UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização da Função da Proteína Nop17p de
*Saccharomyces cerevisiae***

Fernando Alexis Gonzales Zubiarte

Tese de Doutorado

Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo 16/08/2005

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

Gonzales Zubiato, Fernando Alexis
G643c Caracterização da função da proteína Nop17p de *Saccharomyces cerevisiae* / Fernando Alexis Gonzales Zubiato. -- São Paulo, 2005.
1v. (paginação irregular)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Oliveira, Carla Columbano de

1. Expressão gênica 2. Biologia molecular : *Saccharomyces*
3. RNA 4. Ribossoma : Citologia I. T. II. Oliveira, Carla
Columbano de, orientador.

574.88 CDD

“Caracterização da função da proteína Nop17p de *Saccharomyces cerevisiae*”

**FERNANDO ALEXIS GONZALES
ZUBIATE**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ – USP

Prof. Dr. FRANCISCO GORGONIO DA NÓBREGA
UNIVAP

Prof. Dr. SANDRO ROBERTO VALENTINI
FCF – UNESP – Araraquara

Prof. Dr. SANDRO JOSÉ DE SOUZA
LUDWIG

SÃO PAULO
16 DE SETEMBRO 2005

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Professora Carla Oliveira, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança em mim depositada para desenvolver este trabalho e pela orientação acertada na minha formação científica.

Aos meus colegas de laboratório Celso, Daniela, Mauricio, Roberto e Juliana pelo apoio e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Nilson Zanchin pela colaboração nos experimentos de localização sub-celular de proteínas e doação de diversos reagentes.

À professora Beatriz Castilho pela disponibilização de aparelhos para os experimentos de gradiente de polissomos.

Ao Professor Sandro Valentini pela doação do anticorpo anti-GST.

Ao pessoal de Secretaria de Pós-Graduação pela sua compreensão e paciência. Aos professores do departamento de Bioquímica pela disponibilidade de laboratórios e aparelhos.

Aos meus amigos do Instituto de Química em geral pela grande amizade demonstrada nestes anos.

A la Mafia.

Ao Instituto de Química.

Ao CNPq pelo auxílio extremamente fundamental.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Processamento do rRNA precursor 35S	3
1.2 O complexo SSU Procesome	4
1.3 Maturação final do 18S	8
1.4 Formação dos rRNAs 5.8S e 25S	10
1.5 O complexo exossomo	10
1.6 Modificações covalentes no pré-rRNA	14
1.7 Transformação de uridina em pseudouridina	15
1.8 snoRNPs de box C/D dirigem a metilação	16
1.9 Identificação de fatores envolvidos na Biogênese dos ribossomos	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Cepas usadas neste trabalho	19
2.2 Plasmídeos	19
2.3 Transformação de bactéria	24
2.3.1 Choque térmico	24
2.3.2 Eletroporação	24
2.4 Transformação de levedura	24
2.4.1 Transformação com acetato de lítio e DNA carrier	24
2.4.2 Transformação com acetato de lítio e DTT	24
2.4.3 Eletroporação	25
2.5 Análise de restrição	25
2.6 Extração de fragmentos de DNA de gel de agarose	25
2.7 Seqüenciamento	25
2.8 Seleção de clones através do sistema do duplo híbrido	26

2.9	Teste de Atividade de β -Galactosidase	26
2.9.1	Ensaio de X-Gal	26
2.9.2	Ensaio de ONPG	28
2.10	SDS-PAGE	28
2.11	Western Blotting	28
2.12	Localização com GFP	29
2.13	Co-purificação	29
2.14	Marcação in vivo de rRNA	30
2.15	Gradiente de Polissomos	30
3	RESULTADOS	31
3.1	Seleção de proteínas que interagem com Nop17p	31
3.2	Confirmação de interações encontradas no duplo híbrido	35
3.3	Células $\Delta nop17$ apresentam um fenótipo termo-sensível	37
3.4	Análise de Processamento de rRNA em $\Delta nop17$	39
3.5	Complementação de $\Delta nop17$	43
3.6	Importância da interação entre as proteínas Nop17p e Nop58p	46
3.7	Nop17p não liga snoRNAs, mas afeta a ligação de Nop58p	48
3.8	A proteína Nop17p se localiza no núcleo	51
3.9	Proteínas de snoRNP de box C/D não estão localizadas corretamente na cepa $\Delta nop17$	51
3.10	Mapa de interações do complexo snoRNP de box C/D	54
4	DISCUSSÃO	58
5	REFERÊNCIAS	64
6	PUBLICAÇÕES	78
7	CURRICULUM VITAE	

ABREVIATURAS

°C	graus celsius
aa(s)	aminoácido(s)
β-Gal	β-Galactosidase
AD	domínio de ativação
BD	domínio de união ao DNA
BSA	albumina acetilada de soro bovino
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotritol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETS	seqüência espaçadora externa
ITS	seqüência espaçadora interna
kb	quilobase(s)
kDa	quilodáton(s)
kV	quilovolts
LB	luria broth
M	molar
mA	mili ampére(s)
mM	milimolar
ml	mililitro(s)
mRNA	RNA mensageiro
nt	nucleotídeo(s)
Ω	ohms
OD	densidade óptica
ONPG	<i>O</i> -nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	pares de bases

PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial de hidrogênio
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
pré-rRNA	RNA ribossômico precursor
RNase	ribonuclease
RNP	ribonucleoproteína
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
S	coeficiente de sedimentação
SDS	dodecil sulfato de sódio
snoRNAs	small nucleolar RNAs
snRNAs	small nuclear RNAs
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletineldiamina
TLCK-HCl	L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2-heptanone-HCl
tRNA	RNA transportador
µg	micrograma(s)
µl	microlitro(s)
YNB	yeast nitrogen base
YPD	yeast extract peptone dextrose

RESUMO

Um grande número de proteínas está envolvido no processamento de rRNA, e cada uma delas desempenha uma ação específica, seja como um fator estrutural, regulatório ou catalítico. Apesar da biogênese dos ribossomos ter sido intensamente estudada, ainda não se tem conhecimento claro da função de muitas proteínas envolvidas neste mecanismo. Dentre os snoRNPs, o grupo denominado box C/D é responsável pela metilação e clivagens no pré-rRNA. Através da análise de interação proteína-proteína do sistema do duplo híbrido a proteína aqui denominada Nop17p foi isolada interagindo com a proteína Rrp43p, uma subunidade do exossomo. Estudos de microarray mostraram que o mutante nulo *Δnop17* tem o mesmo fenótipo que mutantes de genes envolvidos em tradução.

No presente trabalho apresentamos uma análise detalhada da função da Nop17p e a importância da sua interação com a proteína Nop58p, componente do snoRNP de box C/D. Observamos também um defeito na função da Nop58p na ausência da Nop17p e outro dado importante apresentado aqui é que a localização sub-celular de componentes de snoRNPs de box C/D não é correta na ausência de Nop17p. Estes resultados evidenciam um envolvimento direto entre Nop17p e snoRNPs de box C/D, com um papel de regulação da função e/ou na montagem desses complexos. Apresentamos também dados com a proteína homóloga de humanos (hNop17p), que foi expressada na cepa *Δnop17* de levedura e que conseguiu suprimir parcialmente o fenótipo termo-sensível dessa cepa, demonstrando uma possível conservação da função de Nop17p ao longo da evolução.

ABSTRACT

In eukaryotes, pre-rRNA processing depends on cis-acting elements and on a large number of non-ribosomal trans-acting factors, including endonucleases and exonucleases, RNA helicases, rRNA modifying enzymes and components of snoRNPs. The exosome is a conserved eukaryotic protein complex containing multiple 3'-5' exonucleases, which has been implicated in pre-rRNA, snoRNA and snRNA processing, as well as in mRNA degradation. In order to identify new proteins involved in rRNA processing, we have screened a yeast two-hybrid cDNA library, to isolate proteins interacting with the exosome subunit Rrp43p. In this screen, a novel nucleolar protein, Nop17p, was identified which also interacts with the box C/D snoRNP protein Nop58p. The NOP17 gene is not essential for cell viability but its deletion causes a temperature-sensitive phenotype. Pre-rRNA processing analyses revealed that rRNA formation is affected in the *Δnop17* strain subjected to the non-permissive temperature, although it is not blocked completely. In addition, primer extension analyses of RNA isolated from Nop17p-depleted cells subjected to the non-permissive temperature indicates that the pre-rRNA is undergoing different modification or degradation processes in these cells as compared to the parental strain. Nop17p was recently described in the same complex as Nop58p and, interestingly, its depletion leads to mislocalization of Nop1p, Nop56p, Nop58p and Snul3p, which are the core proteins of the box C/D ribonucleoprotein (snoRNP), indicating that Nop17p function is required either for nucleolar retention or for the proper assembly of the box C/D snoRNP.

1. INTRODUÇÃO

Em eucariotos a biogênese dos ribossomos é um bem orquestrado processo que compreende a maturação dos RNAs ribossomais (rRNAs) e a associação destes com proteínas ribossomais. Cada ribossomo é composto por uma cópia dos rRNAs 18S, 5.8S, 25S e 5S, e por 80 proteínas associadas a estes, denominadas proteínas ribossomais. Em *Saccharomyces cerevisiae* estes rRNAs são transcritos a partir de genes rDNA (DNA codificante do rRNA) que contêm uma repetição de 100 a 200 cópias do operon ribossomal.

A transcrição dos rRNAs ocorre no nucléolo, compartimento celular onde eles também vão sofrer a maioria das modificações de nucleotídeos. Dependendo do rRNA, a transcrição acontece de formas diferentes: a RNA Polimerase I produz um único rRNA precursor 35S contendo as seqüências correspondentes aos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S (revisto em Venema and Tollervey, 1995; Kressler et al., 1999), e a RNA Polimerase III sintetiza uma forma imatura do rRNA 5S. O processo de maturação dos pré-rRNAs precisa ser bastante eficiente, visto que são componentes determinantes da estrutura e na catálise dos ribossomos.

A maturação do rRNA 5S se dá através de uma via independente e muito mais rápida que o processamento do pré-rRNA 35S. O extremo 5' do 5S maduro corresponde ao do transcrito primário, mas o extremo 3' é processado a partir do pré-rRNA 5S que é estendido de 7 a 13 nt (Raué et al., 1991; Piper et al., 1983).

Processamento do rRNA precursor 35S

A via de processamento do pré-rRNA 35S começa com uma série de modificações que acontecem simultaneamente à transcrição, e que incluem clivagens endonucleolíticas e exonucleolíticas, metilações covalentes de bases e ribose, e isomerização de resíduos uridina a pseudouridinas (Maden, 1990; Eichler and Craig, 1994; Venema and Tollervey, 1995; Kressler et al., 1999; Venema and Tollervey, 1999; Grandi et al., 2002; Schäfer et al., 2003).

Durante a maturação dos rRNAs, e já durante sua transcrição, algumas proteínas ribossomais se associam aos pré-rRNAs, enquanto que alguns fatores de processamento se

associam e outros se desligam desses complexos, dependendo da etapa de maturação, ou acompanham os pré-ribossomos por todo o processo até a formação dos ribossomos maduros no citoplasma. Experimentos de gradiente de sedimentação a partir de células de levedura mostraram que o pré-rRNA 35S se associa a proteínas ribossomais e não-ribossomais dentro de um complexo chamado de pré-ribossomo 90S (Baßler et al., 2001; Fatica et al., 2002; Grandi et al., 2002; Nissan et al., 2002; Figura 1).

O processamento do precursor 35S se inicia com clivagens nos sítios A₀ e A₁ localizados no 5' ETS (External Transcribed Spacer; Espaçador Transcrito Externo) e a clivagem em A₂ (localizado no ITS1; Internal Transcribed Spacer; Espaçador Transcrito Interno). Estas clivagens acontecem rapidamente e geram os subcomplexos pré-60S (contendo o pré-rRNA 27S) e pré-40S (contendo o 20S) que posteriormente originarão as subunidades ribossomais (Figura 2). Clivagens em A₀, A₁ e A₂ vão ser fundamentais para a maturação do rRNA 18S, e requerem pareamento de bases sítio-específico do extremo 5' do pré-rRNA 35S com o snoRNA U3 ("small nucleolar RNA"; Hughes and Ares, 1991; Beltrame and Tollervey, 1995).

O complexo SSU Processome ("Small Sub Unit Processome")

Diferentes complexos snoRNPs ("small nucleolar Ribo Nucleo Proteins") atuam nestas etapas iniciais da maturação do pré-rRNA, sendo o mais importante um complexo constituído pelo U3 snoRNA de box C/D (Figura 3) associado a 35 proteínas não ribossomais (Utp1-18, Utp20-22, Noc4, Nop1, Nop56, Nop58, Snu13, Mpp10, Imp3, Imp4, Dhr1, Rrp9, Rrp5, Emg1 e Krr1) e 5 proteínas ribossomais (Rps4, Rps6, Rps7, Rps9 e Rps14), formando U3 snoRNP. U3 snoRNP está envolvido na biogênese da subunidade 40S e alguns de seus fatores protéicos são co-imunoprecipitados com os pré-rRNAs 35S, 33/32S, e 23S (Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002, Granneman and Baserga, 2004; Bernstein et al., 2004).

O complexo formado pelo pré-rRNA 35S e o U3 snoRNP, denominado por Dragon e colaboradores como SSU processome, é essencial na produção da subunidade ribossomal menor e já tinha sido observado por micrografia eletrônica durante a transcrição dos rRNAs

Figura 2. Processamento do pré-rRNA 35S em *Saccharomyces cerevisiae*. **A.** Estrutura de uma unidade de rDNA codificando os rRNAs 18S, 5.8S e 25S e uma cópia do gene do rRNA 5S. pr, promotor; tr, terminador; eh, enhancer; ITS1 e ITS2, espaçadores internos transcritos; 5'ETS e 3'ETS, espaçadores externos transcritos; NTS1 e NTS2, espaçadores não transcritos. **B.** Vias de processamento e modificação do pré-rRNA mostrando os fatores envolvidos. (exonucleases e endonucleases são mostradas em azul; hipotéticas RNA Helicases ATP-dependentes em vermelho e componentes envolvidos na modificação do pré-rRNA em verde. (Figura extraída de Kressler et al., 1999).

Figura 3. Tipos principais de small nucleolar RNAs (snoRNAs) envolvidos em processamento e modificação de pré-rRNA. **A.** snoRNA de box C/D, responsáveis por clivagens e metilações. **B.** snoRNA de box H/ACA, envolvidos em pseudouridilação (Extraído de Smith and Steitz, 1997).

na forma de aglomerados ou “knobs” (Miller and Beatty, 1969; Dragon et al., 2002; Granneman and Baserga, 2004; Figura 4). Na falta do snoRNA U3 ou qualquer dos componentes protéicos do complexo, a formação do “knob” é afetada e conseqüentemente o rRNA 18S não é formado (Dragon et al., 2002). Existe a possibilidade de que o papel do SSU processome não esteja restrito só ao processamento do rRNA se não também ao “folding” do pré-rRNA, como já foi sugerido previamente (Dragon et al., 2002; Venema and Tollervey, 1999). Além do snoRNA U3, o snoRNA de box C/D U14 e os snoRNAs de box H/ACA snR10 e snR30 também estão envolvidos no processamento do 18S através de pareamento de bases com o pré-rRNA (Li et al., 1990; Morrissey and Tollervey, 1993; Tollervey, 1987). Desta maneira, após a clivagem em A₂ são gerados os pré-rRNAs 20S e 27SA₂ que vão seguir vias diferentes como é mostrado na figura 2.

Maturação final do 18S

O pré-rRNA 20S como parte do pré-ribossomo 43S, é transportado desde o nucléolo até o citoplasma e processado no sítio D (Udem and Warner, 1973; Trapman et al., 1975; Stevens et al., 1991), esta clivagem é endonucleolítica e gera o extremo 3' maduro do 18S. Vários mutantes que acumulam especificamente pré-rRNA 20S foram caracterizados em *Saccharomyces cerevisiae*. *ROK1*, um gene essencial codificando uma hipotética helicase, e também *RRP8*, que codifica uma hipotética metil-transferase são requeridos para a maturação do 18S (Venema et al., 1997; Bousquet-Antonelli et al., 2000). O mutante de *CLP-8* mostrou defeito na exportação e processamento do 20S (Carter et al., 1980), o que indicaria que o pré-ribossomo 43S produzido é ineficientemente reconhecido pela maquinaria de exportação e de processamento. *RPS31* codifica uma proteína ribossomal e sua deleção afeta especificamente o processamento do pré-rRNA 20S, mas não afeta sua exportação para o citoplasma (Finley et al., 1989). Este defeito também foi encontrado em células *Δrio1/rrp10*, um gene que codifica uma proteína não ribossomal citoplasmática que se associa, ao menos transitoriamente, à partícula 43S (Vanrobays et al., 2001). A proteína Nob1p também foi identificada como um componente do pré-40S e é requerida estritamente para a clivagem no extremo 3' do 18S (Fatica et al., 2003). Apesar de terem sido encontrados vários fatores envolvidos no processamento do pré-rRNA 20S para a

Figura 4. Transcrição do pré-rRNA 35S em *Saccharomyces cerevisiae*. **A.** Microscopia eletrônica. **B.** Esquema ilustrativo. Partículas em cinza representam pequenos “knobs” 5’; partículas em rosa representam “knobs” SSU grandes recém-formados; partículas em vermelho representam knobs maduros, mais compactados; partículas em azul representam knobs pré-LSU que vão formar a subunidade maior 60S. **C.** Esquema onde a sequência do pré-rRNA é mostrada em vermelho desde a extremidade 5’ até o sítio de clivagem A2, e em azul desde A2 até a extremidade 3’. (Figura extraída de Osheim et al., 2004.)

formação do rRNA 18S maduro, ainda resta conhecer que endonuclease estaria envolvida na clivagem no sítio D e que outros mecanismos existem para a regulação desta maturação.

Formação dos rRNAs 5.8S e 25S

O pré-rRNA 27SA₂, gerado pela clivagem em A₂, vai seguir duas vias diferentes ainda no nucléolo. A principal via envolve uma clivagem no sítio A₃, resultando no pré-rRNA 27SA₃. Este é rapidamente convertido no pré-rRNA 27SB_S por clivagem exonucleolítica 5'-3' até o sítio B_{1S}, gerando o extremo 5' do rRNA 5.8S_S maduro (Henry et al., 1994). A clivagem em A₃ é feita pela endoribonuclease RNase MRP e contribui para a maturação do extremo 5' do rRNA 5.8S (Lygerou et al., 1996). RNase MRP é formada por um componente de snoRNA e nove proteínas associadas, e mutações em qualquer um destes componentes mostrou que a clivagem *in vivo* em A₃ é inibida (Chamberlain et al., 1998; Chu et al., 1997; Lindahl et al., 1992; Daugeron and Linder, 1998; Venema and Tollervey, 1999). Apesar desta clivagem não ser essencial para a síntese do RNA maduro (Henry et al., 1994), a endonuclease MRP é fundamental para a viabilidade celular, o que indica que esta enzima esteja envolvida em outro processo além da clivagem em A₃. A outra via de processamento do 27S envolve a clivagem endonucleolítica no sítio B_{1L}, localizado a 6 ou 7 nucleotídeos upstream de B_{1S}, originando o pré-rRNA 27SB_L contendo o extremo 5' do rRNA 5.8S_L (Raue, 2004, Venema and Tollervey, 1999).

Ambos pré-rRNAs 27SB_S e 27SB_L são subsequentemente clivados no sítio C₂, dentro do ITS2, originando os precursores 7S e 25.5S, a maturação continua através de digestão exonucleolítica (Geerlings et al., 2000; Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997; van Hoof et al., 2000). Finalmente, o ITS1 é removido pelas exonucleases Rat1p para a formação do 27S (Raue, 2003). A degradação exonucleolítica da extremidade 3' do 7S é feita pelo exossomo, um complexo com atividade de exonuclease (Allmang et al., 1999).

O complexo exossomo

Em eucariotos, o exossomo é um complexo envolvido em diferentes passos do processamento do rRNA através da sua atividade exonucleolítica. Este complexo foi

identificado inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* a partir da co-purificação de proteínas com Rrp4p e separação por gradiente de glicerol. O exossomo é um complexo multienzimático com atividade exonucleolítica 3'→5' (Mitchell et al., 1996). Pelo menos 11 proteínas fazem parte deste complexo em levedura, algumas destas recentemente identificadas: Rrp4p, Rrp40p, Rrp41p/Ski6p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p/Dis3p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p, Csl4p e Rrp6p (Mitchell et al., 1997; Briggs et al., 1998; Allmang et al., 1999b). Oito dessas proteínas têm homologia com exonucleases de *E. coli* (Allmang et al., 1999b; Mitchell et al., 1997; Tabela 1) e quatro confirmaram atividade de 3'→5' exonuclease *in vitro*: Rrp4p, Rrp41p, Rrp44p e Rrp6p (Mitchell et al., 1997; Burkard and Butler, 2000). Todos os componentes do exossomo são essenciais para a viabilidade da célula (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997) exceto Rrp6p (Briggs et al., 1998). O complexo exossomo apresenta-se em duas formas, uma forma nuclear e outra citoplasmática, as quais diferenciam-se pela proteína Rrp6p que está presente somente na fração nuclear (Briggs et al., 1998; Allmang et al., 1999b).

Como mencionado acima, o complexo exossomo está envolvido na maturação da extremidade 3' do rRNA 5,8S (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997). Mutantes de cada subunidade do exossomo demonstraram, individualmente, defeito no processamento do pré-rRNA 7S para a formação do rRNA maduro 5,8S (Allmang et al., 1999b). Demonstrou-se também que o exossomo é importante na degradação da região 5' ETS depois das clivagens em A₀ e A₁ acontecer (Allmang et al., 1999b). Apesar de o exossomo não participar diretamente nos primeiros passos do processamento do pré-rRNA, essas reações requerem a presença de todos os componentes deste complexo (Allmang et al., 2000), já que em estudos com mutantes, observou-se um acúmulo do pré-rRNA 35S e um desaparecimento do pré-rRNA 32S (produto da clivagem em A₁). As clivagens em A₂ e A₃ no ITS1 também foram afetadas em mutantes exossômicos, efeito refletido nos níveis mais baixos dos rRNAs maduros 18S e 25S, e conseqüentemente, na produção das subunidades ribossomais (Zanchin and Goldfarb, 1999a; Allmang et al., 2000; Oliveira et al., 2002).

Proteína	Fenótipo	Homólogo em <i>E. coli</i>	Homólogo em <i>A. thaliana</i>	Homólogo em <i>H. sapiens</i>	Homólogo em <i>T. brucei</i>
Rrp4p	essencial	S1 RNA BD	AtRrp4p	hRrp4p	TbRrp4
Rrp40p	essencial	S1 RNA BD		hRrp40p	TbRrp40
Rrp41p	essencial	RNase PH	AtRrp41p	hRrp41p	TbRrp41A, p41B
Rrp42p	essencial	RNase PH			
Rrp43p	essencial	RNase PH			
Rrp44p	essencial	RNase R		hDis3p	TbRrp44
Rrp45p	essencial	RNase PH		PMScl-75, OIP2 e KIAA0116	TbRrp45
Rrp46p	essencial	RNase PH		hRrp46p	
Csl4p	essencial	S1 RNA BD		hCsl4p	TbCsl4
Mtr3p	essencial	RNase PH			
Rrp6p	ts letal	RNase D		PMScl-100	TbRrp6

Tabela 1 . Proteínas componentes do complexo exossomo em *Saccharomyces cerevisiae* e homólogos em outros organismos.

O exossomo atua também na maturação de alguns snoRNAs e snRNAs, auxiliado pela endonuclease Rnt1p (Allmang et al., 1999a). Mutações nos genes *rrp4*, *rrp41/ski6*, *mtr3* e *Δrrp6* afetaram o correto processamento 3' dos snoRNAs U24 e U18, assim como na deadenilação do snRNA U4 e dos snoRNAs: snR33, snR40, U18, U74, snR73 e snR72 (van Hoof et al., 2000b). O exossomo está envolvido ainda na degradação de mRNAs, que é um importante processo na célula, já que não só determina o “steady-state” de um mRNA, mas também é um importante ponto regulatório na expressão gênica (Oliveira et al., 2002).

O papel do exossomo é essencial nas modificações que sofre o RNA, e sua importância na célula é demonstrada pela conservação que existe deste complexo ao longo da evolução. Além da homologia observada entre os componentes exossômicos e RNases bacterianas, também foi identificado um complexo correspondente ao exossomo eucariótico em archaea, constituído por um complexo de RNases, proteínas com domínios de ligação a RNA e helicases que regulam o processamento e degradação 3'→5' de espécies de RNA (Koonin et al., 2001). No parasita unicelular *Trypanosoma brucei*, foram identificados oito genes que codificam proteínas com alta similaridade a subunidades do exossomo e também estão envolvidas no processamento do rRNA 5,8S (Estévez et al., 2001). Em *Arabidopsis thaliana* também foram identificados vários genes homólogos às subunidades do exossomo, sendo que AtRrp41p, homóloga a Rrp41/Ski6p de *S. cerevisiae*, foi capaz de complementar o fenótipo letal do mutante nulo *rrp41(ski6)* em levedura. Foi demonstrado também que AtRrp41p complementa os defeitos de processamento do rRNA de 5,8S e degradação de mRNA, restaurando também a integridade do complexo exossomo em levedura (Chekanova et al., 2000). Em humanos também existe um complexo semelhante ao exossomo, que foi encontrado inicialmente a partir da co-purificação da proteína humana hRrp4p (homóloga a Rrp4p de levedura) em células HeLa (Mitchell et al., 1997). Estima-se que este complexo chamado PM-Scl (Poliomiositis-scleroderma), tenha entre 11 a 16 componentes, e contém 9 componentes homólogos aos do exossomo em *S. cerevisiae* (Brouwer et al., 2001; Allmang et al., 1999b; Raijmakers et al., 2002). Similar ao exossomo, a localização de PM-Scl foi determinada tanto no núcleo como no citoplasma, e a subunidade exossômica nuclear de levedura é homóloga à de humanos. Três componentes do PM-Scl complementam a função *in vivo* dos respectivos mutantes termo-sensíveis de

levedura (Mitchell et al., 1997; Shiomi et al., 1998; Brower et al., 2001). Esses resultados indicam que o complexo PM-Scl deve desempenhar as mesmas funções do exossomo em humanos.

Uma das subunidades componentes do exossomo em *Saccharomyces cerevisiae* é a Rrp43p, a qual foi localizada no nucleoplasma, nucléolo e em menor quantidade no citoplasma (Zanchin and Goldfarb, 1999b; Allmang et al., 1999b). Mutações em *RRP43* demonstraram uma diminuição nos níveis dos polissomos, sugerindo que Rrp43p desempenhe uma função importante na biogênese de ribossomos (Zanchin and Goldfarb, 1999a). Análises de processamento de rRNA confirmaram o envolvimento de Rrp43p em processamento de 5.8S rRNA e na degradação do espaçador 5'-ETS (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999b). Rrp43p também parece influenciar o processamento de 18S (Zanchin and Goldfarb, 1999a; Oliveira et al., 2002).

Modificações covalentes no pré-rRNA

Maturação do transcrito precursor 35S requer dois principais acontecimentos: clivagens endo- e exonucleolíticas, já descritas acima, e modificações covalente de regiões altamente conservadas no rRNA. Estas modificações ocorrem através da interação do pré-rRNA com complexos snoRNPs, os quais estão constituídos por um componente de snoRNA guiando sítio-especificamente esta interação e um grupo de proteínas catalisando esta reação.

As modificações mais predominantes que ocorrem nos nucleotídeos do rRNA são isomerização de uridinas para pseudouridinas (ψ) e metilação de 2'-hidroxila das riboses (Maden, 1990; Balakin et al., 1996; Ni et al., 1997; Ganot et al., 1997; Kiss-Laszlo et al., 1996). Estas modificações são comuns em rRNAs, snRNAs (de splicing), tRNAs e snoRNAs, embora, a abundância e locais dos nucleotídeos modificados variem de espécie para espécie (revisado em Decatur and Fournier, 2003). O rRNA em células humanas sofre aproximadamente cem modificações de cada tipo, enquanto que em *Saccharomyces cerevisiae* acontecem 55 metilações e 44 pseudouridinações (Lowe and Eddy, 1999; Samarsky and Fournier, 1999). A função destas modificações não é conhecida exatamente e nenhuma destas parece ser importante individualmente, mas a inibição destas em nível

global na levedura mostrou um defeito grande na taxa de crescimento (Tollervey et al., 1993; Zebajarian et al., 1999). Acredita-se que as modificações sejam importantes para a manutenção da conformação funcional dos rRNAs, estabilizando interações através de pareamento de bases. Além disso, foi demonstrado que estas modificações ocorrem somente em regiões de rRNA maduro, indicando uma função na estruturação e catálise dos ribossomos durante a tradução (Maden, 1990; Bachellerie et al., 2002; Kowalak et al., 1995; Green and Noller, 1996; and Nissen et al., 2000; Decatur and Fournier, 2003; King et al., 2003).

Os snoRNAs guiam, por pareamento de bases, as modificações de nucleotídeos que vão acontecer nos rRNAs (Filipowicz and Pogacic, 2002). A presença de pequenas seqüências consenso nos snoRNAs, denominadas “box”, determina a modificação que estes vão realizar no rRNA (Balakin et al., 1996); snoRNAs de box H/ACA estão envolvidos na pseudouridinação (ψ) e snoRNAs de box C/D na metilação (Figura 3). Com isto, numerosos complexos de snoRNPs dos dois tipos mencionados acima associam-se ao pré-rRNA em diferentes pontos e o modificam.

Transformação de uridina em pseudouridina

A conversão de uridina em pseudouridina é um processo de isomerização que envolve clivagem, rotação e re-ligação da uracila à ribose (Goldwasser and Henrikson, 1966; Ni et al., 1997). A uridina do pré-rRNA a ser convertida é escolhida através de pareamento de bases com o snoRNA de box H/ACA, caracterizado pela presença de duas seqüências motivo (H e ACA) e uma estrutura secundária também conservada. O box H é constituído pela seqüência ANANNA e o box ACA é formado pelo triplete ACA (Kiss, 2001; Ofengand, 2002; Balakin et al., 1996).

A estrutura do snoRNA consiste em um “hairpin” (dupla fita) seguida de uma seqüência de fita simples contendo o box H, depois outro “hairpin” seguido do box ACA a três nucleotídeos do extremo 3’ do snoRNA (Balakin et al., 1996; Ganot et al., 1997). Cada hairpin contém um “loop” interno, o qual vai parear com o pré-rRNA (aproximadamente de 3-10 nt). Esta estrutura é fundamental para a reação de pseudouridinação e é chamada de “pseudouridylation pocket”.

Os snoRNPS de box H/ACA contêm sempre quatro proteínas comuns: Cbf5p, Gar1p, Nhp2p e Nop10p, as quais formam o “core” deste complexo (Lafontaine et al., 1998; Henras et al., 1998; Kolodrubetz and Burgum, 1991; Pogacic et al., 2000). Homólogos destas proteínas foram encontradas em diferentes organismos, como é o caso da Cbf5p, proteína encontrada em levedura, humanos (Mitchell et al., 1999), camundongo (Meier and Blobel, 1998) e *Drosophila* (Phillips et al., 1998). Cbf5p corresponde ao componente catalítico de pseudouridinação (Kressler et al., 1999; Lafontaine et al., 1998; Henras et al., 1998; Zebarjadian et al., 1999).

snoRNPs de Box C/D dirigem a metilação

A modificação mais comum encontrada no rRNA de *Saccharomyces cerevisiae* é a 2'-O-metilação sítio-específica da ribose, que é guiada pelos snoRNAs de box C/D. Estes snoRNAs são caracterizados por elementos contendo seqüências conservadas chamados de box C (RUGAUGA) e box D (CUGA), assim como outros dois elementos menos conservados box C' e box D' que estão localizados internamente no snoRNA (Balakin et al., 1996; Tycowsky et al., 1996; Kiss-Laszlo et al., 1998; Kiss, 2002) (Figura 3). Os extremos 5' e 3' destes snoRNAs pareiam-se formando uma haste situando os boxes C e D próximos e originando um stem-loop-stem chamado de “motif” C/D, esta estrutura provou ser importante para a ligação de proteínas específicas. O componente protéico de cada complexo de snoRNP de box C/D é formado por quatro proteínas evolutivamente conservadas, que estão em quantidades estequiométricas no complexo: Nop1p, Nop58p, Nop56p e Snul3p (Gautier et al., 1997; Schimmang et al., 1989; Watkins et al., 2000; Wu et al., 1998).

Um passo inicial para a montagem deste snoRNP é a ligação de Snul3p no motif C/D, e homólogos desta proteína em archaea, *Xenopus* e humanos demonstraram uma ligação específica nesta estrutura (Kuhn et al., 2002; Szewczak et al., 2002; Watkins et al., 2000, 2002). A união da proteína Snul3p ao snoRNA promove a associação das proteínas restantes do “core” (Watkins et al., 2002). Foi observado que mutações nas seqüências destes motifs originam deficiência no processamento e na estabilidade do snoRNA (Watkins et al., 2000; Filipowicz and Pogacic, 2002; Terns and Terns, 2002), assim como

também a metilação e a sua localização nucleolar é afetada (Caffarelli et al., 1996; Huang et al., 1992). É interessante notar que a montagem completa do componente protéico do snoRNP é essencial na localização nucleolar, na falta da Nop58p por exemplo a Nop1p se localiza no nucleoplasma e no citosol (Wu et al., 1998; Verheggen et al., 2001; Watkins et al., 2002).

A metilação do rRNA acontece através do pareamento de bases entre o snoRNA e o pré-rRNA, o qual compreende uma região de aproximadamente 10 a 20 nucleotídeos, upstream do box D ou D' (Bachelierie and Cavaille, 1997). O nucleotídeo a ser modificado no pré-rRNA está pareando com o quinto nucleotídeo "upstream" do box D ou D' do snoRNA (Cavaille et al., 1996; Tycowsky et al., 1996; Kiss-Laszlo et al., 1996; Smith et al., 1997).

Apesar de a escolha do substrato depender de interações RNA-RNA, a atividade metiltransferase corresponde a uma das proteínas componentes do snoRNP, sendo a proteína Nop1p a unidade catalítica deste complexo. Além do complexo de snoRNP de box C/D, Nop1p se liga especificamente ao grupo doador AdoMet (*S*-Adenosyl-L-methionine) e esta ligação é necessária para a reação de metilação acontecer (Tollervey et al., 1993; Niewmierzycka and Clarke, 1999; Wang et al., 2000; Galardi et al., 2002).

Os snoRNAs de box C/D U3 e U14 são os únicos deste grupo que estão envolvidos na clivagem nos sítios A₀, A₁ e A₂ do pré-rRNA (Hughes and Ares, 1991; Li et al., 1990), sendo o U14 que atua tanto na clivagem como também na metilação (Dunbar and Baserga, 1998).

Finalmente, depois de acontecerem todas as alterações no pré-rRNA, os rRNAs já maduros 5.8S, 25S e 5S associados a proteínas ribossomais formam parte da subunidade 60S. Da mesma maneira o rRNA 18S forma a subunidade 40S.

Identificação de Fatores envolvidos na Biogênese dos ribossomos

Um grande número de proteínas está envolvido no processamento de rRNA, e cada uma delas desempenha uma ação específica, seja como um fator estrutural, regulatório ou catalítico. Apesar da biogênese dos ribossomos ter sido intensamente estudada, ainda não se

tem conhecimento claro da função de muitas proteínas integradas a este mecanismo. Através da análise de interação proteína-proteína do sistema do duplo híbrido a proteína aqui denominada Nop17p foi isolada interagindo com a proteína Rrp43p, uma subunidade do exossomo e este trabalho teve como um dos seus objetivos principais a caracterização da função da proteína Nop17p para, com isso, desvendar seu envolvimento no processamento de rRNA.

A proteína Nop17p é codificada pelo gene de *Saccharomyces cerevisiae* *YHR034C/NOP17*, que não é essencial para a célula. Estudos de microarray mostraram que o mutante nulo *Δnop17* tem o mesmo fenótipo que mutantes de genes envolvidos em tradução (Hughes et al., 2000). De outro lado, também foi identificada a interação entre Nop17p e a Lsm8p (Fromont-Racine et al., 2000), proteína que forma parte do grupo das proteínas “Lsm” (like-sm proteins), e que está associada ao snRNP U6 no spliceossomo, o que indicaria uma função da Nop17p no processo de splicing. É interessante notar que o gene *NOP17* tem homologia com genes de *Drosophila melanogaster* e de humanos, o que indica que este gene é conservado na evolução.

Entretanto, já que a proteína Nop17p foi encontrada interagindo com a Rrp43p, ela poderia desempenhar um papel no metabolismo de RNA. Neste trabalho apresentamos um estudo detalhado da função da proteína Nop17p. Este estudo demonstra que Nop17p participa da maturação dos rRNAs em *Saccharomyces cerevisiae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cepas usadas neste trabalho

Tabela 2. Cepas usadas neste trabalho.

Cepas	Características	Referência
<i>E. coli</i>		
BNN132	ATCC 47059	Elledge et al., 1991
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i></i>	Hanahan, 1983
DH10B	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80dlac <i>Z</i>ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK1-rpsL mupG</i>	Grant et al., 1990
HB101	<i>supE44 hsdS20 (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mtl-1</i>	Bolívar and Backman, 1979
<i>S. cerevisiae</i>		
L40	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,311 ade2 lys2-80 lam URA3::(<i>lexAop</i>)8-LacZ LYS2::(<i>lexAop</i>)4-HIS3 GAL4 gal80</i>	Vojtek and Hollenberg, 1995
BY4743	<i>MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-100</i>	Research Genetics
Δ nop17	<i>MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-100 YHR034C::KAN</i>	Research Genetics
W303	<i>MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-100</i>	Sherman et al., 1986

Plasmídeos

Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeos	Características	Referência
pACT-c DNA	<i>ADGAL4::cDNA library LEU2 2μ</i>	ATCC, 87002
pACT-137	<i>ADGAL4::NOP17 LEU2 2μ</i>	Oliveira et al., 2002
pACT-155	<i>ADGAL4::NOP58 649-1536 LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-182	<i>ADGAL4::RRP43 LEU2 2μ</i>	Este estudo

pACT-221	<i>ADGAL4::YLR323C LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-222	<i>ADGAL4::YKR071C LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-247	<i>ADGAL4::YPL146C LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-256	<i>ADGAL4::YGL231C LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-259	<i>ADGAL4::NOP58 973-1536 LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-266	<i>ADGAL4::YER172C LEU2 2μ</i>	Este estudo
pACT-NOP8	<i>ADGAL4::NOP8 LEU2 2μ</i>	Zanchin and Goldfarb, 1999
pBlueScript-KS	<i>bla</i> (AmpR)	Stratagene
pBS-NOP17BH	pBlueScript, <i>NOP17</i>	Este estudo
pBS-hNOP17	pBlueScript, <i>FLJ20643</i> ou <i>hNOP17</i>	Este estudo
pBTM-116	<i>BDlexA, TRP1 2μ</i>	Bartel et al., 1993
pBTM-hNOP17	<i>BDlexA::hNOP17, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NIP7	<i>BDlexA::NIP7, TRP1 2μ</i>	Zanchin and Goldfarb, 1999
pBTM-NOP1	<i>BDlexA::NOP1, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NOP17	<i>BDlexA::NOP17, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NOP58	<i>BDlexA::NOP58, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NOP58-155	<i>BDlexA::NOP58 649-1536, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NOP58-259	<i>BDlexA::NOP58 973-1536, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NOP58-1.2	<i>BDlexA::NOP58 1-1236, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-NOP58-NH	<i>BDlexA::NOP58 1-600, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pBTM-SNU13	<i>BDlexA::SNU13, TRP1 2μ</i>	Este estudo
pGAD-C _x	<i>ADGAL4 LEU2 2μ</i>	James et al., 1996
pGADC ₂ -5'NOP17	<i>ADGAL4::NOP17 567-344, LEU2 2μ</i>	Dados não publicados
pGADC ₂ -3'NOP17	<i>ADGAL4::NOP17 1-549, LEU2 2μ</i>	Dados não publicados
pGADC ₃ -hNOP17	<i>ADGAL4::hNOP17 LEU2 2μ</i>	Este estudo
pGADC ₁ -LSM8	<i>ADGAL4::LSM8 LEU2 2μ</i>	Este estudo
pGADC ₂ -NOP1	<i>ADGAL4::NOP1, LEU2 2μ</i>	Este estudo
pGADC ₂ -NOP17	<i>ADGAL4::NOP17, LEU2 2μ</i>	Este estudo
pGADC ₂ -NOP56	<i>ADGAL4::NOP56 LEU2 2μ</i>	Este estudo
pGADC ₂ -NOP58-NH	<i>ADGAL4::NOP58 1-600, LEU2 2μ</i>	Este estudo
pGADC ₂ -SNU13	<i>ADGAL4::SNU13 LEU2 2μ</i>	Este estudo
YCplac111	pUC19-MCS <i>LEU2 CEN4</i>	Gietz & Sugino, 1988
YCpGALHis155	YCplac111 <i>GAL1::His::NOP58-155</i>	Este estudo
YCpGALHis259	YCplac111 <i>GAL1::His::NOP58-259</i>	Este estudo
YCpGALHisNOP17	YCplac111 <i>GAL1::His::NOP17</i>	Este estudo
YCpGALHisRRP43	YCplac111 <i>GAL1::His::RRP43</i>	Oliveira et al., 2002
YCplac33	pUC19-MCS, <i>URA3 CEN4</i>	Gietz & Sugino, 1988
YC33GAL-ANOP17	YCplac33 <i>GAL1::PrtA::NOP17</i>	Este estudo
YC33GAL-ANOP58	YCplac33 <i>GAL1::PrtA::NOP58</i>	Este estudo

YCpGAL-ARRP43	YCplac33 GAL1::PrtA::RRP43	Zanchin and Goldfarb, 1999
pCMV-SPORT6		Life Technologies
IMAGp998F059610	pCMV-SPORT6, <i>FLJ20643</i> EST	rzpd
IMAGp998M046461	pCMV-SPORT6, <i>FLJ20643</i> EST	rzpd
IMAGp998G099578	pCMV-SPORT6, <i>FLJ20643</i> EST	rzpd
pJN40	YEplac195 Pcup URA3 2 μ	
pJN40-NOP17	CUP:: <i>NOP17</i>	Este estudo
pJN40-hNOP17	CUP::h <i>NOP17</i>	Este estudo
pGFPN	<i>GFP</i> URA3 <i>CEN6 ARSH4</i>	Nidenthal et al., 1996
pGFPN-NOP17	<i>GFP::NOP17</i> URA3 <i>CEN6 ARSH4</i>	Este estudo
pGFPC	<i>GFP</i> URA3 <i>CEN6 ARSH4</i>	Nidenthal et al., 1996
pGFPC-NOP17	<i>NOP17::GFP</i> URA3 <i>CEN6 ARSH4</i>	Este estudo
RFP-NOP1	<i>RFP::NOP1</i> LEU2	Gonzales et al., 2005
RFP-NOP56	<i>RFP::NOP56</i> LEU2	Este estudo
RFP-NOP58	<i>RFP::NOP58</i> LEU2	Este estudo
RFP-SNU13	<i>RFP::SNU13</i> LEU2	Este estudo
GST-NOP17	<i>GST::NOP17</i>	Gonzales et al., 2005

Os clones de pACT-cDNA 155, 182, 221, 222, 247, 256, 259 e 266 foram obtidos pelo “screening” de duplo usando a proteína Nop17p como isca contra a biblioteca de cDNAs ATCC 87002, fusionada ao “Activation domain” (AD).

Amplificação por PCR da ORF *YHR034C/NOP17* foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e XhoI e em seguida foi inserido no plasmídeo pBTM-116, nos sítios BamHI e SalI para gerar o plasmídeo pBTM-NOP17 que codifica a proteína de fusão LexA-Nop17p.

O fragmento amplificado por PCR da ORF *LSM8* foi inserido nos sítios BamHI e PstI do pGADC₁ para expressar a fusão AD-Lsm8p. Amplificação do gene *NOP1* foi digerido com a enzima PstI e ligado no pGADC₂ no mesmo sítio obtendo o plasmídeo C₂-NOP1. Para a obtenção do pBTM-NOP1, o gene *NOP1* foi extraído do pGADC₂-NOP1 e digerido com PstI para clonagem no pBTM.

Amplificação por PCR da ORF *NOP58* foi digerida com as enzimas de restrição BamHI e XhoI, e em seguida foi inserida no plasmídeo pBTM-116 nos sítios BamHI e SalI para gerar o plasmídeo pBTM-NOP58. Um fragmento de 1,2 Kb do gene *NOP58* foi

extraído do C₂-NOP58 com as enzimas BamHI e XbaI, subclonado no plasmídeo pSL e posteriormente clonado nos sítios BamHI e Sall nos vetores pBTM-116 e pGADC₂, gerando os plasmídeos pBTM-NOP58-1.2 e C₂-NOP58-1.2. Para a construção dos vetores pBTM-NOP58-NH e pGADC₂-NOP58-NH uma amplificação por PCR de uma região correspondente a 0,6 kb da ORF *NOP58* foi digerida com as enzimas de restrição BamHI e XhoI, e em seguida foi inserida no plasmídeo pBTM-116 e no pGADC₂ nos sítios BamHI e Sall. As ORFs *NOP56* e *SNU13* foram extraídas do C₂-NOP56 e C₂-SNU13, respectivamente, com as enzimas de restrição BamHI e Sall, e posteriormente clonados no pBTM116 nos mesmos sítios (pBTM-NOP56 e pBTM-SNU13).

Para a construção do plasmídeo YCpGALHisNOP17 procedeu-se como segue: o amplificado por PCR da ORF *NOP17* com oligonucleotídeos contendo os sítios BglII e HindIII foi sub-clonado no pBlueScript nos sítios BamHI e HindIII, gerando o pBSNOP17BH. O fragmento SpeI-*NOP17*-HindIII proveniente do pBSNOP17BH foi inserido no plasmídeo YcpGALHisRRP43 (Oliveira et al., 2002), digerido com XbaI e HindIII. A partir desse plasmídeo, a proteína de fusão His-Nop17p é expressa sob o controle do promotor GAL1.

A partir dos plasmídeos pACT155 e pACT259 os fragmentos do gene *NOP58* foram extraídos com BglII e inseridos no pBTM-116 e no Ycplac111His, no sítio de BamHI, gerando desta maneira os plasmídeos pBTM-155, pBTM-259, YcpGALHis155 e YcpGALHis259.

A construção de vetores expressando as proteínas de fusão ProtA-Nop17p e ProtA-Nop58p foi feita usando uma dupla sequência do domínio Z da Proteína A de *Staphylococcus aureus* (protA “IgG-binding domain”) sob o controle do promotor GAL1. O plasmídeo YCpGAL-RRP43 foi clivado com BamHI e Sall para liberação do fragmento de *RRP43*, e o fragmento correspondente ao vetor YCp33-GAL-ProtA foi purificado de gel de agarose e ligado aos produtos de PCR das ORFs: *NOP17* e *NOP58* com os sítios BamHI e XhoI. Estas ORFs foram inseridas “downstream” da sequência de ProtA, gerando-se desta maneira os plasmídeos YC33GAL-ANOP17 e YC33GAL-ANOP58.

A ORF *NOP17* e a sequência terminadora do gene de levedura *ADH1* foram extraídos do pBTM-NOP17 com as enzimas de restrição SmaI e SphI e posteriormente clonados no pJN40 nos mesmos sítios originando o plasmídeo pJN40-NOP17.

O fragmento XbaI-*NOP17*-HindIII foi extraído de Yc33GAL-ANOP17 e clonado nos sítios SpeI e HindIII de GFP-N-FUS para codificar a proteína de fusão GFP-Nop17p sob o controle do promotor de Metionina (MET25). O amplificado BglII-*NOP17*-HindIII foi inserido nos sítios BamHI e HindIII do pGFP-N-FUS sob o controle de promotor MET25 para a expressão da fusão GFP-Nop17, com GFP na porção amino-terminal.

Para a construção de vetores expressando as proteínas de fusão RFP-Nop56p, RFP-Nop58p e RFP-Snu13p foi utilizada a sequência de RFP (Red Fluorescent Protein), clonada sob o controle do promotor constitutivo do gene ADH1. As ORFs *NOP56*, *NOP58* e *SNU13* foram subclonados no pACT nos sítios BamHI e XhoI, posteriormente estas ORFs foram extraídas com BglII e inseridas no plasmídeo RFP-NOP1 no mesmo sítio, para a liberação do fragmento do *NOP1* (RFP-NOP56, RFP-NOP58 e RFP-SNU13).

O gene completo que codifica a proteína humana FLJ20643p, homóloga a Nop17p, foi obtido a partir de três ESTs (IMAGp998G099578, IMAGp998F059610 e IMAGp998M046461) da *Resource Center Primary Database - rzpd* contidos no pCMV-SPORT6 (*Invitrogen™ Life Technologies*). Estes clones foram subclonados no pBlueScript e posteriormente clonado no vetor pJN40 no sítio SalI. Posteriormente, a ORF *hNOP17* foi extraída do pBS-hNOP17 com BglII e XhoI e clonada no pGADC₃ em BamHI e SalI para a expressão da fusão ADGal4-hNop17p. Para produzir o híbrido LexA-hNop17p (“Binding Domain”), *hNOP17* foi extraído do pGADC₃-hNOP17 com EcoRI e BglII e clonado no pBTM em EcoRI e BamHI.

Todas as sequências originadas por PCR foram verificadas por análise exaustiva de restrição e sequenciamento. Os DNAs foram ligados segundo Sambrook et al., (1989) a 16°C por pelo menos 12 horas com a enzima T₄ ligase e o tampão apropriado (Boehringer, Mannheim).

Meios, soluções e métodos usados com bactérias seguiram protocolos descritos por Sambrook et al. (1989) e meios, soluções e métodos usados com levedura foram descritos por Sherman et al. (1986), onde não indicada outra referência.

Transformação de bactéria

Choque térmico. Método utilizado como descrito por Hanahan (1983). Bactérias foram incubadas a 37°C por 2 horas até uma OD₆₀₀ 0,6 (cultura em fase logarítmica), centrifugadas e ressuspensas em 0,1 M de CaCl₂ gelado. 50 ng de DNA plasmidial exógeno foi adicionado à suspensão de células, que foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos. Posteriormente, as células transformantes foram plaqueadas em meio seletivo (LB-Amp).

Eletroporação. Segundo Dower et al. (1988). Uma cultura de bactérias crescendo a 37°C até uma OD₆₀₀ de 0,6 foi concentrada e conservada em glicerol 10% a -70 °C. Para a transformação, células foram eletroporadas com DNA plasmidial com o *Gene Pulser* e o *Pulse Controller* (BIO-RAD), ajustando o Gene Pulser com uma capacitância de 25 µFD e uma voltagem de 2,50 kV em cubetas de 0,2 cm, e o Pulse Controller a uma resistência de 200 Ω.

Transformação de levedura

Transformação com acetato de lítio e DNA carreador. Segundo Sherman et al. (1986), células de levedura foram incubadas a 30°C com constante agitação por 18 horas até uma OD₆₀₀ de 0,8. Estas células foram concentradas e ressuspensas em TE contendo 0,1 M de acetato de lítio e a estas foi adicionado 2 µg de DNA plasmidial, 200 ng de Salmon Sperm DNA (*Gibco*) e uma solução de PEG/LiOAc/TE (ver soluções). A mistura de células e DNA foi incubada a 30°C por 30 minutos e em seguida submetida a um choque térmico a 42°C por 15 minutos, para posteriormente ser plaqueada em meio seletivo e incubada a 30°C.

Transformação com acetato de lítio e DTT. Células crescendo a 30°C com constante agitação por 18 horas até atingir fase estacionária (OD₆₀₀ ≥1,0) foram lavadas com TE e em seguida ressuspensas em solução de LiAc-PEG-DTT (0,2 M acetato de lítio, 50% PEG, 1M DTT). A esta suspensão de células foi adicionado 2-5 µg de DNA plasmidial e

foi incubada a 42°C por 30 minutos. Imediatamente depois, as células foram plaqueadas em meio seletivo.

Eletroporação. Células de levedura foram crescidas a 30°C com agitação por 18 horas até uma OD₆₀₀ de 1,3-1,5 (aproximadamente 1×10^8 cel/mL); após lavagens exaustivas com água esteril gelada, as células foram ressuspensas em 1 M de sorbitol estéril gelado. Usando 0,1 µg de DNA plasmidial diluído em TE. As leveduras foram eletroporadas com o Gene Pulser *BIO-RAD* com uma capacitância de 25 µFD e uma voltagem de 1,50 kV em cubetas de 0,2 cm. E o Pulse Controller *BIO-RAD* a uma resistência de 200 Ω.

Análise de restrição.

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactéria foram clivados com as enzimas de restrição respectivas e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% a uma voltagem de 100 volts.

Extração de fragmentos de DNA de gel de agarose.

Após a eletroforese das amostras de DNA a 100 V em gel de agarose, os fragmentos de DNA foram purificados usando o sistema *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen). Os DNAs foram passados por uma coluna, sendo ligados a uma membrana de sílica-gel, lavagem com álcool e o DNA puro foi eluído com tampão EB fornecido pelo kit.

Seqüenciamento.

DNA plasmidial extraído de *E. coli* usando o sistema *CONCERT (GIBCO-BRL)* foi seqüenciado com o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PERKIN ELMER), o qual contém AmpliTaq® DNA Polymerase, BigDye terminadores e todos os componentes requeridos para esta reação. Usando as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 1', (desnaturação a 94°C por 20", anelamento a 52°C por 20", elongação a 60°C por 4') 40 ciclos.

Seleção de clones através do sistema do duplo híbrido (“two hybrid”)

Para esta seleção foi usado o método de duplo híbrido (Vojtek and Hollenberg, 1995) mediante o qual se analisa a interação de duas proteínas *in vivo* em levedura (Figura 5). Este sistema serve para estabelecer ou confirmar interações entre duas proteínas conhecidas ou para a busca em bibliotecas genômicas ou de cDNAs de proteínas que interagem com uma proteína alvo. Os plasmídeos construídos para codificar as duas proteínas híbridas foram o pBTM-116 (Bartel et al., 1993) e o pACT (Durfee et al., 1993) e pGAD (James et al., 1996). No pBTM-116 foi clonado o gene *NOP17* “downstream” da sequência codificadora do “DNA-Binding Domain” de lexAp o qual está sob o controle do promotor constitutivo ADH1, o “polylinker” encontra-se imediatamente depois do BD e a marca de seleção em levedura é TRP1. No pACT e pGAD o “Activation Domain” (AD, Domínio de ativação) de GAL4p está sob o controle do mesmo promotor constitutivo presente em pBTM.

No pACT, “downstream” da sequência do AD encontra-se inserida uma biblioteca de cDNAs no sítio de XhoI. A biblioteca utilizada foi ATCC 87002 (American Type Culture Collection).

Teste de Atividade de β -Galactosidase

Ensaio de X-Gal (Vojtek and Hollenberg, 1995). Este ensaio é um método bastante sensível para testar se as colônias nas placas estão expressando β -Galactosidase. As colônias de levedura crescidas por 2 a 3 dias em meio sólido foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas com nitrogênio líquido por 30 segundos. Depois, as membranas foram colocadas em Buffer Z contendo X-gal (500 μ g/mL) e incubadas a 37° C até o aparecimento de cor, por um período máximo de duas horas.

Figura 5. Análise de interação entre Nop17p e proteínas codificadas por uma biblioteca de cDNAs através do sistema do duplo-híbrido. Quando as duas proteínas híbridas interagem na célula, a expressão dos genes repórteres *LacZ* e *HIS3* é ativada. *HIS3* e *LacZ* estão dispostos em diferentes partes do genoma.

Ensaio de ONPG (Miller, 1972). O nível de expressão de *lacZ* em células de levedura foi quantificado através deste ensaio colorimétrico de atividade de β -Galactosidase usando como substrato ONPG (*O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside). Células de levedura crescendo a 30° C por 18 horas em constante agitação até uma OD₆₀₀ de 0,5-1,0 foram centrifugadas e ressuspensas em Buffer Z. Em seguida, estas foram lisadas com “glass beads”. Ao extrato protéico adicionou-se ONPG (4 mg/mL em tampão fosfato 100 mM; ver soluções) e foi incubado a 37° C por 15 minutos até 2 horas. Depois foi medida a atividade de *LacZ* a OD₄₂₀.

A atividade da β -Gactosidase foi calculada mediante a seguinte relação:

$$\text{Unidades da Atividade } \beta\text{-Galactosidase} = \text{OD}_{420}(\text{extrato}) / \text{OD}_{600}(\text{células})$$

SDS-PAGE

Os extratos protéicos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo protocolo em Sambrook et al., (1989).

Western Blotting

Após eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979) em tampão de transferência gelado (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glycine; 15% metanol). Esta transferência foi feita com uma corrente constante de 45 mA por um período de 60 minutos.

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com PBS contendo 5% de BSA (albumina de soro bovino), sob leve agitação overnight a 4°C. Transcorrido este tempo, a membrana foi lavada repetidamente com PBS e posteriormente incubada por 2 horas em PBS contendo o anticorpo primário (anti-His *Amersham Biosciences*). A membrana foi lavada novamente com PBS e depois foi transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário (anti-mouse ou anti-rabbit ECL, *Amersham Biosciences*) por 2 horas. A membrana foi então submetida à lavagem final com PBS antes da revelação.

Para a revelação do Western blot, foi usado o kit ECL (*Amersham Biosciences*) que se baseia na conjugação do anticorpo secundário anti-mouse com a “horseradish peroxidase” (HRP). A peroxidase reage com o substrato ao serem adicionados os reagentes de detecção

ECL, resultando em um sinal de quimioluminescência, que foi captado por um filme de Raios X.

Localização com GFP

Foi utilizada uma proteína híbrida constituída da Nop17p e a GFP (Green Fluorescent Protein). Esta proteína de fusão foi construída clonando o gene *NOP17* “downstream” da sequência de GFP já existente no vetor pGFP-N-FUS (Nidenthal et al., 1996).

A localização sub-celular das proteínas Nop1p, Nop56p, Nop58p e Snul3p foi analisada em fusão com a proteína fluorescente vermelha (RFP, Red Fluorescent Protein), fusionada ao N-terminal destas quatro proteínas. Células $\Delta nop17$ foram transformadas com os plasmídeos GFP e GFP-Nop17p junto com plasmídeos expressando as proteínas de fusão com RFP. Estas células foram inoculadas em meio mínimo (para indução do promotor Met25) em pH 7,0 até uma OD₆₀₀ de 0,5. Posteriormente, a cultura foi transferida para uma lâmina de microscópio. GFP e RFP foram excitadas com luz UV e a fluorescência foi detectada em microscópio de fluorescência. Imagens foram obtidas com um microscópio Nikon Eclipse E600, e as imagens digitais foram processadas usando Cool SNAP-Pro digital system de Media Cybernetics (Silver Spring, Maryland, USA).

Co-purificação

Células de levedura foram crescidas co-expressando as proteínas de fusão: His-Rrp43p (cauda de Histidina) e ProtA-Nop17p (ProtA: domínio Z da Proteína A de *Staphylococcus aureus*) em 1 litro de cultura até uma OD₆₀₀ 0,8-1,0. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão NET com PMSF e inibidores de proteases. Após a quebra de células com “glass-beads”, o extrato produzido foi incubado em uma coluna de Níquel por 2 horas, e em seguida foram realizadas lavagens com o mesmo tampão. Eluições com Imidazole 500 mM foram feitas e as frações foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE.

Para analisar a interação entre Nop58p e Nop17p foi usada a proteína de fusão GST-Nop17 previamente purificada de bactéria e o extrato protéico de levedura expressando a fusão ProtA-Nop58p. Os extratos foram incubados em resina de GST-Sepharose por 1 hora e eluídos com Glutathione.

Marcação in vivo de rRNA

Células de levedura parental e *Δnop17* foram incubadas a 37°C por 8 horas e posteriormente foram submetidas a um pulso de [methyl-³H]-metionina a uma concentração final de 100 μCi/mL por 2 minutos. Em seguida foi colocado um excesso de metionina não marcado (100 μg/mL) e foram coletadas e congeladas rapidamente em banho de etanol gelado a intervalos de tempo de 0, 2, 4, 8, 12 e 16 minutos. Para marcação com uracila radioativa, as células parental e *Δnop17* foram incubadas a 37 °C por 18 horas e em seguida submetidas ao pulse-chase por 5 minutos na presença de ³H-uracil radioativo (50 μCi/mL) e depois coletadas a intervalos de tempo de 0, 3, 10, 20 e 60 minutos.

Gradiente de Polissomos

Células de levedura parental e *Δnop17* foram incubadas a 25° C por 18 horas, e em seguida foram transferidas a 37° C e coletadas a intervalos de tempo de 0 e 8 horas. Extratos celulares foram preparados em tampão BBA com inibidores de proteases e colocadas em solução de sacarose de 5% a 47%. Os gradientes foram corridos por 2 horas a 39000 rpm em rotor SW41 da Beckman (tubos polyallomer). Posteriormente o gradiente foi analisado por ultravioleta OD 254nm.

3. RESULTADOS

Seleção de proteínas que interagem com Nop17p

Com o fim de estudar a função da proteína Nop17p, iniciamos uma análise de interação de proteínas através do método de duplo híbrido, usando como isca esta proteína. Para tanto, foram usadas duas proteínas híbridas recombinantes, um híbrido contendo o “DNA-binding Domain”-BD (Domínio de ligação ao DNA) de LexAp fusionado com a proteína Nop17p; e outra proteína de fusão constituída pelo “Activation Domain”-AD (Domínio de ativação de transcrição) de Gal4p fusionado a uma biblioteca de cDNAs de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes dois híbridos foram expressos por dois plasmídeos na levedura L40 e a interação entre as duas proteínas híbridas ativa a transcrição dos genes repórteres dispostos em lugares diferentes do genoma (Figura 5).

A cepa de levedura *S. cerevisiae* L40 contém em seu genoma dois genes repórteres *HIS3* e *lacZ*, cuja expressão é controlada por uma região promotora que contém seqüências de reconhecimento da proteína LexAp bacteriana. Esta cepa só é capaz de crescer em meio sem histidina, e de expressar β -Galactosidase, quando as duas proteínas híbridas codificadas pelos plasmídeos interagirem, ativando os promotores.

A seqüência codificadora da proteína Nop17p foi inserida no plasmídeo pBTM-116 e posteriormente este plasmídeo foi transformado na cepa L40 de *S. cerevisiae*. A cepa resultante, L40/pBTM-NOP17, foi então transformada com o plasmídeo pACT-cDNA library (ATCC 87002; especificações da Biblioteca em Material e Métodos). Esta biblioteca já tinha demonstrado uma alta eficiência em trabalhos anteriores (Zanchin and Goldfarb, 1999b; Oliveira et al., 2002).

Foram realizadas duas transformações de L40/pBTM-NOP17 com a biblioteca de cDNAs e as células foram plaqueadas diretamente em meio seletivo para seleção de clones positivos para interação entre as proteínas (placas sem histidina). 300 colônias His⁺ foram obtidas e subseqüentemente submetidas a teste de expressão de *lacZ*.

Dos 300 clones que demonstraram expressão de *HIS3*, 22 foram positivos também para *lacZ*, e estes foram submetidos à análise subseqüente. O DNA plasmidial foi extraído destes clones positivos e transferido por transformação para a cepa bacteriana HB101, e

plaqueada em meio mínimo M9 com ampicilina e prolina para seleção do plasmídeo pACT, o qual contém a biblioteca de cDNAs. HB101 tem uma mutação no gene *leuB*, o qual pode ser parcialmente complementada pelo gene *LEU2* de levedura que está contido no pACT, e não no pBTM. As bactérias que contêm o pBTM crescem mais lentamente em meio mínimo, possibilitando uma seleção de clones de bactéria contendo o plasmídeo pACT. O DNA plasmidial foi extraído a partir de HB101 e submetido a uma análise de restrição, o que nos permitiu observar diferentes padrões entre pBTM e pACT em electroforese em gel de agarose.

Clones de pACT-cDNA identificados pela análise de restrição foram seqüenciados. Cada clone foi confrontado pelo programa BLAST do Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>; SGD), o qual nos entregou coordenadas cromossomais (número de cromossomo, fita codificadora e posição), ORF e nome do gene; informação adicional da ORF foi extraída do Yeast Protein Database (YPD; <http://www.proteome.com>).

Nop17p, usada como “isca” no sistema de duplo híbrido, interagiu positivamente com oito clones obtidos em diferentes transformações, os quais confirmaram a interação ao ser re-transformados na cepa L40/pBTM-NOP17. Os clones correspondem aos seguintes genes: *RRP43*, *NOP58* (dois clones), *YPL146C*, *YER172C*, *YGL231C*, *YKR071C* e *YLR323C* (Figura 6 e Tabela 4).

O gene *RRP43* codifica a proteína Rrp43p, componente do exossomo, complexo de exonucleases que está envolvido no metabolismo de RNA. O exossomo tem um papel fundamental na maturação de rRNAs, atuando diretamente no processamento do 5.8S e influenciando a formação do 18S e 25S. Também atua no processamento de snoRNAs e na degradação de mRNAs como um regulador da expressão gênica (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997; Zanchin and Goldfarb, 1999a,b; Allmang et al., 1999a,b; Oliveira et al., 2002).

A

B

Figura 6. Análise da interação entre Nop17p e outras proteínas celulares através do sistema do duplo híbrido. **A.** Crescimento em placas sem histidina. Somente clones expressando proteínas que interagem com Nop17p são capazes de crescer em meio sem histidina, através da ativação da transcrição de *HIS3*. **B.** Análise da expressão de *lacZ* através da detecção de atividade de β -Gal na presença de X-Gal. ++, +: controles positivos de interação no duplo-híbrido; -: controle negativo, L40/pBTM-NOP17/pGAD; 155, 182, 221, 222, 247, 256 e 266: clones de cDNA obtidos no duplo-híbrido.

Nº Clones	Gene	Cromossomo	Descrição do Locus
152, 155	YOR310C	XV	<i>NOP58</i> ; proteína nucleolar; processamento de rRNA
182	YCR035C	III	<i>RRP43</i> ; componente do exossomo
221	YLR323C	XII	Gene essencial; função não caracterizada
222	YKR071C	XI	Gene essencial; função não caracterizada
247	YPL146C	XVI	<i>NOP53</i> ; proteína nucleolar; processamento de rRNA.
256	YGL231C	VII	ORF hipotética
266	YER172C	V	<i>BRR2</i> ; fator de splicing; helicase dependente de ATP

Tabela 4. Interações novas obtidas através do sistema do duplo-híbrido com a proteína Nop17p. A cepa de levedura L40, contendo o plasmídeo pBTM-NOP17, foi transformada com uma biblioteca de cDNAs de levedura, clonada no vetor pACT, e os clones expressando *HIS3* e *lacZ* foram isolados. O seqüenciamento dos plasmídeos isolados desses clones revelou a obtenção dos cDNAs acima.

A interação com Rrp43p sugeriu um envolvimento de Nop17p no metabolismo de RNA, possivelmente nos mesmos mecanismos nos quais o exossomo atua. A interação observada entre as proteínas Rrp43p e Nop17p já tinha sido encontrada anteriormente pelo mesmo sistema, quando BD-Rrp43p tinha sido utilizada como isca. O fato de esta interação ser fraca no sistema do duplo-híbrido também nos indicou que Nop17p poderia estar interagindo transitoriamente com Rrp43p na célula ou possivelmente teria um papel regulador (Figura 7A e 7B).

NOP58, gene essencial em *S. cerevisiae*, codifica uma proteína nucleolar que faz parte do “core” de snoRNPs de box C/D, como U3 e U14, envolvidos nas clivagens dos sítios A₀, A₁ e A₂ do pré-rRNA 35S, assim como dos snoRNPs de box C/D envolvidos em metilação do pré-rRNA. A depleção do gene *NOP58* leva a um defeito no processamento do pré-rRNA 35S, e conseqüentemente, a um defeito na maturação do rRNA 18S e em menor grau do 25S (Venema and Tollervey, 1999). A interação entre a proteína Nop17p e a proteína Nop58p mostrou ser bastante forte, e também é importante observar que nós obtivemos dois clones de *NOP58* no “screening” do duplo híbrido (Figura 7A e 7B).

Estes resultados iniciais de interação foram um ponto de partida para um estudo mais aprofundado de caracterização da função de Nop17p, como descreveremos ao longo desta tese.

Confirmação de interações encontradas no duplo híbrido

A interação encontrada entre Nop17p e as proteínas Rrp43p e Nop58p foram confirmadas por outros métodos de análise de interação: pull-down e co-imunoprecipitação. Para isto, construímos diferentes combinações de proteínas de fusão que foram expressas na mesma levedura ou em *E. coli*.

Na análise de interação entre Rrp43p e Nop17p, duas fusões foram co-expressas: Nop17p fusionada com o “tag” ProtA (domínio Z da Proteína A de *Staphylococcus aureus*) e Rrp43p fusionada a uma cauda de histidina (His₆). His-Rrp43 foi imobilizada incubando o extrato total de levedura com Níquel-Sepharose. Depois da lavagem da resina, eluição do

Figura 7. Análise de interação entre Nop17p e as proteínas Rrp43p e Nop58p. **A.** Teste de crescimento em meio sem histidina. **B.** Teste de Xgal. **C.** Confirmação da interação através de co-imunoprecipitação. As fusões His-Rrp43p e ProtA-Nop17p co-expressas na levedura foram incubadas em resina de níquel-sepharose e eluídas com Imidazol. His-Rrp45p e ProtA-Nop17p foram testadas como controle negativo. Imunoblot com anticorpo anti-mouse e anti-His detectou as proteínas Rrp43p e Nop17p eluindo na mesma fração. **D.** Foram incubadas em resina de IgG-sepharose as fusões A-Nop58p e GST-Nop17p e posteriormente eluídas. Imunoblot com anticorpo anti-GST demonstrou que a ProtA-Nop58p só co-purificou na presença da GST-Nop17p, mas não com GST.

material ligado e detecção por imunoblot, ProtA-Nop17p e His-Rrp43p foram detectadas na fração eluída, confirmando sua interação. Experimento em paralelo, com His-Rrp45p e ProtA-Nop17p demonstrou que Nop17p não foi co-eluída com Rrp45p, validando a especificidade da interação Rrp43p-Nop17p (Figura 7C).

A interação entre Nop17p e Nop58p foi analisada usando a proteínas de fusão ProtA-Nop58p expressa em levedura e a proteína de fusão GST-Nop17p (Glutathione-S-transferase) expressa em *E. coli*. Extrato protéico da cepa expressando ProtA-Nop58p foi incubado junto com IgG-sepharose e GST-Nop17p previamente purificada (Figura 7D). O controle foi feito usando extrato de ProtA-Nop58p e GST (sem fusão com outra proteína). Os resultados confirmaram a interação específica de Nop17p com Rrp43p e com Nop58p.

Células *Δnop17* apresentam um fenótipo termo-sensível

Para o estudo da função de Nop17p usamos mutantes de deleção, uma estratégia bastante útil na investigação da função de proteínas. A cepa *Δnop17* mostrou uma taxa de crescimento mais lenta que a cepa selvagem e este defeito no crescimento é mais severo quando as células *Δnop17* foram incubadas em temperaturas mais altas, tais como 30°C e 37°C mostrando ter um fenótipo termo-sensível (Figura 8). A curva de crescimento em meio líquido mostrou que a taxa de divisão celular da *Δnop17* começa a diminuir quatro horas depois da transferência das células de 25°C para 37°C. O fenótipo termo-sensível de *Δnop17* é complementado quando esta cepa é transformada com um plasmídeo contendo uma cópia de *NOP17*. O crescimento deficiente de *Δnop17* a 37°C nos levou a levantar a hipótese de que Nop17p fosse uma proteína de choque térmico. Entretanto, incubação de células selvagem a 37°C não resultou em níveis aumentados de mRNA *NOP17* (dados não mostrados).

Após o fenótipo termo-sensível de *Δnop17* ter sido estabelecido, e dado que Nop17p interage com proteínas envolvidas na biogênese dos ribossomos, nós decidimos analisar o perfil de polissomos da cepa *Δnop17*. Os polissomos foram analisados por gradiente de sacarose a partir de células *Δnop17* e *NOP17*, incubadas por oito horas a 37°C. As células

Figura 8. Análise de termo-sensibilidade do mutante de deleção do gene *NOP17*. Cepas parental e $\Delta nop17$ foram plaqueadas em meio YPD e incubadas por 48h a 25°C , 30°C ou 37°C. Embora o gene *NOP17* não seja essencial na célula, o mutante de deleção é termo-sensível, crescendo bem mais devagar que a cepa parental a 37°C.

Δnop17 mostraram uma redução nos polissomos e na quantidade total de ribossomos, sugerindo uma deficiência na biogênese de ribossomos, que é coerente com a interação de Nop17p com proteínas envolvidas neste processo (Figura 9).

Análise de Processamento de rRNA em *Δnop17*

Visto que Nop17p interage com proteínas envolvidas no processamento do pré-rRNA e sua falta na célula origina redução na quantidade de polissomos, decidimos investigar se Nop17p estaria envolvida em algum processo da síntese dos ribossomos. Analisamos então o processamento de pré-rRNA na cepa *Δnop17* através de “pulse-chase labeling” com [3H]uracila e [metil-3H]-metionina.

Células *Δnop17* e selvagem foram incubadas por oito horas a 37°C e depois transferidas para meio contendo uracila ou metil-metionina marcadas radioativamente. Em seguida, colocamos estas células em meio frio e, desta maneira, acompanhamos o caminho de processamento do pré-rRNA marcado. A cepa *Δnop17* apresentou uma diminuição na eficiência de formação dos rRNAs maduros 18S e 25S. Este defeito foi melhor observado quando as células foram incubadas por um período maior de tempo a 37°C (Figura 10). Depois de 18 horas na temperatura restritiva, as células *Δnop17* apresentam uma redução significativa dos rRNAs 18S e 25S, mas a síntese de 25S é menos afetada que a do rRNA 18S. A concentração menor de rRNAs maduros na cepa *Δnop17* pode ser devido à desestabilização ou processamento mais lento dos pré-rRNAs a 37°C.

Análise de “steady-state” de pré-rRNA e rRNAs foi realizada através de Northern blot usando sondas que hibridizam no pré-rRNA na região madura e nas regiões espaçadoras. Células *Δnop17* submetidas à temperatura não permissiva por até 12 horas revelaram um sutil defeito no processamento do pré-rRNA (Figura 11). A normalização dos rRNAs precursores e rRNAs maduros usando o controle interno (mRNA de actina) confirmou uma redução do rRNA maduro 25S em 35% e do pré-rRNA 20S uma redução de 80% após 12 horas a 37°C na *Δnop17*. Uma redução dos rRNAs maduros 5.8S e 18S também foi detectada (25% and 60%, respectivamente, depois de 12 horas at 37°C).

Figura 9. Gradiente de polissomos após incubar células por 8 horas a 37°C. Células *Δnop17* apresentaram queda nas concentrações dos polissomos e também mostraram menor quantidade das subunidades ribossômicas.

Figura 10. Marcação metabólica do rRNA. Pulse-chase labeling com [3H]uracila ou com [metil-3H]-metionina foi realizado incubando células $\Delta nop17$ e *NOP17* a 37°C por diferentes períodos de tempo. **A.** Marcação com [3H]Uracila de células crescidas a 37°C por oito horas. **B.** Marcação com [metil-3H]-metionina de células incubadas a 37°C por 18 horas. RNA foram coletados nos tempos indicados. As figuras mostram auto-radiografias de RNA transferido para membranas de Nylon e incubadas em En3Hance (Amersham Biosciences). Bandas correspondentes a rRNAs maduros e aos intermediários principais são indicadas.

Figura 11. Análise do processamento do pré-rRNA através de Northern blot. **A.** RNA total foi extraído a partir de células incubadas a 37°C por diferentes intervalos de tempo e hibridizados contra sondas específicas. As bandas correspondentes aos RNAs maduros e aos principais intermediários são indicados do lado direito. **B.** Via de processamento do pré-rRNA 35S em *S. cerevisiae* mostrando as posições relativas das sondas no pré-rRNA 35S.

O pré-rRNA 35S e o intermediário 23S foram detectados com sondas específicas para o 5'ETS (P1) e para o ITS1 (P3) (Figura 11; dados não mostrados). Normalização das bandas obtidas da hibridização com as sondas P2 e P3, mostrou que as razões 35S/18S e 23S/18S são mais altas (50% a 60%, respectivamente) na cepa *Δnop17* que na cepa selvagem. As baixas concentrações dos rRNAs maduros detectadas por análise de steady state (Northern blot) foram consistentes com os dados obtidos nos experimentos de pulse-chase labeling.

Os defeitos de processamento de rRNA apresentados pela cepa *Δnop17* a 37°C não foram devidos à mudança de temperatura, já que a cepa selvagem submetida às mesmas condições não apresentou estes defeitos. Ainda que os resultados de pulse-chase labeling e Northern blot descritos acima tenham indicado que Nop17p é requerida para processamento apropriado do pré-rRNA, estes não revelam que passo do processamento é inibido na falta de Nop17p. Devido ao acúmulo de pré-rRNAs 35S encontrado na cepa *Δnop17* e a interação encontrada com a proteína Nop58p, podemos sugerir um envolvimento de Nop17p nos primeiros passos de processamento de rRNA.

Complementação de *Δnop17*

Apesar do gene *NOP17* não ser essencial, células *Δnop17* cresceram de forma mais lenta à temperatura restritiva de 37° C (Figura 8). O fato da proteína Nop17p ter homologia com genes de *D. melanogaster*, *Anopheles gambiae*, camundongo e humano, indicou que Nop17p desempenha uma função conservada na evolução (Figura 12). Para investigarmos esta possibilidade, a sequência homóloga de humano FLJ20643 (*hNOP17*) foi clonada e a proteína hNop17p expressa em levedura sob o controle do promotor de *CUP1*. Como um controle a Nop17p também foi expressa nas mesmas condições.

Como é mostrado na figura 13, crescimento da cepa *Δnop17* expressando hNop17p a 37°C mostrou que o gene humano complementa parcialmente a deleção do gene *NOP17*. Isto indica que a proteína codificada pelo gene *hNOP17* desempenha uma função homóloga a Nop17p de levedura.

Figura 13. Supressão do fenótipo termo-sensível da cepa $\Delta nop17$ pela proteína homóloga humana hNop17p. A complementação parcial do fenótipo termo-sensível da cepa $\Delta nop17$ foi observada quando esta cepa expressava hNop17p.

Importância da interação entre as proteínas Nop17p e Nop58p

A proteína Nop58p foi determinante para o estudo do envolvimento de Nop17p no processamento de rRNA, indicando uma atuação nos primeiros passos do processamento. No “screening” de duplo híbrido com Nop17p foram obtidos dois clones do gene *NOP58* a partir da biblioteca de pACT-cDNAs (pACT-155 e pACT-259), estes são diferentes e estão truncados no extremo 5'. O clone *NOP58-155* contém uma sequência correspondente a 296 aminoácidos da porção carboxi-terminal (217aa-512aa) e o clone *NOP58-259* corresponde a 188 aminoácidos (324aa-512aa). Para complementar este estudo clonamos também outras regiões de Nop58p para análise de interação com Nop17p. Foram inseridas sequências parciais do gene *NOP58* correspondentes à porção amino-terminal da proteína nos vetores do duplo híbrido: o clone *NOP58-1.2*, com a sequência correspondente a 388 aa de porção amino-terminal, e o clone *NOP58-NH*, que tem uma sequência correspondente a 218 aa da porção amino-terminal. A interação destes novos clones com a Nop17p foi negativa (Figura 14).

Estes resultados indicaram que a região carboxi-terminal da proteína Nop58p é fundamental na interação com Nop17p. Os clones parciais de Nop58p obtidos no duplo híbrido mostraram também uma interação com Nop17p ainda mais forte que a proteína Nop58p inteira. Todos estes resultados apontam a proteína Nop17p como um fator regulador de Nop58p, e esta função reguladora estaria relacionada à interação encontrada com a região carboxi-terminal de Nop58p (região possivelmente envolvida na interação com os snoRNAs).

Domínios da proteína Nop58p			Interação com Nop17p
Clone	216aa	324aa	512aa
155 (296aa)			+++
259 (188aa)			+++
Nop58 (512aa)			+
1,2 (388aa)			-
NH (218aa)			-

Figura 14. Mapa de deleção dos mutantes de Nop58p usados neste trabalho. Os mutantes de deleção foram clonados nos vetores pGAD e pBTM para a análise de interação.

Nop17p não liga snoRNAs, mas afeta a ligação de Nop58p

Muitas proteínas envolvidas em clivagem e modificação do pré-rRNA ligam snoRNAs. Para estudar se Nop17p interage com snoRNAs, foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação, utilizando-se as proteínas de fusão ProtA-Nop17p e ProtA-Nop58p. ProtA-Nop58p co-imunoprecipitou snoRNAs de box C/D, mas não snoRNAs de box H/ACA, como esperado. Já ProtA-Nop17p não co-imunoprecipitou snoRNAs (dados não mostrados). Esses resultados indicam que Nop17p não liga diretamente snoRNAs, mas pode interagir com os complexos snoRNPs de box C/D através de sua ligação a Nop58p.

Estudamos também qual era o efeito na ligação de Nop58p com snoRNAs na ausência de Nop17p. Células *Δnop17* e *NOP17* foram crescidas expressando ProtA-Nop58p à temperatura restritiva de 37°C, após 8 horas as células foram coletadas e extratos protéicos foram gerados para os ensaios de co-imunoprecipitação. RNA extraído das diferentes frações foram analisados por Northern blot. Como é mostrado na figura 15A os snoRNAs U3 e U14 (de box C/D) se associam mais fortemente a ProtA-Nop58p nas células *Δnop17* que nas células *NOP17*. Este resultado indica que Nop17p afeta a interação de Nop58p com determinados snoRNAs de box C/D. Para confirmar se este resultado era ocasionado por diminuição da afinidade da Nop58p pelos snoRNAs e não pela estabilidade dos mesmos, analisamos os níveis de expressão de U3 snoRNA. Como é mostrado na figura 15B o steady state não é afetado na cepa *Δnop17*.

Este resultado favorece a hipótese de que a proteína Nop17p afete a ligação de Nop58p aos snoRNAs e por esta razão, verificamos se Nop17p competia com essa ligação. Extratos provenientes de cepas *Δnop17* e selvagem expressando ProtA-Nop58p foram incubados com proteína GST-Nop17p purificada de *E. coli* e submetidos a co-imunoprecipitação. RNA foi extraído da fração correspondente ao material ligado e analisado através de Northern blot. Surpreendentemente, GST-Nop17p não parece inibir a ligação de ProtA-Nop58p a snoRNAs, mas ao contrário, a adição de GST-Nop17p parece estabilizar ProtA-Nop58p *in vitro*, levando a um aumento na quantidade de snoRNA U3 co-precipitado (Figura 16).

Figura 15. **A.** Co-imunoprecipitação de snoRNPs com A-Nop58p em células selvagem e *Δnop17*. RNA co-imunoprecipitados foram analisados depois de PAGE e Northern blot. 5S rRNA foi utilizado com controle interno por se ligar inespecificamente à coluna de IgG-sepharose. **B.** Análise onde se mostra que o “steady-state” do snoRNA U3 na ausência de Nop17p não é afetado.

Figura 16. Co-ip de snoRNPs com A-Nop58p. Extrato total de levedura expressando A-Nop58p foi utilizado para verificar co-imunoprecipitação de snoRNAs na ausência de Nop17p ou na presença de 10 µg ou 100 µg de Nop17p purificada de *E. coli*. RNAs co-imunoprecipitados foram analisados depois de PAGE e Northern blot. 5S rRNA foi utilizado com controle interno.

A proteína Nop17p se localiza no núcleo

Complementando a análise de processamento de pré-rRNA estudamos também onde a proteína Nop17p estava localizada na célula. Esta localização foi determinada usando uma proteína de fusão com GFP (Green Fluorescent Protein). Uma proteína de fusão RFP-Nop1p (Red Fluorescent Protein) foi usada como um marcador nucleolar. As células *NOP17* foram co-transformadas expressando GFP e RFP-Nop1p ou GFP-Nop17p e RFP-Nop1p e posteriormente foram analisadas sob um microscópio de fluorescência. GFP-Nop17p co-localiza com RFP-Nop1p, indicando uma localização nucleolar para Nop17p (Figura 17). A proteína de fusão GFP-Nop17p era funcional em células de levedura, já que complementou o fenótipo termo-sensível da cepa *Δnop17* (Figura 13). Este resultado de localização nucleolar de Nop17p confirmou os dados de interação com Rrp43p e Nop58p e o envolvimento desta proteína no processamento do pré-rRNA.

Proteínas de snoRNP de box C/D não estão localizadas corretamente na cepa *Δnop17*

Para determinar o efeito de Nop17p formação ou estabilização dos complexos snoRNP de box C/D, usamos células *Δnop17* e selvagem co-expressando GFP-Nop17p e fusões das proteínas do “core” de box C/D fusionadas a RFP. Nestes experimentos, observamos que na cepa *Δnop17* expressando somente GFP e RFP-Nop1p, a fusão RFP-Nop1 estava distribuída na célula, presente tanto no núcleo como no citoplasma, e não mais concentrada no nucléolo (Figura 18A). Já *Δnop17* expressando GFP-Nop17p mostrou uma esperada localização nucleolar para RFP-Nop1p, sugerindo que a presença de Nop17p é importante para a apropriada localização sub-celular de Nop1p. Análise de localização das fusões RFP-com Nop56p, Nop58p e Snu13p mostraram que a localização destas proteínas também são afetadas em células depletadas de Nop17p (Figura 18), indicando que Nop17p é necessária para a retenção nucleolar das proteínas do core do complexo snoRNP de box C/D. Dados semelhantes tinham sido obtidos com células *Δnop58*, nas quais Nop1p também não se concentra no nucléolo (Wu et al., 1998). Esses resultados com Nop17p nos permitem levantar a hipótese de que Nop17p também faça parte do “core” de snoRNPs de box C/D, ou que esteja envolvida na montagem e/ou estabilização dos complexos snoRNP de box C/D.

Figura 17. Localização subcelular de Nop17p. A fusão GFP-Nop17p expressa em células *NOP17* foi localizada no mesmo compartimento que a RFP-Nop1p (núcleo) e em maior concentração no nucléolo, corroborando os dados de análise de processamento de pré-rRNA. .

Figura 18. Localização subcelular dos componentes de snoRNP de box C/D (Nop1p, Nop56, Nop58p e Snu13p) na cepa $\Delta nop17$. Cepa $\Delta nop17$ expressando as proteínas de fusão GFP-Nop17p e RFP-Nop1p, RFP-Nop56p, RFP-Nop58p e RFP-Snu13p respectivamente

Mapa de interações do complexo snoRNP de box C/D

Como foi observado em experimentos descritos neste trabalho, a proteína Nop17p está envolvida no processamento de rRNA através da sua interação com a proteína Nop58p. Para determinar se a ação da Nop17p sobre o rRNA era consequência da interação unicamente com a Nop58p, decidimos examinar a interação da Nop17p com os outros componentes dos snoRNPs box C/D. Através do duplo híbrido analisamos as interações entre os componentes do complexo incluindo a proteína Nop17p.

Nop17p foi testada pelo duplo híbrido com Nop1p, Nop56p, Nop58p e Snul3p. Na figura 19 é mostrada a interação de Nop17p unicamente com Nop58p o que determina que Nop17p esteja envolvida em processamento de rRNA através de sua interação com Nop58p.

As interações entre os componentes do complexo também foram analisadas através de duplo híbrido e são descritas na tabela 5 e mostradas na figura 19. As regiões no snoRNA as quais as proteínas podem se ligar são deduzidas por analogia aos dados do snoRNP de *Xenopus* (Cahill et al., 2002). Nop1p tem dois possíveis sítios de ligação, Box D e D', e também interage com Nop56p e Snul3p. Nop56p pode ligar ao Box C'e interage com Nop1p e Snul3p. A ortóloga Snul3p de *Xenopus* liga-se ao Box D' e neste trabalho mostramos que Snul3p interage fortemente com Nop1p e Nop56p e fracamente com Nop58p. Com base nos dados apresentados neste trabalho, foi possível estruturar um mapa de interações de Nop58p com os outros componentes do complexo, assim como também predizer um modelo do snoRNP de box C/D de levedura (Figura 20).

Figura 19. Análise da interação entre os componentes do complexo snoRNP de box C/D incluindo Nop17p. **A e C.** Crescimento em placas sem histidina. Somente células contendo proteínas interagindo são capazes de crescer em meio sem histidina, através da ativação da transcrição de *HIS3*. **B e D.** Análise da expressão de *lacZ* através da detecção de atividade de β -Gal na presença de X-Gal.

		Proteínas fusionadas com o Binding Domain						
		Nop1p	Nop56p	Nop58p	Nop58p 155	Nop58p 259	Snu13p	Nop17p
Activation Domain	Nop1p						++	
	Nop56p	+			++		++	
	Nop58p	+			++		++	++
	Nop58-155				++			++
	Nop58-259				++	++		++
	Snu13p	+			++			
	Nop17p			++	++	++		

Tabela 5. Resumo das interações entre as subunidades do snoRNP de box C/D e Nop17p identificadas através do duplo-híbrido.

Figura 20. Modelo de snoRNP de box C/D baseado nas interações encontradas neste trabalho, entre as subunidades do snoRNP de box C/D e Nop17p. (Modelo baseado em Cahill et al., 2002).

4. DISCUSSÃO

A ORF NOP17 codificada pelo gene YHR034C, é uma proteína conservada encontrada em eucariotes, com uma ortóloga hipotética humana (FLJ20643) que mostra uma identidade de aminoácidos de 28,6% com Nop17p de levedura, e resgata parcialmente o fenótipo termo-sensível da cepa *Δnop17* (Figura 13). A complementação do fenótipo termo-sensível é parcial, possivelmente porque hNop17p tem baixa similaridade com Nop17p. Também é possível que hNop17p não esteja localizada no núcleo de levedura na fusão com utilizada neste trabalho, já que sua localização ainda não foi analisada. A obtenção de quimeras formadas pela fusão entre as proteínas humana e de levedura expressadas em *Saccharomyces cerevisiae* poderiam talvez render resultados mais esclarecedores. É interessante notar, entretanto, que hNop17p foi isolada como parte de um complexo nuclear, confirmando a hipótese de conservação de função (Zhang et al., 2004).

Nop17p foi identificada como uma proteína interagindo com a Rrp43p no sistema de duplo híbrido (Oliveira et al., 2002; Gonzales et al., 2005). Caracterização posterior de proteínas interagindo com Nop17p também revelou uma interação com Nop58p. Estes resultados proveram uma forte evidência de que Nop17p funcione no processamento de pré-rRNA porque, ainda que em diferentes passos, Rrp43p e Nop58p são requeridos para a maturação de RNA ribossomal. Consistente com estas interações, os experimentos de co-localização da proteína de fusão GFP-Nop17p com RFP-Nop1p indicam que Nop17p esteja restrita ao compartimento nuclear, com maior concentração no nucléolo. A proteína de fusão GFP-Nop17p é funcional já que complementa a *Δnop17* (Figura 13), reforçando a hipótese de que Nop17p seja nuclear.

A interação com Nop58p indicou que Nop17p esteja envolvida na função de snoRNP de box C/D. Evidência adicional corroborando esta hipótese foi obtida através de análise de localização sub-celular dos quatro componentes do “core” deste tipo de snoRNP em uma cepa *Δnop17*. Na ausência de Nop17p as proteínas Nop1p, Nop56p, Nop58p e Snu13p mostraram perda de retenção nuclear, indicando que Nop17p seja requerida para a localização nuclear ou para a montagem estável do complexo de snoRNP de box C/D. Já tinha se observado que a depleção de Nop58p faz com que Nop1p não mais se concentre no nucléolo (Wu et al., 1998). Foi demonstrado mais recentemente que a deficiência em

Sen1p, uma helicase DNA/RNA do tipo I, também leva a uma perda de localização de Nop1p e Ssb1p (Ursic et al., 1995; Ursic et al., 2004). A distribuição das proteínas do “core” de snoRNP de box C/D no núcleo e no citoplasma indica uma deficiência na montagem deste complexo, já que os quatro componentes e várias proteínas adicionais são requeridas para um processamento exato, localização e montagem do complexo snoRNP de box C/D no nucléolo (Verheggen et al., 2001). A perda de localização das proteínas de snoRNP de box C/D na cepa *Δnop17* indica um controle sensível entre o nível de expressão e a formação do complexo nucleolar, já que a ausência ou diminuição de uma única subunidade altera a localização nos componentes restantes do complexo.

As interações entre os componentes do “core” foram analisadas usando o duplo híbrido. As regiões do snoRNA nas quais as subunidades protéicas do complexo podem se ligar foram extraídas por analogia a dados no snoRNP12 de *Xenopus* mas não foram testadas neste trabalho. Nop1p tem dois sítios de ligação, box D e D’, e também interage com Nop56p e Snu13p. Nop56p pode se ligar ao box C’ e interage com Nop1p e Snu13p. O ortólogo de Snu13p em *Xenopus* se liga ao box D’ (Szewczak et al., 2002) e aqui foi encontrado que Snu13p interage fortemente com Nop1p e Nop56p e fracamente com Nop58p. Estas interações nos permitiram propor um modelo de trabalho para o complexo snoRNP de box C/D em *Saccharomyces cerevisiae* (figura 20). De acordo com esse modelo, Nop1p pode se ligar aos boxes D e D’ e interagir com Snu13p e Nop56p ligadas ao box C’ do snoRNA. Nop58p se liga ao box C do snoRNA e interage com Nop17p, o qual pode interagir transientemente com o complexo snoRNP durante sua montagem, ou ser parte constitutiva do complexo snoRNP, o que ainda precisa ser determinado.

A caracterização da função de genes na levedura *S. cerevisiae* depende amplamente da análise de cepas mutantes condicionais construídas por deleção de um gene alvo ou por mutagênese aleatória. Esta estratégia é amplamente eficiente para genes essenciais, mas para a função de genes não essenciais deve ser feita por outros métodos. A caracterização de Nop17p foi facilitada por que a cepa *Δnop17* incubada a 37°C mostrou um forte defeito no crescimento, o qual claramente revela que a função de Nop17p é requerida para ótimo crescimento celular em altas temperaturas. Entretanto, apesar de *NOP17* não ser um gene essencial a cepa deletada cresce mais lentamente que a selvagem mesmo na temperatura permissiva. Concomitantemente com a redução da taxa de crescimento há uma diminuição

global de formação de rRNA. Um pequeno acúmulo de pré-rRNA 35S e do intermediário 23 S foi detectado e a cinética de maturação de rRNA mostra que uma menor quantidade dos rRNAs maduros 18S e 25S são formados na cepa *Δnop17*. Este resultado indica que a diminuição de rRNAs maduros pode ser devida à desestabilização dos pré-rRNAs. A degradação rápida de pré-rRNAs foi observada em várias cepas com defeitos no processamento de pré-rRNA (Venema and Tollervey, 1999; Allmang et al., 2000; Kufel et al., 2003). Análise de rRNAs através de primer extension revelou a presença de produtos correspondentes a pré-rRNAs hiper-metilados na cepa *Δnop17* (Gonzales et al., 2005). O fato de Nop17p interagir com Nop58p e Rrp43p indica que Nop17p poderia mediar o sinal para degradação do pré-rRNA quando é supermetilado. Alternativamente, o pré-rRNA poderia estar mais exposto para modificação de nucleotídeos quando o processamento é mais lento ou defeituoso, resultando em precursores hiper-metilados, que são dirigidos mais tarde para degradação.

Interação de Nop17p com Nop58p pode ser importante para apropriada metilação do pré-rRNA. É interessante notar que o rRNA 5.8S, que não sofre metilação, é o rRNA menos afetado na cepa *Δnop17*. Nop17p não mostrou interação com Nop1p, a RNA metil-transferase (Galardi et al., 2002), mas já que o complexo snoRNP de box C/D completo é requerido para a atividade de metil-transferase, a deficiência de Nop17p provavelmente afeta o processamento do pré-rRNA através da sua interação com Nop58p. Este resultado é consistente com a alteração de localização das proteínas do “core” do complexo na cepa *Δnop17*. A informação obtida através de métodos atuais usados para investigar o processamento de pré-rRNA em levedura evidencia que muitas cepas condicionais apresentam defeitos sobrepostos, mas não é suficiente para inferir os papéis específicos de proteínas individuais. Por exemplo, Spb1p, uma proteína contendo um domínio de ligação ao AdoMet foi encontrada interagindo com Nop1p e Nop58p, mas não com snoRNAs (Pintard et al., 2000). Spb1p afeta o processamento do pré-rRNA, mas células mutantes não mostraram mudanças na metilação global do pré-rRNA, apesar de sua interação com Nop1p e Nop58p e ligação a AdoMet (Pintard et al., 2000). Nop17p não liga diretamente aos snoRNAs testados e sua deficiência não afeta a estabilidade de snoRNPs. Já Nop58p, um componente do “core” de snoRNP de box C/D, liga snoRNAs, incluindo U3, U14, U18 e U24 e é requerido para a estabilidade do snoRNAs (Lafontaine and Tollervey, 1999; Wu

et al., 1998). Nop58p foi identificada no complexo 90S (Grandi et al., 2002) e está envolvida na clivagem do pré-rRNA 35S dirigida pelo snoRNP U3 e também na metilação do pré-rRNA (Lafontaine and Tollervey, 1999; Sharma and Tollervey, 1999; Wu et al., 1998). Krogan e colaboradores mostraram que Nop58p e Nop17p foram encontrados no mesmo complexo de processamento de pré-rRNA. Análises de processamento de pré-rRNA e modificação nucleotídica em cepas *Δnop58* mostraram concentrações menores de rRNAs maduros, ainda que a metilação total de rRNAs não foi afetada (Lafontaine and Tollervey, 1999), mas a análise de metilação de sítios específicos não foi realizada naquele trabalho.

A cepa *Δnop17* mostrou defeitos de processamento de rRNA e de localização de proteínas de snoRNP de box C/D similares aos defeitos encontrados na cepa *Δnop58*. Entretanto, análise de metilação de alguns sítios nos rRNAs 18S e 25S nas cepas *Δnop17* e *Δnop58* revelaram que enquanto os rRNAs são mais metilados em *Δnop17*, eles são menos metilados na cepa *Δnop58* (Gonzales et al., 2005). Esses resultados indicam que embora Nop17p pareça estar envolvida na montagem e estabilização de snoRNP de box C/D, ela não deve fazer parte do core desse complexo. Esta hipótese precisa ainda ser confirmada através de experimentos complementares. Outra questão que ainda precisa ser respondida é a de qual metil-transferase é responsável pela hiper-metilação de rRNAs na cepa *Δnop17*, já que nesta cepa Nop1p está distribuída na célula, e não mais concentrada no nucléolo.

A co-precipitação mais eficiente dos snoRNAs U3 e U14 com ProtA-Nop58p na cepa *Δnop17* indica que Nop17p compita com snoRNAs para a ligação com Nop58p, regulando a atividade do snoRNP. Apesar de Nop17 influenciar esta ligação, os experimentos de competição *in vitro* indicaram que ela não compita com RNA na sua ligação a Nop58p (Figura 16). Experimentos posteriores de análise da ligação de Nop17 a snoRNP deverão esclarecer esse ponto. É interessante notar que recentes estudos com o ortólogo de Nop58p em archaea, Nop5p, mostraram que uma região carboxi-terminal dessas proteínas é conservada entre muitos organismos e é responsável pela ligação ao snoRNA (Aittaleb et al., 2003). Na nossa análise de duplo híbrido, Nop17p interage com a região carboxi-terminal de Nop58p. Entretanto nossos estudos de co-imunoprecipitação com A-Nop58 e GST-Nop17 purificada de *E. coli* não confirmaram a hipótese de competição. Os dados de localização das proteínas componentes do complexo snoRNP de box C/D mostraram que na

ausência da Nop17p elas não se concentram mais no núcleo, indicando que a Nop17 estaria envolvida na estabilização deste complexo na célula.

Nop17p pode ter um papel similar ao feito pela Imp3, a qual regula a atividade do snoRNP U3 (SSU procesome) mediando as interações de Imp4 e Mpp10p com o snoRNA U3 (Wehner et al., 2002). O significado da interação de Nop17p com a sub-unidade exossômica Rrp43p é mais difícil de ser interpretada. Com base dos dados no duplo híbrido, a interação Nop17p-Nop58p é mais forte que Nop17p-Rrp43p. Adicionalmente, Nop17p não interage com mutantes termo-sensíveis *rrp43p* no duplo híbrido (Chien et al., 1991; dados não mostrados). A depleção de Rrp43p na célula inibe fortemente o processamento nos sítios A0, A1, A2, e A3, e já que estas reações de processamento ocorrem por clivagens endonucleolíticas, o papel de Rrp43p, uma exonuclease hipotética, nestas reações deve ser indireto (Beltrame and Tollervy, 1995; Zanchin and Goldfarb, 1999; Oliveira et al., 2002). Rrp43p, como parte do exossomo, participa na formação do extremo 3' do rRNA 5.8S, degradação do 5'ETS e de pré-rRNA intermediários aberrantes, e está envolvida na síntese de muitos snoRNAs (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999a; Zanchin and Goldfarb, 1999b; van Hoof et al., 2000b). Os fenótipos comuns de células deletadas de Nop17p e Rrp43p são primeiras clivagens no pré-rRNA mais lentas e formação reduzida de rRNAs maduros, sugerindo que a interação Nop17p-Rrp43p seja importante unicamente para os primeiros passos de processamento.

Dados do duplo híbrido geral de levedura reportado por Fromont-Racine (Fromont-Racine et al., 1997) mostraram a possível interação entre Nop17p e Lsm8p. Isto poderia indicar que Nop17p esteja envolvida em splicing de pré-mRNA. Entretanto, a cepa *Δnop17* não mostrou defeito em splicing de pré-mRNA (dados não mostrados). É importante ressaltar que dados posteriores de complexos nucleares Lsm mostraram que as proteínas Lsm estão também envolvidas no processamento de pré-rRNA (Kufel et al., 2003). Células depletadas de proteínas Lsm mostraram degradação rRNAs maduros e acúmulo de intermediários de degradação do pré-rRNA (Kufel et al., 2003). Dessa maneira, a interação entre Nop17p e Lsm8p poderia ocorrer no contexto de processamento de rRNA, e não de splicing de mRNA.

Ainda que muitos snoRNAs já tenham sido caracterizados, a maior parte de proteínas específicas para os complexos snoRNPs ou fatores regulatórios ainda são desconhecidos.

Recentemente, muitas proteínas novas estão sendo isoladas, incluindo Naf1p. Esta proteína foi identificada como um fator interagindo transientemente com os snoRNPs de box H/ACA, e possivelmente é requerida para síntese de snoRNAs ou montagem dos snoRNPs (Dez et al., 2002; Fática et al., 2002b; Yang et al., 2005; Ballarino et al., 2005). A depleção de Naf1p causa um aumento nas concentrações de pré-rRNAs 23S e 35S e uma diminuição na quantidade de pré-rRNA 20S e rRNA 18S (Fática et al., 2002b). Defeitos similares são detectados na cepa *Δnop17* a 37°C, ainda que no caso da Naf1p, tempos muito mais longos são necessários para observar estes defeitos no processamento do pré-rRNA (Dez et al., 2002; Fática et al., 2002b).

Em conclusão, os resultados obtidos usando a cepa condicional *Δnop17* mostrou que o processamento de rRNA é afetado na ausência de Nop17p em altas temperaturas, levando a uma redução global da síntese de rRNA. O resultado observado com a depleção de Nop17p, que afeta a localização das proteínas do “core” de snoRNP de box C/D, fazendo com que essas proteínas se distribuam no núcleo e no citoplasma, indica que Nop17p esteja envolvida na montagem e/ou na estabilização do complexo de snoRNP de box C/D. Nop17p pode ainda ter um papel regulador, interagindo transientemente com os complexos de snoRNPs. Experimentos posteriores poderão esclarecer essas hipóteses.

5. REFERÊNCIAS

1. Aittaleb, M.; Rashid, R.; Chen, Q.; Palmer, J.R.; Daniels, C.J.; and Li, H. (2003). Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nat Struct Biol.* **10**(4):256-63.
2. Allmang, C.; Kufel, J.; Chanfreau, G.; Mitchell, P.; Petfalski, E.; and Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**: 5399-5410.
3. Allmang, C.; Petfalski, E.; Podtelejnikov, A.; Mann, M.; Tollervey, D.; Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'-5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**(16):2148-58.
4. Allmang, C.; Mitchell, P.; Petfalski, E.; and Tollervey, D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucl. Acids Res.* **28**, 1684–1691.
5. Baßler, J.; Grandi, P.; Gadal, O.; Leßmann, T.; Petfalski, E.; Tollervey, D.; Lechenr, J. and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol. Cell* **8**: 517-529.
6. Bachellerie, J.P.; Cavaille, J. (1997). Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci.* **22**(7):257-61.
7. Bachellerie, J.P.; Cavaille, J.; Huttenhofer, A. (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie.* **84**(8):775-90.
8. Balakin, A.G.; Smith, L.; and Fournier, M.J. (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* **86**(5):823-34.
9. Ballarino, M.; Morlando, M.; Pagano, F.; Fatica, A.; Bozzoni, I. (2005). The co-transcriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **25**(13):5396-403.
10. Bartel, P.L. and Fields, S. (1995). Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* **254**: 241-263.
11. Beltrame, M.; Tollervey, D. (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* **11**(4):1531-42.

12. Beltrame, M.; and Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18 S rRNA synthesis. *EMBO J.* **14**, 4350–4356.
13. Bernstein, K.A.; Gallagher, J.E.; Mitchell, B.M.; Granneman, S.; and Baserga, S.J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot Cell* **3**(6):1619-26.
14. Bousquet-Antonelli, C.; Presutti, C.; and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**(6):765-75.
15. Bouveret, E.; Rigaut, G.; Shevchenko, A.; Wilm, M.; and Seraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* **19**(7): 1661-1671.
16. Briggs, M.W.; Burkard, K.T.; and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J Biol Chem.* **273**(21):13255-63.
17. Brouwer, R.; Pruijn, G.J.; van Venrooij, W.J. (2001). The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma. *Arthritis Res.* **3**(2):102-6.
18. Burkard, K.T.; and Butler, J.S. (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Mol Cell Biol.* **20**(2):604-16.
19. Cadwell, C.; Yoon, H.J.; Zebajadian, Y.; and Carbon, J. (1997). The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol. Cell. Biol.* **17**:6175-6183
20. Caffarelli, E.; Fática, A.; Prislei, S.; De Gregório, E.; Fragapane, P.; and Bozzoni, I. (1996). Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved C and D boxes control both the processing reaction and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J.* **15**:1121-1131.
21. Cahill, N.M.; Friend, K.; Speckmann, W.; Li, Z.H.; Terns, R.M.; Terns, M.P., and Steitz, J.A. (2002). Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP. *EMBO J.* **21**(14):3816-28.
22. Cavaille, J.; Nicoloso, M.; Bachellerie, J.P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* **383**(6602):732-5.

23. Chiara, M.D.; Palandjian, L.; Feld Kramer, R.; Reed, R. (1997). Evidence that U5 snRNP recognizes the 3' splice site for catalytic step II in mammals. *EMBO J.* **16**(15): 4746-4759.
24. Chien, C.-T.; Bartel, P.L.; Sternglanz, R. and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9578-9582.
25. Chu, S.; Zengel, J.M.; and Lindahl, L. (1997). A novel protein shared by RNase MRP and RNase P. *RNA* **3**:382-91
26. Daugeron, M.C.; and Linder, P. (1998). Dbp7p, a putative ATP-dependent RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for 60S ribosomal subunit assembly. *RNA* **4**:566-81
27. Decatur, W.A.; and Fournier, M.J. (2003). RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem.* **278**(2):695-8.
28. Decker, J.C. (1998). The exosome: a versatile RNA processing machine. *Curr. Biol.* **8**: R238-R240.
29. Dez, C.; Noaillac-Depeyre, J.; Caizergues-Ferrer, M.; and Henry, Y. (2002). Naf1p, an essential nucleoplasmic factor specifically required for accumulation of box H/ACA small nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7053-7065.
30. Dower, W.J.; Miller, J.F.; and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**(13):6127-45.
31. Dragon, F.; Gallagher, J.E.; Compagnone-Post, P.A.; Mitchell, B.M.; Porwancher, K.A.; Wehner, K.A.; Wormsley, S.; Settlege, R.E.; Shabanowitz, J.; Osheim, Y.; Beyer, A.L.; Hunt, D.F.; and Baserga, S.J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**:967-970.
32. Durfee, T.; Becherer, K.; Chen, P.L.; Yeh, S.H.; Yang, Y.; Kilburn, A.E.; Lee, W.H.; and Elledge, S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.*, **7**, 555-569.
33. Eichler, D.C., and Craig, N. (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **49**: 179-239.
34. Fatica, A.; Cronshaw, A.D.; Dlakic, M. and Tollervy, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol. Cell* **9**: 341-351.

35. Fatica, A.; Dlakic', M.; and Tollervey, D. (2002b). Naf1 p is a box H/ACA snoRNP assembly factor. *RNA* **8**,1502-1514.
36. Filipowicz, W. and Pogacic, V. (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**: 319-327.
37. Finley D, Bartel B, Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**(6214):394-401.
38. Frischmeyer, P.A.; van Hoof, A.; O'Donnell, K.; Guerrierio, A.L.; Parker, R.; Dietz, H.C. (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**(5563): 2258-61.
39. Fromont-Racine, M.; Rain, J.C.; and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genet.* **16**, 277-282.
40. Fromont-Racine, M.; Mayes, A.E.; Brunet-Simon, A.; Rain, J.C.; Colley, A.; Dix, I.; Decourty, L.; Joly, N.; Ricard, F.; Beggs, J.D.; and Legrain, P. (2000). Genome-wide protein interaction screens reveal functional networks involving Sm-like proteins. *Yeast* **17**: 95-110.
41. Galardi, S.; Fatica, A.; Bachi, A.; Scaloni, A.; Presutti, C. and Bozzoni, I. (2002). Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **22**(19): 6663-6668.
42. Gautier, T.; Berges, T.; Tollervey, D.; and Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* **17**(12):7088-98.
43. Ganot, P.; Bortolin, M.L.; and Kiss, T. (1997). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**(5):799-809.
44. Ganot, P.; Jady, B.E.; Bortolin, M.L.; Darzacq, X.; and Kiss, T. (1999). Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol. Cell. Biol.* **19**:6906-6917.
45. Geerlings, T.; Vos, J.C.; and Raué, H.A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA* **6**:1698-1703.

46. Goldwasser, E.; and Heinrikson, R.L. (1966). The biochemistry of pseudouridine. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **5**:399-416.
47. Gonzales, F.A; Zanchin, N.I.T.; Luz, J.S.; and Oliveira, C.C. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a Novel Nop58p-Interacting Protein that is Involved in the Early Steps of Pre-rRNA Processing. *J Mol Biol.* **18**;346(2):437-55.
48. Grandi, P.; Rybin, V.; Bassler, J.; Petfalski, E.; Strauss, D.; Marzioch, M.; Schafer, T.; Kuster, B.; Tschochner, H.; Tollervey, D.; Gavin, A.C.; Hurt, E. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 7897- 7912.
49. Granneman, S.; and Baserga, S.J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res.* **296**(1): 43-50.
50. Green, R.; Noller, H.F. (1996). Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *RNA* **2**(10):1011-21.
51. Hamm, J.; Darzynkiewicz, E.; Tahara, S.M.; and Mattaj, I.W. (1990). The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal. *Cell.* **62**: 569–577.
52. Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**(4):557-80.
53. Henras, A.; Henry, Y.; Bousquet-Antonelli, C.; Noaillac-Depeyre, J.; Gelugne, J.P.; Caizergues-Ferrer, M. (1998). Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* **17**(23):7078-90.
54. Henry, Y.; Wood, H.; Morrissey, J.P.; Petfalski, E.; Kearsey, S.; and Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* **13**:2452–63.
55. Huang, G.M.; Jarmolowski, A.; Struck, J.C.; and Fournier, M.J. (1992). Accumulation of U14 small nuclear RNA in *Saccharomyces cerevisiae* requires box C, box D, and a 59, 39 terminal stem. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4456–4463.
56. Hughes, J.M.; Ares, M. Jr. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J.* **10**(13):4231-9.

57. Hurt, E.C.; McDowall, A.; and Schimmang, T. (1988). Nucleolar and nuclear envelope proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Cell. Biol.* **46**: 554-563.
58. James, P.; Halladay, J.; and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**: 1425-1436.
59. Jiang, W.; Middleton, K.; Yoon, H.J.; Fouquet, C.; and Carbon, J. (1993). An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4884-4893.
60. King, T.H.; Liu, B.; McCully, R.R.; and Fournier, M.J. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol Cell.* **11**(2):425-35.
61. Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* **20**(14):3617-22.
62. Kiss T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**(2):145-8.
63. Kiss-Laszlo, Z.; Henry, Y.; Bachellerie, J.P.; Caizergues-Ferrer, M.; and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**(7):1077-88.
64. Kiss-Laszlo, Z.; Henry, Y.; Kiss, T. (1998). Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J.* **17**(3):797-807.
65. Kolodrubetz, D.; and Burgum, A. (1991). Sequence and genetic analysis of NHP2: a moderately abundant high mobility group-like nuclear protein with an essential function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**:79-90
66. Kowalak, J.A.; Bruenger, E.; McCloskey, J.A. (1995). Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *J Biol Chem.* **270**(30):17758-64.
67. Kressler, D.; Linder, P.; and De la Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**(12):7897-912.
68. Krogan, N.J.; Peng, W.T.; Cagney, G.; Robinson, M.D.; Haw, R.; Zhong, G.; Guo, X.; Zhang, X.; Canadien, V.; Richards, D.P.; Beattie, B.K.; Lalev, A.; Zhang, W.; Davierwala,

- A.P.; Mnaimneh, S.; Starostine, A.; Tikuisis, A.P.; Grigull, J.; Datta, N.; Bray, J.E.; Hughes, T.R.; Emili, A.; and Greenblatt, J.F. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell*. **13**:225–239.
69. Kufel, J.; Allmang, C.; Petfalski, E.; Beggs, J.; Tollervy, D.J. (2003). Lsm Proteins are required for normal processing and stability of ribosomal RNAs. *Biol. Chem.*, **24**, 278(4):2147-56.
70. Kuhn, J.F.; Tran, E.J.; and Maxwell, E.S. (2002). Archaeal ribosomal protein L7 is a functional homolog of the eukaryotic 15.5kD/Snu13p snoRNP core protein. *Nucleic Acids Res.* **30**(4):931-41.
71. Lafontaine, D.L.J.; Bousquet-Antonelli, C.; Henry, Y.; Caizergues-Ferrer, M.; and Tollervy, D. (1998). The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev.* **12**(4):527-37.
72. Lafontaine, D.L.J.; and Tollervy, D. (1999). Nop58p is a common component of the box CCD snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA*, **5**, 455–567.
73. Lange, T.S.; and Gerbi, S.A. (2000). Transient nucleolar localization Of U6 small nuclear RNA in *Xenopus Laevis* oocytes. *Mol. Biol. Cell*. **11**: 2419–2428.
74. Lauber, J.; Plessel, G.; Prehn, S.; Will, C.L.; Fabrizio, P.; Groning, K.; Lane, W.S.; and Luhrmann, R. (1997). The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p. *RNA*. **3**(8): 926-941.
75. Li, H.D.; Zagorski, J.; and Fournier, M.J. (1990). Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **10**(3):1145-52.
76. Lindahl, L.; Archer, R.H.; and Zengal, J.M. (1992). A new rRNA processing mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **20**:295–301
77. Lowe, T.M.; and Eddy, S.R. (1999). A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science* **283**(5405):1168-71.
78. Lygerou, Z.; Allmang, C.; Tollervy, D.; Seraphin, B. (1996). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* **272**(5259):268-70.
79. Maden, B.E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **39**:241-303.

80. Mayes, A.E.; Verdone, L.; Legrain, P.; and Beggs, J.D. (1999). Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J.* **18**: 4321–4331.
81. Meier, U.T.; and Blobel, G. (1994). NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J. Cell Biol.* **127**:1505-1514
82. Mitchell, P.; Petfalski, E. and Tollervey, D. (1996). The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev.* **10**: 502-513.
83. Mitchell, P.; Petfalski, E.; Shevchenko, A.; Mann, M. and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**: 457-466.
84. Mitchell, J. R.; Wood, E.; and Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**:551-555.
85. Mitchell, P.; and Tollervey, D. (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell.* **11**(5):1405-1413.
86. Moore, M.J. (2002). Nuclear RNA turnover. *Cell* **108**, 431–434.
87. Muhlrads, D.; and Parker, R. (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* **370**(6490): 578-81.
88. Newman, A.J.; Teigelkamp, S.; and Beggs, J.D. (1995). snRNA interactions at 5' and 3' splice sites monitored by photoactivated crosslinking in yeast spliceosomes. *RNA.* **1**(9): 968-80.
89. Ni, J.; Tien, A.L.; and Fournier, M.J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* **89**(4):565-73.
90. Niedenthal, R.K.; Riles, L.; Johnston, M.; and Hegemann, J.H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**: 773-786.
91. Niewmierzycka, A.; and Clarke, S. (1999). S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem.* **274**(2):814-24.
92. Nissan, T. A.; Bassler, J.; Petfalski, E.; Tollervey, D.; and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* **21**(20): 5539-5547.

93. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920-930.
94. O'Keefe, R.T.; and Newman, A.J. (1998). Functional analysis of the U5 snRNA loop 1 in the second catalytic step of yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**: 565–574.
95. Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* **514**(1):17-25. Review. Erratum in: *FEBS Lett* **517**(1-3):287.
96. Oliveira, C.C.; Gonzales, F.A. and Zanchin, N.I.T. (2002). Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit Rrp43p show a deficiency in mRNA degradation and no longer interact with the exosome. *Nuc. Acids Res.* **30**(19): 4186-4198.
97. Osheim, Y.N.; French, S.L.; Keck, K.M.; Champion, E.A.; Spasov, K.; Dragon, F.; Baserga, S.J.; and Beyer, A.L. (2004). Pre-18S Ribosomal RNA Is Structurally Compacted into the SSU Processome Prior to Being Cleaved from Nascent Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, **16**, 943–954.
98. Parker, R.; and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**(2):121-127.
99. Paushkin, S.; Gubitz, A.K.; Massenet, S.; and Dreyfuss, G. (2002). The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 305–312.
100. Phillips, B.; Billin, A.N.; Cadwell, C.; Buchholz, R.; Erickson, C.; Merriam, J.R.; Carbon, J.; and Poole, S.J. (1998). The Nop60B gene of *Drosophila* encodes an essential nucleolar protein that functions in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **260**:20-29
101. Pintard, L.; Kressler, D.; and Lapeyre, B. (2000). Spb1p is a yeast nucleolar protein associated with Nop1p and Nop58p that is able to bind S-adenosyl-L-methionine in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1370–1381.
102. Piper, P.W.; Bellatin, J.A.; and Lockheart, A. (1983). *EMBO J.* **2**: 353-359 ou Piper, P.W.; Patel, N.; Lockheart, A. (1984). *Eur J Biochem.* **141**(1):115-8. Processing of the 3' sequence extensions upon the 5S rRNA of a mutant yeast in *Xenopus laevis* germinal vesicle extract.
103. Pogacic, V.; Dragon, F.; and Filipowicz, W. (2000). Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol. Cell. Biol.* **20**:9028-9040.

104. Raijmakers, R.; Noordman, Y.E.; van Venrooij, W.J.; and Pruijn, G.J. (2002). Protein-protein interactions of hCsl4p with other human exosome subunits. *J Mol Biol.* **315**(4):809-18.
105. Raghunathan, P.L.; and Guthrie, C. (1998). A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Science* **279**(5352): 857-60.
106. Raue, H.A. (2003). Pre-ribosomal RNA processing and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*: the machine that makes the machine. In *The Nucleolus* (Olson, M. O. J., ed.). pp.1–24, Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
107. Raué, H.A.; and Planta, R.J. (1991). Ribosome biogenesis in yeast. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **41**:89-129.
108. Rockmill, B., Lambie, E.C., Roeder, G.S. (1991). Spore enrichment. *Methods Enzymol.* **194**: 146-149.
109. Samarsky, D.A.; and Fournier, M.J. (1999). A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **27**(1):161-4.
110. Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E. F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edit.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
111. Schafer, T.; Strauss, D.; Petfalski, E.; Tollervey, D.; and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* **22**(6): 1370-1380.
112. Schimmang, T.; Tollervey, D.; Kern, H.; Frank, R.; and Hurt, E.C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J.* **8**(13):4015-24.
113. Sharma, K.; and Tollervey, D. (1999). Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 50 end of 18 S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6012–6019.
114. Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
115. Shiomi, T.; Fukushima, K.; Suzuki, N.; Nakashima, N.; Noguchi, E.; and Nishimoto, T. (1998). Human dis3p, which binds to either GTP- or GDP-Ran, complements *Saccharomyces cerevisiae* dis3. *J Biochem (Tokyo)* **123**(5):883-90. Erratum in: *J Biochem (Tokyo)* 1998 **124**(1):250.

116. Smith, C.M.; and Steitz, J.A. (1997). Sno Storm in the nucleolus: New Roles for Myriad Small RNPs. *Cell* **89**(5):669-72.
117. Stanek, D.; Rader, S.D.; Klingauf, M.; and Neugebauer, K.M. (2003). Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol.* Feb 17;160(4):505-16.
118. Stevens, A.; Hsu, C.L.; Isham, K.R.; and Larimer, F.W. (1991). Fragments of the internal transcribed spacer 1 of pre-rRNA accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* lacking 5'-3' exoribonuclease 1. *J Bacteriol.* **173**(21):7024-8.
119. Szewczak, L.B.; DeGregorio, S.J.; Strobel, S.A.; and Steitz, J.A. (2002). Exclusive interaction of the 15.5 kD protein with the terminal box C/D motif of a methylation guide snoRNP. *Chem Biol.* **9**(10):1095-107.
120. Terns, M.P.; and Terns, R.M. (2002). Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene Expr.* **10**(1-2):17-39.
121. Tharun, S.; He, W.; Mayes, A.E.; Lennertz, P.; Beggs, J.D. and Parker, R. (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**: 515-518.
122. Trapman, J.; Retel, J.; and Planta, R.J. (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp Cell Res.* **90**(1):95-104.
123. Tycowski, K.T.; Smith, C.M.; Shu, M.D.; and Steitz, J.A. (1996). A small nucleolar RNA requirement for site-specific ribose methylation of rRNA in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(25):14480-5.
124. Tycowski, K.T.; You, Z.H.; Graham, P.J.; and Steitz, J.A. (1998). Modification of U6 spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol. Cell.* **2**: 629-638.
125. Tollervy, D. (1987). A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* **6**: 4169-4175.
126. Tollervy, D.; Lehtonen, H.; Jansen, R.; Kern, H.; and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell.* **72**(3):443-57.
127. Udem, S.A.; Warner, J.R.(1973). The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem.* **248**(4):1412-6.
128. Ursic, D.; Demarini, D.J.; and Culbertson, M. (1995). Inactivation of the yeast Sen1 protein affects the localization of nucleolar proteins. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 571-584.

129. Ursic, D.; Chinchilla, K.; Finkel, J.S.; and Culbertson, M.R. (2004). Multiple protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucl. Acids Res.* **32**, 2441–2452.
130. Valentini, S.; Oliveira, C.C.; Silver, P.A.; and McBride, A. (2002). Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor-5A (eIF-5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* **160**, 394-405.
131. van Hoof, A.; Staples, R.R.; Baker, R.E.; and Parker, R. (2000a). Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA.. *Mol Cell Biol.* **20**(21):8230-43.
132. van Hoof, A.; Lennertz, P.; and Parker, R. (2000b). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* **19**:1357-1365.
133. van Hoof, A.; Frischmeyer, P.A.; Dietz, H.C.; and Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science.* **295**(5563): 2262-4).
134. van Nues, R.W.; and Beggs, J.D. *Genetics* (2001). Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. **157**(4): 1451-67.
135. Vanrobays, E.; Gleizes, P.E.; Bousquet-Antonelli, C.; Noaillac-Depeyre, J.; Caizergues-Ferrer, M., and Gelugne, J.P. (2001). Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *EMBO J.* **20**(15):4204-13.
136. Venema, J., and Tollervey, D. (1995). Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1629-1650.
137. Venema, J.; Bousquet-Antonelli, C.; Gelugne, J.P.; Caizergues-Ferrer, M.; and Tollervey, D. (1997). Rok1p is a putative RNA helicase required for rRNA processing. *Mol Cell Biol.* **17**(6):3398-407.
138. Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Gen.* **33**, 261-311.

139. Verheggen, C.; Mouaikel, J.; Thiry, M.; Blanchard, J.M.; Tollervey, D.; Bordonne, R.; Lafontaine, D.L., and Bertrand, E. (2001). Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J.* **20**(19):5480-90.
140. Vojtek, A.B.; Hollenberg, S.M.; and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205
141. Vojtek, A.B.; and Hollenberg, S.M. (1995). Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods in Enzimology* **255**, 331-342.
142. Wang, H.; Boisvert, D.; Kim, K.K.; Kim, R.; and Kim, S.H. (2000). Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *EMBO J.* **19**(3):317-23.
143. Watkins, N.J.; Segault, V.; Charpentier, B.; Nottrott, S.; Fabrizio, P.; Bachi, A.; Wilm, M.; Rosbash, M.; Branlant, C.; and Luhrmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* **103**(3):457-66.
144. Watkins, N.J.; Dickmanns, A.; and Luhrmann, R. (2002). Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol Cell Biol.* **22**(23):8342-52.
145. Wehner, K.A.; Gallagher, J.E.G.; and Baserga, S.J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7258–7267.
146. Will, C.L.; and Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 290-301.
147. Wu, P.; Brockenbrough, J.S.; Metcalfe, A.C.; Chen, S.; and Aris, J.P. (1998). Nop5p is a small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18 S rRNA processing in yeast. *J Biol Chem.* **273**(26):16453-63.
148. Xu, D.; Field, D. J.; Tang, S-J.; Moris, A.; Bobechko, B.P. (1998). Synthetic lethality of yeast slt mutations with U2 small nuclear RNA mutations suggests functional interactions between U2 and U5 snRNPs that are important for both steps of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2055–2066.

149. Yang, P.K.; Hoareau, C.; Froment, C.; Monsarrat, B.; Henry, Y.; Chanfreau, G. (2005). Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly. *Mol Cell Biol.* **25**(8):3295-304.
150. Zanchin, N.I.T.; and Goldfarb, D.S. (1999a). Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1518-1525.
151. Zanchin, N.I.T.; and Goldfarb, D.S. (1999b). The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **27**(5):1283-8.
152. Zebarjadian, Y.; King, T.; Fournier, M.J.; and Clarke, L.; and Carbon J. (1999). Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol Cell Biol.* **19**(11):7461-72.
153. Zhang, Y.; Yang, J.; Wu, N.H.; Shen, YF. (2004). Screening, cloning, and analyzing for hSNF5 binding proteins in human fetal brain. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **26**(5):529-32.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS
TRABALHOS NESTE ARQUIVO