UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARCELA BACH PRIETO

**Caracterização funcional das proteínas Nop17p e Rsa1p
de *Saccharomyces cerevisiae***

Versão Corrigida da Tese Defendida

Data de depósito na SPG
21/07/2014

São Paulo
2014

MARCELA BACH PRIETO

Caracterização funcional das proteínas Nop17p e Rsa1p
de *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

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

P951c Prieto, Marcela Bach
Caracterização funcional das proteínas Nop17p e Rsa1p de
Saccharomyces cerevisiae / Marcela Bach Prieto. -- São
Paulo, 2014.
90p.

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

1. Expressão gênica 2. Proteína-proteína : Interação :
Bioquímica 3. RNA : Processamento 4. *Saccharomyces* I. T.
II. Oliveira, Carla Columbano de, orientador.

574.88 CDD

Ao meu irmão, Diogo Bach Prieto
Aos meus pais, Verenice do Rocio Bach Prieto e Diogo Prieto

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre acompanhou meus passos.

Às inspirações budistas e espíritas, que permitiram que eu compreendesse coisas fundamentais ao longo destes últimos anos.

À Prof^a Dra. Carla, pela orientação durante este trabalho e seus ensinamentos.

Aos meus pais Verenice e Diogo, dedicados à família e apoiadores das minhas decisões, e ao meu irmão Diogo, que é a peça mais importante do quebra-cabeça da minha vida, companheiro e amigo.

Aos Professores Frederico Gueiros, Chuck Farah e Koiti Araki, que cederam seus espaços diversas vezes, a mim e a este trabalho.

À minha família: avós, padrinhos, madrinhas, tias, tios, primos e primas (que são tantos!) e tornaram os fins de semana sempre cheios de vida em Ponta Grossa.

À minha família de São Paulo: Luciene (Lu), Juliana (Jubis), Maryana (Méry), Fernando (Fer, Bola de Fogo), André (Polaquinho), Vitor (Prof. Dr. Zama) e Alexandre (Bisson). Vocês, com certeza, foram meus bons encontros na cidade grande! Quero vocês sempre presentes nos bailes da minha vida!

Aos colegas e amigos de laboratório: lá do início, Márcia (Marcinha), Patrícia (Pat), Maurício (Mau) e Camila (Camis), que me auxiliaram sempre em todo tipo de dificuldade experimental, por suas companhias e amizades. Depois, Germano (Gérman), Rogério (Róger), Alessandra (Alê) e Fernando (Mas eu só vou tomar uma!) pela caminhada dividida e muitos bons momentos! Vocês foram fundamentais para este trabalho!

Aos amigos fiéis e sempre presentes, nos velhos e novos tempos: Tatiane (Tate), Vanessa (Miss), Fernanda (Fer), Frederico (Fredy) e Anderson (Ander). Vocês são pra uma vida inteira! Obrigada pelos momentos incríveis!

Aos demais amigos de PG, Roberta (Roptita), Mariana (Mare), Ana (Carol), Rodrigo (Row), Karine (Ka), Patricia (Pat), Ana Paula, Izabel (12 de fevereiro), Régis (Lube), Carla (Kau) e Laura (Lau), pelos momentos de festa e descontração.

Aos amigos de SP (IQ, eu diria!), que compartilhei alegrias, festas, brindes e danças durante este tempo: Stella (Stellinha), Theopi (Theo), Valquíria (Killer), Luiza (Lu), José de Ribamar (Jota), Filipe (Braguinha), Valdir (Lichia), Bruna (Brunildes), Fabiane (Fabi), Raphael (Rapha), Carlos (Carlitos), Mariana (Mari), Raphael (Rapha

“Augusto”), Cícero (Batata), Daniel (Dani), Tiago (Tiaguinho), Tiago (Borra), Antônio, Jamir, Alexandre (Alê), Evandro, Rodrigo (Rod’s), Ilda (Ildinha, Namastê!) e Fábio (Pererê).

Aos funcionários do IQ, os quais muitas vezes estenderam a mão em auxílio a uma dificuldade.

À Capes e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

À Cidade de São Paulo, que apesar de ter sugado minha saúde, me permitiu viver experiências sensacionais, tanto artísticas quanto esportivas (Vai Corinthians!) e culturais!

E aos Festivais, especialmente ao Movimento Psicodália, que tanto pregam o contato com a natureza, a paz e a gentileza. Estes dias de fuga da cidade grande foram (e para sempre serão) essenciais para meu bem viver!!!

Acreditar em algo e não o viver é desonesto.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Prieto, M. B. **Caracterização funcional das proteínas Nop17p e Rsa1p de *Saccharomyces cerevisiae***. 2014 (90p) Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nop17p e Rsa1p são proteínas nucleolares em *Saccharomyces cerevisiae*, as quais foram identificadas pela sua associação a dois complexos celulares: os snoRNPs de box C/D, através de interação com as subunidades Nop58p e Snu13p, respectivamente, e o R₂TP/Hsp90p. Nop17p parece ser responsável por direcionar a chaperona Hsp90p durante a montagem dos snoRNPs, e a associação de Rsa1p a estes complexos ainda não tem uma função estabelecida. Neste trabalho, nós mostramos que a ausência de ambas as proteínas afetam a estabilidade da proteína Nop58p dos snoRNPs e afetam a localização do snoRNA U3. Em relação à ordem de interação das proteínas do core de snoRNps de box C/D, Nop17p associa-se de maneira transiente a Nop1p/Snu13p, seguida da ligação de Nop58p ao complexo. Quanto à rede de interação do R₂TP, obtivemos o mutante Nop17(N307S), que não mais interage com Tah1p. Este mutante interage com a subunidade Rvb1p do R₂TP, mas não se associa com outras proteínas parceiras de Nop17p(WT). Apesar da importância da interação Nop17p-Tah1p, sua interrupção não afeta o crescimento celular, o que sugere a possibilidade de outro fator estar envolvido na associação entre Nop17p e Hsp90p.

Palavras-chave: Nop17p, Rsa1p, snoRNA U3, snoRNPs de box C/D, R₂TP

ABSTRACT

Prieto, M. B. **Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* proteins Nop17p and Rsa1p.** 2014 (90p) PhD thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nop17p and Rsa1p are *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar proteins, which were identified for its association with two cellular complexes: box C/D snoRNPs, through interaction with the core subunits Nop58p and Snu13p respectively, and the R₂TP/Hsp90p. Nop17p seems to be responsible for directing Hsp90p to the assembly of snoRNPs. The Rsa1p association to these complexes still have no defined function. In this work, we showed that both proteins absence affect Nop58p stability and causes a mislocalization of the U3 snoRNA. Relative to the order of assembly of the box C/D snoRNPs core proteins, Nop17p associates transiently with Nop1p/Snu13p, followed by the Nop58p joining to the complex. To study in more detail the protein interactions within the R₂TP complex, we obtained the Nop17(N307S) mutant, which no longer interacts with Tah1p, but still interacts with Rvb1p, another R₂TP subunit. Nop17(N307S) does not interact with other Nop17p(WT) partners. Despite the importance of the Nop17p-Tah1p association, the disruption of this interaction does not affect cell growth, suggesting the involvement of a second factor on the Nop17p and Hsp90p association.

Keywords: Nop17p, Rsa1p, U3 snoRNA, box C/D snoRNPs, R₂TP

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
ECL	realçador de quimioluminescência
EDC	cloridrato de N -(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETS	espaçador externo transcrito
FPLC	cromatografia líquida rápida de proteínas
GAL1	promotor do gene GAL1/YBR020W de <i>S. cerevisiae</i>
GAL4	ativador da transcrição, gene YPL248C de <i>S. cerevisiae</i>
GR	glutathione reduzida
HRP	peroxidase <i>horseradish</i>
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITS	espaçador interno transcrito
KDa	<i>Kilodalton</i>
LB	meio de cultura (Luria-Bertani),
NBT	tetrazólio nitro-azul
NHS	N-hidroxilsulfosuccimida
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietileno glycol
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonil
pré-rRNA	precursor do RNA ribossomal
PVDF	fluoreto de polivinilideno
qPCR	PCR quantitativo
RPM	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
S	<i>Sverdberg</i>
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
snoRNP	complexo ribonucleoprotéico nucleolar pequeno
sRNP	complexo ribonucleoprotéico pequeno
SSU	<i>small subunit</i>

TAP	purificação por afinidade em sequência
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeats</i>
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
WT	tipo selvagem
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lista de plasmídeos utilizados.....	32
Tabela 2.	Lista de cepas de <i>E. coli</i> utilizadas para este estudo.....	33
Tabela 3.	Lista de cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas para este estudo.....	33
Tabela 4.	Lista de oligonucleotídeos utilizados para ensaios de <i>Northern blot</i> e qPCR.....	36
Tabela 5.	Lista de primers utilizados para o sequenciamento dos mutantes de Nop17p.....	40
Tabela 6.	Proteínas identificadas por espectrometria de massas após purificação por TAP- <i>tag</i> e coluna cromatográfica.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática simplificada do processamento do pré-rRNA 35S.....	18
Figura 2.	Processamento do pré-rRNA 35S pelo SSU processomo.....	20
Figura 3.	Modelo estrutural de snoRNAs e snoRNPs.....	22
Figura 4.	Associação dos complexos R2TP e snoRNP de box C/D.....	25
Figura 5.	Rede de interação proteína-proteína no complexo R2TP e Rsa1p.	29
Figura 6.	Nop17p, Rsa1p e Tah1p.....	44
Figura 7.	Estabilidade dos snoRNPs de box C/D.....	48
Figura 8.	Análise de ligação co-transcricional de Nop58p ao snoRNA U3 por qPCR.....	50
Figura 9.	Localização subcelular do snoRNA U3 nas cepas <i>wt</i> , $\Delta nop17$, $\Delta rsa1$ e $\Delta tah1$ nas condições permissiva e restritiva.....	52
Figura 10.	<i>Western-blot</i> das frações de ensaio de <i>pull-down</i> de proteínas em glutationa-sepharose.....	58
Figura 11.	<i>Western-blot</i> das frações de ensaio de <i>pull-down</i> de proteínas em glutationa-sepharose resolvidas em gel desnaturante.....	59
Figura 12.	Purificação de proteínas de fusão para <i>SPR</i>	61
Figura 13.	<i>SPR</i> para interação proteína-proteína.....	63
Figura 14.	Rede de interação entre Nop17p e proteínas do R ₂ TP e outras envolvidas em processamento de rRNA.....	66
Figura 15.	Representação esquemática da construção da mutante Nop17(N307S).....	68
Figura 16.	Sequenciamento e ensaios de duplo-híbrido com Nop17(N307S).	70
Figura 17.	Comparação do crescimento celular das cepas <i>wt</i> e $\Delta nop17$ com as transformantes $\Delta nop17/pMET-NOP17$ e $\Delta nop17/pMET-NOP17(N307S)$	71
Figura 18.	Representação esquemática da montagem dos snoRNPs de box C/D.....	74
Figura 19.	Modelo de montagem de snoRNPs de box C/D baseado nas etapas sequenciais de associação das proteínas ao snoRNA.....	77

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	Via de processamento dos pré-rRNAs 35S e 5S.....	16
1.2.	Modificações covalentes no rRNA.....	19
1.3.	Biogênese de snoRNPs de <i>box C/D</i>	23
1.3.1.	O complexo R ₂ TP.....	23
1.3.2.	Nop17p.....	26
1.3.3.	Rsa1p.....	27
2.	OBJETIVOS.....	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.	Construção de plasmídeos.....	31
3.2.	Transformação de bactéria pelo método PEG.....	32
3.3.	Sequenciamento.....	33
3.4.	Cultura e manipulação de <i>S. cerevisiae</i>	33
3.5.	Co-imunoprecipitação (co-ip) de Proteínas.....	34
3.6.	Análise de proteínas por <i>Western blot</i>	35
3.7.	Co-imunoprecipitação (co-IP) de RNAs.....	36
3.8.	<i>Northern blot</i>	36
3.9.	CoIP de cromatina.....	37
3.10.	Análise de DNA por qPCR.....	37
3.11.	Localização de snoRNA através de FISH.....	37
3.12.	Co-imunoprecipitação (co-ip) e cromatografia de exclusão por tamanho.....	37
3.13.	Expressão de proteínas recombinantes em bactéria.....	38
3.14.	<i>Pull-down</i> de proteínas <i>in vitro</i>	39
3.15.	Purificação de proteínas.....	39
3.16.	Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	40
3.17.	Construção de mutante de Nop17p.....	40
3.18.	Análise <i>in vivo</i> de interação entre proteínas pelo método do duplo-híbrido.....	41

4.	RESULTADOS.....	42
4.1.	Nop17p, Rsa1p e Tah1p.....	42
4.2.	A ausência de Nop17p e Rsa1p influencia a estabilidade da proteína Nop58p do core de snoRNP de box C/D <i>in vivo</i>	45
4.3.	A depleção de Nop17p e Rsa1p afeta a quantidade do snoRNA U3 presente nos snoRNPs.....	47
4.4.	Mutantes de deleção de Nop17p e Rsa1p promovem alterações na formação de snoRNPs já durante a transcrição de U3.....	49
4.5.	Localização do snoRNA U3 nos mutantes de deleção de Nop17p e Rsa1p.....	51
4.6.	Purificação de Nop17p e Rsa1p via TAP-tag.....	54
4.7.	Montagem <i>in vitro</i> de snoRNPs de box C/D.....	56
4.8.	Purificação das proteínas de fusão GST-Snu13p, His-Nop1p e His-Nop17p, síntese do chip Au-MUA-EDC/NHS-GR e montagem <i>in vitro</i> de snoRNPs de box C/D.....	60
4.9.	Nop17p interage fortemente com Tah1p, proteína do complexo R ₂ TP..	65
4.10.	Identificação da região específica de Nop17p envolvida na interação com Tah1p.....	67
4.11.	Caracterização do mutante Nop17(N307S).....	69
5.	DISCUSSÃO.....	72
6.	CONCLUSÃO.....	78
7.	REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O ribossomo é um complexo molecular que atua no citoplasma celular para a síntese de proteínas e é constituído por duas subunidades, chamadas menor (40S) e maior (60S) em eucariotos. Sua função molecular é conservada entre procariotos e eucariotos, mas quando comparados, é encontrada grande diferença com relação tanto ao tamanho da partícula madura, quanto na regulação de sua síntese e atividade (Wilson et al., 2012). A subunidade 40S madura é formada pelo rRNA 18S associado a 32 proteínas, enquanto que a subunidade 60S compreende os rRNAs 5.8S, 25S e 5S, e mais 46 proteínas (Knoops et al., 2012). Muitos estudos relacionados à dinâmica estrutural, e à regulação e formação desta maquinaria celular utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo eucariótico (Venema et al., 1999; Fromont-Racine et al., 2003).

A biogênese do ribossomo é um processo altamente complexo que envolve a ação coordenada de fatores de montagem, processamento e transporte. Em eucariotos, este processo inicia-se em um compartimento nuclear chamado nucléolo (Hernandez-Verdun et al., 2010), com a transcrição dos rRNAs na forma dos precursores 35S e 5S pelas RNA polimerases I e III, respectivamente (Mayer et al., 2006). Os genes que codificam os rRNAs são os mais abundantes em eucariotos, e em *S. cerevisiae* eles estão presentes em mais de uma centena de cópias em um mesmo cromossomo (Kobayashi, 2011). Quando transcritos, os pré-rRNAs passam por uma série de etapas de maturação devidamente compartimentalizadas, as quais envolvem aproximadamente 170 proteínas acessórias, entre elas endo- e exoribonucleases, helicases, chaperonas e fatores de montagem como os snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein particles*) até a exportação para o citoplasma, onde os rRNAs associados às proteínas ribossomais, na forma de subunidades ribossomais maduras, poderão atuar na síntese de proteínas (Henras et al., 2008; Kressler et al., 2010).

1.1. Via de processamento dos pré-rRNAs 35S e 5S

O transcrito primário 35S contém os rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S e também regiões espaçadoras externas (5'-ETS e 3'-ETS) e internas (ITS1 e ITS2),

as quais compreendem diversos sítios de clivagem endo- e exonucleolíticas e não integram o ribossomo maduro (Figura 1). Este transcrito estabelece interações com diversos fatores ainda durante a transcrição, antes do precursor 35S ser liberado através de uma clivagem pela RNase III na sua extremidade 3'-ETS (Osheim et al., 2004). O primeiro complexo de proteínas a se ligar ao pré-rRNA 35S é o complexo t-UTP (formado pelas *U-three proteins*) (Mougey et al., 1993; Gallagher et al., 2004), o qual é requerido para a associação de outros dois complexos essenciais nesta etapa inicial do processamento, chamados UTP-C e snoRNP U3 (Dragon et al., 2002). Estes e outros fatores formam o chamado SSU (*small subunit*) processomo (com um tamanho aproximado de 2MDa localizado na extremidade 5' do pré-rRNA) e são responsáveis pela liberação dos pré-rRNAs 20S e 27SA2 (Perez-Fernandez et al., 2007; Phipps et al. 2011).

O snoRNA U3 (*small nucleolar RNA*), integrante do complexo snoRNP U3, é essencial para a viabilidade deste processamento inicial por atuar como uma chaperona durante o dobramento correto do *core* do rRNA 18S (Osheim et al., 2004), através de importantes interações por pareamento de bases entre estes dois RNAs que são mantidas nesta etapa (Figura 2) (Hughes et al., 1991). Além dos fatores já citados, também são parte integrante do SSU processomo algumas proteínas ribossomais da partícula menor 40S (Grandi et al., 2002), e os snoRNPs U22 (Tycowski et al., 1994), U14 (Li et al., 1990), snR30 (Morrissey et al., 1993) e snR10 (Tollervey, 1987) também estão associados às clivagens iniciais, para separação dos pré-rRNAs 20S e 27SA2.

Enquanto o pré-rRNA 20S é transportado para o citoplasma para uma clivagem no sítio D formar o rRNA 18S maduro (Vanrobays et al., 2001), o pré-rRNA 27SA₂ tem seu processamento continuado no nucléolo, e constitui assim o primeiro componente da partícula pré-60S (Figura 1) (Saveanu et al., 2003). Este precursor pode ser processado por duas vias distintas: diretamente no sítio B_{1L}, levando à formação do pré-rRNA 27SB_L ou através de uma clivagem por uma endoribonuclease no sítio A₃, seguida de processamento na sua extremidade 5' para formar o 27SB_S. A partir daí, ambos 27SB_L e 27SB_S são processados de maneira idêntica, com a etapa de clivagem no sítio C₂ (dentro da região ITS2) para separação dos pré-rRNAs 7S e 26S, os quais serão digeridos por algumas exoribonucleases em diferentes etapas de processamento, para a produção dos

Figura 1: Representação esquemática simplificada do processamento do pré-rRNA 35S. Após sua transcrição pela RNA polimerase I, o precursor 35S é clivado e processado em diversos sítios, originando os rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S. As etapas de clivagem bem como sua compartimentalização celular estão representadas. Retirado de Phipps et al., 2011.

rRNAs maduros 5.8S e 25S, respectivamente (Figura 1) (Geerlings et al., 2000). Entre estas ribonucleases, figuram o complexo do exossomo, Rex1p e Rex2p, Rat1p e Xrn1p (Liu et al., 2006; van Hoof et al., 2000).

O rRNA 5S é o menor dos rRNAs, sendo transcrito pela RNA polimerase III e processado por uma via independente através da participação de exonucleases (Rex1p, Rex2p e Rex3p) que atuam na clivagem de um segmento de 7 a 13 nucleotídeos na extremidade 3' (van Hoof et al., 2000). O rRNA 5S é essencial para a formação de pré-ribossomos e também para o funcionamento do ribossomo maduro (Kiparisov et al., 2005), mas ainda há dúvidas com relação ao momento exato de inclusão do 5S na partícula 60S em formação (Ciganda et al., 2011). Trabalhos mais atuais estão relacionados à incorporação deste rRNA ainda na partícula 90S, através de alguns fatores acessórios como Rpf2 e Rrs1, as quais recrutam o rRNA 5S complexado com as proteínas ribossomais Rpl5p e Rpl11p (Zhang et al., 2007). A proteína Rpl5p atua na estabilização deste rRNA, e garante também sua correta localização nuclear para a montagem do ribossomo (Moradi et al., 2008).

Todo esse processo resulta na liberação dos rRNAs maduros associados à parte das proteínas ribossomais, os quais serão transportados para o citoplasma onde são reguladas as etapas tardias de processamento e montagem das subunidades ribossomais, com associação de novas proteínas e modificações covalentes como, por exemplo, fosforilação de proteínas (Zempa et al., 2007; Senger et al., 2001) para a formação dos ribossomos maduros (Spahn et al., 2001).

1.2. Modificações covalentes no rRNA

Ao longo da via de maturação dos rRNAs, algumas modificações covalentes pontuais também se fazem necessárias para o correto dobramento dos rRNAs maduros e também o funcionamento do ribossomo no citoplasma (Baudin-Baillieu et al., 2009). As mais importantes são a metilação de riboses na posição 2'-hidroxila e isomerização de uridina em pseudouridina (Watkins et al., 2012). Estas modificações são realizadas em nucleotídeos específicos ao longo do pré-rRNA por complexos ribonucleoprotéicos essenciais chamados snoRNPs, e como anteriormente citados, são formados por proteínas e snoRNAs. Os snoRNAs são responsáveis pelo

Figura 2: Processamento do pré-rRNA 35S pelo SSU processossomo. Representação esquemática das clivagens iniciais A₀, A₁ e A₂ no transcrito 35S (linha fina em preto, com destaque para os rRNAs maduros em cinza). O snoRNA U3 (em preto) encontra-se associado ao 35S por pareamento de bases. Retirado de Gérczei et al., 2009.

reconhecimento dos sítios de modificação no pré-rRNA através de pareamento de base com o mesmo, direcionando a proteína responsável pela modificação covalente (Figura 3a) (Reichow et al., 2007; van Nues et AL., 2011; Li et AL., 2011). A remoção individual de algumas destas modificações pode afetar o crescimento celular, mas o conjunto de vários destes sítios é essencial para a viabilidade celular (Liang et al., 2009).

Resumidamente, os snoRNPs de box H/ACA são responsáveis por pseudouridilação em posições específicas do pré-rRNA e os snoRNAs envolvidos em pseudouridilação contêm sequências conservadas, *boxes* H e ACA, e estão concentrados no nucléolo (Kiss et al., 2010). Estes complexos estão presentes tanto em *archaea*, quanto em plantas, leveduras e humanos, e apesar de a sua função ser conservada ao longo da evolução, algumas diferenças são encontradas nestes complexos quando comparadas as proteínas formadoras do *core* (Ni et al., 1997; Hoareau-Aveilla et al., 2006). Em leveduras, as proteínas que se ligam aos snoRNAs de *box* H/ACA e formam o *core* deste complexo são as subunidades Gar1p, Nhp2p, Nop10p e a pseudouridilase Cbf5p (Lafontaine et al, 1998).

Os snoRNPs de *box* C/D, envolvidos em metilação de 2'-hidroxila da ribose de resíduos de nucleotídeos, são formados por snoRNAs contendo os *boxes* C e D, C' e D', os quais direcionam a formação de duas sequências características: uma sequência terminal C/D que forma uma estrutura conhecida como *K-turn* (*stem-internal loop-stem structure*), e uma sequência interna, chamada C'/D', a qual forma uma estrutura em *stem-loop* (conhecida como *K-loop*) (Figura 3a) (Lin et al., 2011). Embora os *boxes* C/D e C'/D' apresentem a mesma sequência consenso, C/D é mais conservada que C'/D'. Estas regiões compreendem dois centros de interação a proteínas, onde ambas estão associadas a uma cópia de cada proteína do *core*: Nop1p, Nop58p, Nop56p e Snu13p, com Nop1p atuando como metil-transferase (Figura 3b) (Tollervey et al., 1991; Lafontaine et al., 1999; Lafontaine et al., 2001; Verheggen et al., 2002).

A predição estrutural dos snoRNPs de *box* C/D de eucariotos apresenta similaridade com a estrutura encontrada em sRNPs de *Archaea*. Nop58p e Nop56p formam um heterodímero estabelecendo interação tanto com as regiões C/D e C'/D' do snoRNA, respectivamente. Snu13p parece reconhecer o *K-turn* e o motivo C'/D' é associado com Nop56p e Nop1p (Figura 3b) (Granneman et al., 2009). A reação de

Figura 3: Modelo estrutural de snoRNAs e snoRNPs. (a) Baseado em predição estrutural de snoRNAs contendo as sequências conservadas H e ACA para snoRNAs de *box* H/ACA e C, D, C' e D' para snoRNPs de *box* C/D, os modelos representam as regiões de pareamento entre o snoRNA e o rRNA. (b) Região de interação das proteínas do core de snoRNPs: Cbf5p, Gar1p, Nop10p e Nhp2p para snoRNPs de *box* H/ACA e Fib (Nop1p), 15.5K (Snu13p), Nop56p e Nop58p para snoRNPs de *box* C/D. Retiradas de Reichow et al 2007 e Watkins et al., 2012.

metilação do rRNA pela Nop1p ocorre em uma posição adjacente às sequências D ou D' (base-pareadas ao rRNA), no quinto nucleotídeo a partir do pareamento (Qu et al., 2011).

1.3. Biogênese de snoRNPs de *box C/D*

A biogênese de snoRNPs de *box C/D* inicia-se com a transcrição de diversas classes de snoRNAs, os quais são liberados e processados diferentemente, podendo ser a partir de um precursor que contém grupos de snoRNAs transcritos independentemente ou como snoRNAs intrônicos (Hirose et al., 2003). O processamento final destes snoRNAs é dependente de Xrn2p/Rat1p e do exossomo, que atuam nas extremidades 5' e 3' respectivamente, para gerar os snoRNAs maduros (Chanfreau et al., 1998; Petfalski et al., 1998; Allmang et al., 1999).

Em humanos, devido à facilidade da separação do material nuclear, já são conhecidos diversos fatores nucleoplasmáticos associados à biogênese de snoRNPs, incluindo proteínas envolvidas na localização, processamento e montagem do complexo (Boulon et al., 2004, Watkins et al., 2004). Estes fatores foram também identificados e inicialmente caracterizados em leveduras, como por exemplo, as proteínas *Lsm* envolvidas em processamento (Fernandez et al., 2004) e o complexo R₂TP, que atua na montagem dos snoRNPs (Zhao et al., 2008).

De maneira geral, a correta montagem dos snoRNPs requer o *folding* exato tanto do snoRNA quanto das proteínas constituintes do *core*, e para isso, necessita de uma proteína com função chaperona, a qual é recrutada por este complexo conhecido como R₂TP (descrito adiante). Os snoRNPs parecem passar por um rearranjo estrutural durante sua montagem no nucleoplasma, incluindo a associação estável das proteínas do *core* e a remoção das chaperonas envolvidas nesta etapa, com a formação de snoRNPs maduros no nucléolo.

1.3.1. O complexo R₂TP

Este complexo, formado pelas proteínas Rvb1p, Rvb2p, Tah1p e Pih1p/Nop17p foi caracterizado como fator de montagem de muitos complexos

celulares, incluindo os snoRNPS de *box C/D* e *H/ACA* (Figura 4) (Zhao et al., 2008). Pouco se conhece a respeito deste complexo em leveduras, mas os estudos resolvidos até agora indicam que Rvb1p e Rvb2p formam um hexâmero com atividade ATPásica, provavelmente necessária para o remodelamento do complexo em formação (McKeegan et al., 2009). Rvb1p e Rvb2p são altamente conservadas em eucariotos e, em humanos (também chamadas TIP49p e TIP48p, respectivamente), estão envolvidas em inúmeros processos celulares, como remodelamento de cromatina, transcrição e apoptose, além também, da montagem de snoRNPs, e por isso são chamadas ATPases do tipo AAA⁺ (ATPase associada com diversas atividades celulares) (Huen et al., 2010).

Tah1p (TPR associado à Hsp90) é uma proteína pequena (12,5KDa) e é assim chamada por conter o motivo TPR, o qual é conhecido por mediar a interação da chaperona Hsp90p com seus cofatores. Esta subunidade foi encontrada, juntamente com Nop17p, em uma varredura de ligantes da Hsp90/Hsp82/Hsc82 e alguns estudos já mostraram que ela é capaz de modular a atividade da chaperona (Eckert et al., 2010), e ainda estabilizar a ligação de Hsp90p a Nop17p (Zhao et al., 2008). Nop17p, que será melhor descrita adiante, associa-se fortemente à Tah1p, e indiretamente à chaperona Hsp90p, mas apresenta interação forte e direta com o complexo snoRNP de *box C/D* (Gonzales et al., 2005).

Tah1p e Nop17p se associam ao hexâmero formado pelas Rvb1p e Rvb2p, para formar o R₂TP, e parecem adotar diferentes conformações até o recrutamento da Hsp90p, que tem a função de assistir os snoRNPs em formação (Figura 4). Como as chaperonas reconhecem os diferentes substratos através de associação com outras proteínas (chamadas cochaperonas ou cofatores), Nop17p deve funcionar assim, como cochaperona para a aproximação de Hsp90p ao complexo em formação. Assim, o R₂TP é tido como necessário para maturação do snoRNP e sua translocação do nucleoplasma para o nucléolo, mas não se sabe exatamente o papel de cada subunidade do R₂TP durante a montagem dos snoRNPs (Eckert et al., 2010).

Além dos dados já conhecidos em leveduras e humanos, as subunidades do R₂TP também já foram inicialmente estudadas em drosófila (Benbahouche et al., 2014) e plantas (Rodor et al., 2010), o que contribui para um maior entendimento a respeito de sua função molecular na montagem dos snoRNPs de *box C/D*, já que

Figura 4: Associação dos complexos R₂TP e snoRNP de *box* C/D. A proteína Nop17p (Pih1p) é integrante de um complexo chamado R₂TP, e foi considerada como um cofator de Hsp90p. Ela estaria auxiliando no reconhecimento de substratos da chaperona, nesse caso, o snoRNP de *box* C/D em formação. Retirado de Zhao et al., 2008.

este complexo parece estar envolvido no processo de organização das proteínas do *core* e na associação destas com os snoRNAs.

1.3.2. Nop17p

Em *Saccharomyces cerevisiae*, Nop17p (Pih1p) está presente no núcleo celular (de maneira mais concentrada no nucléolo), e foi inicialmente caracterizada por se associar aos snoRNPs de *box C/D* interagindo diretamente com a subunidade Nop58p do *core* (Gonzales et al., 2005). De maneira independente, foi também encontrada (juntamente com Tah1p) em uma varredura de ligantes de Hsp90p (Zhao et al., 2005). Dessa maneira, a rede de interação proteína-proteína estabelecida para formar o R_2TP já descrita, sugere que Nop17p estaria atuando como uma proteína adaptadora, para mediar a interação entre a chaperona Hsp90p e os complexos em formação, nesse caso, o snoRNP de *box C/D*.

Estudos anteriores já mostraram, de maneira superficial, que Nop17p poderia modular juntamente com Tah1p, a atividade da chaperona Hsp90p, uma vez que o complexo Nop17p–Tah1p inibe a função de ATPase da Hsp90p, *in vitro* (Zhao et al., 2008). Ou seja, Nop17p–Tah1p, ao inibir a atividade de ATPase da chaperona, poderia dar especificidade a esta enzima, direcionando-a aos alvos específicos, como os snoRNPs (Zhao et al., 2008). Este modelo de interação sugere que as cochaperonas são necessárias para manter uma conformação ‘aberta’ da Hsp90, prevenindo uma dimerização N-terminal necessária para a sua atividade ATPásica. Rvb1p e Rvb2p estariam cooperando com o remodelamento durante a montagem do complexo R_2TP , embora seus estados oligoméricos no complexo sejam dependentes da maquinaria Hsp90p–Nop17p–Tah1p (Zhao et al., 2008).

Além da sua interação direta com Nop58p, Nop17p interage com outras proteínas envolvidas ao longo do processamento do pré-rRNA, como Rrp43p (subunidade do exossomo; Gonzales et al., 2005), Cwc24p (*splicing* do snoRNA U3; Goldfeder and Oliveira, 2007) e Nop53p (fator ativador do exossomo no processamento de rRNA; Granato et al., 2005). Estas proteínas fazem parte de complexos nucleares importantes para os processos de maturação do rRNA e *splicing*. Talvez, a mesma função de Nop17p como cofator de Hsp90p para

endereço da chaperona aos snoRNPs de *box C/D* seja importante também para outras maquinarias moleculares.

1.3.3. Rsa1p

Rsa1p (*ribosome assembly 1*) é uma proteína não-essencial para a viabilidade celular e foi inicialmente caracterizada em *S. cerevisiae* como um fator de processamento da partícula ribossomal maior 60S, atuando em etapas tardias de sua maturação (Kressler et al., 1999). Estes estudos mostraram a relação entre Rsa1p e duas outras proteínas: a helicase dependente de ATP chamada Dbp6p, a qual apresenta letalidade sintética com Rsa1p e já era conhecida por seu envolvimento na maturação da partícula 60S, e a proteína ribossomal Rpl10p, a qual parece ser dependente de Rsa1p para associar-se à subunidade 60S (Kressler et al., 1999; DeLabre et al., 2001). Além disso, a ausência de Rsa1p na célula ocasiona deficiência na formação do 25S maduro, e conseqüentemente uma alteração no perfil polissomal (Kressler et al., 1999).

Mais tarde, Rsa1p foi demonstrada como fator importante para etapas anteriores do processamento do pré-rRNA, através de sua interação direta com Snu13p (Boulon et al., 2008). Como Snu13p é conhecida por reconhecer sequências específicas de diferentes RNAs (e assim participar de diferentes complexos como snoRNPs de *box C/D* e o snRNP U4), Rsa1p também parece estar associada à biogênese destes RNPs, de maneira conservada entre leveduras e humanos e associada ao R₂TP (Figura 5; Boulon et al., 2008). A proteína Rsa1p de leveduras já foi reconhecida como homóloga das proteínas NUFIP (em humanos) e AtNUFIP (em plantas) (Rodor et al., 2011), as quais apresentam uma região conservada chamada PEP (responsável pela interação com Snu13p), e já foram inicialmente estudadas com relação ao seu envolvimento na biogênese de snoRNPs de *box C/D*. Recentemente, estudos estruturais identificaram os aminoácidos Glu72 de Snu13p e Arg249 de Rsa1p como importantes para a interface de interação Rsa1p-Snu13p. Mutantes pontuais destes resíduos afetam a interação entre Rsa1p e Snu13p, e como conseqüência, os snoRNPs de *box C/D* não são eficientemente formados (Rothé et al., 2013).

De maneira indireta, a má formação destes snoRNPs de *box* C/D ocasiona um efeito no processamento do pré-rRNA. Assim, de maneira ainda desconhecida, Rsa1p parece também estar associada à biogênese de snoRNPs de *box* C/D, intermediando a associação do snoRNP com as helicases Rvb1p e Rvb2p (Boulon et al., 2008), e consequentemente com a chaperona Hsp90, mas pouco se sabe sobre sua função na associação do R₂TP a este complexo ou sobre porque Nop17p e Rsa1p parecem apresentar uma função sobreposta.

Figura 5: Rede de interação proteína-proteína do complexo R₂TP e Rsa1p. Comparação das interações envolvendo Hsp90, Tah1/hSpagh, Pih1p/hPih1 (Nop17), yRvb1/hRvb1, yRvb2/hRvb2 e Rsa1/Nufip entre leveduras e humanos. No esquema, os diferentes ensaios realizados estão representados por cores, com azul para *pull-down* de proteínas, e verde para interações encontradas por duplo-híbrido. Retirado de Boulon et al., 2008.

2. OBJETIVOS

Baseando-se nos dados do envolvimento de Nop17p e Rsa1p na manutenção de complexos snoRNPs de box C/D *in vivo*, o presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização funcional de ambas proteínas para delinear seu envolvimento na biogênese dos snoRNPs de box C/D, os quais participam do processamento de rRNA.

Objetivos específicos:

- Análise da estabilidade *in vivo* de snoRNPs de box C/D em mutantes de deleção de Nop17p e Rsa1p ;
- Análise *in vitro* do envolvimento de Nop17p na montagem de snoRNPs de box C/D;
- Obtenção de mutantes de Nop17p para investigação de domínios de interação proteína-proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Construção de plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1 e foram construídos de acordo com as estratégias de clonagem descritas abaixo:

Para a expressão de proteínas recombinantes em bactérias (em fusão à glutatina-S-transferase (GST) e cauda de histidina (His₆)), os genes NOP1 (ORF YDL014W) e SNU13 (ORF YEL026W) foram excisados de clones no plasmídeo pGAD obtidos anteriormente (Gonzales et al., 2005) através de clivagem com BamHI e XhoI, e subclonados nos vetores pGEX-4T-1 e pET28a. O gene NOP17 (ORF YHR034C) já estava disponível no laboratório na fusão pET28A-NOP17 (Gonzales et al., 2005), também utilizado para expressão de proteína recombinante com His₆. Os genes NOP56 (ORF TLR197W) e NOP58 (YOR310C) foram amplificados a partir de DNA genômico de *S. cerevisiae*, utilizando os primers 5' GGA TCC ATG GCT TAC GTT TTA ACT 3' e 5' CTC GAG TTA TTT CTT CTC TTT CTT 3' para NOP58 e 5' GGA TCC ATG GCT CCT ATT GAA TAC 3' e 5' CTC GAG TTA ATC CTT ACT TTT CTT 3' para NOP56. Os produtos das reações de PCR foram digeridos com BamHI e XhoI, e os fragmentos foram clonados nos mesmos vetores pET28A e pGEX4T1.

Para expressão condicional da proteína Nop58p em levedura, foi utilizada uma fusão já disponível no laboratório (Gonzales et al., 2005), com o gene NOP58 clonado no vetor centromérico YCp33GAL sob controle do promotor regulável GAL1, em fusão com a proteína A de *Staphylococcus aureus*. Nos ensaios de duplo-híbrido, as diversas fusões utilizadas para expressão em levedura também estão listadas na Tabela 1, e compreendem as proteínas Nop17p selvagem e mutante fusionadas ao *lexA* (domínio de ligação à DNA, no vetor pBTM) e Rvb1p, Rvb2p, Tah1p, Hsp82p, Cwc24p, Dre2p e Nop58p fusionadas a Gal4 (ao domínio de ativação da transcrição no vetor pGAD). Estes clones, assim como as cepas controles chamadas positivo (+) e duplo positivo (++) também já se encontravam disponíveis no laboratório (Zanchin et al., 1999; Gonzales et al., 2005; Georg et al., não publicado).

Tabela 1. Lista de plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características	Referência
pGAD-NOP1	GAL4::NOP1, LEU2	Gonzales et al., 2005
pGAD-SNU13	GAL4::SNU13, LEU2	Gonzales et al., 2005
pGEX4T1	GST Tag C-terminal, Amp ^R	Amersham
pGEX4T1-SNU13	GST::SNU13, Amp ^R	Este estudo
pGEX4T1-NOP1	GST::NOP1, Amp ^R	Este estudo
pGEX4T1-NOP56	GST::NOP56, Amp ^R	Este estudo
pGEX4T1-NOP58	GST::NOP58, Amp ^R	Este estudo
pGEX4T1-NOP17	GST::NOP17, Amp ^R	Gonzales et al., 2005
pET28a	His Tag N-terminal, Kan ^R	Novagen
pET28a-SNU13	HIS::SNU13, Kan ^R	Este estudo
pET28a-NOP1	HIS::NOP1, Kan ^R	Este estudo
pET28a-NOP56	HIS::NOP56, Kan ^R	Este estudo
pET28a-NOP58	HIS::NOP58, Kan ^R	Este estudo
pET28a-NOP17	HIS::NOP17, Kan ^R	Gonzales et al., 2005
pBTM116	lexA, domínio de ligação	Chien et al., 1991
pBTM-NOP17	lexA::NOP17, TRP1	Gonzales et al., 2005
pBTM-NOP17(N307S)	lexA::NOP17(N307S), TRP1	Este estudo
pGAD	GAL4, domínio de ativação	James et al., 1996
pGAD-TAH1	GAL4::TAH1, LEU2	Georg et al., não publicado
pGAD-HSC82	GAL4::HSC82, LEU2	Georg et al., não publicado
pGAD-RVB1	GAL4::RVB1, LEU2	Georg et al., não publicado
pGAD-RVB2	GAL4::RVB2, LEU2	Georg et al., não publicado
pGAD-CWC24	GAL4::CWC24, LEU2	Goldfeder et al., 2007
pGAD-DRE2	GAL4::DRE2, LEU2	Goldfeder et al., não publicado
pGAD-NOP58	GAL4::NOP58, LEU2	Gonzales et al., 2005
YCP33Gal-A-NOP58	GAL::ProtA-NOP58, URA3, CEN4	Gonzales et al., 2005
pMET-A-NOP17	MET25, promotor	Gonzales et al., 2005
pMET-NOP17(N307S)	MET25, promotor	Este estudo

3.2. Transformação de bactéria pelo método PEG

Células competentes de *E. coli* (DH5 α , Hanahan et al., 1983) foram incubadas em tampão de transformação (0,1M KCl, 0,03M CaCl₂, 0,05M MgCl₂, 7% PEG) juntamente com 10ng de DNA plasmidial. Após incubação por um período de 30 minutos em gelo, as células foram submetidas a um choque térmico a 25°C por 10

minutos e incubadas em meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L) durante 1 hora. Após este período, as células foram centrifugadas a 6000RPM e ressuspensas em LB para plaqueamento em meio seletivo (LB acrescido de antibiótico).

Tabela 2. Lista de cepas de *E. coli* utilizadas para este estudo

Cepa	Genotipo/ Características	Referência
DH5	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Estratagene
BL21	<i>E. coli</i> B F–ompT hsdS(rB– mB–) dcm+ Tet ^r gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]*	Estratagene

3.3. Sequenciamento

Todos os plasmídeos foram seqüenciados usando o *kit ABI PRISM® BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin-Elmer). As condições de reação em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* foram: 96°C durante 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 96°C por 35 segundos/ 50°C por 30 segundos/ 60°C por 4 minutos, e finalizado com temperatura de 4°C.

3.4. Cultura e manipulação de *S. cerevisiae*

Métodos para cultura e manipulação de células de leveduras foram realizados conforme descrito por Guthrie e Fink, 1991. Os meios de cultura YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose) e YNB (5g/L YNB, 20g/L glicose ou galactose) acrescido de aminoácidos foram utilizados para culturas de células em meio sólido e líquido. No caso de alguma exceção, estará indicada com outra referência no texto.

Tabela 3. Lista de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para este estudo

Cepa	Genotipo/ Características	Referência
WT (BY4742)	<i>MATα, his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
$\Delta nop17$	<i>MATα, his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 NOP17::KAN^R</i>	Euroscarf
$\Delta rsa1$	<i>MATα, his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RSA1::KAN^R</i>	Euroscarf
$\Delta tah1$	<i>MATα, his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TAH1::KAN^R</i>	Euroscarf
ML4	WT/YCP33-A-NOP58	Este estudo
ML5	$\Delta nop17$ /YCP33-A-NOP58	Este estudo
ML6	$\Delta rsa1$ /YCP33aA-NOP58	Este estudo
L40	<i>MATα, his3Δ200 trp1-901 leu2-3,311 ade2 lys2-801am URA3::(<i>lexAop</i>)8-lacZ LYS2::(<i>lexAop</i>)4-HIS3</i>	James et al., 1996
ML8	L40/pBTM-NOP17/pGAD	Este estudo
ML9	L40/pBTM-NOP17/pGAD-TAH1	Este estudo
ML10	L40/pBTM-NOP17/pGAD-HSC82	Este estudo
ML11	L40/pBTM-NOP17/pGAD-RVB1	Este estudo
ML12	L40/pBTM-NOP17/pGAD-RVB2	Este estudo
ML13	L40/pBTM-NOP17/pGAD-CWC24	Este estudo
ML14	L40/pBTM-NOP17/pGAD-DRE2	Este estudo
ML15	L40/pBTM-NOP17/pGAD-NOP58	Este estudo
ML16	L40/pBTM-NOP17/pGAD	Este estudo
ML17	L40/pBTM-NOP17/pGAD-TAH1	Este estudo
ML18	L40/pBTM-NOP17/pGAD-HSC82	Este estudo
ML19	L40/pBTM-NOP17/pGAD-RVB1	Este estudo
ML20	L40/pBTM-NOP17/pGAD-RVB2	Este estudo
ML21	L40/pBTM-NOP17/pGAD-CWC24	Este estudo
ML22	L40/pBTM-NOP17/pGAD-DRE2	Este estudo
ML23	L40/pBTM-NOP17/pGAD-NOP58	Este estudo
++ (L40-41)	L40/pBTM-NIP7/pACT-NOP8	Zanchin et al., 1999
+ (L40-61)	L40/pBTM-NIP7/pACT-RRP43	Zanchin et al., 1999
TAP-NOP17	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3, 112 trp1-289 ura3-52</i>	Euroscarf
TAP-RSA1	<i>MATα ade2 arg4 leu2-3, 112 trp1-289 ura3-52</i>	Euroscarf

3.5. Co-imunoprecipitação (co-ip) de Proteínas

Culturas com crescimento a 37°C das cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ expressando protA-Nop58p foram coletadas por centrifugação a 6000RPM e ressuspendidas em tampão (20mM Tris/HCl pH = 8,0; 0,5mM acetato de magnésio; 0,2% Triton X-100; 150mM acetato de potássio; 1mM DTT e 1mM PMSF). A lise das células foi realizada através de agitação em vórtex na presença de *glass beads*, por 30 minutos totais, com resfriamento em gelo durante 30 segundos, a cada 30 segundos de lise. Após centrifugação a 12000RPM, a imunoprecipitação foi realizada incubando-se o extrato total com a resina *IgG-Sepharose* (Amersham Biosciences) por 2 horas a 4°C. Após o tempo de incubação, a resina foi lavada com o mesmo tampão e amostras das frações referentes ao extrato total (ET), fração não ligada à resina (NL), lavagem (L) e imunoprecipitado (IP) foram coletadas e conservadas a -20°C. Para análise das proteínas imunoprecipitadas, as frações experimentais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (Sambrook et al., 1989).

3.6. Análise de proteínas por *Western blot*

Em cada uma das análises por *Western blot*, as frações de proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare), a qual foi bloqueada por incubação por 2 horas com 10mL de solução 5% leite desnatado em tampão PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; pH=7,4) ou PBS-T (PBS; 0,5% tween), seguida de 3 lavagens de 10 minutos por incubação com 10mL de tampão PBS ou PBS-T. Os anticorpos utilizados para hibridização com as diferentes membranas ao longo dos experimentos foram incubados por 2 horas a 4°C com agitação, diluídos em 0,5% leite desnatado em PBS ou em PBS-T. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-HIS₆ (GE Healthcare, camundongo, diluição 1:3000), anti-GST (Sigma, coelho, diluição 1:2000), anti-Nop17p (soro policlonal, camundongo, 1:500), anti-Nop1p (soro policlonal, coelho, 1:500) e anti-Snu13p (soro policlonal, camundongo, 1:500). Os anticorpos secundários foram: anti-IgG de coelho (GE Healthcare, conjugação com HRP, diluição 1:12000; Invitrogen, conjugação com fosfatase alcalina, 1:5000), anti-IgG de camundongo (GE Healthcare, conjugação com HRP, diluição 1:7500;

Invitrogen, conjugação com fosfatase alcalina, 1:5000). Entre as incubações com os anticorpos primário e secundário, bem como após a incubação com o anticorpo secundário, três lavagens foram realizadas nas mesmas condições citadas anteriormente.

Para revelação do *Western blot*, após hibridização com anticorpos conjugados com HRP, foi utilizado o *ECL Western Blotting Detection System* (GE Healthcare), para visualização do sinal por exposição a filme de raios-X. As membranas incubadas com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina foram submetidas à hibridização com uma solução de NBT/BCIP (Sigma-Aldrich) para marcação na própria membrana.

3.7. Co-imunoprecipitação (co-IP) de RNAs

Como descrito anteriormente, foram realizadas co-ips utilizando protA-Nop58p expressa à 37°C nas cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$. RNA total proveniente das frações da co-ip foi isolado através de um método empregando extrações com tampão acetato (50mM acetato de sódio; 10mM EDTA; pH=5,0) e fenol a quente, seguido de extrações com fenol-clorofórmio (50% fenol; 50% clorofórmio; 0,5% 8-hidroxiquinoleína) (Oliveira et al., 1995). O RNA total extraído do IP e 8µg de RNA total das frações referentes ao ET, NL e L foram separados em gel desnaturante (uréia 6M e acrilamida 8%) e transferidos para membranas de nylon (Hybond N+, GE Healthcare) para posterior ensaio de *Northern blot*.

3.8. Northern blot

Experimentos de *Northern blot* foram realizados como descrito em Oliveira et al., 2002, mas em resumo, a membrana com os RNA fixados foi submetida à hibridização com os oligonucleotídeos marcados radioativamente com ATP, [γ -³²P] (PerkinElmer). A análise foi realizada através de escaneamento em *PhosphorImager* e o sinal quantificado utilizando-se o programa ImageQuant. Os oligonucleotídeos utilizados contra o snoRNA U3 e o rRNA 5S estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para ensaios de Northern blot e qPCR

Oligonucleotídeo	Sequência	Referência
5S ^{for}	5' TTTCCCGTCCGATCAACTG 3'	Santos et al., 2011
5S ^{rev}	5' GCGAGGCAAATCCTGAAAATTT 3'	Granato et al., 2005
U3 prom ^{for}	5' CGAAGGCAAATCCTGAAAATTT 3'	Este estudo
U3 prom ^{rev}	5' TTGACAGCAGAATACAAAGCCTTT 3'	Este estudo
U3 exon1 ^{for}	5' TCAACCATTGCAGCAGCTTT 3'	Coltri et al., 2010
U3 exon1 ^{rev}	5' TCTGCTCCGAAATGAAAACCTAGTA 3'	Coltri et al., 2010
U3 exon2 ^{for}	5' TCTATAGGAATCGTCACTCTTTGACTC 3'	Coltri et al., 2010
U3 exon2 ^{rev}	5' GACCAAGCTAATTTAGATTCAATTTTCGG 3'	Coltri et al., 2010

3.9. CoIP de cromatina

Células das cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ expressando protA-Nop58p, incubadas a 37°C foram fixadas com 1% formaldeído e submetidas à co-ip de cromatina segundo protocolo descrito em Granato et al., 2008. As frações de IP, referentes ao DNA imunoprecipitado foram quantificadas utilizando-se qPCR como descrito a seguir.

3.10. Análise de DNA por qPCR

A fração IP proveniente da co-ip de cromatina serviu como molde para a reação de PCR quantitativa, para a qual foi utilizado o conjunto de reação *Máxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix* (Molecular Probes Inc., Eugene) em equipamento Real Time Applied Biosystem 7500. Os primers utilizados para a amplificação do snoRNA U3 e o rRNA 5S estão listados na Tabela 1, sendo os dados provenientes da quantificação equiparados com cálculos conforme Livak et al., 2001.

3.11. Localização de snoRNA através de FISH

O protocolo detalhado utilizado para a hibridização *in situ* entre o oligonucleotídeo 5'- ATG GGG CTC ATC AAC CAA GTT GG -3' e o snoRNA U3 nas cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ está descrito em <http://www.singerlab.org/protocols>. O

sistema de marcação fluorescente de oligonucleotídeo utilizado foi CyTM3ULS Labelling Kit (Amersham Biosciences) conforme instruções do fabricante. As microscopias foram realizadas em um Nikon TE300 equipado com objetiva x100 PlanFluor e as imagens foram capturadas com câmera Roper CoolSnap HQ.

3.12. Co-imunoprecipitação (co-ip) e cromatografia de exclusão por tamanho

Culturas de células das cepas TAP-RSA1 e TAP-NOP17 (*Euroscarf*) foram coletadas e ressuspensas em tampão (10mM Tris/HCl pH = 8,0; 1mM acetato de magnésio; 10mM 2-mercaptoetanol; 10mM PMSF; 150mM cloreto de sódio e 0,02% nonidet-P-40). A lise mecânica foi realizada por *ball-mill* (Retsch 200MM) a aproximadamente -196°C durante 6 minutos, sob frequência de agitação de 20/s. Após uma etapa de centrifugação (16.000RPM, 30 minutos), os extratos foram submetidos a imunoprecipitação, incubando-se com resina *IgG-Sepharose* (Amersham Biosciences). O material imunoprecipitado foi eluído através de clivagem com TEV protease (tampão experimental adicionado de 0,5mM EDTA, hibridização por 16h a 4°C) para a utilização em gel-filtração. A coluna cromatográfica escolhida foi a *SuperoseTM6* (a qual separa moléculas ou conjunto de moléculas de tamanho variando aproximadamente entre 15 e 600 KDa) sendo que o mesmo tampão de co-ip foi utilizado na cromatografia. As frações resultantes foram enviadas à análise por espectrometria de massas (LC-MS), as quais foram realizadas em equipamento NanoLC Proxeon Easy-nLC II acoplado com LTQ Orbitrap Velos ETD (Thermo Scientific).

3.13. Expressão de proteínas recombinantes em bactéria

A cepa BL21 de *E. coli* foi utilizada para expressão das proteínas de fusão GST-Snu13p, His-Nop1p e His-Nop17p. Para isso, alíquotas de BL21 competentes (estocadas em 0,1M CaCl e 15% glicerol a -80°C) foram transformadas com 10ng de DNA recombinante através de choque térmico a 42°C por 2 minutos, seguida de incubação com meio de cultura LB a 37°C por 1 hora. Os transformantes foram selecionados em meio LB na presença de antibióticos e as proteínas foram expressas em culturas de células crescidas a 30°C com adição de 0,5mM IPTG

durante 3 horas na fase exponencial de crescimento. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação à 6000RPM e estocadas a -20°C.

3.14. *Pull-down de proteínas in vitro*

Células de *E. coli* com GST, GST-Snu13p, His-Nop1p, e His-Nop17p expressas foram descongeladas e ressuspensas em PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; 1mM PMSF; 1mM DTT; pH=7,4). As células foram submetidas à lise em *French press* por 3 vezes, com pressão de aproximadamente 1000 PSIG e os resíduos celulares foram separados por centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C.

As concentrações de proteínas nos diferentes extratos foram quantificadas através de um ensaio colorimétrico, incubando extrato total protéico por 30 minutos a 37°C em solução 5mM CuSO₄ em ácido bicinconínico (BCA solution, Sigma). A concentração foi determinada por comparação com uma curva padrão de BSA (*bovine serum albumin*), com leituras realizadas em 562nm. O extrato total de proteínas de *E. coli* expressando GST ou GST-Snu13p foi incubado durante 1 hora a 4°C com resina de glutationa-sepharose (GE Healthcare), previamente lavada com água e equilibrada com PBS. Após imobilização de GST ou GST-Snu13p, a resina foi lavada com PBS e incubada durante 2 horas com extrato total de células expressando as proteínas HIS-Nop1p e HIS-Nop17p, separadamente uma após a outra, com intervalo de lavagens com PBS entre os extratos e após a segunda incubação. Após a última lavagem com PBS, as proteínas foram eluídas da resina por adição de tampão PBS contendo 10mM glutationa reduzida. Foram coletadas amostras de todas as etapas (ET, NL, L e pull-down (PD)), sendo as proteínas separadas por SDS-PAGE e analisadas por *Western blot* utilizando α-GST, α-His e α-Nop17p.

3.15. *Purificação de proteínas*

Para a purificação das proteínas de fusão, células de *E. coli* expressando GST-Snu13p, His-Nop1p e His-Nop17p foram ressuspensas em tampão A (50mM

Tris/HCl pH = 8,0; 350mM NaCl; 30mM imidazol para as fusões com His-tag e 50mM Tris/HCl pH = 8,0; 150mM NaCl para a fusão GST-tag), com adição de 1mM PMSF e 1mM DTT. Da mesma maneira como anteriormente citado, as células foram lisadas em *French press* e clarificadas por centrifugação. A metodologia de purificação utilizada foi coluna de afinidade, sendo utilizadas as seguintes colunas: Ni-NTA para as fusões com His-tag, e GST-trapp seguida de coluna de heparina para a fusão GST-Snu13p. O gradiente linear de tampão B (50mM Tris/HCl pH = 8,0; 350mM NaCl; 500mM imidazol para as fusões com His-tag, 50mM Tris/HCl pH = 8,0; 150mM NaCl; 30mM glutatona reduzida para a coluna de GST-trapp e 50mM Tris/HCl pH = 8,0; 1M NaCl para a coluna de heparina) foi realizado em *Akta FPLC*, e as frações do gradiente de purificação foram quantificadas por ensaio colorimétrico utilizando BCA e CuSO_4 e analisadas por SDS-PAGE seguida de coloração com prata.

3.16. Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

O ensaio de interação proteína-proteína através de SPR foi iniciado com uma etapa de montagem e estabilização do disco, e para isso, um disco de superfície de ouro (AutoLab) foi tratado com: ácido mercaptoundecanóico e tampão acetato durante 4 horas, 100 μL 0,1M EDC/ 0,025M NHS por 15 minutos, 100 μL de solução de 0,1g/L glutatona reduzida em PBS durante 30 minutos seguida de lavagem com água por 15 minutos. Para bloqueio, foi utilizado 100 μL de 1M etanolamina/Tris/HCl pH = 8,5 durante 15 minutos. As proteínas purificadas e dialisadas contra o mesmo tampão (50mM Tris/HCl pH = 8,0; 100mM NaCl) foram adicionadas e incubadas separadamente durante uma hora na superfície do disco obedecendo a seguinte ordem: GST-Snu13p, His-Nop1p e His-Nop17p, com lavagens de 30 minutos (utilizando tampão proveniente da diálise) entre cada adição. Os dados de mudança do sinal SPR foram coletados em tempo real.

3.17. Construção de mutante de Nop17p

A construção dos inúmeros vetores pBTM-NOP17mutantes foi realizada de acordo com Mulhrad et al., 1992, utilizando-se pBTM-NOP17 como plasmídeo molde, na montagem da reação de PCR (10ng DNA molde, 1x tampão de reação

(100mM Tris-HCl pH 8,3, 500mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,05mM MnCl₂), 1mM dGTP/dCTP/dTTP, 200µM dATP, 2un. DNA polimerase (purificada) para amplificação do gene NOP17 para introdução de mutações aleatórias. Para a análise da interação destes mutantes com Tah1p, os mutantes foram inseridos no pBTM-NOP17 linearizado (sítio EcoNI) via recombinação homóloga por transformação direta de L40/pGAD-Tah1p. A seguir, os mutantes foram testados utilizando a marca de auxotrofia da cepa L40 no sistema de duplo-híbrido (proteínas de fusão BD-Nop17p(mutantes) e AD-Tah1p). Os mutantes foram sequenciados utilizando-se os primers listados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Lista de primers utilizados para o sequenciamento dos mutantes de Nop17p

Primer	Sequência	Referência
lexA	5' CTTGTCAGCAGAGC 3'	Este estudo
NOP17for230	5' GTTGGAGAACACATAGGCACTTC 3'	Este estudo
137rev250	5' GCGGGAACACTATCC 3'	Este estudo
137for570	5' GAAGAGGAGGCCGGAG 3'	Este estudo
137rev650	5' CCATCGTCGTCGGGATCA 3'	Este estudo
pBTMrev	5' GTCACCTTAAAATTTGTAATAAC 3'	Este estudo

3.18. Análise *in vivo* de interação entre proteínas pelo método do duplo-híbrido

O sistema utilizado neste trabalho foi descrito previamente (Chien et al., 1991, James et al., 1996). Foram realizados os testes de crescimento em meio sem histidina e de atividade de β -galactosidase (utilizando-se X-GAL) para análise de interação proteína-proteína *in vivo*.

4. RESULTADOS

4.1. Nop17p, Rsa1p e Tah1p

Nop17p e Rsa1p são proteínas conservadas evolutivamente, não essenciais para a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, e ambas foram inicialmente caracterizadas por atuarem indiretamente no processamento de rRNA. Enquanto Rsa1p de *S. cerevisiae* foi identificada pela sua participação em passos tardios da montagem da subunidade ribossomal maior 60S (Kressler et al., 1999), Nop17p foi caracterizada por influenciar o processo de síntese dos rRNAs 25S e 18S, afetando assim a maturação de ambas as partículas ribossomais, 60S e 40S (Gonzales et al., 2005). Além disso, Nop17p e Rsa1p foram descritas como fatores importantes para a montagem dos snoRNPs de *box C/D*, apresentando interação direta *in vitro* com diferentes subunidades do *core* deste complexo: Nop58p e Snu13p, respectivamente (Zhao et al., 2008). As duas proteínas interagem entre si *in vitro* e encontram-se localizadas de maneira mais concentrada no nucléolo celular.

Nop17p possui 39,5 KDa e, apesar de não apresentar domínios estruturais definidos, possui duas regiões caracterizadas, chamadas *intrinsically disordered regions* (IDR). Estas sequências tiveram sua importância destacada na associação junto às demais proteínas do complexo R₂TP: a região IDR1 é formada pelos aminoácidos Gly195–Leu227 e é responsável pela interação com as proteínas Rvb1p e Rvb2p, enquanto IDR2, abrangendo os aminoácidos Asn240–Tyr267, compreende a região de interação com Tah1p (Paci et al., 2012). Rsa1p tem 43,9 KDa e apresenta uma região conservada chamada motivo PEP, que abrange os aminoácidos Thr232–His264 e é responsável pela interação com Snu13p (Boulon et al., 2008). Na Figura 6a, uma representação esquemática da sequência de aminoácidos das proteínas destaca as regiões descritas.

Tah1p é também uma proteína conservada evolutivamente e não essencial em *S. cerevisiae*, descrita como parte integrante do complexo R₂TP, onde estabelece interação direta com Nop17p, para atuarem juntamente na regulação da chaperona Hsp90. Tah1p possui 12,5 KDa e contém dois motivos TPR, compreendidos pelas sequências Ser2–Ala33 e Pro38–Arg66 na porção N-terminal da proteína. Estes domínios são comumente encontrados em diversos cofatores da

Hsp90 e outras chaperonas, podendo estar presentes em até dezesseis repetições, para o reconhecimento da sequência de resíduos EEVD na porção C-terminal da Hsp90 (Jiménez et al., 2011), os quais também estão representados na Figura 6a.

Mutantes de deleção dos genes destas proteínas apresentam fenótipo condicional a 37°C, sendo assim termosensíveis. Para a análise de crescimento das cepas mutantes, foram realizadas curvas de crescimento a 25°C e 37°C em meio líquido. *Δtah1* manteve sua taxa de crescimento muito próxima da cepa selvagem (*WT*), tanto a 25°C quanto a 37°C (Fig. 6b). Por outro lado, culturas de células das cepas com os genes das proteínas Nop17p e Rsa1p deletados individualmente (*Δnop17* e *Δrsa1*) apresentam crescimento 3,7% e 10,2% menor a 37°C, respectivamente, e *Δrsa1* já apresentou uma taxa menor de razão de crescimento mesmo a 25°C, 8,6% menor em comparação à *WT* (Figura 6b). Dessa forma, os demais estudos *in vivo* das cepas mutantes de deleção foram realizados a 37°C.

É importante ressaltar que essas três proteínas estão envolvidas na via de montagem/estabilização de complexos de snoRNPs, mas suas funções moleculares não foram ainda determinadas. Quando os mutantes de deleção são incubados em temperatura mais alta, as células têm seu crescimento inibido, o que reforça a hipótese da importância destas proteínas em montagem e estabilização de complexos, que ficariam mais instáveis em temperaturas mais altas. O fato de nenhum destes fatores serem essenciais para a viabilidade celular pode indicar alguma redundância funcional ainda não identificada.

Figura 6: Nop17, Rsa1p e Tah1p. (a) Diagramas de representação das proteínas apresentam as respectivas sequências de aminoácidos, destacando regiões envolvidas na interação com outras proteínas. IDR: *intrinsically disordered regions*, TPR: *tetratricopeptide domain* (b) Comparação do crescimento celular das cepas $\Delta nop17$, $\Delta rsa1$ e $\Delta tah1$ em relação à cepa WT de *Saccharomyces cerevisiae*. As medidas de absorbância à 600nm para as curvas de crescimento a 25°C e 37°C foram realizadas em meio YPD líquido durante 12 horas.

4.2. A ausência de Nop17p e Rsa1p influencia a estabilidade da proteína Nop58p do core de snoRNP de *box C/D in vivo*

Como mencionado acima, Nop17p e Rsa1p foram inicialmente descritas como proteínas relacionadas aos snoRNPs de *box C/D*, através da interação direta com as proteínas Nop58p e Snu13p respectivamente, as quais são subunidades destes complexos. Para analisar os níveis de Nop58p no core de snoRNPs de *box C/D*, bem como a estabilidade deste complexo maduro na ausência de Nop17p e Rsa1p, foram realizados ensaios de coimunoprecipitação de snoRNPs de *box C/D* com a proteína de fusão protA-Nop58 expressa nas cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$, seguidos por *western blot*. Os resultados mostram que a proteína Nop58p encontra-se muito mais instável nas cepas $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$, sendo detectada uma maior proporção de bandas correspondentes a fragmentos desta proteína tanto nas frações correspondentes ao extrato total, bem como nas imunoprecipitações nas amostras das cepas de deleção (Figura 7a, representada por *). De maneira interessante, embora Nop58p seja muito instável na cepa $\Delta nop17$, as frações correspondentes à imunoprecipitação indicam que Nop58p ainda é capaz de manter interação estável com Nop1p dentro do complexo maduro e Nop1p continua estável na ausência de Nop17p (Figura 7a, figura abaixo). Este resultado está de acordo com dados anteriores mostrando a estabilidade da proteína Nop1p em células depletadas de Nop58p (Lafontaine e Tollervey, 1999).

Nop58p, assim como Nop56p, possui um domínio *coiled-coil* na região central da proteína e repetições *KKE/D* na região carboxi-terminal. Esta região C-terminal não é essencial para a função da proteína, e foi caracterizada como uma região que confere instabilidade às proteínas *in vitro*, e deve atuar como uma região de ligação proteína-proteína *in vivo* (Gautier et al., 1997). Análise de protA-Nop58p por *western blot* mostra que a Nop58p é quebrada, resultando na falta de uma região que pode ser importante para associação de outras proteínas a fim de manter Nop58p, e por consequência o complexo, estáveis. Este experimento permite a conclusão de que a região C-terminal de Nop58p está sendo proteolisada porque a proteína A, detectada pelo anti-soro, está fusionada à porção N-terminal de Nop58p, visualizada como uma banda de menor massa molecular. Os dados iniciais da importância de Nop17p e Rsa1p para o processamento do pré-rRNA podem ser inicialmente explicados pelo envolvimento direto destas proteínas na montagem e/ou a

manutenção dos snoRNPs de box C/D. A depleção de Nop17p ou Rsa1p causa a desestabilização de snoRNPs de box C/D e tais complexos são responsáveis por modificações covalentes durante as etapas iniciais do processamento do rRNA precursor pré-35S.

4.3. A depleção de Nop17p e Rsa1p afeta a quantidade do snoRNA U3 presente nos snoRNPs

Uma vez que Nop17p e Rsa1p são importantes para a estabilidade da proteína Nop58p, e esta estabelece interação direta com o snoRNA na formação e atuação dos snoRNPs de *box C/D in vivo*, foram realizadas análises do snoRNA U3 na ausência das proteínas em estudo. RNA total extraído de coimunoprecipitação com protA-Nop58p das cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ foram utilizados em ensaios de *northern blot*, com análise através de sondas específicas para o snoRNA U3 e o rRNA 5S, o qual foi escolhido como controle interno devido tanto à sua alta concentração celular, como ao seu processamento independente de snoRNPs de *box C/D*. Da quantificação das bandas (Figura 7b) dos RNAs presentes nas amostras, o que se observa é o snoRNA U3 ligado especificamente à Nop58p, de maneira mais abundante na cepa $\Delta nop17$. Já a ausência da Rsa1p, não pareceu afetar significativamente a interação entre Nop58p e o snoRNA U3.

O snoRNA de *box C/D* U3 participa das clivagens iniciais do precursor 35S, e para isso, estabelece importantes conexões com o rRNA e com proteínas acessórias. Devido a esta característica, este snoRNA é essencial para viabilidade da célula e encontra-se como um dos mais abundantes no núcleo celular (Osheim et al., 2004). Os resultados obtidos aqui são intrigantes porque indicam que embora na ausência de Nop17p, Nop58p fique mais instável, sua interação com o snoRNA fica mais estável. Com base na estrutura dos snoRNPs de *box C/D* de *archaea*, o domínio N-terminal de Nop58p deve ser responsável por sua interação com Nop1p, a região central contendo o *coiled-coil* deve mediar a formação do heterodímero Nop58p-Nop56p, e o domínio C-terminal é responsável pela interação com RNA (Ye et al., 2009). São necessários, portanto, mais dados estruturais da proteína de levedura para ser possível explicar os resultados mostrados aqui.

Figura 7: Estabilidade dos snoRNPs de *box* C/D. (a) Ensaio de co-imunoprecipitação de proteínas utilizando Nop58p como isca. Extrato total de *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ expressando protA-Nop58 foram submetidas à co-ip em IgG-sepharose para análise da estabilidade de Nop58p no extrato total (ET) e no complexo imunoprecipitado (IP). NL representa o material não ligado à resina e L a última etapa de lavagem. A figura abaixo destaca também a estabilidade de Nop1p mantida ao longo do experimento. *, porção de protA-Nop58p (b) Análise de ligação do snoRNA U3 a Nop58p. Extrato celular total das cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ foram utilizados para co-imunoprecipitação seguida de extração de RNA total, os quais foram resolvidos em gel desnaturante e submetidos a *northern blot* com sondas radioativas contra o snoRNA U3 e o rRNA 5S.

4.4. Mutantes de deleção de Nop17p e Rsa1p promovem alterações na formação de snoRNPs já durante a transcrição de U3

Durante a biogênese dos snoRNPs, a associação das proteínas do *core* já se dá enquanto o snoRNA ainda está sendo transcrito. Como a interação proteína-RNA nestes complexos é alterada *in vivo* na ausência de Nop17p, realizamos ensaios de coimunoprecipitação de cromatina (ChIP) nas cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$, para verificar se a ligação das proteínas do *core* do complexo ao snoRNA U3 pode ser afetada já no início da sua formação, isto é, durante a transcrição. A análise de ligação de Nop58p ao snoRNA U3 foi realizada por PCR quantitativo em tempo real das frações de co-imunoprecipitação de cromatina com protA-Nop58p, utilizando-se *primers* para quatro diferentes regiões do U3, representados na Figura 8, e para uma região intergênica do cromossomo IV como controle.

Um aumento significativo de U3 co-imunoprecipitado com Nop58p co-transcricionalmente foi observado nas duas cepas mutantes, usando primers para as duas regiões do segundo exon do snoRNA (Figura 8), confirmando a diferença da quantidade do snoRNA U3 ligado à Nop58p na ausência de Nop17p e indicando que Rsa1p possa influenciar a ligação de Nop58p durante as etapas iniciais da montagem dos snoRNPs de *box C/D*. Isso reforça a hipótese de que Nop17p e Rsa1p estejam envolvidas na montagem de snoRNPs, e de que a associação destas às proteínas do *core* de snoRNPs já se dá em etapas iniciais da sua formação, ainda enquanto o snoRNA está sendo transcrito.

Figura 8: Análise de ligação co-transcricional de Nop58p ao snoRNA U3 por qPCR. Extrato total de culturas de células das cepas *WT*, Δ *nop7* e Δ *rsa1* foram utilizados para co-imunoprecipitação de cromatina seguida de quantificação de material nucléico precipitado. A quantificação do gene do snoRNA U3 ligado à Nop58p foi realizada por qPCR utilizando-se *primers* específicos para o snoRNA U3 (representados acima) e para uma região intergênica do cromossomo IV como gene de referência.

4.5. Localização do snoRNA U3 nos mutantes de deleção de Nop17p e Rsa1p

O snoRNA U3 é transcrito no núcleo, processado e associado a algumas proteínas necessárias para a formação do SSU no nucleoplasma e nos corpos nucleolares enquanto é transportado até o nucléolo, onde sua montagem é finalizada para exercer sua função no processamento da partícula ribossomal precursora 90S (Verheggen et al.; 2002). Trabalhos anteriores já mostraram genes envolvidos com o transporte e a localização do snoRNA na célula (Qiu, et al.; 2008), e dado o efeito de Nop17p e Rsa1p na montagem de snoRNP, partimos para ensaios de análise da localização de snoRNA U3 nos mutantes de deleção $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$.

Para tal, foram realizados ensaios de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando-se o sistema CyTM3ULS e microscopia de fluorescência, em culturas crescidas nas temperaturas permissiva (25°C) e restritiva (37°C). O snoRNA U3 maduro localiza-se no nucléolo, um sub-compartimento nuclear onde ocorre a transcrição e as primeiras etapas do processamento de rRNA. Consequentemente, este compartimento tem alta concentração de RNA e proteínas e é visualizado como não sobreposto ao DNA, exemplificado na cepa *WT* a 25°C (Figura 9a).

Comparando-se as diferentes cepas e condições nas Figuras 9a e 9b, a localização do snoRNA U3 é drasticamente afetada nas células com Rsa1p deletada já na temperatura permissiva. O snoRNA U3 encontra-se espalhado tanto no núcleo quanto no citoplasma, e este efeito é acentuado em condição restritiva, 37°C (Fig. 9b). Já na ausência de Nop17p, a alteração na localização do U3 ocorre somente na temperatura mais elevada, em que o snoRNA também encontra-se espalhado pelo citoplasma celular. O experimento de FISH para localização do snoRNA U3 também foi realizado na cepa $\Delta tah1$, que também apresenta uma menor concentração de U3 no nucléolo na condição não permissiva, embora seu efeito seja menos drástico do que o da ausência de Nop17p (Figura 9).

Estes dados são importantes, pois a perda da localização correta do snoRNA U3 suporta os resultados de má-estruturação dos complexos snoRNPs e a diminuição da sua funcionalidade no processamento de rRNA, uma vez que snoRNPs maduros mal formados não são direcionados para o nucléolo.

A

Figura 9: Localização subcelular do snoRNA U3 nas cepas *WT*, $\Delta nop17$, $\Delta rsa1$ e $\Delta tah1$ nas condições permissiva e restritiva. A análise de localização de RNA foi realizada por FISH nas diferentes cepas com crescimento a 25°C (a) e 37°C (b) utilizando-se oligonucleotídeo com marcação fluorescente contra o snoRNA U3. As sobreposições foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

B

Figura 9: Continuação

4.6. Purificação de Nop17p e Rsa1p via TAP-tag

Com o objetivo de conhecer mais a respeito dos complexos os quais Nop17p e Rsa1p associam-se *in vivo*, técnicas de purificação a partir de grandes volumes de cultura foram realizadas com as cepas TAP-NOP17 e TAP-RSA1. Utilizando-se as metodologias de *TAP-tag* e cromatografia de exclusão por tamanho, as proteínas co-precipitadas por Nop17p e Rsa1p foram identificadas por espectrometria de massas (LC-MS).

Infelizmente, nenhum resultado conclusivo foi obtido nas análises por espectrometria de massas, tanto das frações analisadas em solução quanto depois de separação de bandas por SDS-PAGE e extração das proteínas a partir do gel. As diferentes tentativas de purificação de complexos *in vivo* foram realizadas em diferentes tampões e com um grande volume de cultura, de até 10L, o que não foi suficiente para identificar Nop17p e Rsa1p formando complexos estáveis.

Com base nestes resultados, podemos concluir que Nop17p e Rsa1p não formam complexos estáveis o suficiente para permitir sua purificação. É provável que estas proteínas interajam com subunidades do R₂TP e do snoRNP de *box C/D* transientemente na célula. Isso é principalmente possível no caso de Nop17p, já que esta proteína interage diretamente com muitas proteínas na célula, dentre elas, Tah1p e Hsp90p (Zhao et al., 2005), Rvb1p e Rvb2p (Zhao et al., 2008), Nop58p e Rrp43p (Gonzales et al., 2005), Cwc24p (Goldfeder et al., 2007) e Nop53p (Granato et al., 2005).

Para tentar obter complexos formados com estas proteínas, foram realizados experimentos com a utilização de reagentes de *crosslink in vivo*, mas também assim não foi possível o isolamento de complexos protéicos com Nop17p e Rsa1p. A Tabela 5 destaca algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massas, que correspondem a proteínas muito abundantes na célula e que também foram encontradas em experimentos de coimunoprecipitação com proteína A de *S. aureus* expressa em leveduras e utilizada como controle.

Como estas técnicas não nos permitiram isolar complexos maiores relacionados à Nop17p e Rsa1p, nem estabelecer uma conexão *in vivo* dos complexos R₂TP e snoRNP de *box C/D*, partimos para estudos *in vitro* da montagem do *core* de snoRNPs.

Tabela 5. Proteínas identificadas por espectrometria de massas após purificação por TAP-tag e coluna cromatográfica.

<i>Open Reading Frame</i>	Proteína	Observação
YGR192C	Tdh3p	Gliceraldeído desidrogenase
YJL052W	Tdh1p	Gliceraldeído desidrogenase
YAL038W	Cdc19p	Piruvato quinase
YPR080W	Tef1p	Fator de elongação da tradução
YLR141W	Rrn5p	Envolvida em transcrição do DNA
YBR196C	Pgl1p	Fosfoglucoose isomerase
YKL060C	Fba1p	Frutose 1,6-bifosfato aldolase
YOLO86C	Adh1p	Álcool desidrogenase
YHR139C	Eno2p	Enolase
YJR139C	Hom6p	Homoserina desidrogenase
YDR050C	Tpl1p	Triose fosfato isomerase
YDR023W	Ses1p	Seril-tRNA sintetase citosólica
YCR012W	Pgk1p	3-fosfoglicerato quinase
YLR044C	Pdc1p	Piruvato descarboxilase
YER043C	Sah1p	S-adenosil-L-homocisteína hidrolase
YDR043C	Heh2p	Proteína de membrana nuclear
YHL034C	Sbp1p	Proteína envolvida em tradução
YMR083W	Adh3p	Álcool desidrogenase mitocondrial
YOR133W	Eft1p	Fator de elongação
YHR183W	Gnd1p	6-fosfogluconato desidrogenase
YKL081W	Tef4p	Fator de elongação (subunidade)

4.7. Montagem *in vitro* de snoRNPs de *box C/D*

Para estudar a formação de snoRNPs de *box C/D*, bem como a participação de Nop17p na montagem do *core* do complexo, foi utilizada a metodologia de *pull-down* de proteínas, com proteínas expressas em *E. coli*. A proteína de fusão GST-Snu13p foi escolhida como isca, por sua interação com os snoRNAs se dar de maneira independente das demais proteínas, e atuar assim como um dos fatores responsáveis por direcionar as demais para o complexo (Watkins, et al. 2002). As outras proteínas do *core*, foram expressas em fusão com His-tag (His-Nop1p, His-Nop56p, His-Nop58p ou His-Nop17p) e a fração correspondente à eluição pôde ser analisada por *Western blot* utilizando anti-soros anti-His e anti-GST.

Neste experimento, extrato total de células expressando GST-Snu13p foi passado por uma coluna de glutationa-sefarose. O material não ligado foi descartado e, em seguida, a resina foi lavada para que fossem mantidas somente as proteínas ligadas especificamente à resina. Depois disso, em cada ensaio, extrato total de células expressando His-Nop1p, His-Nop56p, His-Nop58p ou His-Nop17p foi adicionado, descartando-se novamente o material não ligado, e seguindo com a lavagem da resina antes da eluição das proteínas. Observou-se que os extratos de His-Nop17p, His-Nop56p e His-Nop58p não estão presentes no material eluído, representado por PD (*pull-down*) na Figura 10, e somente His-Nop1p foi co-precipitada por GST-Snu13p (a qual estava eficientemente imobilizada na coluna) (Figura 11a). Este primeiro resultado mostra que Nop1p interage diretamente com Snu13p, diferente de Nop56p, Nop58p ou Nop17p e Nop1p pode estar assim, mediando a interação entre as outras proteínas do *core*.

Os ensaios seguintes foram realizados para investigar se isso se dá de fato, e GST-Snu13p e His-Nop1p previamente imobilizadas na resina foram incubadas com extrato total de His-Nop56p, His-Nop58p e His-Nop17p separadamente. Como resultado, observou-se que além de His-Nop1p, His-Nop17p também foi co-precipitada por GST-Snu13p, (Figura 11b (anti-His e anti-Nop17p)), e isso nos sugere que as proteínas Nop1p e Snu13p juntas podem formar um domínio que interage com Nop17p, mostrando que esta pode estar ainda envolvida na formação e estabilização do complexo em fases anteriores à de ligação de Nop58p ao complexo. O fato de sua interação ser fraca demonstra que esta associação de Nop17p às duas proteínas do *core* deve ser dada de maneira rápida, já que Nop17p

parece atuar como uma co-chaperona assistindo a formação do complexo e reforça a conclusão apresentada acima de que Nop17p se liga a outras proteínas de forma transiente enquanto os complexos são formados.

Figura 10: *Western-blot* das frações de ensaio de *pull-down* de proteínas em glutationa-sepharose. (a) His-Nop17p com GST e GST-Snu13p; ET1: GST; ET2: GST-Snu13p; ET3: His-Nop17p; NL1: GST; NL2 e NL4: His-Nop17p; NL3: GST-Snu13p. (b) His-Nop58p com GST e GST-Snu13p; ET1: GST; ET2: GST-Snu13p; ET3: His-Nop58p; NL1: GST; NL2 e NL4: His-Nop58p; NL3: GST-Snu13p. (c) His-Nop58p com GST e GST-Snu13p; ET1: GST; ET2: GST-Snu13p; ET3: His-Nop58p; NL1: GST; NL2 e NL4: His-Nop58p; NL3: GST-Snu13p. Anticorpos indicados na figura.

Figura 11: *Western-blot* das frações de ensaio de *pull-down* de proteínas em glutathiona-sepharose resolvidas em gel desnaturante. (a) His-Nop1p com GST e GST-Snu13p (ET1: GST; ET2: GST-Snu13p; ET3: His-Nop1p; NL1: GST; NL2 e NL4: His-Nop1p; NL3: GST-Snu13p). PD (*pull-down*): material eluído da resina utilizando-se glutathiona reduzida, ET: extrato total e NL: material não ligado. (b) His-Nop17p com His-Nop1p e GST ou His-Nop1p e GST-Snu13p. Os anticorpos utilizados - α -GST, α -His e α -Nop17p - estão indicados nas figuras.

4.8. Purificação das proteínas de fusão GST-Snu13p, His-Nop1p e His-Nop17p, síntese do chip Au-MUA-EDC/NHS-GR e montagem *in vitro* de snoRNPs de box C/D

Os ensaios realizados anteriormente através da técnica de *pull-down* de proteínas mostraram que Nop1p e Snu13p associadas parecem formar um domínio de interação com Nop17p, fortalecendo ainda mais a hipótese deste ser um fator importante para a formação e estabilização do complexo de snoRNP de box C/D. O fato de sua interação ser fraca (sugerindo que esta associação de Nop17p às duas proteínas do *core* deve ser transiente) necessita de outra metodologia mais sensível para confirmação destes dados. Assim, decidimos buscar padronizar a purificação destas proteínas de fusão, a fim de realizar experimentos de ressonância plasmônica de superfície (SPR), além de estabelecer uma síntese de um chip de glutatona reduzida (GR), o qual seria utilizado como aparato para a interação da primeira proteína isca, GST-Snu13p.

Os dados de SPR (unidade SPR) são acompanhados ao longo do tempo, e correspondem ao fenômeno de ressonância plasmônica na superfície do metal base do chip (ouro, no nosso caso). As condições de ressonância são influenciadas pelo material adsorvido no filme do metal, existindo uma relação linear entre a energia de ressonância e a concentração de massa de moléculas adsorvidas. De maneira simplificada, o sinal SPR é uma medida indireta da massa na superfície do *sensor chip*, já que outras variáveis como temperatura e índice de refração também devem ser levadas em consideração (Salamon et al, 1997).

Para a obtenção das proteínas de fusão, as mesmas foram expressas em *E. coli* (Figura 12a) e purificadas através de coluna de afinidade compatível com os *tags* (Ni-sefarose para His₆ e Glutationa-sefarose para GST). Dentre as três fusões utilizadas, GST-Snu13p foi a proteína com melhor eficiência na purificação (Figura 12b), devido à boa expressão em *E. coli*, eficiência da purificação, e obtenção de eluição da proteína em altas concentrações. Já no caso de Nop1p e Nop17p em fusão com His-*tag*, a expressão destas proteínas é baixa e, conseqüentemente, as concentrações finais das proteínas purificadas também são baixas (Figura 12b). Para os testes *in vitro* de interação e estabilidade, foram utilizadas quantidades iguais das proteínas já dialisadas contra um mesmo tampão (esta etapa de diálise é

Figura 12: Purificação de proteínas de fusão para SPR. (a) Proteínas de fusão expressas em *E. coli*, separadas por eletroforese e coradas com *Comassie blue* (NI: não induzido; I: indução por 3 horas). (b) Proteínas de fusão expressas em *E. coli*, e purificadas por coluna cromatográfica em FPLC. As proteínas purificadas foram separadas por eletroforese e coradas com prata. Os números indicados nas figuras representam as diferentes frações das colunas de purificação.

importante, já que a mesma condição salina e de pH é necessária para caracterizar controles negativos e formar linhas de bases experimentais no SPR).

Com SPR, conseguimos uma boa eficiência na síntese dos chips de glutathione reduzida, a qual é composta de algumas etapas que permitem a formação de um filme plano e estável sobre a superfície do ouro, com carboxilatos ativados por EDC/NHS que reagem de maneira rápida e covalente com a GR (Figura 13a). Esta molécula (GR) foi escolhida para funcionar como plataforma para a primeira proteína isca (por se associar simetricamente ao MUA e estabelecer uma forte interação GST-Snu13p). O tampão utilizado como linha base experimental foi o mesmo tampão proveniente da diálise das três proteínas de fusão juntas, e foi utilizado também como solução de lavagem.

Observando as etapas de interação proteína-proteína nos sensorgramas da Figura 13b, reforçamos os dados de interação entre Nop17p e as proteínas do core de snoRNPs de box C/D Nop1p e Snu13p juntas, confirmando assim, o envolvimento de Nop17p na montagem de snoRNP de box C/D em etapas anteriores à ligação de Nop58p ao complexo.

Figura 13: *SPR* para interação proteína-proteína. (a) Sensorgrama de acompanhamento da síntese do *chip* de glutathione reduzida, o qual demonstra a variação do ângulo *SPR* em função do tempo. As diversas etapas durante a síntese estão representadas no gráfico. (b) Sensorgramas provenientes dos ensaios de interação proteína-proteína por *SPR*. Cada quadro é referente a uma das proteínas, adicionadas em *chip* de glutathione sintetizado.

B

Figura 13: Continuação

4.9. Nop17p interage fortemente com Tah1p, proteína do complexo R₂TP

Como já era conhecida a participação de Nop17p no complexo R₂TP, realizamos ensaios de interação proteína-proteína buscando analisar a força de interação entre Nop17p e Tah1p e também com a chaperona Hsp82p, a qual este complexo é associado. A proteína de fusão BD-Nop17p foi utilizada como isca no sistema do duplo-híbrido e sua interação com as proteínas fusionadas ao domínio da ativação da transcrição (AD) foi testada. De acordo com os resultados de análise de crescimento em meio seletivo e do teste de expressão de β -galactosidase na presença de X-Gal, Figura 14a, a força da interação estabelecida entre Nop17p e Tah1p é muito grande (comparável ao controle positivo Nip7p – Nop8p), enquanto que Nop17p não interage com Hsp82p neste sistema. Outros dados de duplo-híbrido, entre Nop17p e as subunidades Rvb1p e Rvb2p do R₂TP, e também das proteínas Cwc24p, Dre2p e Nop58p confirmam sua interação, variando de fraca (Dre2p), intermediária (Rvb2p e Cwc24p) até forte (Rvb1p, Tah1p e Nop58p), na Figura 14b. Estes dados reforçam a associação de Nop17p ao R₂TP, e exemplifica outro complexo que pode ser assistido pelo R₂TP e a chaperona Hsp90, neste caso o complexo de *splicing*, via Cwc24p.

Figura 14: Rede de interação entre Nop17p e proteínas do R₂TP e outras proteínas envolvidas em processamento de rRNA. (a) Ensaio de duplo-híbrido para confirmar força de interação entre Nop17p e Tah1p, utilizando-se da comparação com os controles (-), (+) e (++). (b) Ensaio de duplo-híbrido entre Nop17p e as proteínas Rvb1p, Rvb2p, Cwc24p, Dre2p e Nop58p. A análise se dá através da expressão dos genes HIS3 (-HIS) e da β-galactosidase (x-gal).

4.10. Identificação da região específica de Nop17p envolvida na interação com Tah1p

Zhao et al., 2008 mostraram a participação de Nop17p no complexo R₂TP, enfatizando sua interação direta com Tah1p através das porções carboxila-terminal de ambas proteínas. Para melhor entender a especificidade dessa interação, utilizamos mutagênese por PCR (Mulhrad et al., 1992) para gerar mutantes aleatórios de Nop17p, os quais foram transformados na cepa L40 e submetidos à ensaios de duplo-híbrido. Na Figura 15a, está representada a condição de interação Nop17p-Tah1p, com transcrição do gene repórter HIS3. A técnica de mutagênese aleatória e a condição de não-interação (L40/pBTM-NOP17(mutantes)+pGAD-TAH1) pelos transformantes gerados estão representadas na Figura 15b, e assim, 917 colônias transformantes foram testadas. De todas as colônias cultivadas, somente uma não foi capaz de crescer em meio de cultura YNB na ausência de histidina, isto é, não foi capaz de interagir com Tah1p neste sistema (Figura 16a).

O mutante selecionado foi sequenciado por três vezes utilizando-se diferentes *primers* que compreendessem o comprimento total do gene da proteína, os quais estão representados na Figura 16b e listados na Tabela 4. A mutação referente ao aminoácido asparagina³⁰⁷ foi validada, e a troca de asparagina por serina na posição 307 afeta a interação Nop17p – Tah1p diretamente, ou através de desestruturação do domínio carboxi-terminal, afetando a interação estabelecida com Tah1p indiretamente. Este resultado é importante, porque o aminoácido asparagina 307 não está incluído nas regiões caracterizadas como ‘desordenadas’, citadas anteriormente, e delimita ainda mais a região de interação Nop17p-Tah1p.

Figura 15: Representação esquemática da construção da mutante Nop17(N307S). (a) Técnica de duplo-híbrido, com His3 como gene repórter. (b) Representação da técnica descrita em Mulhrad et al., 1992 e utilizada para gerar mutantes aleatórios de Nop17p (transformantes).

4.11. Caracterização do mutante Nop17(N307S)

A proteína Nop17(N307S) não interage com Tah1p *in vivo*, e para melhor caracterizarmos este mutante, ensaios de complementação e interação proteína-proteína foram realizados. Na Figura 16c, ensaios de duplo-híbrido entre Nop17(N307S) e as proteínas já conhecidas com relação à sua força de interação com Nop17(WT) (Figura 14b) mostram que o mutante deixa de interagir também com as proteínas Rvb2p e Nop58p, mantendo somente uma interação fraca com Cwc24p e Rvb1p. Isso indica que, a mutação N307S deve afetar outras regiões da Nop17p, desestruturando seus domínios de interação com outras proteínas.

Na Figura 17, as cepas *WT*, $\Delta nop17$ e $\Delta nop17$ transformadas com o plasmídeo pMET expressando tanto Nop17p selvagem quanto Nop17(N307S) foram comparadas em relação à suas taxas de crescimento celular nas temperaturas permissiva, 25°C e restritiva, 37°C. As taxas de crescimento das transformantes $\Delta nop17/Nop17$ e $\Delta nop17/Nop17(N307S)$ foram comparáveis àquela estabelecida pela cepa *WT*, diferente de $\Delta nop17$, a qual exibe uma razão de crescimento menor à 37°C. Este resultado tem a mesma dificuldade de interpretação do encontrado com a cepa $\Delta tah1$, que também apresenta crescimento celular comparável ao da cepa *WT* (Figura 6b). Tanto a falta da proteína Tah1p, quanto a não interação Nop17p - Tah1p desestabilizam a formação do R₂TP, e consequentemente, a montagem correta do snoRNP de box C/D, mas nenhuma destas características parece afetar o crescimento celular. A idéia de que outra proteína possa substituir funcionalmente Tah1p não pode ser descartada, mas devido à Nop17p não formar complexos estáveis passíveis de identificação, não podemos sugerir um fator que possa estar presente nestes complexos *in vivo*.

Figura 16: Sequenciamento e ensaios de duplo-híbrido com Nop17(N307S). (a) Ensaio de interação proteína-proteína com uma das 917 colônias testadas para interação Nop17p-Tah1p. (b) Representação esquemática dos primers utilizados para sequenciamento do mutante encontrado. (c) Ensaio de 2HY com Nop17(N307S). As proteínas do R₂TP (Rvb1p, Rvb2p, Tah1) e a chaperona Hsp90 foram testadas com relação à interação com N307S, assim como as proteínas de processamento Cwc24p, Dre2p e Nop58p envolvidas em processamento de rRNA e que são conhecidas por sua interação com Nop17p(WT).

A

B

Figura 17: Comparação do crescimento celular das cepas *WT* e Δ *nop17* com as transformantes Δ *nop17/pMET-NOP17* e Δ *nop17/pMET-NOP17(N307S)*. As medidas de absorbância à 600nm para as curvas de crescimento à 25°C e 37°C foram realizadas em meio YPD líquido durante 10 horas.

5. DISCUSSÃO

Nop17p e Rsa1p são proteínas conservadas evolutivamente, não essenciais para a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, e durante este trabalho, foram estudadas com relação à sua atuação na montagem de snoRNPs de *box C/D*. A ausência destas proteínas na célula gera um fenótipo de termo-sensibilidade, de maneira que a 37°C as cepas $\Delta nop17$ e $\Delta rsa1$ apresentam menor taxa de crescimento. O maior efeito observado na cepa $\Delta rsa1$ (em relação à $\Delta nop17$) sugere que a falta desta proteína seja mais prejudicial ao desenvolvimento celular pelo fato de Rsa1p estar envolvida na maturação ribossomal em dois pontos importantes: tardiamente na partícula 60S, atuando juntamente com a helicase Dbp6p e a proteína ribossomal Rpl10p, e em etapas anteriores, por sua associação à biogênese dos snoRNPs de *box C/D*. A deleção da proteína Tah1p não afeta o crescimento celular mesmo numa condição restritiva, e dada a importância já destacada à essa proteína com relação a sua função na associação ao R₂TP, acreditamos que outro fator possa atuar substituindo Tah1p neste complexo.

Uma vez que Nop17p e Rsa1p já se mostraram associadas aos snoRNPs de *box C/D*, a falta das duas proteínas afeta negativamente tanto a estabilidade da proteína Nop58p do core, bem como a interação Nop58p-U3. Com relação à $\Delta nop17$, a falta desta proteína deve gerar snoRNPs maduros mal-estruturados como consequência de quebras e ligação errônea das subunidades dos complexos, com estas podendo ter alguns de seus diferentes domínios expostos na superfície e prejudicando sua associação com o snoRNA, enquanto que Nop58p tem seu domínio de ligação a RNA mais estavelmente ligado ao snoRNA U3 nestas condições, tanto nos complexos maduros, como em formação.

De maneira diferente, Rsa1p também deve estar afetando a formação do complexo, já que mesmo em extratos totais de $\Delta rsa1$ uma diminuição dos níveis do snoRNA U3 é evidente. Os dados de imunoprecipitação mostram que a falta de Rsa1p também afeta a interação Nop58p-U3, mas de uma maneira menos drástica que Nop17p. Levando em consideração que Rsa1p interage diretamente tanto com Nop17p como com Snu13p, este resultado indica que Rsa1p deve estar relacionada estritamente com a estruturação das proteínas do complexo, bem como a ligação destas ao U3 snoRNA. Em comparação com os dados obtidos em fase co-

transcricional da montagem do complexo, que mostram um aumento dos níveis de U3 imunoprecipitado com Nop58p, Rsa1p parece estar envolvida direta ou indiretamente em mais de uma etapa da formação do complexo, ou de maneira mais direta em etapas mais tardias da maturação. A partir destes dados, não podemos definir exatamente a participação de Rsa1p na montagem dos snoRNPs de box C/D, isto é, se Rsa1p associa-se à Snu13p–U3 para estabelecer uma ponte entre o snoRNP e o R₂TP/Hsp90p (via Nop17p) ou se ela associa-se juntamente com o R₂TP/Hsp90p, possibilidades que estão representadas por interações proteína–proteína na Figura 18a.

Para desempenhar sua função no processamento do rRNA, a compartimentalização do snoRNP U3 maduro no nucléolo é primordial. Assim, o transporte do snoRNA U3 ao longo da sua maturação é necessário, e Nop17p e Rsa1p mostraram-se importantes para a correta localização do snoRNA U3. Devido ao envolvimento de ambas as proteínas na formação de snoRNPs funcionais, a falta das mesmas afeta o transporte dos snoRNPs até o nucléolo, causando um acúmulo de U3 no citoplasma. O mesmo acúmulo já era conhecido no caso das proteínas integrantes do *core* dos snoRNPs, causado pela ausência de Nop17p (Gonzales et al.; 2005), e reafirma a importância das proteínas em contribuir para complexos estáveis, uma vez que complexos mal formados não devem ser reconhecidos e encaminhados até o nucléolo.

Identificar complexos de maior magnitude em que Nop17p e Rsa1p fossem integrantes, juntas ou separadamente, é importante para conhecer novos detalhes a respeito do mecanismo de ação de ambas as proteínas. Alguns de nossos experimentos não nos permitiram delimitar novas interfaces de interação destas proteínas *in vivo*, mas análises *in vitro* nos forneceram novas informações a respeito da rede de interação estabelecida dentro do snoRNP de box C/D, com a inclusão de Nop17p. Experimentos de *pull-down* e SPR de proteínas mostraram uma nova associação em que Nop17p atua como uma co-chaperona diretamente nas subunidades Nop58p, Snu13p e Nop1p, unindo-as como um complexo estável.

Baseado nisso e em dados já conhecidos, a Figura 19 representa esquematicamente a ordem de associação destas proteínas: em uma primeira etapa (1), Snu13p liga-se ao snoRNA independentemente das outras proteínas do *core*, reconhecendo a região do *K-turn* (box C). Em seguida (2), ocorre a incorporação de

Figura 18: Representação esquemática sugere diferentes possibilidades na atuação de Rsa1p (a) e Nop17p (b) na montagem dos snoRNPs de box C/D, com o envolvimento das demais subunidades do R2TP.

Nop1p e Nop56p, as quais podem estar anteriormente associadas de maneira estável ou não, uma vez que Nop1p consegue ligar-se aos boxes D e D' do snoRNA na ausência de Nop56p, mas o contrário não é verdadeiro e Nop56p precisa da participação de Nop1p para reconhecer o motivo C/D. Como terceiro momento, Nop17p estaria atuando como uma co-chaperona, reconhecendo a interface Nop1p/Snu13p e trazendo consigo as demais subunidades do R₂TP/Hsp90, as quais também participam da remodelagem e estabilização do complexo em formação (3), para daí a associação de Nop58p ao motivo C'/D' (4) ocorrer, com a liberação do R₂TP/Hsp90 e a formação do snoRNP maduro. Uma questão não esclarecida aqui é como se dá a associação de Nop58p em uma etapa final: esta proteína necessita da presença das proteínas do R₂TP para sua associação à Nop56p e ao snoRNA dentro do complexo maduro, mas não podemos afirmar se ela é carregada para o interior do *core* por um R₂TP já formado (com o reconhecimento de Nop17p pelas proteínas Nop1p e Snu13p) ou se ela associa-se via Nop17p após as mudanças conformacionais guiadas por este complexo. Esta etapa final constitui uma das questões abertas para ser finalizada na via de montagem dos snoRNPs de box C/D e está representada em 1, na Figura 18b.

Na tentativa de estabelecer uma conjugação entre os complexos R₂TP e snoRNP de *box* C/D, o mutante Nop17p(N307S) foi identificado. Este mutante não se associa à Tah1p ou Rvb2p, mas isto não é suficiente para interromper a formação dos snoRNPs de *box* C/D. Estudos de interação proteína-proteína com a mutante Nop17p(N307S) e outras proteínas as quais Nop17p já é conhecida por interagir nos mostraram que a maioria destas associações também é afetada. Uma vez que as associações necessárias da Nop17p não estão presentes para Nop17p(N307S) *in vivo*, esperaríamos um efeito de não complementação da mutante N307S na cepa $\Delta nop17$, devido à importância desta proteína a 37°C. Mas o efeito encontrado por curvas de crescimento a 37°C foi exatamente o contrário, e a cepa transformante $\Delta nop17/pMET-NOP17(N307S)$ foi capaz de recuperar a taxa de crescimento da cepa *WT*.

O fato da ausência de Tah1p também não afetar o crescimento celular a 37°C indica que alguma outra proteína pode estar associada à Nop17p na falta da proteína Tah1p no R₂TP (Figura 18b (2)), mas a dificuldade em encontrar novos parceiros funcionais não nos permite sugerir possíveis fatores. Isto é interessante

para destacar a importância de Nop17p dentro do complexo R₂TP: uma vez que Nop17p não possui regiões estruturadas, ela deve ser o elemento essencial para a aproximação de Hsp90p com diversos complexos em formação na célula, que são reconhecidos via Nop17p. Já Tah1p, que estaria estabelecendo uma ponte de interação entre Nop17p e Hsp90, deve ter função substituída por algum outro fator que contenha domínios TPR de ligação à chaperona, e associe-se a Nop17p.

Figura 19: Modelo de montagem de snoRNPs de box C/D baseado nas etapas sequenciais de associação das proteínas ao snoRNA. Destaque para o envolvimento de Nop17p, assim como das demais subunidades do R₂TP juntamente com a chaperona Hsp90p.

6. CONCLUSÃO

Nop17p e Rsa1p são proteínas conservadas evolutivamente e atuam diretamente na montagem de snoRNPs de box C/D em *Saccharomyces cerevisiae*. Nop17p deve ser fator essencial para o reconhecimento das proteínas Nop1p, Snu13p e Nop58p do core de snoRNPs em formação e para a aproximação da chaperona Hsp90p assistente, via R₂TP. Rsa1p parece também estar envolvida na associação destes complexos, mas de maneira ainda não definida via Snu13p e Nop17p. A ausência destas proteínas na célula acarreta má estruturação e deslocalização dos snoRNPs de box C/D, com conseqüências diretas no processamento de rRNA, o qual depende de metilação de nucleotídeos específicos e clivagens realizadas por estes complexos.

7. REFERÊNCIAS

- Allmang, C.; Kufel, J.; Chanfreau, G.; Mitchell, P.; Petfalski, P.; Tollervey, D. (1999) Function of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO* **18**: 5399-5410
- Benbahouche, N.; Iliopoulos, I.; Török, I.; Marhold, J.; Kajava, A.; Farkas, R.; Kempf, T.; Schnölzer, M.; Meyer, P.; Kiss, I.; Bertrand, E.; Mechler, B.; Pradet-Balade, B. (2014) *Drosophila* Spag is the homolog of RNA polymerase II- associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries. *JBC* **289**: 6236-6247
- Baudin-Baillieu, A.; Fabret, C.; Liang, X. H.; Piekna-Przybylska, D.; Fournier, M. J.; Rousset, J. P. (2009) Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *NAR* **37**: 7665-7677
- Boulon, S.; Verheggen, C.; Jady, B. E.; Girard, C.; Pescia, C.; Paul, C.; Ospina, J. K.; Kiss, T.; Matera, A. G.; Bordonne, R. (2004) PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol. Cell* **16**: 777-787
- Boulon, S.; Marmier-Gourrier, N.; Pradet-Balade, B.; Wurth, L.; Verheggen, C.; Jady, B.; Roth, B.; Pescia, C.; Robert, M.; Kiss, T.; Bardoni, B.; Krol, A.; Branlant, C.; Allmang, C.; Bertrand, E.; Charpentier, B. (2008) The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *JCB* **180**: 579-595
- Chanfreau, G.; Legrain, P.; Jacquier, A. (1998) Yeast RNase III is a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* **284**: 975-988
- Chien, C.; Bartel, P.; Sternglanz, R.; Fields, S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *PNAS* **88**: 9578-9582

- Ciganda, M.; Williams, N. (2011) Eucaryotic 5S rRNA biogenesis. *WIREs RNA* **2**: 523-533
- Coltri, P.; Oliveira, C. (2012) Cwc24p is a general *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor required for the stable U2 snRNP binding to primary transcripts. *Plos One* **7**: 1-11.
- Darzacq, X.; Kittur, N.; Roy, S.; Shav-al, Y.; Singer, R. H.; Meier, U. T. (2006) Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *The Journal of Cell Biology* **173**: 207-218
- DeLabre, M. L.; Kessl, J.; Karamanou, S.; Trumpower, B. L. (2001) RPL29 codes for a non-essential protein of the 60S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae* and exhibits synthetic lethality with mutations in gene for proteins required for subunit coupling. *BBA* **1574**: 255-261
- Dragon, F.; Gallagher, J.; Compagnose-Post, P.; Mitchell, B.; Porwancher, K.; Wehnert, K.; Wormsley, S.; Settlagek, R.; Shabanowitz, J.; Osheim, Y.; Beyer, A.; Hunt, D.; Baserga, S. (2002) *Nature* **417**: 967-970
- Eckert, K.; Saliou, J.; Monzelun, L.; K.; Vigouroux, A.; Atmane, N.; Caillat, C.; Quevillon-Chérueil, S.; Madiona, K.; Nicaise, M.; Lazereg, S.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cienfériani, S.; Meyer, P.; Moréra, S. (2010) The Pih1-Tah1 chaperone complex inhibits Hsp90 chaperone molecular ATPase activity. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 31304-31312
- Fernandez, C. F.; Pannone, B. K.; Chen, X.; Fuchs, G.; Wolin, S. L. (2004) An Lsm2-Lsm7 complex in *Saccharomyces crerevisiae* associates with the small nucleolar RNA snR5. *Mol. Biol. Cell* **15**: 2842-2852
- Fromont-racine, M.; Senger, B.; Saveanu, C.; Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in Eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42

- Gallagher, J. E.; Dunbar, D. A.; Granneman, S.; Mithcell, B. M.; Osheim, Y.; Beyer, A. L.; Baserga, S. (2004) RNA polymerase I transcriptional and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev.* **18**: 2506-2517
- Gautier, T.; Bergès, T.; Tollervey, D.; Hurt, E. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**: 7088-7098
- Geerlings, T. H.; Vos, J. C.; 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
- Goldfeder, M. B., Oliveira, C. C. (2007) Cwc24p, a novel *Saccharomyces cerevisiae* nuclear ring finger protein, affects pre-snoRNA U3 splicing. *J. Bio. Chem.* **283**: 2644-2653
- Gonzales, F. A.; Zanchin, N.; Luz, J.; Oliveira, C. C. (2005) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* **346**: 437-455
- Granato, D. C.; Gonzales, F. A.; Luz, J.; Cassiola, F.; Machado-Santelli, G.; Oliveira, C. C. (2005) Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nop7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* **272**: 4450-4463
- Grandi, P.; Rybin, V.; Bassler, J.; Petfalski, E.; Strauss, D.; Marzioch, M.; Schéfer, T.; Kuster, B.; Tschochner, H.; Tollervey, D.; Gavin, A. C.; Hurt, E. (2002) 90S preribosome include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell* **10**: 105-115

- Granneman, S.; Kudla, G.; Petfalski, E.; Tollervey, D. (2009) Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 9613-9618
- Guthrie, C., Fink, G. R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*. **194**: 3-933
- Henras .; Soudet, J.; Grus, M. G.; Lebaron, S.; Caizergues-Ferrer, M.; Mougin, A.; Henry, Y. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 2334-2359
- Hernandez-Verdun, D.; Roussel, P.; Thiry, M.; Sirri, V.; Lafonataine, D. L. (2010) The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *WIREs RNA* **1**: 415-431
- Hirose, T.; Shu, M. D.; Steitz, J. A.; (2003) Splicing-dependent and –independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells. *Mol. Cell* **12**: 113-123
- Hoareau-Aveilla, C.; Bonoli, M.; Caizergues-ferrer, M.; Henry, Y. (2006) hNaf1 is required for accumulation of human Box H/ACA snoRNPs, scaRNPs, and telomerase. *RNA* **12**: 832-840
- Huen, J.; Kakihara, Y.; Ugwu, F.; Cheung, K. L.; Houry, W. A. (2010) Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem. Cell Biol.* **88**: 29-40
- Hughes, J. M. X.; Ares, M. (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* **10**: 4231-4239
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.

- Jiménez, B.; Ugwu, F.; Zhao, R.; Ortí, L.; Makhnevych, T.; Pineda-Lucena, A.; Houry, W. (2012) Structure of minimal tetratricopeptide repeat domain protein Tah1p reveals mechanism of its interaction with Pih1p and Hsp90. *JBC* **287**: 5698-5709.
- Kiparisov, S.; Petrov, A.; Meskauskas, A.; Sergiev, P. V.; Dontsova, O. A.; Dinman, J. D. (2005) Structural and functional analysis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genomics* **274**: 235-247
- Kiss, T.; Fayet-Lebaron, E.; Jády, B. E. (2010) Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol. Cell* **37**: 597-606
- Knoops, K.; Schoehn, G.; Schaffitzel, C. (2012) Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes in cotranslation folding, targeting and translocation. *WIREs RNA* **3**: 429-441
- Kobayashi, T. (2011) Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 1396-1403
- Kressler, D.; Doére, M.; Rojo, M.; Linder, P. (1999) Synthetic lethality with conditional *dbp6* alleles identifies Rsa1p, a nucleoplasmic protein involved in the assembly of 60S ribosomal subunits. *MCB* **19**: 8633-8645
- Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. (2010) Driving ribosome assembly. *BBA* **1803**: 673-683
- Lafontaine, D. L.; Bousquet-Antonelli, C.; Henry, Y.; Caizergues-Ferrer, M.; Tollervey, D. (1998) The box H+ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev.* **12**: 527-537
- Lafontaine, D. L.; Tollervey, D. (1999) Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* **5**: 455-467

- Lafontaine, D. L.; Tollervey, D. (2001) Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNP. *MCB* **20**: 2650-2659
- Li, H. D.; Zagorski, J.; Fournier, M. J. (1990) Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1145-1252
- Li, S.; Duan, J.; Li, D.; Yang, B.; Dong, M.; Ye, K. (2011) Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase. *Genes and Dev.* **25**: 2409-2421
- Liang, X. H.; Liu, Q.; Fournier, M. J. (2009) Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA* **15**: 1716-1728
- Lin, J.; Lai, S.; Jia, R.; Xu, A.; Zhang, L.; Lu, J.; Ye, K. (2011) Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. *Nature* **469**: 559-563
- Liu, Q.; Greiman, J. C.; Lima, C. D. (2006) Reconstitution, activities and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**: 1223-1237
- Livak, K.; Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408
- Mayer, C.; Grummt, I. (2006) Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* **25**: 6384-6391
- Mc Keegan, K. S.; Debieus, M. C.; Boulon, S.; Bertrand, E.; Watkins, N. J. (2007) A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D assembly. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 6782-6793

- Mc Keegan, K. S.; Debieus, M. C.; Watkins, N. J. (2009) Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interaction between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during the snoRNP biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 4971-4981
- Moradi, H.; Simoff, I.; Bartish, G.; Nygard, O. (2008) Functional features of the C-terminal region of yeast ribosomal protein L5. *Mol. Gen. Genomics* **280**: 337-350
- Morrissey, J. P.; Tollervey, D. (1993) Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2469-2477
- Mougey, E. B. O.; Osheim, Y.; Miller, O. L.; Beyer, A.; Sollner-Webb, B. (1993) The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev.* **7**: 1609-1619
- Mulhrad, D.; Hunter, R.; Parker, R. (1992) A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. *Yeast.* **8**: 79-82.
- Ni, J.; Tien, A. M.; Fournier, M. J. (1997) Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* **89**: 565-573
- Oliveira, C. C.; McCarthy, J. E. G. (1995) The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. *The J. of Biol. Chem.* **270**: 8936-8943
- Osheim, Y. N.; French, S. L.; Keck, K. M.; Champion, E. A.; Spasov, K.; Dragon, F.; Baserga, S.; Beyer, A. L. (2004) Pre-18S ribosomal RNA structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **16**: 943-954
- Paci, A.; Liu, X. H.; Huang, H.; Lim, A.; Houry, W. A.; Zhao, R. (2012) The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *JBC* **287**: 43205-43214

- Perez- Fernandez, J.; Roman, A.; De Las Rivas, J.; Bustelo, X. R.; Dosil, M. (2007) The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 5414-5429
- Petfalski, E.; Dandekar, T.; Henry, Y.; Tollervey, D. (1998) Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1181-1189
- Phipps, K. R.; Charette, J. M.; Baserga, S. J. (2011) The small subunit processome in ribosome biogenesis – progress and prospects. *WIREs RNA* **2**: 1-21
- Qiu, H.; Eifert, J.; Wacheul, L.; Thiry, M.; Berger, A.; Jakovlevic, J.; Woolford Jr, J.; Corbett, A.; Lafontaine, D.; Terns, R.; Terns, M. (2008) Identification of genes that function in the biogenesis and localization of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *MCB* **28**: 3686-3699.
- Qu, G.; van Nues, R. W.; Watkins, N. J.; Maxwell, E. S. (2011) The spatial-function coupling of box C/D and C'/D' RNPs is an evolutionary conserved feature of the eukaryotic box C/D snoRNP nucleotide modification complex. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 365-374
- Reichow, S. L.; Hamma, T.; Ferré-D'amaré, A.; Varani, G. (2007) The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *NAR* **35**: 1452-1464
- Rodor, J.; Jobet, E.; Bizarro, J.; Vignols, F.; Carles, C.; Suzuki, T.; Nakamura, K.; Echeverría M. (2011) AtNUFIP, an essential protein for plant development, reveals the impact of snoRNA gene organization on the assembly of snoRNPs and rRNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* **65**: 807-819
- Rothé, B.; Back, R.; Quinternet, M.; Bizarro, J.; Robert, M.; Blaud, M.; Romier, C.; Manival, X.; Charpentier, B.; Bertranda, E.; Branlant, C. (2013) Characterization of the interaction between protein Snu13p/15.5K and the Rsa1p/NUFIP factor: a demonstration of its functional importance for snoRNP assembly. *NAR* **2013**: 1-22

- Salamon, Z.; Macleod, A.; Tollin, G. (1997) Surface Plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. *BBA* **1331**: 117-129
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniats, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santos, M.; Goldfeder, M.; Zanchin, N.; Oliveira, C. (2011) The essential nucleolar yeast protein Nop8p controls the exosome function during 60S ribosomal subunit maturation. *Plos One* **6**: 1-17.
- Saveanu, C.; Namane, A.; Gleizes, P. E.; Lebreton, A.; Rousselle, J. C.; Noaillac-Depeyre, J.; Gas, N.; Jacquier, A.; Fromont-Racine, M. (2003) Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 4449-4460
- Senger, B.; Lafontaine, D. L.; Graindorge, J. S.; Gadai, O.; Camasses, A.; Sanni, A.; Garnier, J. M.; Breitebach, M.; Hurt, E.; Fasiolo, F. (2001) The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cutoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol. Cell* **8**: 1363-1373
- 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
- Smith, C. M.; Steitz, J. A. (1997) Sno storm in the nucleolus: New roles for myriad small RNPs. *Cell* **89**: 669-672
- Spahn, C. M.; Beckmann, R.; Eswar, N.; Penczek, P. A.; Sali, A.; Blobel, G.; Frank, J. (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* – tRNA – ribosome ans subunit interactions. *Cell* **107**: 373-386
- Tollervey, D. (1987) A yeast small nucleolar RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO* **6**: 4169-4175

- Tollervey, D.; Lehtonen, H.; Carmo-Fonseca, M.; Hurt, E. C. (1991) The small nucleolar RNP preprotein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO* **10**: 573-583
- Tycowski, K. T.; Shu, M. D.; Steitz, J. A. (1994) Requirement for intron-encoded U22 small nucleolar RNA in 18S ribosomal RNA maturation. *Science* **266**: 1558-1561
- van Hoof, A.; Lennertz, P.; Parker, P. (2000) 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* **19**: 1337-1365
- van Nues, R. W.; Granneman, S.; Kudla, G.; Chicken, M.; Tollervey, D.; Watkins, N. J. (2011) Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing. *EMBO* **30**: 2420-2430
- Vanrobays, E.; Gleizes, P. E.; Bousquet-Antonelli, C.; Noaillac-Depeye, J.; Caizergues-Ferrer, M.; Gálugne, J. P. (2001) Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *EMBO* **20**: 4204-4213
- Venema, J.; Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 261-311
- Verheggen, C.; Lafontaine, D.; Samarsky, D.; Mouaikel, J.; Blanchard, J.; Bordonné, R.; Bertrans, E. (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO* **21**: 2736-2745
- Watkins, N.J.; Dickmanns, A.; Lührmann, 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. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8342-8352

- Watkins, N. J.; Lemm, I.; Ingelfinger, D.; Schneider, C.; Hossbach, M.; Urlaub, H.; Luhrmann, R. (2004) Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol. Cell* **16**: 789-798
- Watkins, N. J.; Bohnsack, M. T. (2012) The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *WIREs RNA* **3**:397-414
- Wilson, D. N.; Cate, J. H. (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *CSH Perspec. In Biol.* **4**: 1-17
- Zanchi, N. I. T.; Goldfarb, D. S. (1999) Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1518-1525
- Ye, K.; Jia, R.; Lin, J.; Ju, M.; Peng, J.; Xu, A.; Zhang, L. (2009) Structural organization of box C/D RNA-guided RNA methyltransferase. *PNAS* **106**: 13808-13813.
- Zempa, I.; Kutaya. U. (2007) Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Letters* **581**: 2783-2793
- Zhang, J.; Harnpicharnchai, P.; Jakovljevic, J.; Tang, L.; Guo, Y.; Oeffinger, M.; Rout, M.; Hiley, S.; Hughes, T.; Woolford, J. (2007) Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev.* **21**: 2580-2592
- Zhao, R.; Davey, M.; Hsu, Y. C.; Kaplanek, P.; Tong, A.; Parsons, A. B.; Krogan, N.; Cagney, G.; Mai, D.; Greenblatt, J.; Boone, C.; Emili, A.; Houry, W. A. (2005) Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone. *Cell* **120**: 715-727

Zhao, R.; Kakihara, Y.; Gribun, A.; uen, J.; Yang, G.; Khanna, M.; Costanzo, M.; Brost, R.; Boone, C.; Hughes, T. R.; Yip, C. M.; Houry, W. A. (2008) Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *JCB* **180**: 563-578

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados pessoais

Nome: Marcela Bach Prieto

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: Ponta Grossa, PR

Data de Nascimento: 12/02/1986

2. Educação

Graduação em Química Tecnológica com Ênfase em Química Ambiental

Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, PR)

Conclusão em 2008

3 Formação Complementar

Monitora bolsista PAE – USP

Disciplina de Biologia Molecular para o curso de Farmácia - 2012

Comissão Organizadora do III Encontro da Pós-Graduação do IQ-USP – 2011

Monitora bolsista PAE – USP

Disciplina de Bioquímica e Biologia Molecular para o curso de Odontologia - 2011

Treinamento em aplicações e fundamentos da qPCR em tempo real

Life Tech. Brasil (São Paulo, SP) – 2011

Aplicação do VI Curso de Inverno em Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular

Depto. de Bioquímica, IQ-USP – 2011

Proteomics Methods

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (São Paulo, SP) - 2010

Comissão Organizadora do II Encontro da Pós-Graduação do IQ-USP - 2010

Aplicação do V Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular
Depto. de Bioquímica, IQ-USP – 2010

Estágio Curricular do Curso Bacharelado em Química
Metalsistem do Brasil Ind. Metalúrgica Ltda – 2007

Monitora bolsista UEPG
Disciplina de Química Geral Experimental para o curso de Química Tecnológica
2005

4 Ocupação

Bolsista de Doutorado – CAPES/2009-2013

5 Resumos em Congresso

II Congresso Institucional IQ-USP – 2012

XL Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
2011

VII Encontro de Pesquisa da UEPG – 2007

XV Encontro Anual de Iniciação Científica – 2006

XIII Encontro de Química da Região Sul – 2005