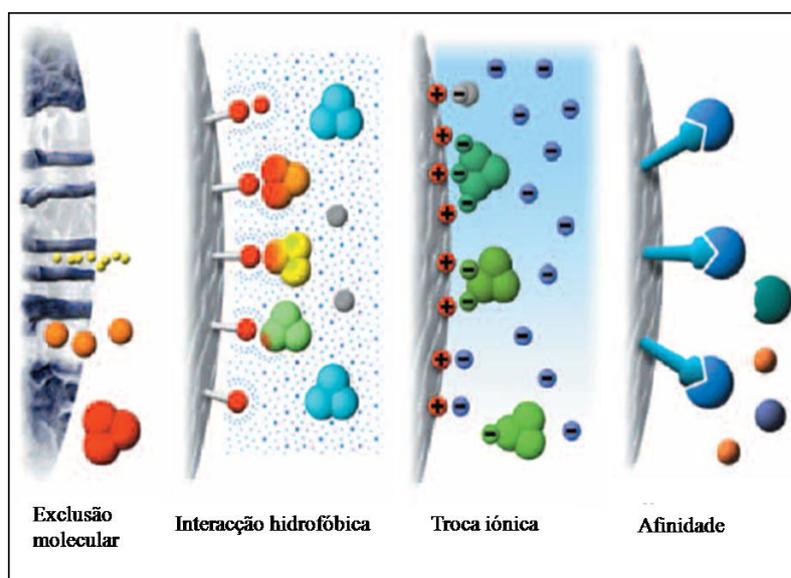


Figura 14 - Representação das técnicas cromatográficas de purificação [70].

## ***1.8. A histidina como ligando na cromatografia de afinidade***

Para que a purificação por cromatografia de afinidade seja bem sucedida é necessário que o ligando bioespecífico se ligue covalentemente à matriz cromatográfica, e que mantenha a sua afinidade de ligação para com a biomolécula de interesse. No entanto, a ligação entre o ligando e as biomoléculas deverá ser reversível para permitir que a biomolécula seja recuperada na forma activa [70]. Devido à fragilidade dos ligandos e à baixa capacidade de ligação das matrizes, de uma maneira geral, novas abordagens são necessárias para conceber ligandos sintéticos que combinem a selectividade de um ligando natural com a elevada capacidade e durabilidade dos sistemas sintéticos [71]. Apesar de não se ter verificado um grande avanço no desenvolvimento de novos ligandos para os ácidos nucleicos, surgiu recentemente uma nova estratégia de afinidade usando aminoácidos como ligandos imobilizados para a purificação de DNA plasmídico (pDNA). O uso de pequenas moléculas como a histidina e arginina como ligandos demonstraram a sua capacidade no isolamento de pDNA superenrolado (sc) e evidenciaram a presença de interacções específicas com o pDNA nas matrizes cromatográficas [72, 73].

A histidina é conhecida como um aminoácido essencial, polar, cuja estrutura apresenta um grupo funcional, o imidazol. O imidazol torna este aminoácido participante comum em reacções catalisadas por enzimas e o seu estado protonado permite à histidina uma funcionalidade como ácido, enquanto a forma não protonada é nucleofílica e pode funcionar como base. Este resíduo tem também um papel importante na estabilização conformacional das proteínas [13].

O potencial da histidina na cromatografia de afinidade foi demonstrado pela separação eficiente do pDNA num lisado de *E. coli*, num estudo onde se verificou que o sc pDNA interagia com a histidina imobilizada mas a forma circular aberta (oc) do pDNA e o DNA genómico (gDNA) não interagia tão fortemente. O RNA presente no lisado ficou fortemente retido na coluna devido à maior exposição das suas bases nucleótídicas e a eluição foi alcançada com uma diminuição da concentração de sulfato de amónio [74]. Com base nestas observações sugeriu-se que as interacções da histidina com as bases do DNA poderiam incluir ligações por pontes de hidrogénio, emparelhamento com o anel imidazol/interacções hidrofóbicas e ligações de hidrogénio mediadas pela água [74]. Essas interacções seriam então dependentes da composição

das bases nucleotídicas pelo que as sequências ricas em adenina e a guanina reforçariam essas interações, dada a reconhecida interação preferencial da histidina com essas purinas [75].

O pDNA obtido por este método de afinidade mostrou elevada qualidade de acordo com os critérios estabelecidos por agências reguladoras, como a FDA (*Food and Drug Administration*) para a produção e aplicação terapêutica de plasmídeos. As contaminações com gDNA e endotoxinas encontravam-se dentro dos níveis de referência e o RNA e as proteínas não foram detectadas. De modo a confirmar o seu potencial terapêutico, células eucarióticas foram transfectadas com o pDNA purificado e sua expressão génica foi alcançada [74].

## 2. *JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJECTIVOS*

---

Como foi descrito, o estudo do RNA tornou-se, recentemente, uma das áreas mais estimulante da biologia molecular, devido ao seu envolvimento em muitas doenças e à sua participação na compreensão da origem da vida. Mas este campo é complexo, sendo necessário o acesso aos mais inovadores equipamentos e técnicas de imagem, a análise da expressão génica e a bioinformática, bem como o impulsionamento da informação cruzada entre as múltiplas disciplinas científicas.

O grande potencial terapêutico do RNA tem sido avaliado em estudos recentes para o tratamento do cancro e de doenças neurodegenerativas que envolvem a aplicação do mRNA, tRNA e iRNA [3, 76]. Exemplos disso são as últimas investigações que levaram à criação de um novo sistema de veículo que pode contribuir para vacinas mais específicas e eficientes contra doenças infecciosas [76]. Este sistema usa moléculas de iRNA para reforçar significativamente a eficiência da vacina enquanto se adequa com base no tipo de resposta imunológica que é mais desejável para uma determinada doença. Na prática, o sistema é baseado num polímero de micro partículas que transporta a vacina de DNA e o iRNA para as células imunológicas, permitindo melhorar significativamente a resposta imune e dirigi-los para uma certa direcção que é efectiva contra a doença. É portanto evidente o crescente interesse na estrutura e na função do RNA, o que torna importante e necessário o desenvolvimento de métodos de purificação fiáveis e preparativos em larga escala. Os protocolos disponíveis para o isolamento do RNA são limitados, morosos e requerem o uso de solventes tóxicos (secção 1.6.), o que tornam estes procedimentos não adequados para recuperar o produto a ser biologicamente aplicado.

O principal objectivo deste estudo é investigar a aplicabilidade do recente método baseado na cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados como ligandos específicos, para isolar o RNA. Uma vez que o RNA, tal como o DNA, tem a capacidade de se ligar à histidina imobilizada num suporte de agarose, esta interacção pode ser explorada para purificar especificamente os diferentes RNAs, atendendo às suas propriedades estruturais. Para concretizar o objectivo, efectuaram-se estudos do perfil cromatográfico das espécies de sRNA e de rRNA com diferentes concentrações de sulfato de amónio em gradiente linear e por passos com uma matriz de histidina-agarose.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1. Material

O gel de L-Histidina-agarose, o padrão tRNA de *E. coli*, a celulose oligo(dT) e os compostos orgânicos usados nas extracções de RNAt foram obtidos na Sigma (St. Louis, MO, USA). O kits RNA/DNA midi kit foi adquirido na Qiagen (Hilden, Germany) e o glicogénio na Roche (Mannheim, Germany). As colunas de dessalinização PD-10 foram adquiridas da GE healthcare (Uppsala, Sweden) e o marcador de RNA é proveniente da Invitrogen (Carlsband, CA, USA). Todos os sais usados foram de grau analítico.

### 3.2. Crescimento bacteriano

O RNA total usado neste estudo foi obtido de uma cultura celular de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O crescimento efectuou-se a 37°C, num agitador orbital a 250 rotações por minuto (rpm) e com 500mL de Meio Terrific Broth (TB) (12 g/L de triptona, 24 g/L de extracto levedura, 4 ml/L de glicerol, 0,017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e foi suspenso no final da fase exponencial (DO<sub>600</sub>  $\approx$  9). As células foram recuperadas por centrifugação e armazenadas a -20°C.

### 3.3. Isolamento do RNA total

O RNA total (RNAt) foi extraído das células de *E. coli* DH5 $\alpha$  como base num protocolo já descrito [59] com algumas modificações. Resumidamente, a extracção iniciou-se com a ressuspensão das células com 5mL de uma solução contendo tiocianato de guanidina. Foram, depois, adicionados ao lisado celular 500  $\mu$ L de acetato de sódio 2M, pH 4,0 e 5 mL de fenol saturado em água e, finalmente, 1mL de clorofórmio/álcool isoamílico (49:1), de modo a obter duas fases imiscíveis. Depois do passo de centrifugação, a fase aquosa foi recolhida e precipitada com glicogénio 20  $\mu$ L/mL. A concentração da fase rica em RNA foi obtida com a adição de 5 mL de isopropanol previamente arrefecido a -80°C, e incubação por 10 minutos a -20°C. Posteriormente,

foi realizada uma segunda precipitação nas mesmas condições. Por fim, o RNA isolado foi lavado com 3mL de etanol 75% e ressuspensionado em 400µL de água tratada com dietilo pirocarbonato (DEPC).

### **3.4. Separação do mRNA, rRNA e sRNA**

O isolamento do mRNA, rRNA e do sRNA foi obtido pela separação selectiva da amostra de RNAt como descrito anteriormente [77] com algumas modificações. Resumidamente, a separação iniciou-se com o ajuste da força iónica de uma amostra com aproximadamente 1 mg de RNAt, seguido da sua adição a 75 mg de celulose oligo(dT) liofilizada, para separar o mRNA. Após o passo de centrifugação, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante da resina e reservou-se em gelo para se proceder posteriormente ao isolamento do rRNA e sRNA. A celulose oligo(dT) foi transferida para uma mini-coluna, que depois foi equilibrada com 10mL tampão de ligação (500mM NaCl e 10mM Tris-HCl, pH 7,5, em água tratada com DEPC). Ressuspendeu-se a resina na coluna com 20mL de tampão de ligação e eluiu-se por acção gravitacional. Recolheram-se as fracções eluídas e combinou-se com o sobrenadante reservado anteriormente. Repetiu-se a lavagem com 10mL de tampão de ligação e eluiu-se nas condições anteriores, mas descartou-se o eluato. A resina foi, depois, lavada com 10mL de tampão de lavagem de baixa força iónica, 250 mM NaCl em Tris-HCl 10mM, pH 7,5 em água tratada com DEPC, e as fracções eluídas foram reservados e combinados com as anteriores. Repetiram-se duas vezes as lavagens com o tampão de lavagem de baixo sal e descartaram-se as fracções resultantes destas lavagens. Para eluir o mRNA, adicionaram-se 200µL de tampão de eluição, Tris-HCl 10mM, pH 7,5 em água tratada com DEPC, à resina. Adicionaram-se, novamente, 200µL de tampão de eluição à coluna, eluiu-se e combinou-se com o mRNA anterior. De seguida, o mRNA recuperado foi precipitado com 0.15 volumes (~ 60µL) de acetato de sódio 2M e 2.5 volumes (1mL) de etanol 100% e colocou-se a incubar durante a noite a -20°C. Por fim, o mRNA foi lavado com etanol 75% e ressuspensionado em 100 µL de água tratada com DEPC.

Para a recuperação do rRNA e sRNA, precipitaram-se e lavaram-se os sobrenadantes resultantes do processo de separação do mRNA e ressuspendeu-se o *pellet* com o tampão QRV2 do RNA/DNA Midi kit. Seguiu-se o procedimento de

acordo com o descrito. Por fim, ressuspendeu-se cada um dos *pellets* de rRNA e sRNA em 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L de água tratada com DEPC, respectivamente.

### ***3.5. Obtenção dos diferentes lisados celulares***

Os lisados celulares utilizados neste estudo foram obtidos das células de *E. coli* DH5 $\alpha$  submetidas a três tratamentos diferentes: lise alcalina, lise enzimática e lise desnaturante. A lise alcalina iniciou-se a com a ressuspensão das células com a solução P1 ( 50mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA; 100 $\mu$ g/mL RNase A). Seguiu-se a adição das soluções P2 (200mM NaOH e 1% (m/v) SDS) e P3 (3M acetato sódico, pH 5,5M) e os passos de centrifugação para se recuperar no sobrenadante os ácidos nucleicos. Estes foram precipitados com isopropanol e ressuspendidos em 1mL de água tratada com DEPC. A lise enzimática decorreu de acordo com a lise descrita anteriormente [77] com algumas modificações. Brevemente, as células bacterianas foram ressuspendidas em 15mL de tampão de lise e incubadas a 45°C. O tampão de lise consistia em 200mM NaCl, 200mM Tris-HCl, pH 7,5, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> e 2% (m/v) SDS com 20mg/mL de Proteinase K em tampão de armazenamento (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM acetato de cálcio e 40% (v/v) glicerol. Após a centrifugação, o sobrenadante foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e ressuspensão em 400  $\mu$ L de água tratada com DEPC.

A lise desnaturante foi baseada na lise efectuada na extracção de RNAt descrita anteriormente. As células foram incubadas em gelo com a solução desnaturante contendo 4M tiocianato de guanidina, 25mM de citrato sódico, pH 7,0, 0,5% (m/v) sarcosyl e 0,1M  $\beta$ -mercaptoetanol. Após a centrifugação do lisado, precipitou-se com isopropanol e ressuspendeu-se o pellet com água tratada com DEPC.

### ***3.6. Cromatografia Preparativa***

Os estudos cromatográficos dos lisados e dos RNAs provenientes das extracções foram realizados no sistema ÄKTApurifier com aplicação UNICORN (GE Healthcare, Sweden), no qual foi acoplado uma coluna 10 $\times$ 20mm (cerca de 2ml) empacotada com um gel comercial de e L-histidina-agarose (Ref. H0767, Sigma, St. Louis, MO). Este suporte é caracterizado pelo fabricante como uma matriz de agarose 4%, com um espaçador de 12 átomos e uma densidade de ligandos de marcação entre 1 e 2 $\mu$ mol/ml. Para cada ensaio, a coluna foi equilibrada com diferentes concentrações de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

em de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 (2,7M; 2,3M; 2M; 1,7M; 1,6M; 1,5M) com um caudal de 1mL/min. As amostras de RNA (200µl) foram depois injectadas, usando um injector com 100µl de capacidade, com o mesmo caudal. A absorvância das fracções eluídas foi constantemente monitorizada a 260nm. A eluição foi efectuada em (1) dois passos, iniciando-se a eluição com a maior concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 e terminando-se com o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; (2) com eluição em 3 passos, cuja maior concentração de sal foi aplicada no primeiro passo, decresceu-se para uma concentração mais moderada no segundo passo e por fim retirou-se todo o conteúdo de sal com a passagem de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 pela coluna; (3) com gradiente linear que compreendeu a aplicação do tampão 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 1,7M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ambos em Tris-HCl 10 mM, pH 7,0. Entre cada ensaio, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 e re-equilibrada com a concentração de sal mais elevada do ensaio seguinte. As fracções foram recolhidas de acordo com os picos cromatográficos obtidos e foram concentradas e dessalinizadas com os concentradores Vivaspin (Vivascience).

### ***3.7. Electroforeses de agarose e de poliacrilamida***

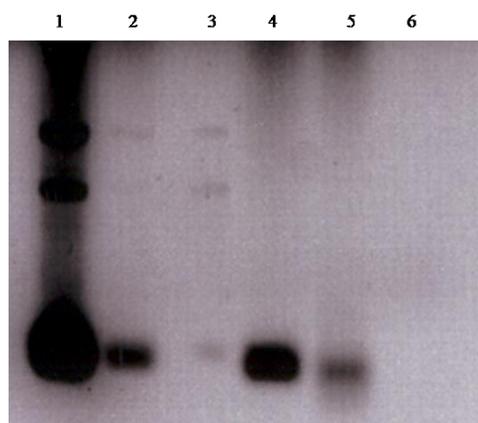
As fracções obtidas foram analisadas de acordo com os seus pesos moleculares em electroforese horizontal com gel de agarose e/ou electroforese vertical em gel de poliacrilamida. As fracções do RNAt, rRNA e dos lisados celulares foram analisadas em gel de agarose 1,2% (30min, 120V) em tampão TAE (40mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1mM EDTA, pH 8,0) e brometo de etídio 0,5mg/mL. O gel de electroforese foi directamente visualizado em câmara de ultravioleta (UV). As fracções dos lisados celulares e dos sRNAs foram analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% em tampão TBE (0,84M Tris base, 0,89M ácido bórico e 0,01M EDTA, pH 8,3). As fracções foram previamente desnaturadas com formamida 97,5% e as condições desnaturantes foram mantidas no gel com a presença de ureia 8M. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5mg/ml) em tampão TBE para posterior visualização em câmara de UV.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1. *Optimização dos protocolos de extracção de RNA*

Este estudo pretende demonstrar a aplicabilidade da cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados, e a potencialidade da histidina como ligando, na purificação dos diferentes tipos de RNA. De forma a atingir o objectivo proposto, foi necessário obter amostras dos vários tipos de RNAs para serem posteriormente aplicados na cromatografia. Devido à sua caracterização bem conhecida e vasta aplicabilidade, a *E. coli* foi o organismo eleito para o isolamento do RNAt. Seguindo os procedimentos descritos, uma variedade de compostos orgânicos e soluções salinas foram aplicadas de modo a obter as moléculas de interesse. Com a realização dos primeiros ensaios, foi possível ajustar e mesmo eliminar alguns dos passos que constituem os protocolos de extracção complexos, sendo assim possível simplificar algumas técnicas de separação do rRNA e sRNA. Inicialmente, executou-se o protocolo da extracção de RNA total e de seguida, com as amostras daí resultantes, testou-se o protocolo de separação dos vários tipos de RNA (figura 15).



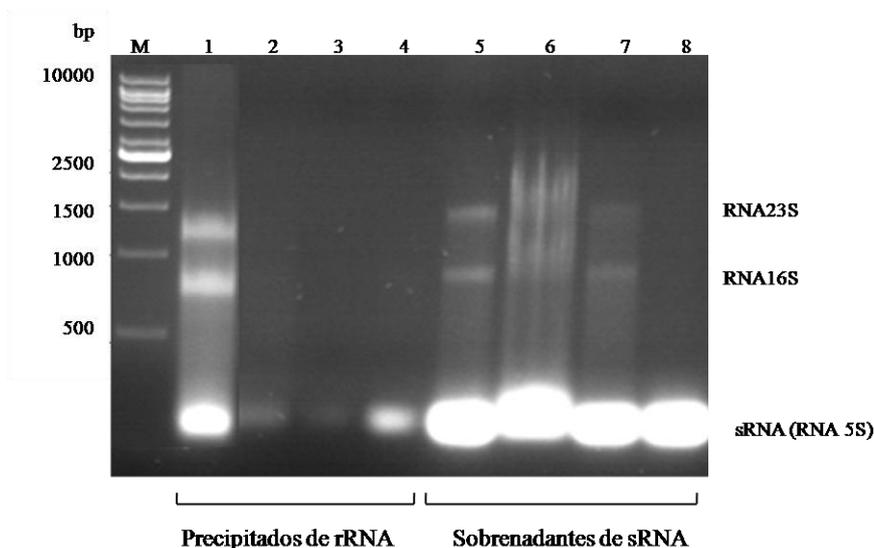
**Figura 15 – Electroforese com os tipos de RNAs resultantes da extracção e separação, aplicando o protocolo descrito na literatura.**

Linha 1 – RNAt; linha 2 – RNA contendo rRNA e sRNA; linha 3–rRNA; linha 4 – sRNA; linha 5 – padrão de tRNA; linha 6 – mRNA.

Na electroforese, a amostra de RNAt indicou a presença de rRNA, caracterizado pelas bandas de maior peso molecular, e sRNAs, com menor peso molecular, no entanto o mRNA não foi visível (linha 1). Quando o RNAt foi submetido ao protocolo de separação, verificou-se a recuperação de rRNA (linha 3) e sRNA (linha 4), mas não de mRNA (linha 6). A recuperação desse RNA já se tinha verificado muito baixa ou mesmo nula pelos resultados espectrofotométricos. Este resultado era, de alguma forma previsível, uma vez que o grau de poliadenilação nas moléculas de mRNA de *E. coli* é muito mais baixo do que em eucariontes e, enquanto nestes últimos as cadeias polyA ajudam a estabilizar as moléculas de mRNA, na *E. coli* elas servem para acelerar a destruição dos fragmentos de mRNA [78]. Neste protocolo, a aplicação da celulose oligo(dT) visava a ligação das cadeias polyA, promovendo a ligação específica e a separação do mRNA. Por outro lado, a separação de rRNA e sRNA foi inicialmente testada usando o RNA/DNA Midi Kit, explorando as diferentes ligações estabelecidas na coluna de troca aniónica. No entanto, devido à baixa capacidade da coluna (200µg), este método tornava-se um processo moroso, dispendioso e pouco eficiente.

Entretanto, verificou-se a possibilidade de beneficiar das condições de estringência dos ácidos nucleicos para efectuar a sua separação. Vários investigadores descreveram que o rRNA, mas não o tRNA, precipitava na presença de elevadas concentrações de cloreto de sódio, cloreto de lítio e sulfato de amónio [79]. Segundo descrito, a mistura de ácidos nucleicos poderia ser homogeneizada com NaCl 1M, incubada no frio por algumas horas e centrifugada, e desta forma, o tRNA seria recuperado do sobrenadante por adição de 2 volumes de etanol. Esta metodologia foi, então, testada na separação do rRNA e sRNA de uma amostra de RNAt, usando diferentes concentrações (1M e 2M) de NaCl e de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . As amostras foram incubadas durante duas horas a 4°C e centrifugaram-se a 15000g, a 4°C. O sobrenadante foi reservado para posterior clarificação e o precipitado de rRNA foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em 100µL de água tratada com DEPC. Devido à imiscibilidade verificada entre o isopropanol e o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , os sobrenadantes, ricos em sRNA, foram aplicados a uma coluna de dessalinização com matriz sephadex G-25, seguindo as instruções do fabricante. Após a leitura espectrofotométrica de referência, as fracções recolhidas foram precipitadas com 2 volumes de isopropanol gelado e incubadas 10 min. a -20°C. Prosseguiu-se com uma centrifugação a 15000g, a 4°C, lavou-se o *pellet* com etanol 75% e ressuspenso em 200µL de água tratada com DEPC. Por fim, efectuou-se a leitura espectrofotométrica das amostras de rRNA e sRNA a 260nm e 280nm de modo a

aferir as suas concentrações. A figura que se segue representa uma electroforese de agarose, que permitiu visualizar as bandas relativas a cada um dos tipos de rRNAs e de sRNAs isolados com os dois sais em diferentes concentrações.



**Figura 16 – Electroforese de agarose das amostras de rRNA e sRNA isoladas a partir do método de precipitação com sal a baixa temperatura.**

Linha M- marcador; linha 1- rRNA separado por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M; linha 2 - rRNA separado por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1M; linha 3 - rRNA separado por precipitação com NaCl 2M; linha 4 - rRNA separado por precipitação com NaCl 1M; linha 5 - sRNA separado por precipitação com NaCl 2M; linha 6 - sRNA separado por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1M; linha 7 - sRNA separado por precipitação com NaCl 1M; linha 8- sRNA separado por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M;

Na figura 16, as duas primeiras bandas de maiores pesos moleculares correspondem aos rRNAs 23S e 16S, com 2900nt e 1500nt, respectivamente; com um peso abaixo dos 500 bp encontra-se o conjunto dos sRNAs, nos quais o rRNA 5S ( $\approx$  120nt) se inclui. Os resultados obtidos para o estudo dos diferentes sais e concentrações testadas, revelaram que a precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M é a mais eficiente no isolamento do rRNA (linha 1) e também do sRNA (linha 8), uma vez que nas restantes se verificou que o sobrenadante resultante da precipitação, que deveria conter apenas sRNA, também apresentava rRNA (linha 5, 6 e 7). A amostra de rRNA isolada pela precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M, não foi posteriormente testada em electroforese de poliácridamida para confirmar que a banda abaixo dos 500 bp seria apenas RNA 5S. De qualquer forma, não se verificaram quaisquer interferências nos ensaios cromatográficos efectuados posteriormente, até porque o RNA 5S parece comportar-se como os outros sRNAs.

Os resultados apresentados estão de acordo com a literatura, que descreve que o ião  $\text{NH}_4^+$  parece estabilizar em maior grau a estrutura terciária do rRNA, devido à ligação específica que se estabelece e que envolve ligações de hidrogénio com um rearranjo tetraédrica do grupo das bases carbonílicas do rRNA, ao passo que o ião  $\text{Na}^+$  forma complexos menos estáveis, devido tanto ao local onde interage, como às suas diferentes possibilidades de ligação [80]. Assim, concluiu-se que a estabilização da estrutura terciária dos rRNAs 23S, 16S e 5S é promovida pela presença do ião  $\text{NH}_4^+$  a baixas temperaturas, ocorrendo a precipitação.

A tabela seguinte indica a quantidade obtida dos diferentes RNAs através deste método e do protocolo já descrito.

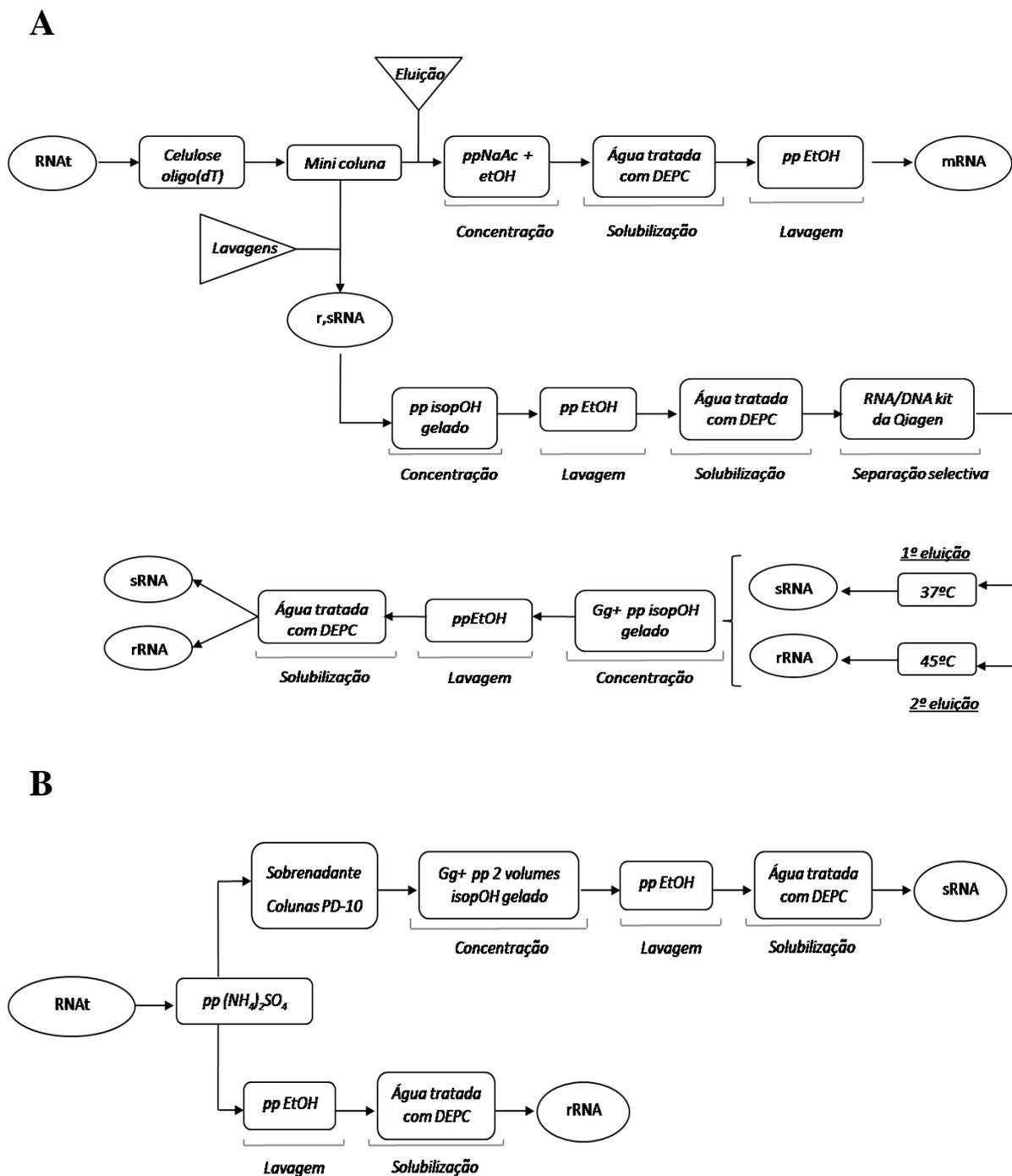
**Tabela 4 – Quantidades de RNAs obtidos nos diferentes métodos utilizados.**

RNA<sub>t</sub> indica a massa de RNA com que se iniciou a separação do rRNA e sRNA nos diferentes métodos.

AMOSTRA	RNA <sub>t</sub> (µg)	rRNA (µg)	sRNA (µg)	RNA perdido (µg)
MÉTODO				
Protocolo descrito [77]	350	8,59	126,41	215
Método otimizado	350	27,32	314,06	8,62

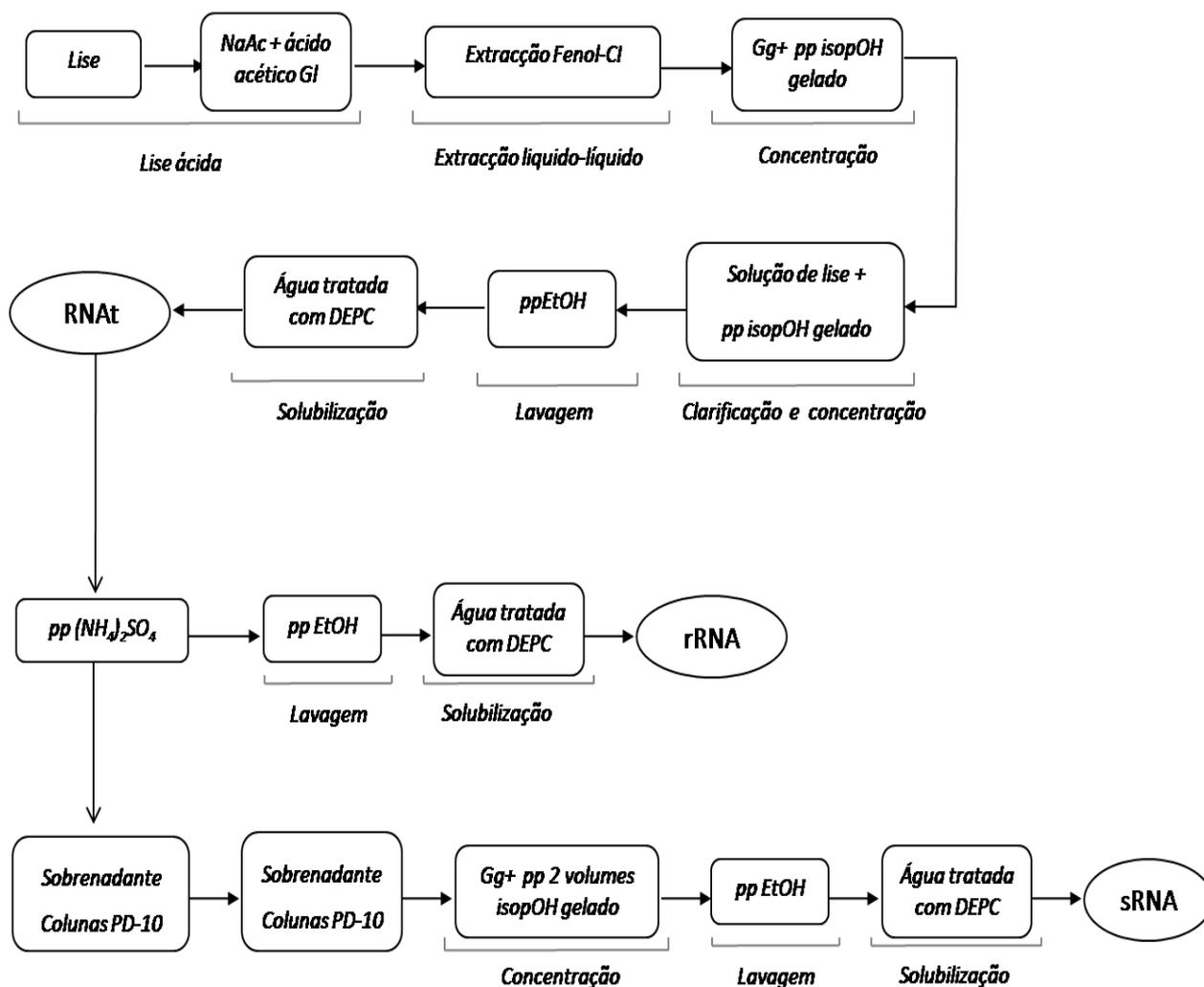
Comparativamente com o protocolo já descrito, o método otimizado apresenta rendimentos bastante superiores e elimina a utilização de kits comerciais, tornando-se assim um procedimento mais económico e de fácil execução. Para além disso, a recuperação de rRNA com o protocolo já descrito revelou-se insuficiente para os estudos cromatográficos propostos.

As figuras seguintes esquematizam o protocolo descrito na literatura e o método otimizado neste estudo para a separação de rRNA e sRNA, e o procedimento completo de extracção, desde a lise bacteriana até à obtenção dos diferentes tipos de RNAs.



**Figura 17 - Esquemas gerais dos processos usados na separação do rRNA e sRNA.**

A) Procedimento descrito na literatura [77] para a separação dos vários tipos de RNAs. B) Método otimizado para separar rRNA e sRNA. (DEPC, dietilopirocarbonato; EtOH, etanol; Gg, glicogénio; IsopOH, isopropanol; NaAc, acetato de sódio; pp, precipitação, r,sRNA, RNA contendo rRNA e sRNA).



**Figura 18 - Esquema geral do processo otimizado para a extração do RNAt e separação do rRNA e sRNA.**

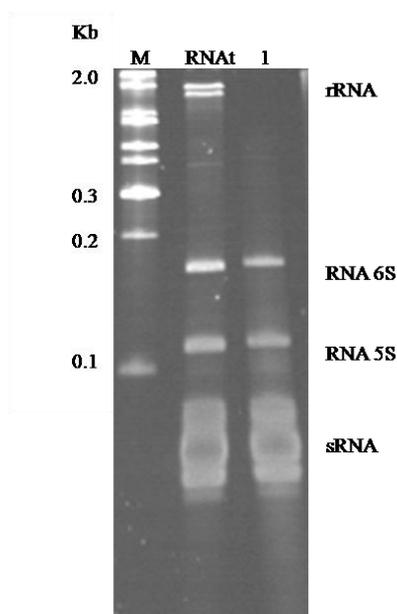
(CI, clorofórmio/álcool isoamílico; DEPC, dietilpirocarbonato; EtOH, etanol; Gl, Glaciator; Gg, glicogénio; IsopOH, isopropanol; NaAc, acetato de sódio; pp, precipitação).

## ***4.2. Perfil cromatográfico das várias espécies de RNA***

A capacidade da histidina, como ligando imobilizado na cromatografia de afinidade, foi recentemente demonstrada na separação das isoformas oc e sc do pDNA, tanto em amostras obtidas por isolamento com kits comerciais, como a partir de um lisado de *E. coli* [72, 74]. Neste último, verificou-se que o RNA permanecia ligado à coluna em elevadas concentrações de sal e era apenas eluído pela diminuição sequencial da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para 1,5M e depois para o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0. Com base neste resultados, e uma vez que neste estudo, não se pretende a eliminação do RNA mas sim, verificar as interações que poderão advir da sua ligação à histidina, efectuaram-se uma série de experiências cromatográficas, de modo a averiguar o comportamento dos vários tipos de RNA nesta matriz. Os ensaios iniciaram-se com a análise dos sRNAs e rRNAs com diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  usando gradientes por passos (dois passos), nos quais o perfil terminava com a aplicação do tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 à coluna.

### 4.2.1. sRNA

Antes da execução dos ensaios, as amostras de sRNA foram analisadas por electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 7,5% e ureia, de modo a identificar que tipos de sRNAs estavam presentes. A figura seguinte apresenta uma electroforese desnaturante com a caracterização dos sRNAs.

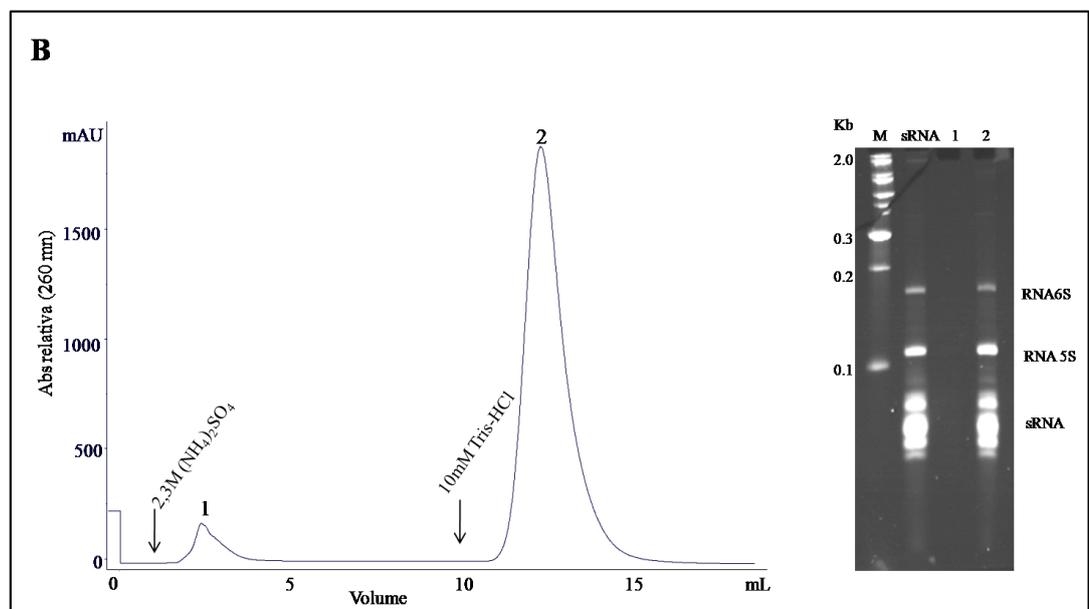
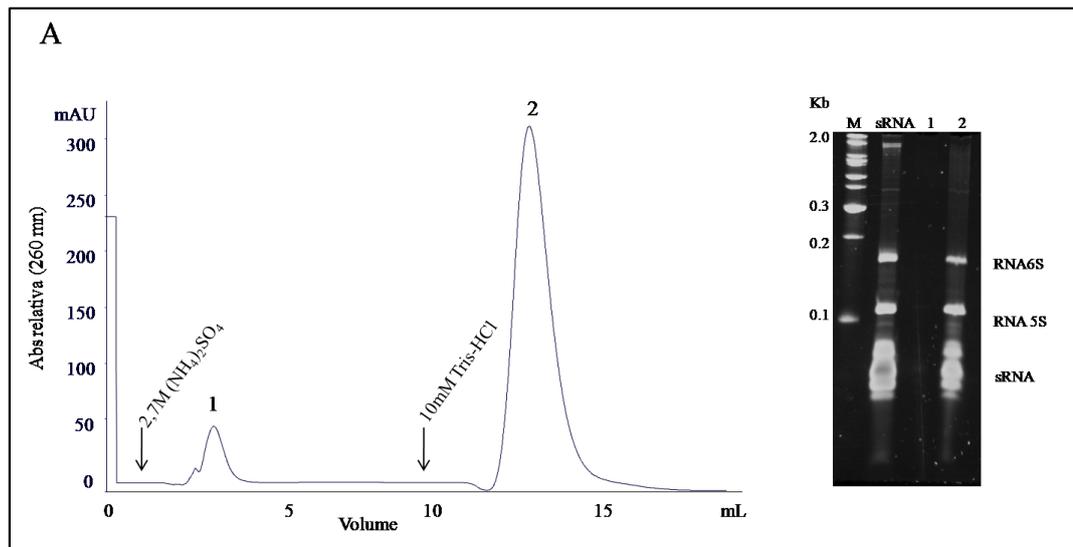


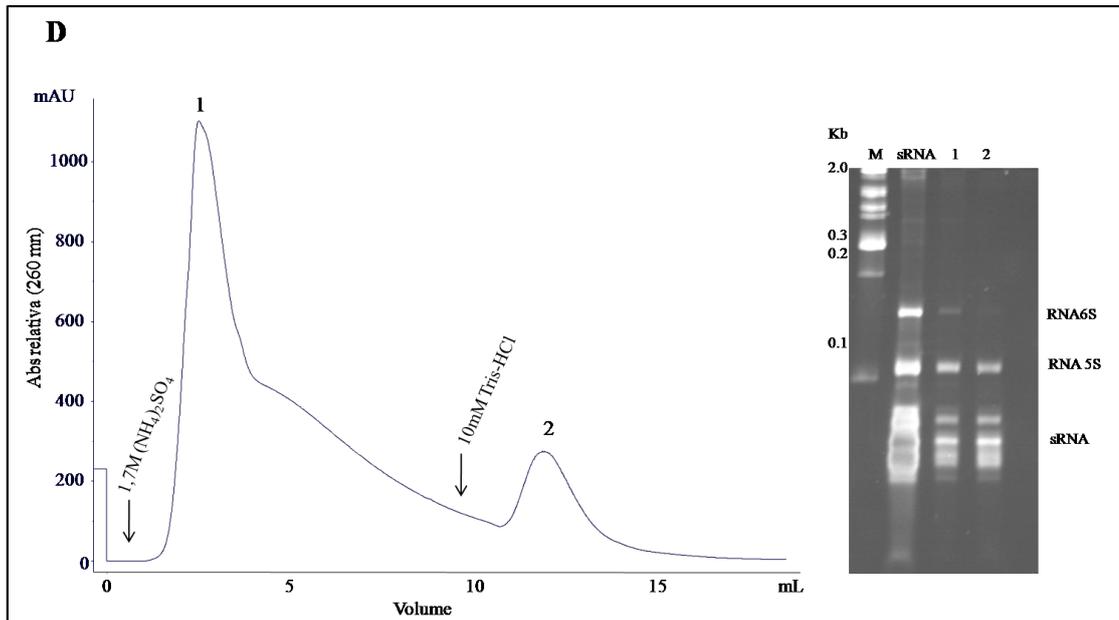
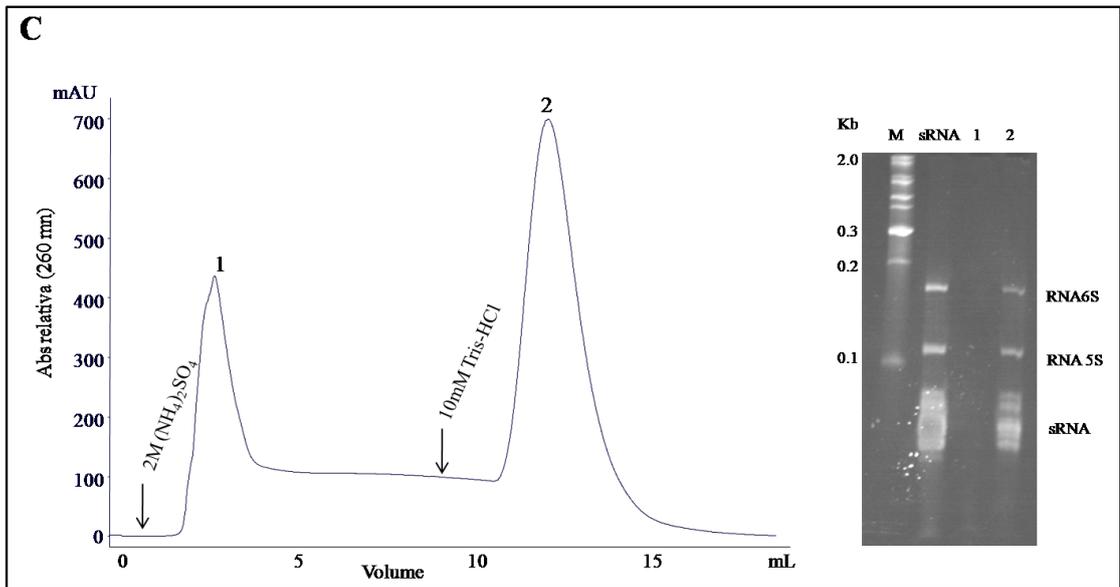
**Figura 19 – Electroforese desnaturante com amostras de sRNA.**

Linha M – marcador; linha 1 – sRNA resultante da extracção por precipitação.

Nesta electroforese (figura 19) é visível o RNA 6S com um peso molecular de aproximadamente 180 nucleótidos e de seguida o rRNA 5S, que apesar de pertencer à classe dos rRNAs e de precipitar nas condições adequadas, também se comporta como um sRNA, devido ao seu baixo peso molecular ( $\approx 120$  nt). Esta ambiguidade de comportamento que se verificou na precipitação poderá estar relacionada com as conformações estruturais que apresenta. Estudos estruturais do rRNA 5S também já sugeriram que alguns detalhes da sua estrutura no ribossoma diferem da obtida com fragmentos descomplexados em solução [46, 81] e que a sua interacção com os outros rRNAs também existe [82]. Desta forma, podem, eventualmente, estar a ocorrer, em solução, diferentes interacções com os diferentes tipos de RNAs. Por último, verificou-se um aglomerado de RNAs com um peso molecular ainda mais baixo do que os anteriores que corresponde aos vários tipos de tRNA, cujo peso molecular se encontra aproximadamente nos 70nt, e a outros sRNA não identificados.

Seguiram-se os ensaios cromatográficos referidos anteriormente, onde cada um dos picos cromatográficos foi posteriormente analisado por electroforese, de modo a identificar que tipo de espécies estava a eluir (figura 20), e consequentemente compreender as interacções dos RNAs com a matriz de histidina-agarose, com as diferentes estratégias de eluição.





**Figura 20 – Perfil cromatográfico dos sRNAs com diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e respectivas electroforeses em gel de poliacrilamida desnaturante.**

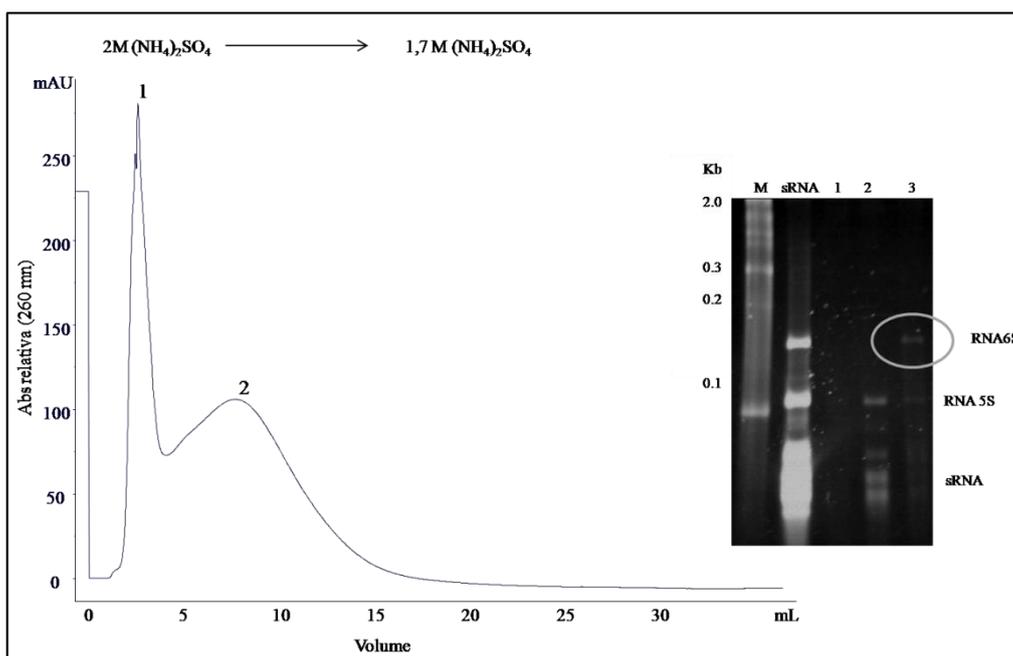
A eluição foi efectuada a 1ml/min aplicando a respectiva concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em cada um dos ensaio e terminando a eluição com tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha 1 – fracção recolhida do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracção recolhida do pico 2 do cromatograma.

Nos ensaios A e B (figura 20) verificou-se a ligação total dos sRNAs para as concentrações mais altas de sal: 2,7M (A) e 2,3M (B), sendo que a sua eluição só ocorreu com a aplicação do tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 (ensaios A e B, linha 2). Contrariamente a este comportamento, o pico resultante da aplicação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,7M foi caracterizado pela presença de sRNAs (ensaio D, linha 1), mas que também foram visíveis com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, apesar do pico ser bastante menor (ensaio D, linha 2).

Através destes perfis cromatográficos, concluiu-se que o aumento da concentração de sal favorece as ligações entre os sRNAs e a matriz de histidina, sendo possível a retenção do RNA na coluna. Quando se altera o tampão salino para o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, o RNA eluiu indiferenciadamente, ocorrendo, aparentemente, uma diminuição da intensidade das interações. Nos cromatogramas das concentrações de 2M (C) e 1,7M (D) verificou-se também que já ocorria uma eluição diferenciada das várias espécies de RNA, pelo que, apesar de com 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ainda se verificar alguma retenção, a ligação com a histidina-agarose é menos favorecida a 1,7M e a capacidade de ligação apresenta-se ainda mais diminuída. Destes resultados era perceptível que entre as concentrações 2M e 1,7M, estavam, certamente, a ocorrer interações diferentes com cada um dos sRNAs ou mesmo com um grupo definido de sRNAs. Com este resultado surgiu o interesse de explorar as interações com a matriz de histidina nesta gama de concentrações, a fim de desenvolver uma estratégia de purificação.

#### 4.2.2. Estratégia para a purificação do RNA 6S

Para averiguar o comportamento dos sRNAs na gama de concentrações definida anteriormente, estabeleceu-se um gradiente linear entre 2M e 1,7M e no fim lavou-se a coluna com o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, da qual as fracções também foram recolhidas. De seguida apresenta-se o perfil cromatográfico desta estratégia e a respectiva electroforese, que indicou as espécies eluídas.



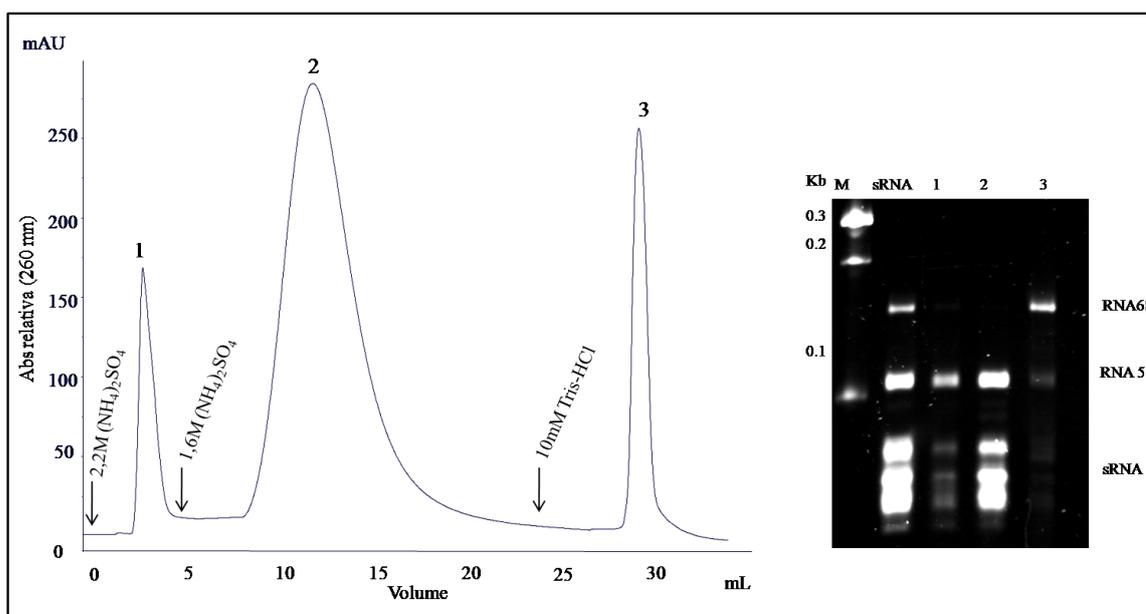
**Figura 21- Perfil cromatográfico dos sRNAs com eluição em gradiente de linear e respectiva electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.**

A eluição foi efectuada a 1ml/min. em gradiente linear de um tampão com concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M a 1,7M. Terminado o gradiente a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha 1 – fracção recolhida do pico 1 do cromatograma; linha 2 - fracção recolhidas do pico 2 do cromatograma; linha 3 – fracção recolhida da lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 10mM, pH 7.

Neste ensaio cromatográfico (figura 21) as espécies eluídas no primeiro pico, correspondente à eluição com 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, não foram visível na electroforese (linha 1) no entanto, no segundo pico (uma concentração entre 2M e 1,7M) estavam presentes sRNAs à excepção do RNA 6S (linha 2), que parecia estar apenas presente nas fracções eluídas com Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 (linha 3). Este facto sugere que o RNA 6S apresenta diferentes interacções com a matriz de histidina, relativamente aos outros

tipos de RNAs, pelo que foi importante verificar quais as condições de força iónica mais favoráveis à retenção e ao seu isolamento.

De forma a analisar o recente resultado e com base na relação entre a força iónica e a retenção/eluição dos sRNAs, discutida no ponto anterior, efectuaram-se ensaios com gradiente em três passos com diferentes concentrações de sal (figura 22).



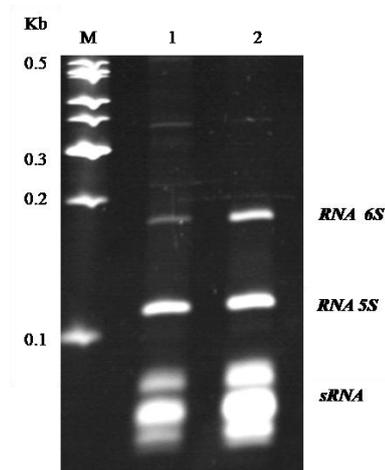
**Figura 22 – Separação cromatográfica do RNA 6S e respectiva electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.**

A eluição foi efectuada a 1ml/min. decrescendo a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no eluente de 2,2M para 1,6M, terminando a eluição com o tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha 1 – fracção recolhida do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracção recolhida do pico 2 do cromatograma; linha 3 – fracção recolhida do pico 3 do cromatograma.

Pelo cromatograma obtido e pela respectiva análise das fracções em electroforese de poliacrilamida (figura 22), verificou-se que alguns sRNAs não se ligaram à coluna quando submetidos a elevadas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no entanto, a presença do RNA 6S não era visível (linha 1). De qualquer forma, a maioria desse tipo de sRNAs permaneceram ligados à coluna e eluíram quando a força iónica diminuiu (linha 2), o que explica o segundo pico do cromatograma. Nestas condições, o RNA 6S continuou ligado, e a sua eluição só se verificou quando o sal foi removido pela aplicação do tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 (linha 3). Destes resultados, concluiu-se que é

necessário um passo de elevada força iónica ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,2M) para promover a ligação do RNA 6S, diminuindo a força iónica para (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,6M eluem indiferenciadamente todos os outros sRNA (incluindo 5S e tRNA) e pela remoção de sal do tampão, elui, unicamente, o RNA 6S. Esta estratégia eficiente na separação do RNA 6S poderá ter importantes aplicações em estudos estruturais e em ensaios de transcrição *in vitro*, de modo a aprofundar o conhecimento do mecanismo de acção deste RNA na regulação da transcrição.

Dada a relevância do resultado de isolamento do RNA 6S, é essencial a sua correcta caracterização e identificação. Assim, para confirmar que foi, efectivamente o RNA 6S, a ser separado pela histidina-agarose, determinaram-se os seus níveis durante diferentes estágios de crescimento da *E. coli* (figura 23).



**Figura 23 – Caracterização do RNA 6S pelo crescimento bacteriano.**

As células de *E. coli* foram recolhidas em diferentes fases do seu crescimento e extraíram-se os sRNAs para a análise por electroforese de poliacrilamida. Linha M – marcador; linha 1 – RNA 6S e restantes sRNAs com 3 horas de crescimento celular; linha 2 – RNA 6S e restantes sRNAs com 24 horas de crescimento celular.

Os diferentes níveis do RNA 6S nas diferentes fases de crescimento, nos organismos de expressão, é uma das suas principais características. O RNA 6S é encontrado em elevadas concentrações na fase estacionária do crescimento e a sua função parece estar associada a esta acumulação específica. Os nossos resultados demonstraram claramente a sua acumulação significativa de 3 horas para 24 horas de crescimento (linha 1 e 2).

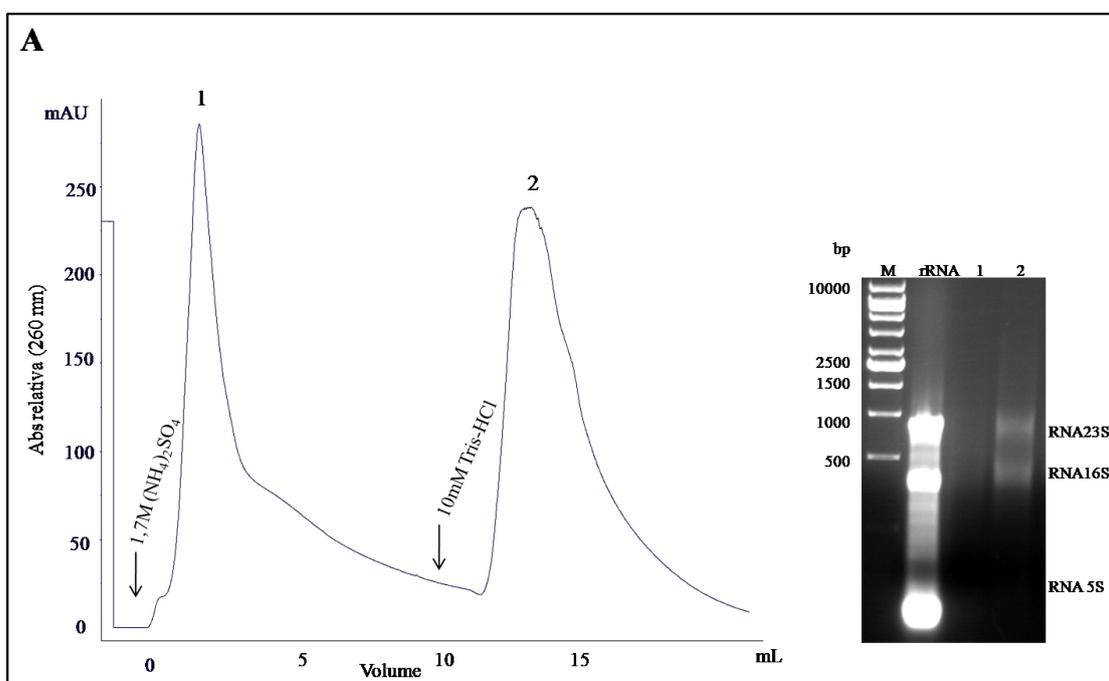
As interacções específicas verificadas nestas experiências, que permitiram o isolamento do RNA 6S explorando a afinidade e especificidade da matriz de histidina,

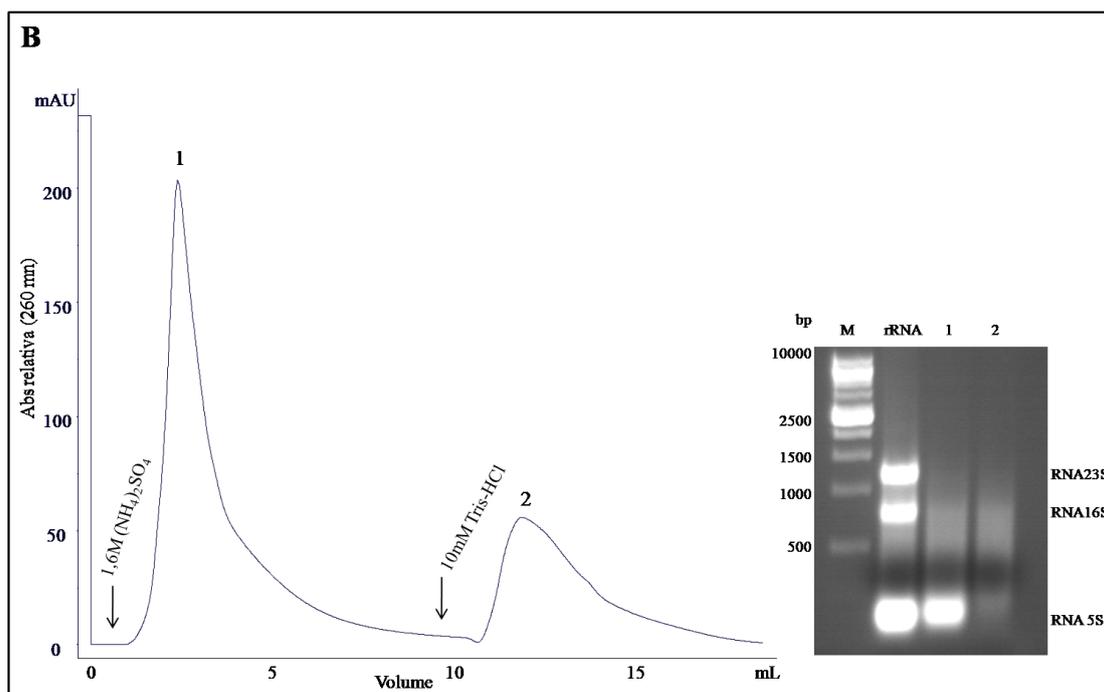
podem ser explicadas pela própria natureza do RNA. Este ácido nucleico apresenta-se naturalmente em cadeia simples, pelo que as suas bases nucleotídicas estão bastantes mais expostas e disponíveis para interacções. Este facto em associação com a forte tendência da histidina em interagir com os nucleótidos, recentemente reconhecida em estudos atómicos efectuados nas estruturas dos complexos proteína-RNA [83], torna claro o facto de este aminoácido permitir a retenção do RNA na coluna. Relativamente ao tipo exacto de interacções que poderiam estar a ocorrer, estas podem incluir (i) ligações de hidrogénio entre o átomo doador de H ( $N\tau H$ ) e o átomo aceitador de H ( $N\pi$ ) na histidina não protonada com as arestas das bases. (ii) emparelhamento com o anel imidazol/interacções hidrofóbicas, (iii) ligações de hidrogénio mediadas pela água [75, 84]. Neste seguimento, a eluição dos sRNAs quando a concentração de sal decresce sugere que o emparelhamento das bases com o anel imidazol/interacções hidrofóbicas são os efeitos dominantes, uma vez que as ligações de hidrogénio não enfraquecem em baixas concentrações de sal.

Adicionalmente, as características estruturais do sRNA 6S também parecem ser relevantes para justificar o seu diferente comportamento com a histidina. A sua estrutura secundária foi descrita como apresentando bastantes similaridades com o promotor de DNA, que desencadeia o início da transcrição [85]. Nela, verificou-se a presença de A e G, nucleótidos estes que também foram descritos interagir preferencialmente com a histidina [75]. Curiosamente, em novos aspectos descritos sobre a função do sRNA 6S, os nucleótidos A e G foram também identificados como estando directamente envolvidos no contacto com a RNA polimerase [54]. Juntos, estes factos apontam para a existência de um reconhecimento molecular entre os ligandos de histidina e o RNA 6S.

### 4.2.3. *rRNA*

Nos ensaios cromatográficos efectuados com os rRNAs, averiguou-se o seu comportamento com concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  inferiores às usadas com os sRNAs, afim de se estabelecer já uma gama de concentrações para eluir diferenciadamente as duas classes de RNAs (sRNAs e rRNA). Com base nos resultados obtidos com os sRNAs com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,7M, onde a sua eluição era favorecida, iniciou-se o estudo do perfil de ligação/eluição com essa mesma concentração, seguindo-se com a concentração de 1,6M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os cromatogramas e as respectivas electroforeses são apresentados de seguida.



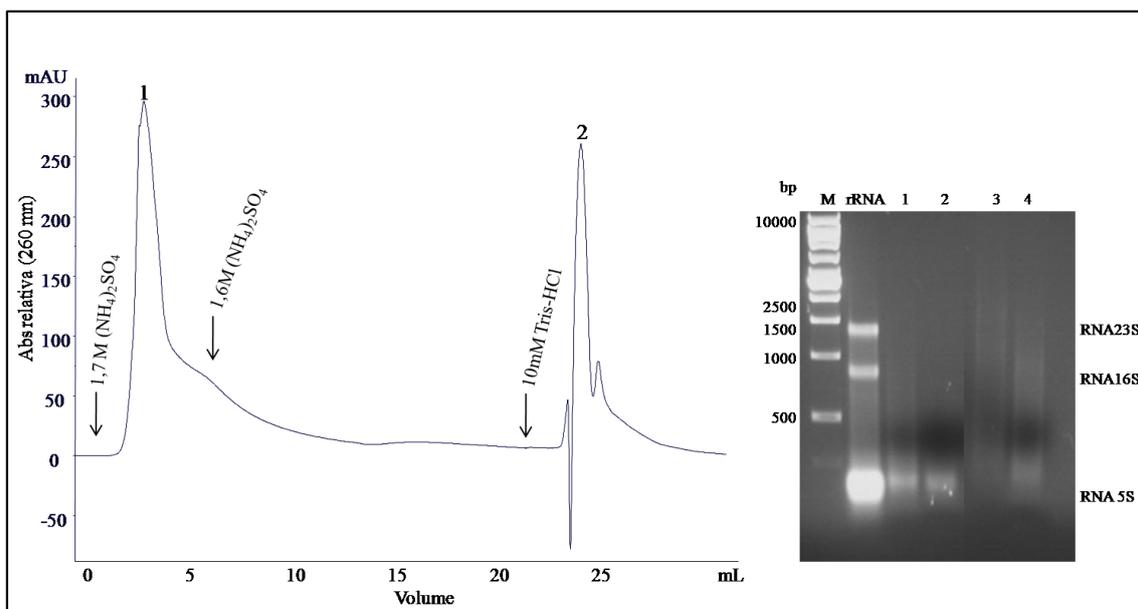


**Figura 24 – Perfil cromatográfico dos rRNAs com diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e as respectivas electroforeses em gel de agarose.**

A eluição foi efectuada a 1ml/min. aplicando a respectiva concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em cada um dos ensaio e terminando a eluição com tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M- marcador; linha 1 – fracção recolhida do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracção recolhida do pico 2 do cromatograma;

Da análise dos cromatogramas e das respectivas electroforeses (figura 24), depreendeu-se que a formação do primeiro pico em ambas as concentrações seria da detecção da espécie rRNA 5S (sRNAs), e com a aplicação de Tris-HCl 10mM, pH 7,0 estariam a eluir os rRNAs 23S e 16S. Facto que se demonstrou de alguma forma inesperado, uma vez que, estes rRNAs apresentam maior peso molecular e tendo como referência o comportamento do DNA (menos retido), seria de se esperar uma menor retenção. Este resultado poderá estar relacionado com a estrutura em cadeia simples do RNA e também com as suas dimensões. Desta forma as suas bases estão mais exposta para as interacções com a matriz e a sua superfície de contacto também é maior dado o seu elevado número de nucleótidos, quando comparados com os sRNAs.

Numa segunda abordagem, efectuou-se um gradiente em três passos, com concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 1,7M num primeiro passo, 1,6M num segundo passo e Tris-HCl 10mM, pH 7,0 no último passo (figura 25).



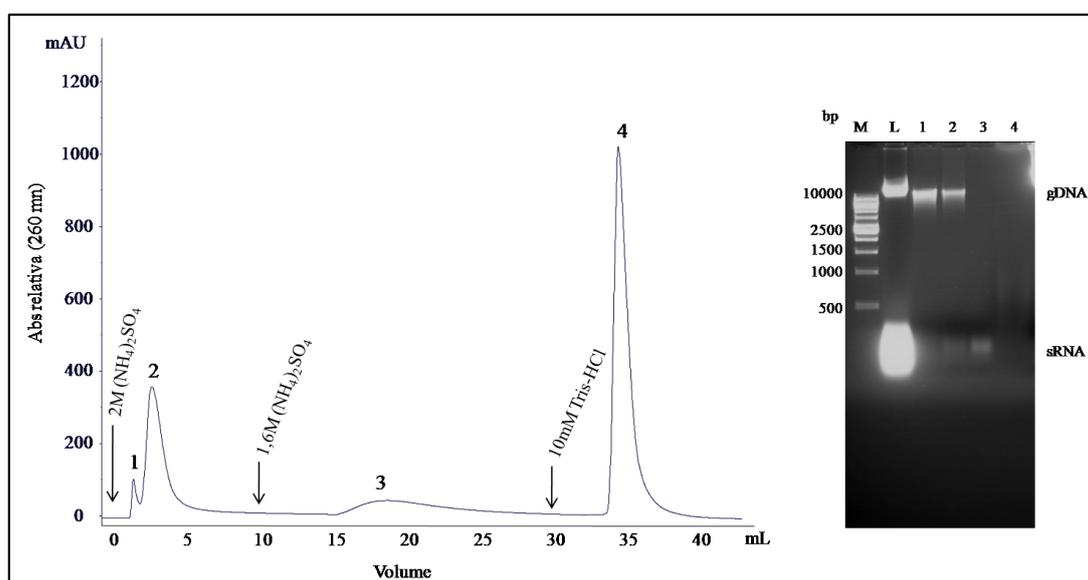
**Figura 25- Cromatograma dos rRNAs com eluição em gradiente de três passos e respectiva electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.** A eluição foi efectuada a 1ml/min. decrescendo a concentração do eluente de 1,7M para 1,6M e terminando a eluição com tampão Tris- HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha 1 – fracções recolhidas do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracções recolhidas do pico 2 do cromatograma.

Neste ensaio, verificou-se a formação de um pico aquando da eluição com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,7M, tendo sido observada a eluição do rRNA 5S (linha 1 e 2). Para o patamar de eluição usando a concentração de 1,6M, nenhuma espécie de RNA eluiu e todas as que estavam retidas eluíram com Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Na electroforese as fracções deste último pico (linha 3 e 4) não são visíveis, nem identificáveis, sendo difícil a caracterização das espécies eluídas.

Serão necessários mais estudos cromatográficos para avaliar o comportamento desta classe de RNAs, e se definir uma purificação selectiva com a matriz de afinidade com histidina imobilizada.

### 4.3. Ensaio preliminares com lisados de *E. coli*

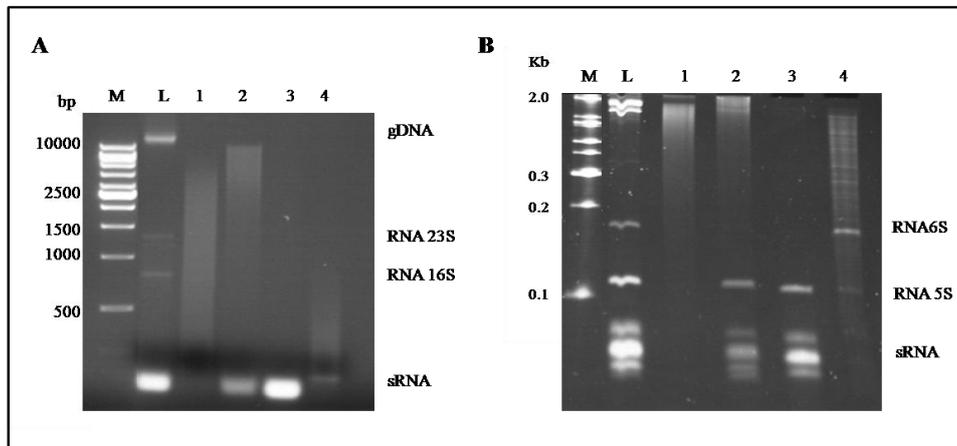
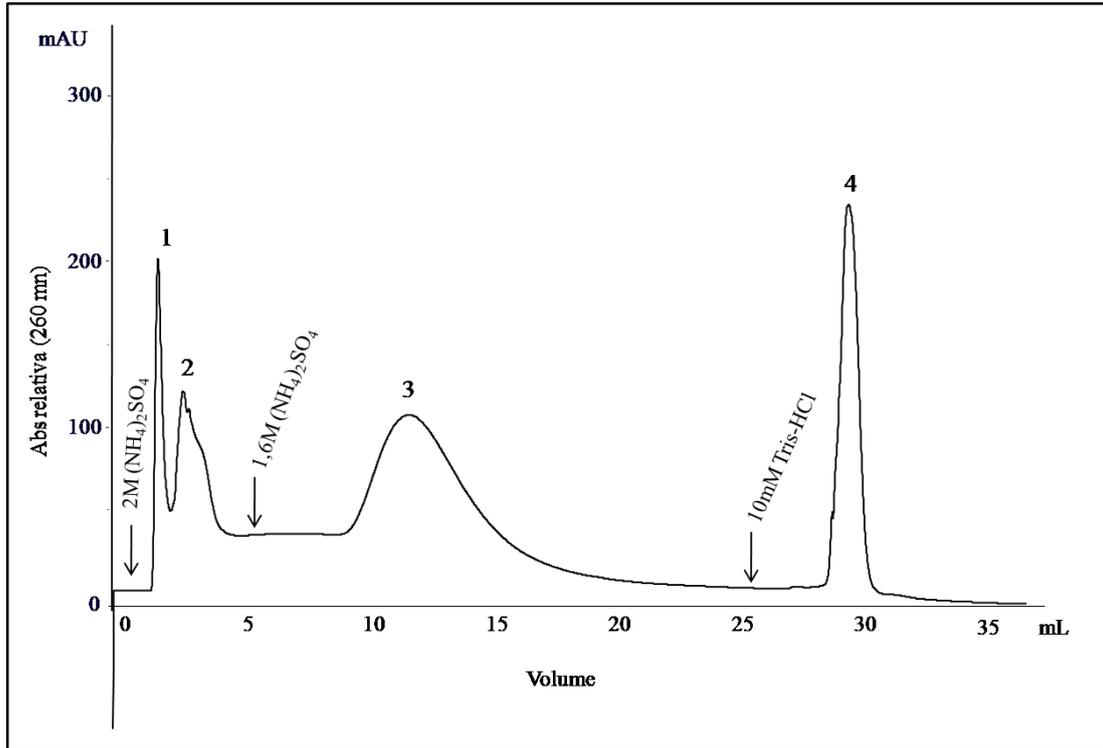
Para compreender o comportamento dos vários tipos de RNA na matriz de histidina, efectuaram-se alguns estudos preliminares com lisados de *E. coli* obtidos com três diferentes tipos de lises: alcalina, desnaturante e enzimática, aplicando as condições cromatográficas estabelecidas anteriormente. Pretendia-se, desta forma, verificar se a histidina-agarose continuava a ligar selectivamente o RNA e se, eventualmente, ocorria a separação do RNA 6S, mas agora usando um extracto complexo, na presença de proteínas e gDNA. Os cromatogramas seguintes apresentam os resultados deste estudo.



**Figura 26 - Perfil cromatográfico do lisado de *E. coli* obtido por lise alcalina em histidina-agarose e respectiva electroforese de agarose.**

A eluição foi efectuada a 1ml/min. decrescendo a concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no eluente de 2M para 1,6M e terminando a eluição com o tampão com Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha L- amostra de lisado; linha 1 – fracções recolhidas do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracção recolhida do pico 2 do cromatograma; linha 3 – fracções recolhidas do pico 4 do cromatograma; linha 4 - fracções recolhidas do pico 3 do cromatograma.

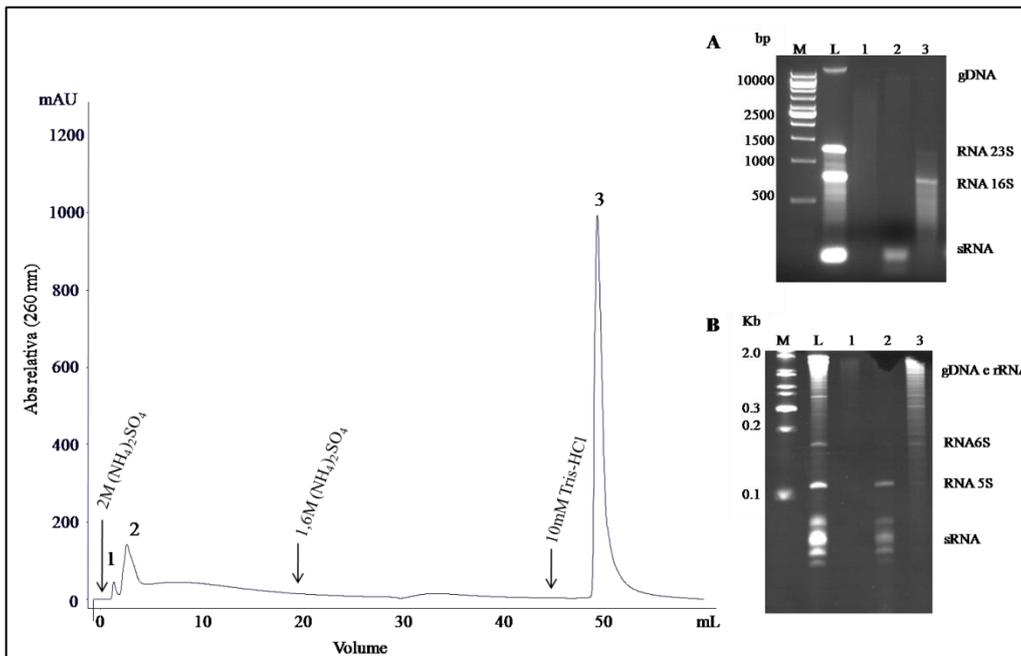
A lise alcalina, normalmente utilizada para o isolamento de DNA, foi aplicada às células de *E. coli*, das quais resultou uma amostra contendo gDNA e RNA (linha L). Com a aplicação da amostra à matriz de histidina com o gradiente em três passos, o cromatograma apresentou quatro picos. Após a análise, por electroforese, das fracções recolhidas de cada um dos picos, estas revelaram a presença de gDNA nos dois primeiros picos resultantes da eluição com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2M (linha 1 e 2). No terceiro pico, obtido com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,6M, não se identificou a eluição de nenhuma espécie (linha 4) e no último pico, eluido com tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,0, foram identificadas as espécies de sRNA (linha 3). Com estes resultados, verificou-se que pela diminuição da força iónica o RNA permanecia retido, ocorrendo a sua eluição apenas quando o sal era removido (linha 3). Neste ensaio não se verificou nenhuma ligação selectiva da histidina-agarose para com os diferentes tipos de RNA, o que poderá ser devido ao facto do RNA se degradar com o tipo de pH usado nesta lise. Esta degradação foi verificada, não só por não serem visíveis os rRNAs 23S e 16S na amostra, mas também pela análise dos sRNAs em electroforese de poliacrilamida, onde se verificaram apenas arrastamentos. Destes resultados conclui-se que, apesar desta lise se verificar eficiente na separação de DNA do RNA, não é adequada à recuperação do RNA, devido à degradação induzida pelo elevado pH.



**Figura 27 - Perfil cromatográfico do lisado de *E. coli* obtido em condições desnaturantes, em histidina-agarose e respectivas electroforeses de agarose (A) e poliacrilamida (B).**

A eluição foi efectuada a 1ml/min. decrescendo a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no eluente de 2M para 1,6M e terminando a eluição com o tampão com Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha 1 – fracções recolhidas do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracção recolhida do pico 2 do cromatograma; linha 3 – fracções recolhidas do pico 3 do cromatograma; linha 4 - fracções recolhidas do pico 4 do cromatograma.

A lise efectuada com o sal de guanidina, revelou a presença de gDNA, sRNA, e uma quantidade muito baixa de rRNAs (isto porque o tempo na incubação da guanidina com as células foi excedido) (electroforeses A e B, linha L). Da aplicação desta amostra na coluna de histidina, verificou-se um perfil cromatográfico em todo idêntico ao da purificação do RNA 6S e, pela electroforese de poliácridamida (B), confirmou-se a eluição dos sRNAs em condições moderadas de força iónica (linha 3) e o isolamento do RNA 6S, quando o sal foi removido do tampão de eluição (linha 4). O gDNA não foi visível na electroforese de agarose (A, linha 1 e 2), talvez pela sua baixa quantidade na amostra, no entanto, comparando o seu tempo de retenção no cromatograma e o perfil de retenção obtido na lise anterior pôde prever-se a sua eluição no primeiro e segundo picos. As leves bandas de elevado peso molecular na electroforese de poliácridamida (linha 1 e 2), suportam a hipótese da eluição do gDNA.



**Figura 28 - Perfil cromatográfico do lisado de *E. coli* por lise enzimática em histidina-agarose e respectivas electroforeses de agarose e poliácridamida.**

A eluição foi efectuada a 1ml/min. decrescendo a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no eluente de 2M para 1,6M e terminando a eluição com o tampão com Tris-HCl 10mM, pH 7,0. Linha M – marcador; linha L – amostra de lisado; linha 1 – fracções recolhidas do pico 1 do cromatograma; linha 2 – fracção recolhida do pico 2 do cromatograma; linha 3 – fracções recolhidas do pico 3 do cromatograma.

Na lise com proteinase K, o lisado obtido apresentava gDNA, rRNA, sRNA e possíveis proteínas (electroforeses A e B, linha L). O cromatograma obtido revelou o mesmo perfil que o do ensaio com a lise alcalina: os dois primeiros picos são formados pela eluição com elevadas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e apresentam os mesmos tempos de retenção; o terceiro pico é derivado da aplicação do tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,0 na coluna. Na visualização do conteúdo das fracções recolhidas, no primeiro pico não foi identificado o ácido nucleico que eluiu, devido, provavelmente, à sua baixa concentração, mas atendendo aos tempos de retenção demonstrados para o gDNA, e como discutido anteriormente, suspeita-se da eluição do gDNA (electroforeses A e B, linha 1 e 2). A análise do segundo pico, diferentemente da lise alcalina, já indicou a presença de sRNA sem degradação, confirmada pela electroforese em poliacríamida (B, linha 2). A análise do terceiro pico por electroforese de agarose (A) revelou a presença das bandas correspondentes aos rRNAs 23S e 16S (A, linha 3). Neste processo, os rRNAs de elevado peso molecular parecem comportar-se de forma idêntica aos rRNAs isolados por precipitação (secção 3.2.2), ficando retidos na coluna de histidina-agarose em elevadas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e eluindo com a remoção do sal do tampão. No entanto, neste ensaio não se verificou nenhuma eluição selectiva de sRNAs, pelo que é também necessário considerar a possibilidade de ocorrerem interacções entre as diferentes classes dos RNAs no lisado. Para avaliar este e outros comportamentos continua a ser necessário desenvolver mais investigação nesta área de purificação dos RNAs aplicando a cromatografia de afinidade e em particular, a matriz de histidina-agarose.

A interacção natural e biológica entre o aminoácido histidina e os ácidos nucleicos tem sido comprovada em inúmeras áreas e diferentes vertentes, suportando a possibilidade da sua aplicação nas estratégias de purificação explorando a afinidade inerente. Concretamente, têm surgido algumas ideias no que diz respeito à ligação dos aminoácidos aos ácidos nucleicos como participantes no metabolismo dos organismos primitivos, muito antes de existir o processo bem organizado da síntese proteica, como hoje se conhece [86]. Em algumas experiências envolvendo uma enzima de DNA (desoxiribozima) que usa a histidina como cofactor na reacção de clivagem do RNA, já foi demonstrada a grande importância dos aminoácidos como coenzimas [87]. Outras mostraram a afinidade de aptâmeros de RNA para com a L-histidina através de cromatografia com matriz de sepharose [88]. Estes resultados visam encontrar evidências científicas para a teoria do “Mundo do RNA” e demonstram a grande

importância que a histidina apresenta nos processos biológicos, pelo que da aplicação deste aminoácido poderão advir grandes desenvolvimentos na investigação científica.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

---

A cromatografia de afinidade é um método no qual as interações bioespecíficas e reversíveis são usadas para uma extração, separação e/ou purificação selectiva de material biologicamente activo de uma mistura de moléculas. O aminoácido histidina como ligando imobilizado na coluna cromatográfica tem contribuído, eficientemente, para essas práticas serem alcançadas com os ácidos nucleicos. Este trabalho veio demonstrar uma estratégia de purificação para separar o RNA 6S de uma mistura de sRNAs de *E. coli*. Os mecanismos subjacentes parecem envolver não só interações hidrofóbicas, mas também um bioreconhecimento das bases nucleotídicas pelo ligando de histidina. A conformação das biomoléculas, e neste caso em particular, do DNA e RNA, parecem ter um papel muito importante na interacção e no reconhecimento, tornando-se um dos factores fundamentais a influenciar a interacção dos diferentes ácidos nucleicos e dos diferentes tipos de RNA com a matriz de histidina-agarose. O entendimento desse bioreconhecimento, que parece advir das interações selectivas da histidina para com os vários RNAs, será certamente, fundamental para a compreensão de processos biológicos, que contribuirão para a aplicação terapêutica dos RNAs, nomeadamente no desenvolvimento da terapia génica. Com a recente teoria do “Mundo do RNA”, a cromatografia de histidina poderá ser também uma mais valia no esclarecimento da origem do código genético, permitindo o isolamento de diferentes tipos de RNA para aplicar em diversos estudos estruturais e funcionais. A aplicação da cromatografia de afinidade com histidina imobilizada no “Mundo do RNA” seria uma abordagem interessante e de grande importância científica.

Os resultados preliminares obtidos com os lisados de *E. coli*, demonstram, mais uma vez, o potencial que este método cromatográfico pode apresentar na separação selectiva do gDNA e dos diferentes tipos de RNA presentes num lisado, numa única estratégia cromatográfica. Concretizado este método de purificação com a histidina, tornar-se-á possível eliminar a laboriosa, tóxica e difícil extração com fenol e avançar na recuperação do produto de RNA e na sua aplicabilidade biológica.

Em conclusão, os resultados obtidos com a histidina, como ligando imobilizado em cromatografia de afinidade, revelaram uma elevada potencialidade desta técnica para a purificação fiável dos vários tipos de RNA, tendo sido destacadas novas aplicabilidades desta técnica cromatográfica.

## 6. REFERÊNCIAS

---

1. Azevedo, C., *Biologia celular e molecular*. 1999, Lisboa: Lidel-edições técnicas lda. 131-157.
2. Elliott, W.H. and D.C. Elliot, *Biochemistry and Molecular Biology*. 2001, New York: Oxford University Press. 303-399.
3. Jones, B.A. and A.D. Schreiber, *mRNA as a therapeutic target in lung disease*. Drug Design Reviews - Online, 2005. **2**(5): p. 361-372(12).
4. Ketting, R.F. and R.H. Plasterk, *What's new about RNAi? Meeting on siRNAs and miRNAs*. EMBO Rep, 2004. **5**(8): p. 762-5.
5. Dahm, R., *Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research*. Hum Genet, 2008. **122**(6): p. 565-81.
6. Jones, M.E., *Albrecht Kossel, a biographical sketch*. Yale J Biol Med, 1953. **26**(1): p. 80-97.
7. Silva, J.M.e., *Bioquímica da informação genética*. primeira ed. 2006, Lisboa: Publicações ciência e vida, lda. 12-40, 70-142,183-191.
8. Morange, M., *A History of Molecular Biology*. 2000: Harvard University Press.
9. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure Of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(4): p. 623-624.
10. Crick, F.H., *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol, 1958. **12**: p. 138-63.
11. Crick, F.H., *The Croonian lecture, 1966. The genetic code*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1967. **167**(9): p. 331-47.
12. Crick, F.H., et al., *General nature of the genetic code for proteins*. Nature, 1961. **192**: p. 1227-32.
13. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger, Principles of Biochemistry*. Fourth ed. 2004, New York: Worth Publishers. 848-866, 907-929, 931-1017.
14. Griffiths, A., et al., *Introdução á genética*. eighth ed. 2006, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 246-261.
15. Wolf, Y.I. and E.V. Koonin, *On the origin of the translation system and the genetic code in the RNA world by means of natural selection, exaptation, and subfunctionalization*. Biol Direct, 2007. **2**: p. 14.
16. Baynes, J. and M. Dominiczak, *Medical Biochemistry*. 1999, England Mosby, Harcourt Brace and Company Limited. 367-399.
17. Nucleótido. 2009 [cited 2009/06/18]; Available from: [https://www.msu.edu/course/isb/202/snapshot.afs/ebertmay/notes/inotes/02\\_13\\_07\\_genes\\_evol.html](https://www.msu.edu/course/isb/202/snapshot.afs/ebertmay/notes/inotes/02_13_07_genes_evol.html).
18. Stryer, L., *Biochemistry*. fourth ed. 1995, New York: W. H. Freeman and Company. 785 -869.
19. Pabo, C.O. and R.T. Sauer, *Protein-DNA recognition*. Annu Rev Biochem, 1984. **53**: p. 293-321.
20. Devlin, T.M., *Textbook of Biochemistry with clinical correlation*. fifth ed. 2002, New York: Wiley-Liss. 27-89, 207-230, 280-323.
21. Tuerk, C., et al., *CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): p. 1364-8.

22. Shen, L.X., Z. Cai, and I. Tinoco, Jr., *RNA structure at high resolution*. FASEB J., 1995. **9**(11): p. 1023-1033.
23. Svoboda, P. and A. Di Cara, *Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(7-8): p. 901-8.
24. Farrell, R.E., *RNA Methodologies*. third ed. 2005, York, USA: Academic Press.
25. Doty, P., et al., *SECONDARY STRUCTURE IN RIBONUCLEIC ACIDS*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1959. **45**(4): p. 482-499.
26. Blake, R.D. and S.G. Delcourt, *Thermodynamic effects of formamide on DNA stability*. Nucl. Acids Res., 1996. **24**(11): p. 2095-2103.
27. Duguid, J.G. and V.A. Bloomfield, *Electrostatic effects on the stability of condensed DNA in the presence of divalent cations*. Biophys J, 1996. **70**(6): p. 2838-46.
28. Koculi, E., et al., *Charge density of divalent metal cations determines RNA stability*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(9): p. 2676-82.
29. Murray, R.K., et al., *Harper's Biochemistry*. 25 ed. 2000, USA: McGraw-Hill. 375-487.
30. Transcrição. [cited 20090620]; Available from: <http://www.biog1105-1106.org/demos/106/unit02/3d.prokterminationsignal.html>.
31. Brimacombe, R. and W. Stiege, *Structure and function of ribosomal RNA*. Biochem J, 1985. **229**(1): p. 1-17.
32. Gutell, R.R., N. Larsen, and C.R. Woese, *Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective*. Microbiol Rev, 1994. **58**(1): p. 10-26.
33. Ban, N., et al., *The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 A Resolution*. Science, 2000. **289**(5481): p. 905-920.
34. Yusupov, M.M., et al., *Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution*. Science, 2001. **292**(5518): p. 883-96.
35. Harms, J., et al., *High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium*. Cell, 2001. **107**(5): p. 679-88.
36. Spahn, C.M., et al., *Structure of the 80S ribosome from Saccharomyces cerevisiae--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions*. Cell, 2001. **107**(3): p. 373-86.
37. Moore, P.B. and T.A. Steitz, *The involvement of RNA in ribosome function*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 229-35.
38. Bottger, E.C., et al., *Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics*. EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 318-23.
39. Clark, B.F., *The crystal structure of tRNA*. J Biosci, 2006. **31**(4): p. 453-7.
40. Champe, P.C. and R.A. Harvey, *Biochemistry*. second ed. 1994, USA: Lippincott Williams and Wilkins. 343-421.
41. Sprinzl, M., *Chemistry of aminoacylation and peptide bond formation on the 3'terminus of tRNA*. J Biosci, 2006. **31**(4): p. 489-96.
42. RajBhandary, U.L. and C. Kohrer, *Early days of tRNA research: discovery, function, purification and sequence analysis*. J Biosci, 2006. **31**(4): p. 439-51.
43. tRNA. 2009 [cited 20090620]; Available from: <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/tRNA/Function.htm>.
44. Ikemura, T. and J.E. Dahlberg, *Small Ribonucleic Acids of Escherichia coli. I. CHARACTERIZATION BY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS AND FINGERPRINT ANALYSIS*. J. Biol. Chem., 1973. **248**(14): p. 5024-5032.

45. Pinder, J.C., D.Z. Staynov, and W.B. Gratzer, *Electrophoresis of RNA in formamide*. *Biochemistry*, 1974. **13**(26): p. 5373-8.
46. Szymanski, M., et al., *5 S rRNA: structure and interactions*. *Biochem J*, 2003. **371**(Pt 3): p. 641-51.
47. Dokudovskaya, S., et al., *Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA*. *Rna*, 1996. **2**(2): p. 146-52.
48. Holmberg, L. and O. Nygård, *Release of Ribosome-Bound 5S rRNA upon Cleavage of the Phosphodiester Bond between Nucleotides A54 and A55 in 5S rRNA*. *Biological Chemistry*, 2000. **381**(11): p. 1041-1046.
49. Ammons, D., J. Rampersad, and G.E. Fox, *5S rRNA gene deletions cause an unexpectedly high fitness loss in Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(2): p. 637-42.
50. Kim, V.N., *Small RNAs: classification, biogenesis, and function*. *Mol Cells*, 2005. **19**(1): p. 1-15.
51. Wassarman, K.M., A. Zhang, and G. Storz, *Small RNAs in Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, 1999. **7**(1): p. 37-45.
52. Gottesman, S., *The small RNA regulators of Escherichia coli: roles and mechanisms\**. *Annu Rev Microbiol*, 2004. **58**: p. 303-28.
53. Wassarman, K.M. and G. Storz, *6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity*. *Cell*, 2000. **101**(6): p. 613-23.
54. Gildehaus, N., et al., *Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from E. coli: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts*. *Nucl. Acids Res.*, 2007: p. gkm085.
55. Bastard, J.P., et al., *[RNA isolation and purification methods]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2002. **60**(5): p. 513-23.
56. Zolfaghari, R., X. Chen, and E.A. Fisher, *Simple method for extracting RNA from cultured cells and tissue with guanidine salts*. *Clin Chem*, 1993. **39**(7): p. 1408-1411.
57. Majumdar, D., Y.J. Avissar, and J.H. Wyche, *Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA*. *Biotechniques*, 1991. **11**(1): p. 94-101.
58. Sambrook, J. and D.W. Russell, *A Single-step Method for the Simultaneous Preparation of DNA, RNA, and Protein from Cells and Tissues*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006. **2006**(2): p. pdb.prot4056-.
59. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(2): p. 581-5.
60. Chirgwin, J.M., et al., *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. *Biochemistry*, 1979. **18**(24): p. 5294-5299.
61. Glisin, V., R. Crkvenjakov, and C. Byus, *Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation*. *Biochemistry*, 1974. **13**(12): p. 2633-2637.
62. Gordon, J.A., *Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins*. *Biochemistry*, 1972. **11**(10): p. 1862-1870.
63. Chomczynski, P., *Solubilization in formamide protects RNA from degradation*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(14): p. 3791-2.
64. Rosenberg, I.M., *Protein Analysis and Purification*. first ed. 1996, Boston: Birkhauser. 265-319.
65. *Etapas cromatográficas*. [cited 2009/07/01]; Available from: <http://www.shodex.com/english/illust/i0007.gif>.

66. Curling, J., *Process Chromatography: Five Decades of Innovation*. Biopharm International 2007: p. 10-49.
67. Jansen, J.e.a., *Purification Principles. High Resolution Methods and applications*. 1989, New York: VCH Publishers.
68. Ninfa, A.J. and D.P. Ballou, *Fundamental Laboratory approaches for Biochemistry and Biotechnology*. 1998, USA: Fitzgerald Science Press, Inc. 89-114.
69. Sousa, F., D.M. Prazeres, and J.A. Queiroz, *Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(9): p. 518-25.
70. Bioscience, A. *Affinity Chromatography. Principles and methods*. 2002 [cited 2009/06/28]; Available from: [www.chromatography.amershambiosciences.com](http://www.chromatography.amershambiosciences.com).
71. Hage, D.S., *Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications*. Clin Chem, 1999. **45**(5): p. 593-615.
72. Sousa, F., et al., *Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support*. Anal Biochem, 2005. **343**(1): p. 183-5.
73. Sousa, F., D.M. Prazeres, and J.A. Queiroz, *Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification*. Biomed Chromatogr, 2009. **23**(2): p. 160-5.
74. Sousa, F., et al., *Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step*. Biotechnol Appl Biochem, 2006. **45**(Pt 3): p. 131-40.
75. Hoffman, M.M., et al., *AANT: the Amino Acid-Nucleotide Interaction Database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D174-81.
76. Bumcrot, D., et al., *RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(12): p. 711-719.
77. Stellrecht, C.M. and V. Gandhi, *Concurrent isolation of ribosomal, messenger, and low molecular weight RNA*. Biotechniques, 2002. **33**(5): p. 1122-4.
78. Dreyfus, M. and P. Regnier, *The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria*. Cell, 2002. **111**(5): p. 611-3.
79. Cherayil, J.D., *Transfer RNAs and other soluble RNAs*. first ed. 1990, Boston: CRC Press. 6.
80. Wang, Y.X., M. Lu, and D.E. Draper, *Specific ammonium ion requirement for functional ribosomal RNA tertiary structure*. Biochemistry, 1993. **32**(46): p. 12279-82.
81. Xiong, Y. and M. Sundaralingam, *Two crystal forms of helix II of Xenopus laevis 5S rRNA with a cytosine bulge*. RNA, 2000. **6**(9): p. 1316-1324.
82. Osswald, M. and R. Brimacombe, *The environment of 5S rRNA in the ribosome: cross-links to 23S rRNA from sites within helices II and III of the 5S molecule*. Nucl. Acids Res., 1999. **27**(11): p. 2283-2290.
83. Jeong, E., et al., *Discovering the interaction propensities of amino acids and nucleotides from protein-RNA complexes*. Mol Cells, 2003. **16**(2): p. 161-7.
84. Morozova, N., et al., *Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures*. Bioinformatics, 2006. **22**(22): p. 2746-2752.
85. Barrick, J.E., et al., *6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter*. RNA, 2005. **11**(5): p. 774-784.
86. Szathmary, E., *The origin of the genetic code: amino acids as cofactors in an RNA world*. Trends Genet, 1999. **15**(6): p. 223-9.

87. Roth, A. and R.R. Breaker, *An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(11): p. 6027-6031.
88. Majerfeld, I., D. Puthenvedu, and M. Yarus, *RNA affinity for molecular L-histidine; genetic code origins*. J Mol Evol, 2005. **61**(2): p. 226-35.

## *7. ANEXOS*

---

**A new affinity approach to isolate *Escherichia coli* 6S RNA with  
histidine-chromatography**

R. Martins, J.A. Queiroz, F. Sousa\*

*Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior,  
6201-001 Covilhã, Portugal*

\*corresponding author:

Fax: +351 275 319 883

E-mail: fanisousa@fcsaude.ubi.pt

Small RNAs (sRNA) constitute a family of regulatory non-coding RNAs that are the target of several research studies in all organisms. In bacteria, their functions have been associated with RNA processing, mRNA stability, translation, protein stability and secretion, acting mostly by base-pairing but also by protein-binding [1]. *Escherichia coli* (E. coli) 6S RNA was one of the first small RNAs to be discovered in the late 1960s and its sequence and secondary structure was promptly proposed [2]. Although 6S RNA was soon recognized, its function remained unknown for several years. This RNA specie was always found in highly abundance in total cellular RNA however, the studies of depletion and over expression of this RNA species in cells studies have not demonstrated any evident change in cell behaviour [2]. In the 2000 year, the first breakthrough on 6S RNA function was the demonstration of its ability to bind  $\sigma^{70}$ -holoenzyme form of RNA polymerase inhibiting its activity in the stationary phase of cell growth. The great structural similarity observed between 6S RNA and a DNA open promoter in RNA transcription process and the identification of 6S RNA in a specific complex link to RNA polymerase led to the hypothesis suggesting that 6S RNA functions by mimicking the transcription promoter. 6S RNA seems to directly compete with DNA promoters for  $\sigma^{70}$ -RNA polymerase active site to inhibit transcription [3, 4]

Over these last years, new insights triggered a better understanding in the molecular mechanism of this RNA [5, 6]. The techniques employed in 6S RNA isolation continued to be plasmid design and enzymatic purification which becomes time-consuming and expensive. Therefore, the development of new tools for 6S RNA purification would be of great importance to simplify the current methods based on genetics approaches.

The use of amino acid-based affinity chromatography had been described as a promising approach for acid nucleic purification because of the biological selectivity

created between the amino acid ligand and the molecule in study. In general the selectivity found in affinity chromatography can be due to some biological function or individual chemical structure, favouring the interaction [7]. In the present study, the isolation of *E. coli* sRNA was tested in an affinity chromatographic support with immobilized histidine in order to combine the reliable and economical chromatography with highly selective the amino acid histidine that has shown great applicability in nucleic acids purification. Histidine–agarose chromatographic support was demonstrated to efficiently separate supercoiled and open circular pDNA isoforms due to hydrophobic interactions occurring between the support and the pDNA molecules but also promoting biorecognition of nucleic acid bases by the histidine ligand [8]. Furthermore, in this previous studies the RNA showed to be strongly retained in the column because of the higher base exposure, and its elution occurred with a decrease in salt concentration [9].

The RNA used in this study was obtained from a cell culture of *E. coli* DH5 $\alpha$ . Growth was carried out in shake flasks at 37°C and 250 rpm with 250 mL of Terrific Broth medium (12 g/L tryptone, 24 g/L yeast extract, 4 mL/L glycerol, 0.017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) and it was suspended at late log phase (OD<sub>600</sub>  $\approx$  9). Cells were recovered by centrifugation and stored at -20°C. Total cellular RNA (RNA<sub>t</sub>) was extracted by using a previously described modified protocol [10]. Figure 1 shows a schematic representation of the total RNA extraction procedure as well as the isolation of sRNA from this extract. Briefly, the extraction started with cell homogenization with 5 mL of a solution containing guanidinium thiocyanate. 500  $\mu$ L of 2M sodium acetate, pH 4.0 and 5 mL of water-saturated phenol were then added to cell lysate. To obtain two immiscible phases, 1 mL of chloroform/isoamyl alcohol (49:1) was added. After the centrifugation, the collected upper aqueous phase was mixed with 11  $\mu$ L of 20  $\mu$ L/mL

glycogen. Glycogen is used as a carrier for the precipitation of nucleic acids and its purpose here was to facilitate the visualization of the RNA pellet. Concentration of the rich RNA phase was achieved with 5 mL isopropanol, previous ice-colded at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and incubated 10 minutes at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The RNA precipitation was more efficient and faster with this procedure, thus the long incubation time at  $-20^{\circ}\text{C}$  can be avoided. In the second precipitation, ice-cold isopropanol was used as well. Isolated RNA was washed with 3 mL 75% ethanol and solubilized in 400 $\mu\text{L}$  DEPC-treated water.

Previous to the precipitation protocol, the separation of rRNA and sRNA from the RNA extract was, performed by a described protocol [11], which uses RNA/DNA kits to achieve the isolation of mRNA, rRNA and sRNA. Due to the low yields of mRNA polyadenylated in *E. coli* only the rRNA and sRNA isolation steps were applied however, this procedure revealed time-consuming and expensive because of the number of steps and the use of a commercial kit. The possibility to precipitated RNA extract with 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  for 2h at  $4^{\circ}\text{C}$  became a very useful method, since it was found to be simple, economics and effective. In this optimized protocol, after centrifugation of the RNA extract with 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , the supernatant containing sRNA was applied to a PD-10 desalting column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and 11  $\mu\text{L}$  of 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  glycogen was added. The sRNA concentration was achieved with 2 volumes of ice-cold isopropanol and solubilization was performed as mentioned above. The figure 1B and C shows the multiple steps of the described protocol and the simplicity of the optimized in this study.

A 10 $\times$ 20mm (about 2ml) column was packed with the commercial L-histidine-agarose gel (Sigma, St. Louis, MO). This support is characterized by the manufacturer as a cross-linked 4% beaded agarose matrix with a 12 atoms spacer and an extent of labelling between 1 and 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . The column was connected to a ÄKTApurifier

system with UNICORN software (GE Healthcare, Sweden) and equilibrated with 2.2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 10mM Tris buffer, pH 7.0, at a flow rate of 1 mL/min. sRNA samples (200  $\mu\text{L}$ ) were then injected at the same flow rate. The absorbance was monitored at 260nm. sRNA binding was promoted with 2.2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 10mM Tris buffer, pH 7.0 and the elution of some bound species occurred when the ionic strength of the buffer was first decreased by shifting the eluting buffer to 1.6M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 10mM Tris buffer, pH 7.0. Finally, the ionic strength was decreased to 10mM Tris buffer, pH 7.0 to provide the release of bound RNA. Fractions were pooled according to the chromatograms obtained and concentrated and desalted using Vivaspin concentrators (Vivascience) and analysed by denaturated gel electrophoresis (120V, 1h30min) using 7.5% polyacrilamide gel in TBE (0.84 M Tris base, 0.89M boric acid and 0.01 M EDTA, pH 8.3) buffer. sRNA samples were denaturated with formamide and the denaturation conditions were maintained in the gel due to the presence of 8M ureia. After the electrophoresis was completed, the sRNA molecules in the gel were stained with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide in TBE buffer.

Figure 2A shows a chromatographic profile obtained by injection of a 200 $\mu\text{L}$  sample ( $\approx 100\mu\text{g}$ ) containing all small RNAs species present in the cells, including 6S RNA, 5S RNA and tRNA. A polyacrilamide gel electrophoresis analysis of the fractions eluting from the column (figure 2B) indicated that in the first peak the unbound material correspond to some smalls RNAs, without the presence of 6S RNA (lane 1). However, the majority of sRNAs tended to remain bound and to eluted in a lower ionic strength (lane 2), which explains the second peak in the chromatogram. 6S RNA was the specie stronger retained and it elution occurred when the ionic strength was decreased and the 10mM Tris buffer, pH 7.0 was applied onto the histidine support, as it is represented in the third peak (lane 3). To guarantee an accurate identification of this RNA type,

because the sRNA extract is very complex and presents numerous RNA species, 6S RNA levels were determined during different stages of *E. coli* growth. 6S RNA is known to be highly expressed in the stationary phase [3] and our results clearly demonstrated its significant accumulation from 3hours to 24hours growth (figure 2C).

The retention behaviour of sRNA at high ionic strength showed in this work is consistent with the previously results obtained in RNA separation from *E. coli* lysate [9]. Thus, by decreasing the salt concentration it was expected all sRNA to elute however, 6S RNA remained bound to histidine matrix.

Previously, other chromatographic assays were performed to test the ionic strength effects in the sRNA retention (data not shown). For that, 2.2M and 1.6M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 10mM Tris buffer, pH 7.0 were used in two separated assays in the same conditions above and also analyzed as above. The higher salt concentration retained all sRNA and elution was total with Tris buffer, while in mild ionic strength sRNA immediately eluted. These results were important to investigate the behaviour of sRNAs in different salt concentrations and lead to 6S RNA purification. Consequently, the high salt concentration played a key role on the 6S RNA binding to histidine ligand.

The single-stranded nature of RNA, which is normally involved in RNA recognition because of the highly base exposure and availability for interactions, is the main explanation for the specific interactions in these experiments. Furthermore, atomic studies performed on protein-RNA complex structures have shown that histidine has a strong tendency to interact with nucleotides [12]. As for the exact type of interactions, these may include (i) hydrogen-bonding between H-donor ( $\text{N}\tau\text{H}$ ) and H-acceptor ( $\text{N}\pi$ ) atoms in the non-protonated histidine with base edges, (ii) ring stacking/hydrophobic interactions, (iii) water-mediated hydrogen bonds [13, 14]. In line with this, the elution

of sRNA when salt concentration is decreased suggests that ring stacking/hydrophobic interactions and histidine–RNA direct hydrogen-bonding are the dominating effects.

Additionally, 6S RNA structural features seem to be relevant on its distinct behaviour. Its DNA promoter-like secondary structure consists on two long irregular double-stranded stem regions, which are interrupted by small bulge loops, and a largely single-stranded internal loop in the central region. Along the central bulge and through the continuous stem sequences there are mostly present adenines (A) and guanines (G) [15] which were describe to preferential interact with histidine [14]. Interestingly, in newly described aspects on the function of 6S RNA A and G also were identified as specific nucleotides involved in the close contact with RNA polymerase [6].

In conclusion, this study demonstrated a purification strategy to separate 6S RNA from a sRNA mixture of *Escherichia coli* lysate. The underlying mechanism involves not only electrostatic and hydrophobic interaction but also a biorecognition of nucleic acids bases by the histidine ligand. The successful results obtained with this support reveal an efficient technique to obtain a reproducible and appropriate RNA quality with potential applicability on RNA studies such as the newly therapeutic interest of RNA.

## References

1. Wassarman, K.M., A. Zhang, and G. Storz, *Small RNAs in Escherichia coli*. Trends Microbiol, 1999. **7**(1): p. 37-45.
2. Willkomm, D.K. and R.K. Hartmann, *6S RNA – an ancient regulator of bacterial RNA polymerase rediscovered*. Biological Chemistry, 2005. **386**(12): p. 1273-1277.
3. Wassarman, K.M. and G. Storz, *6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity*. Cell, 2000. **101**(6): p. 613-23.
4. Wassarman, K.M., *6S RNA: a small RNA regulator of transcription*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(2): p. 164-8.
5. Karen, M.W., *6S RNA: a regulator of transcription*. Molecular Microbiology, 2007. **65**(6): p. 1425-1431.
6. Gildehaus, N., et al., *Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from E. coli: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts*. Nucl. Acids Res., 2007: p. gkm085.
7. Sousa, F., D.M. Prazeres, and J.A. Queiroz, *Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(9): p. 518-25.
8. Sousa, F., et al., *Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support*. Anal Biochem, 2005. **343**(1): p. 183-5.
9. Sousa, F., et al., *Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step*. Biotechnol Appl Biochem, 2006. **45**(Pt 3): p. 131-40.
10. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
11. Stellrecht, C.M. and V. Gandhi, *Concurrent isolation of ribosomal, messenger, and low molecular weight RNA*. Biotechniques, 2002. **33**(5): p. 1122-4.
12. Jeong, E., et al., *Discovering the interaction propensities of amino acids and nucleotides from protein-RNA complexes*. Mol Cells, 2003. **16**(2): p. 161-7.
13. Morozova, N., et al., *Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures*. Bioinformatics, 2006. **22**(22): p. 2746-2752.

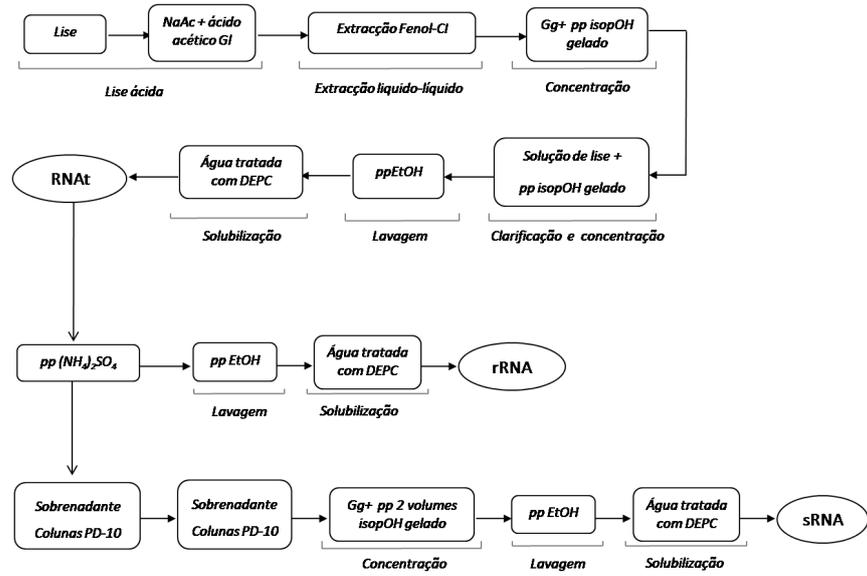
14. Hoffman, M.M., et al., *AANT: the Amino Acid-Nucleotide Interaction Database*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D174-81.
15. Barrick, J.E., et al., *6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter*. *RNA*, 2005. **11**(5): p. 774-784.

## Figure legend

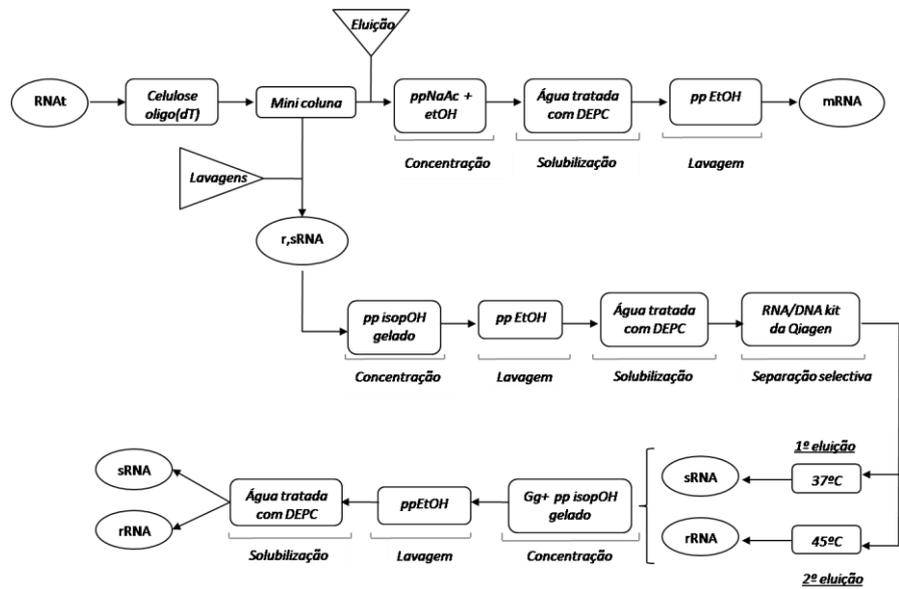
Figure 1. (A) Process used for the extraction of total cellular RNA and small RNA for 6S RNA purification. (B) Process used for the separation of mRNA, rRNA and sRNA based on described protocol. (C) Optimized protocol for the separation of rRNA and sRNA. (NaAc, sodium acetate; G, Glacial; CI, chloroform/Isoamyl alcohol; Gg, glycogen; IsopOH, isopropanol; etOH, ethanol; DEPC, diethylpyrocarbonate;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ammonium sulphate; pp, precipitation).

Figure 2. (A) Chromatographic separation of 6S RNA with histidine-agarose support. Step elution was performed at 1ml/min by decreasing the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration in the eluent from 2.2 M to 1.6 M, ending with a 10mM Tris buffer elution. (B) Denaturing polyacrylamide electrophoresis analysis of the chromatographic peaks: lane M- molecular weight markers; lane S- sRNA sample; lane 1- Traces of sRNA without 6S RNA; lane 2- sRNA without 6S RNA; lane 3- 6S RNA. (C) Characteristic pattern of 6S RNA growth: lane  $S_3$ - sRNA 3 hours of cell growth; lane  $S_{24}$ - sRNA 24 hours of cell growth.

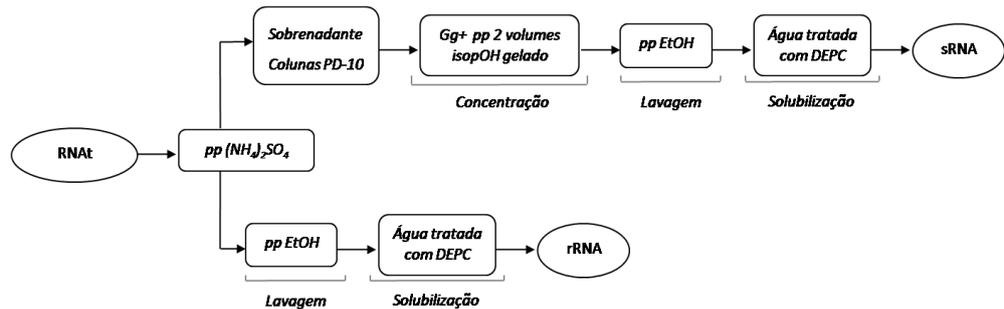
**A**

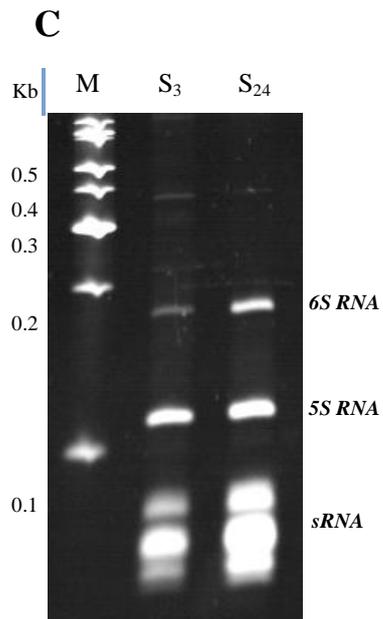
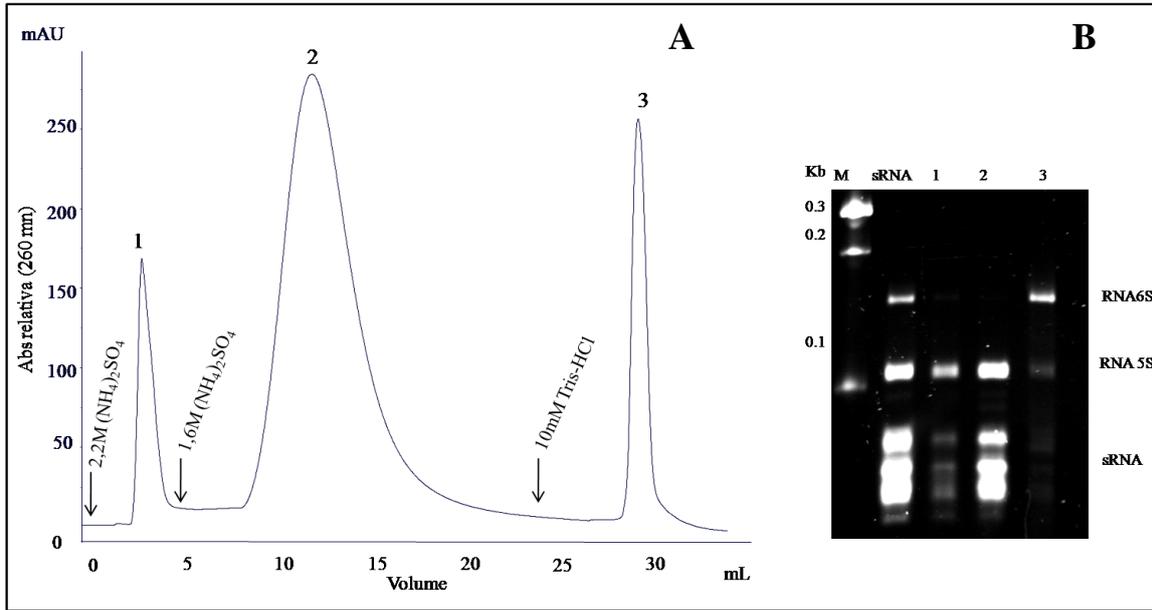


**B**



**C**





**FIG.2**

