UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

LEIDY PAOLA PÁEZ CEPEDA

Caracterização da Função Molecular de Nop53 e de
seu Papel no Controle do Exossomo em
Saccharomyces cerevisiae

Versão corrigida da dissertação

São Paulo
04/07/2017

LEIDY PAOLA PÁEZ CEPEDA

**Caracterização da Função Molecular de Nop53 e de seu Papel
no Controle do Exossomo em *Saccharomyces cerevisiae***

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

Orientadora: Prof. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo
2017

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

Cepeda, Leidy Paola Paez
C399c Caracterização da função molecular de Nop53 e de seu papel no controle
do exossomo em *Saccharomyces cerevisiae* / Leidy Paola Paez Cepeda
-- São Paulo, 2017.
106p

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Oliveira, Carla Columbano de

I. 1. Expressão gênica II. Biologia molecular : *Saccharomyces*
I. T. II. Oliveira, Carla Columbano de, orientador.

574.88 CDD

Dedicado a mi hermana

Jhohana, te doy gracias infinitas por todas aquellas cosas que hiciste y dejaste de hacer por mí a lo largo de tu vida, por ser comprensiva y corregirme cuando era necesario. Siempre fuiste un ejemplo de trabajo, tenacidad e inteligencia, nunca te dejaste vencer en las dificultades, recuerdo que decías: “mañana será un día mejor”. Cuando decidí venir a Brasil, fuiste la primera entusiasta y me brindaste tu apoyo moral y financiero. Recuerdo tu sonrisa y tu ímpetu al creer en mí, sabías, más que yo, que lo iba a lograr. Espero que tus enseñanzas sean manifestadas en cada paso que dé, que mi vida sea una representación del legado dejaste en mí y en todas y cada una de las personas que te rodearon. siempre te recordaré, te amo y te amaré inmensamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado paz no momento difícil, e sustentado ao longo da vida.

Quero expressar um agradecimento especial a minha orientadora, a professora Carla Columbano, pela ajuda na adaptação inicial ao laboratório e na área de pesquisa, e por prestar toda a orientação e esclarecimentos científicos necessários para o meu desempenho durante o mestrado. Lembrarei seu exemplo de trabalho constante e dedicação. Agradeço pela paciência, disponibilidade, boa-vontade, e por tantas vezes ter juntado o seu sorriso ao meu.

A minha mãe, Irene por sempre dar o melhor dela para seus filhos, por ser uma mãe esforçada e valente, pelas suas orações e ensina-me sua enorme fé em Deus.

A meu querido namorado Leonardo, por sempre estar ao meu lado, por me dar forças nas horas difíceis e sempre segurar minha mão e dizer que vai ficar tudo bem. Agradeço todos os anos de amizade, amor e espero continuar prolongando nossos sonhos juntos.

A meus irmãos Vladimir, Gustavo e minha irmã Jhohana (*in memoriam*), que são muito importantes na minha vida, aprendi muito ao lado de vocês e hoje tenho a certeza de ser uma boa parte de todo o aprendizado, obrigada pelo seu amor imenso para mim.

A meus sogros, Rosa e Fredy por acompanhar nossos passos. A Jackson e Sandra, pelo carinho e pela forma acolhedora como me receberam quando cheguei a São Paulo. Alejandro Poveda, Adriana Leguizamon, Laura Poveda e Daniel Niño, obrigada por seu carinho, ficar junto e sempre desejar o melhor para mim e para Leo.

Aos meus colegas do laboratório, ao Fernando Gonzales (Fernandito), pela ajuda nas estratégias de clonagens e dar um apoio nos procedimentos experimentais, obrigada por ser um bom amigo. A Fiorella, obrigada por ser uma força no momento tão difícil de minha vida. Ana Maria Marques, Griselda Perona, Felipe Bagatelli, Ellen Okazuda, Alessandra Sousa, Flavia Adachi e Debora Goldmer pelas boas conversas experimentais, o aprendizado e os bons momentos ao longo desses anos.

A todos os colegas de pós-graduação e do bloco zero, especialmente a Alexandre Bisson e George Souza por compartilhar um espaço de trabalho, e junto com suas conversas

da vida e da ciência tornaram meus dias muito felizes.

A minhas companheiras de casa, Mara Silva, Beatriz Bueno e Ana Lia Pradella por seu carinho e boas conversas.

A minhas primeras professoras, Maria Cristina Castellanos, agradeço suas ensinanças, em especial que um ótimo cientista deve ser também um bom ser humano, e sempre manter um caráter crítico. A Sandra Patricia Chaparro, agradeço seu apoio quando precisei vir pela primeira vez ao Brasil. A Nathalie Becerra (Natis), sendo muito especial para mim, fomos muitos cúmplices de pesquisa na Colômbia, e daí nossos sonhos se juntaram. Às três, agradeço pela suas amizades e por nunca ter duvidado em mim e acreditar junto comigo neste sonho. Vocês sempre estarão em um lugar muito especial no meu coração.

Ao programa de Bioquímica de Instituto de Química (USP), em especial aos secretários Milton Cesar Santos Oliveira e Emiliano Rodrigo Ferreira Gomes Gonçalves pelo suporte administrativo neste mestrado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o governo de Brasil pelo apoio financeiro.

F NATURE were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living.

Henri Poincaré

RESUMO

CEPEDA, L.P.P. **Caracterização da Função Molecular de Nop53 e de seu Papel no Controle do Exossomo em *Saccharomyces cerevisiae*.** 2017.102p. Dissertação de Mestrado. - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nop53 é uma proteína nucleolar, conservada evolutivamente e essencial na levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a biogênese da subunidade maior do ribossomo, 60S. O principal fenótipo causado pela repressão da expressão de Nop53 é o acúmulo do intermediário de processamento de pré-Rna, 7S, que também é substrato do complexo exossomo na formação do rRNA maduro 5.8S. Nop53 interage diretamente com a subunidade do exossomo Rrp6 e com a subunidade Mtr4 do co-ativador do exossomo TRAMP.

O objetivo principal deste trabalho foi o de analisar como a interação entre Nop53 e o exossomo pode modular a atividade deste último. Para isso, foram utilizados métodos bioquímicos, genéticos e de biologia molecular. Os resultados mostrados aqui demonstram que a depleção de Nop53 faz com que mais proteínas ribossomais, principalmente da subunidade maior, sejam co-imunoprecipitadas com o *core* do exossomo, sugerindo que Nop53 possa ter um papel na liberação do exossomo da subunidade pré-60S depois da formação do rRNA maduro 5.8S. Esta hipótese foi confirmada através da separação de complexos por centrifugação em gradiente de glicerol, que mostrou a presença de subunidades do exossomo em complexos maiores na ausência de Nop53, provavelmente correspondendo a partículas pré-ribossomais. Co-imunoprecipitação de RNA com o exossomo na ausência de Nop53 também confirmou uma maior associação deste complexo com o pré-rRNA 7S. Como também mostrado aqui, além de interagir com Rrp6, Nop53 interage com subunidades do *core* do exossomo e a superexpressão de uma destas subunidades, Rrp43, complementa parcialmente a ausência de Nop53 na célula. Estes resultados levaram à conclusão de que Nop53 pode recrutar o exossomo para a partícula ribossomal pré-60S para a maturação do pré-rRNA 7S a 5.8S, e atue também na liberação do exossomo, possivelmente através de sua interação com a helicase Mtr4.

Palavras-Chave: *Saccharomyces cerevisiae*, Nop53, Exossomo, processamento de RNA, subunidade pré-60S.

ABSTRACT

CEPEDA, L.P.P. **Characterization of the role of Nop53 in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome.** 2017.102p. Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Abstract Nop53 is a nucleolar, conserved and essential protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, involved in the biogenesis of the large ribosomal subunit 60S. The main phenotype of the depletion of Nop53 in yeast cells is the accumulation of the pre-rRNA processing intermediate 7S, which is also the substrate of the exosome complex for the formation of the mature rRNA 5.8S. Nop53 directly interacts with the exosome subunit Rrp6, and with the subunit Mtr4 of the TRAMP complex, an exosome co-activator.

The main objective of this work was the analysis of the interaction between Nop53 and the exosome and the identification of the mechanism through which Nop53 regulates the exosome activity. The results shown here demonstrate that the depletion of Nop53 leads to a more stable association of the exosome with the pre-60S ribosome particle, as determined by co-immunoprecipitation of proteins with one of the exosome core subunits, and by fractionation of complexes through glycerol gradients. These results suggested that Nop53 could play a role in the release of the exosome after the formation of the mature rRNA 5.8S. This hypothesis was confirmed through the co-immunoprecipitation of pre-rRNA 7S with the exosome in the absence of Nop53. In addition to the interaction with the exosome subunit Rrp6, as shown here, Nop53 also interacts with core subunits of the complex. Interestingly, overexpression of one of these subunits, Rrp43, partially complements the depletion of Nop53. These results led to the conclusion that Nop53 may recruit the exosome to the pre-60S particle for the maturation of the pre-rRNA 7S to the mature 5.8S, but Nop53 may also be involved in the release of the exosome, possibly through its interaction with the helicase Mtr4.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Nop53, Exosome, rRNA processing, pre-60S ribosome particle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma (S)
μL	Microlitro (S)
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
CBP	<i>Calmodulin binding protein</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
C-terminal	Carboxi-terminal
dNTPs	Desoxi-ribonucleotídeos (dATP,dCTP,dTTP.dGTP)
DTT	ditiotretitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ES	Segmentos de expansão (<i>expasion segments</i>)
ETS	Sequência espaçadora externa (<i>external trascribed spacer</i>)
GAL1	Promotor do gene GAL1/YBR020W (glactoquinase) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent protein</i>)
GST	Glutathiona S transferase
IPTG	Isoporpil β -D-tiogalactopiranosídeo
ITS	Sequência espaçadora externa (<i>internal external trascribed spacer</i>)
Kb	quilobase
KDa	Kilodalton
kV	kilovoltios

LB	Meio Luria-broth
LSU	Subunidade ribossomal maior (<i>large subunit</i>)
M	Molar
mA	Mili ampère (S)
mL	Mililitros (S)
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	nanograma
nt	Nucleotídeo
N-Terminal	Amino-terminal
NTPs	Ribonucleotídeos (ATP,CTP, TTP. GTP)
NTS	Sequência espaçadora não transcrita (<i>non-transcribed spacer</i>)
OD	Densidade optica
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada de fosfatos
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Pré-RNA	Precursor de RNA ribossomal
rDNA	DNA que codifica o RNA ribossomal
RNP	Ribonucleoproteína
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	rotações por minuto
<i>r</i> -proteínas	Proteínas ribossomais
rRNA	RNA ribossomal
S	Coeficiente de sedimentação (svedberg)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
snoRNAs	RNAs nucleolares pequenos (<i>small nucleolar RNAs</i>)
snoRNP	Ribonucleoproteína nucleolar pequena (<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>)
snRNAs	RNAs nucleares pequenos (<i>small nuclear RNAs</i>)
SSU	Subunidade menor (<i>small subunit</i>)
TAE	Tampão contendo tris, acetato e EDTA
TAP	Tandem affinity purification
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N',N',N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
tRNA	RNA transportador
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i> meio mínimo para levedura
2YT	Meio de duas vezes extrato levedura-triptona

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Ribossomo	17
1.1.1	Biogênese do ribossomo	17
1.1.2	RNA ribossomal: Estrutura e processamento	19
1.2	O complexo exossomo	23
1.2.1	Estrutura do complexo	23
1.2.2	Ligação de RNA pelo exossomo	26
1.2.3	Reconhecimento e controle dos RNAs pelo exossomo	28
1.2.4	Cofatores do exossomo	30
2	Objetivos	37
3	Materiais e métodos	39
3.1	Cultura e manipulação de <i>E. coli</i>	39
3.1.1	Preparação de células competentes DH5 α	39
3.1.2	Transformação de células competentes DH5 α	40
3.1.3	Transformação de células competentes BL21	41
3.1.4	Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	41
3.2	Métodos de manipulação de DNA e construção de plasmídeos	41
3.2.1	Purificação de DNA em gel de agarose	42
3.2.2	Amplificação de DNA por PCR	42
3.2.3	Sequenciamento de plasmídeos	42
3.2.4	Construção de plasmídeos	43
3.3	Cultura e manipulação de <i>S. cerevisiae</i>	47
3.3.1	Transformação de leveduras	47
3.3.2	Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.4	Análise de proteínas	50
3.4.1	Quantificação de proteínas pelo método do ácido binciconínico (BCA)	50

3.4.2	Separação de Proteínas por SDS-PAGE	51
3.4.3	Coloração de proteínas por “Coomassie Blue”	51
3.4.4	Análise de proteínas por <i>western blot</i>	51
3.4.5	Purificação do complexo do exossomo na cepa $\Delta nop53$ / <i>GAL::His-NOP53</i> por cromatografia de afinidade com TAP-tag . .	52
3.4.6	Espectrometria de massas MS/MS	55
3.4.7	Software de análise de dados de espectrometria de massas	55
3.4.8	Gradiente de glicerol 10 – 30%	55
3.4.9	Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	56
3.4.10	Estudo <i>in vitro</i> de interação proteína-proteína por <i>pull-down</i>	57
3.5	Análise de processamento de RNA	58
3.5.1	Extração de RNA total de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.5.2	Separação de RNA total em gel de agarose ou poliacrilamida	59
3.5.3	Marcação radioativa de DNA	60
3.5.4	Análise por <i>northern blot</i>	60
3.5.5	Co-imunoprecipitação de RNA	60
3.5.6	RT-PCR	61
4	Resultados	63
4.1	Superexpressão de Rrp43 suprime a ausência de Nop53	63
4.2	A cepa <i>nop53</i> / <i>GAL::His-NOP53</i> transformada com Rrp43 selvagem e mutante	66
4.3	Nop53 afeta a estabilidade do exossomo	66
4.4	Nop53 não influencia a interação de Rrp6 _{FL} com o <i>core</i> do exossomo . . .	80
4.5	As subunidades Rrp40 e Rrp45 interagem fisicamente com Nop53	83
4.6	Nop53 afeta a interação do exossomo com outros complexos	85
4.7	O exossomo liga-se ao pré-RNA 7S na ausência de Nop53	87
5	Discussão	91
6	Conclusões	97
	Referências	98

Lista de Figuras

1.1	Estrutura cristalográfica do ribossomo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.2	Biogênese do ribossomo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.3	Estrutura secundária de rRNAs 18S, 25S, e 5.8S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.4	Representação esquemática do processamento do pré-rRNA	22
1.5	Conservação evolutiva do complexo exossomo em arqueas e eucariotos . . .	24
1.6	Estrutura cristalográfica de exossomo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.7	Via de degradação de RNA no exossomo nuclear de <i>S. cerevisiae</i>	27
1.8	Resumo dos múltiplos mecanismos de processamento e degradação de RNA realizadas pelo exossomo	29
3.1	Esquema de purificação por cromatografia de afinidade com TAP-tag . . .	54
3.2	Esquema de separação isopícnic em gradiente de glicerol	56
4.1	Na ausência da Nop53 a subunidade Rrp6 é mais expressa	65
4.2	Análise do processamento de pré-RNA através de <i>northern blot</i>	67
4.3	<i>Western Blot</i> anti-Rrp6 de proteínas co-imunoprecipitadas com Rrp43-TAP e com Rrp6-TAP	69
4.4	Análise de proteínas identificadas por espectrometria de Massas	72
4.5	Na ausência da Nop53 a subunidade Rrp6 é mais expressa.	82
4.6	As subunidades Rrp40 e Rrp45 interagem fisicamente com a Nop53	84
4.7	Separação de padrões de peso molecular por gradiente de glicerol	86
4.8	Análise de separação do exossomo por gradiente de glicerol	87
4.9	Quantificação relativa por RT-qPCR da co-imunoprecipitação de RNA . .	89
5.1	Modelo de subunidade ribossomal 60S contendo a partícula Nop53 que recruta o exossomo EXO11 Rrp6-Rrp47-Mtr4 através de interações com Rrp45-Rrp40-Rrp6.	95

Lista de Tabelas

1.1	Resumo de cofatores gerais e específicos de exossomo	31
3.1	Cepas <i>E. coli</i> utilizadas neste estudo	40
3.2	Meios de cultura de E.coli utilizados neste estudo	40
3.3	Oligonucleotídeos utilizados para clonagens e seqüenciamento de DNA . . .	43
3.4	Plasmídeos utilizados neste estudo	45
3.5	Cepas de levedura utilizadas neste estudo	48
3.6	Meios de cultura de levedura utilizados neste estudo	48
3.7	Denominação de cepas transformadas	49
3.8	Oligonucleotídeos de DNA utilizados para ensaios de northern blot	61
4.1	Principais grupos de proteínas co-imunoprecipitadas com TAP-Rrp43 e TAP Rrp6 na presença e ausência de Nop53	79

Introdução

1.1 Ribossomo

1.1.1 Biogênese do ribossomo

Os ribossomos são complexos ribonucleoproteicos que traduzem as informações contidas no mRNA e catalisam a síntese de proteínas funcionais em todos os organismos (Frank, 2000; Woolford and Baserga, 2013). Em eucariotos, os ribossomos são compostos por quatro RNAs (rRNA) (18S, 5.8S, 25S, 5S) e pelo menos 80 proteínas (*r*-proteínas/RPs) que formam as subunidades ribossomais: a subunidade menor 40S e a subunidade maior 60S (Kressler et al., 1999; Klinge et al., 2012; Melnikov et al., 2012). Estudos estruturais dos ribossomos levaram à elucidação da estrutura resolvida por cristalografia de raios-*X*, revelando em detalhes esta complexa macromolécula e seus sítios funcionais (Figura 1.1) (Ben-Shem et al., 2011).

Nos eucariotos, as subunidades ribossomais funcionais são produzidas através de um processo complexo, altamente dinâmico e coordenado em várias etapas. Este envolve a transcrição coordenada entre as três RNAs polimerases, a maturação dos rRNAs a partir de transcritos primários e sua associação com as proteínas ribossomais, dando origem aos ribossomos maduros (Venema and Tollervey, 1999).

A montagem ocorre inicialmente no compartimento subnuclear especializado, denominado nucléolo; entretanto, as etapas posteriores de maturação ocorrem no nucleoplasma e no citoplasma após a exportação nuclear (Figura 1.2) (Tschochner and Hurt, 2003; García-Gómez et al., 2011; Greber, 2016). Os componentes são primeiro montados em uma unidade ribossomal precursora 90S denominada SSU processomo,

Figura 1.1: **Estrutura cristalográfica do ribossomo de *Saccharomyces cerevisiae*.** Visão das subunidades do ribossomo onde estão representados o rRNA em preto e as proteínas em azul (40S) e o rRNA em cinza e as proteínas em dourado (60S), destacando os sítios DC (centro de decodificação), *factor binding* (onde ocorre a ligação dos fatores de tradução durante a elongação e término) e o PTC (centro da peptidiltransferase), bem como os sítios A (aminoacil), P (peptidil) e E (*exit* ou de saída), onde os tRNAs são acomodados durante a tradução (Modificado a partir de DeLano, 2002).

que contém o precursor do RNA ribossomal 35S (pré-rRNA 35S), a ribonucleoproteína nucleolar pequena U3 (U3 snoRNP- U3 *small nucleolar ribonucleoprotein*), snoRNPs H/ACA e C/D, fatores de montagem da subunidade 40S e proteínas ribossomais de fase inicial (*early-binding*). Ela posteriormente se dissocia em duas subunidades desiguais, a subunidade menor pré-40S (SSU – *small subunit*) e a subunidade maior pré-60S (LSU – *large subunit*). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a SSU é composta pelo rRNA 18S (18S, 1800 nt) e 33r – proteínas, enquanto a LSU é composta pelos rRNAs 25S, 5.8S e 5S (5S, 121 nt; 5.8S, 158 nt; and 25S, 3396 nt) junto com 46 r-proteínas (Moss, 2004; Woolford and Baserga, 2013). Além dos rRNAs e das proteínas ribossomais, a montagem dos ribossomos requer pelo menos 150 fatores proteicos e proximamente 100 partículas de snoRNPs, formadas por RNAs nucleolares pequenos (snoRNAs) e proteínas específicas. Todos em conjunto participam diretamente no processamento, modificação e dobramento de rRNA, na montagem de proteínas dentro das subunidades ribossomais, na exportação

nuclear, entre outros, permitindo que o processo de maturação dos ribossomos ocorra com a velocidade, precisão e direção necessárias (Figura 1.2) (Kressler et al., 1999; Venema and Tollervey, 1999; Tschochner and Hurt, 2003).

Figura 1.2: **Biogênese do ribossomo em *Saccharomyces cerevisiae*.** No nucléolo, as RNA polimerases I e III transcrevem os RNAs ribossômicos precursores 35S e 5S, respectivamente. O pré-rRNA 35S é incorporada na unidade ribossômica precursora 90S (SSU processosome). Depois da clivagem em A2, são geradas duas subunidades desiguais: subunidade maior pre-60S e subunidade menor pre-40S. Posteriormente, essas subunidades são submetidas à maturação e à exportação nuclear de forma independente (Retirado de Greber, 2016).

1.1.2 RNA ribossomal: Estrutura e processamento

O rRNA está presente no *core* de cada subunidade com *r*-proteínas agregadas na superfície. A estrutura secundária do rRNA 18S é formada por quatro domínios conservados (I-IV, 1.3 a, Esquerda). O RNA 5.8S não está livre, ele associa-se por pareamento de base com o RNA 25S formando uma estrutura secundária com seis domínios (I-VI Figura 1.3a, direita)

(Woolford and Baserga, 2013). Estes RNAs se dobram formando a estrutura terciária na qual junto com *r*-proteínas formam as estruturas das subunidades do ribossomo mostradas na Figura 1.1. Nos eucariotos, os domínios estão intercalados por regiões variáveis ou segmentos de expansão (ES, *expansion segments*) que progressivamente incrementa com o tamanho e complexidade e são responsáveis por 40% do aumento do tamanho dos ribossomos (Figura 1.3b) (Ramesh and Woolford, 2016).

Figura 1.3: **Estrutura secundária de rRNAs 18S, 25S, e 5.8S de *Saccharomyces cerevisiae*.** (a) Esquerda, quatro domínios da estrutura secundária de rRNA 18S representados em diferentes cores. Direita, rRNA 25S contendo seis domínios em diferentes cores e rRNA 5.8S em preto ligado com pareamento de base ao domínio I. (b) Segmentos de expansão (ES), hélice 25 é um exemplo para mostrar um incremento no comprimento da sequência passando de *E. coli* até *Homo sapiens*. (Modificado a partir Woolford and Baserga, 2013; Ramesh and Woolford, 2016).

Os genes de rRNA são os mais conservados em todas as células, as leveduras têm quatro tipos de RNAs transcritos a partir da região do rDNA, localizada no cromossomo XII. A RNA polimerase I transcreve uma longa molécula precursora, o pré-rRNA 35S. Esse transcrito contém sequências dos RNAs maduros (18S, 5.8S e 25S) separadas entre si por dois espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e limitadas por espaçadores externos (5' ETS e 3' ETS). A unidade de rDNA é formada por dois espaçadores não transcritos (NTS1 e NTS2), separados pelo gene de rRNA 5S o qual é transcrito pela RNA polimerase III (Figura 1.4a) (Venema and Tollervey, 1999; Strunk and Karbstein, 2009).

O pré-rRNA 35S é clivado sucessivamente em três sítios, o primeiro no espaçador 5' ETS na posição A0 (a clivagem gera o pré-rRNA 33S), o segundo no sítio A1 e finalmente na porção terminal 3' do rRNA maduro 18S. Essas clivagens levam à formação dos pré-rRNAs 20S e 27SA2. O processamento final do precursor 20S ocorre no citoplasma por meio da clivagem no sítio D que leva à formação do rRNA maduro 18S, porém o processamento do precursor 27SA2 continua no núcleo para a geração dos rRNAs maduros 5.8S e 25S. O rRNA 5S é processado de maneira independente e se associa à partícula pré-60S ainda no núcleo (Figura 1.4b) (Hughes and Ares Jr, 1991; Beltrame et al., 1994).

O processamento do precursor 27SA2 para a formação dos rRNAs 5.8S e 25S ocorre por duas etapas alternativas: aproximadamente 85% do pré-rRNA 27SA2 é clivada no sítio A3 em ITS1, processo realizado pela RNase MRP, seguido pela degradação 5'→3' no sítio B1s pela Rat1. O restante do pré-rRNA 27SA2 (15%) é clivado diretamente no sítio B1L. A clivagem no sítio B2 no extremo 3' do 25S ocorre simultaneamente com a clivagem no sítio B1. O processamento das duas formas dos precursores 27SB (27SBS and 27SBL) é desenvolvido da mesma maneira, a via de maturação envolve sítios do processamento C2→C1 e a degradação exonucleolítica no sítio E pelo exossomo (Figura 1.4b) (Venema and Tollervey, 1999; Fromont-Racine et al., 2003).

Figura 1.4: **Representação esquemática do processamento do pré-rRNA.** O pré-rRNA 35S contém as sequências dos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S, separado pelos ITS1 e ITS2 e limitadas pelos 5' ETS e 3' ETS (Fromont-Racine et al., 2003). O rRNA 5S é transcrito pela RNA polimerase III e processado de maneira independente do pré-rRNA 35S.

1.2 O complexo exossomo

1.2.1 Estrutura do complexo

O exossomo é um complexo multi-proteico de 400 kDa altamente conservado que possui atividade de exoribonuclease na direção $3' \rightarrow 5'$. Este complexo foi primeiro identificado em leveduras e depois identificado em outros eucariotos e em arquea (Estevez et al., 2001; Koonin et al., 2001). Em arquea, o exossomo é formado por duas proteínas com domínio RNase PH denominadas: Rrp41 e Rrp42 que formam um anel hexamérico. Este interage em um dos lados com três monômeros de uma mesma proteína que possui domínio de ligação ao RNA (S1/KH) denominadas: Rrp4 ou Csl4 (Figura 1.5) (Büttner et al., 2005; Lorentzen et al., 2005; Navarro et al., 2008). Embora, Rrp41 e Rrp42 exibam dobramentos similares à RNase PH, apenas a Rrp41 possui todos os resíduos de aminoácidos necessários para a catálise enzimática. Assim, o anel hexamérico do exossomo de arquea possui três sítios catalíticos, todos localizados na interface entre Rrp41 e Rrp42 de cada heterodímero (Navarro et al., 2008).

A estrutura tridimensional do exossomo em eucariotos se assemelha de um modo geral ao anel do exossomo de arquea, mas a composição das subunidades do complexo presente em eucariotos é distinta e mais complexa. O exossomo eucarioto possui nove subunidades que compõem o *core* (também conhecido como EXO9), das quais, seis subunidades contêm um domínio inativo de RNase PH denominadas: Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3 e três proteínas que contêm domínios de ligação a RNA: Csl4, Rrp4 e Rrp40 (conhecido como proteínas do cap), (Figura 1.5) (Makino et al., 2013).

Ao longo da evolução, o *core* (EXO9) do exossomo de eucariotos perdeu sua atividade de nuclease pelas substituições de aminoácidos nos sítios ativos de todas as subunidades com domínio RNase PH, originando um *core* eucariótico sem atividade catalítica (Liu et al., 2006; Makino et al., 2013). Porém, em eucariotos, duas subunidades catalíticas adicionais são ligadas ao *core*. Em levedura, o exossomo nuclear contém

Figura 1.5: **Conservação evolutiva do complexo exossomo em arqueas e eucariotos.** O exossomo de arqueia possui três proteínas: duas proteínas com domínio RNase PH: Rrp41 e Rrp42 em azul e verde que formam um anel hexamérico e uma proteína do CAP, a Rrp4 ou Csl4 em laranja que possui domínio de ligação à RNA. Ao longo da evolução, o *core* o exossomo eucariótico se assemelha à *core* de arqueia, mas o exossomo eucariótico possui nove subunidades diferentes, seis subunidades contêm um domínio inativo de RNase PH (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3) e três proteínas que contêm domínios de ligação à RNA (Csl4, Rrp4 e Rrp40) (Modificado de Makino et al., 2013).

onze subunidades ($\text{EXO9}^{\text{Rrp44-Rrp6}}$), enquanto que o complexo citoplasmático contém dez subunidades ($\text{EXO9}^{\text{Rrp44}}$), (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999; Burkard and Butler, 2000).

Rrp44 é a décima subunidade do exossomo (EXO-10) que está localizada no núcleo e no citoplasma (Figura 1.6). Essa nuclease é constituída por cinco domínios: um N-terminal que possui o domínio PIN com atividade de endonuclease, dois domínios *cold-shock* (CSD1 e CSD2), o domínio central de exonuclease $3' \rightarrow 5'$ (RNB) e o domínio S1 C-terminal. Estudos estruturais mostram que a Rrp44 associa-se pelo domínio PIN ao exossomo através de contatos com o dímero Rrp41-Rrp45 e pelo domínio CSD1 com a subunidade a Rrp43 (Bonneau et al., 2009), produzindo uma localização na base do anel RNase PH (parte abaixo do anel). Ambos sítios ativos estão acessíveis ao canal principal do *core* (Figura 1.6).

No núcleo, EXO-10 está associada a outra RNase, denomina Rrp6, a subunidade número 11 (EXO-11). A função da Rrp6 é de degradação $3' \rightarrow 5'$ para formação do

Figura 1.6: **Estrutura cristalográfica de exossomo de *Saccharomyces cerevisiae*.** O *core* de exossomo é cataliticamente inativo (mostrado em cinza). Sua função catalítica depende da associação da décima subunidade, a Rrp44, formando a EXO-10 (cor rosa, parte inferior). No núcleo em levedura, outra subunidade, Rrp6, (vermelho, parte superior) ligase à exossomo, formando a EXO-11. Estrutura cristalográfica do exossomo, mostrando 30 nucleotídeos de RNA passando pelo *core* (lado direito) subunidades de exossomo indicando os domínios da cada proteína (parte inferior) (Modificado de Makino et al., 2013, 2015).

rRNA 5.8S (Phillips and Butler, 2003; Zuo and Deutscher, 2001; Midtgaard et al., 2006). Rrp6 é composta de um domínio N-terminal (também chamado PMC2NT) que liga ao cofator Rrp47, seguido de uma parte central que possui o domínio exoribonuclease (*Exo domain*) a qual inclui o sítio catalítico DEDD e o domínio regulador HDRC (helicase and RNase D C-terminal). A porção C-terminal (CDT) liga o *core* diretamente, perto a parte de cima do barril Exo-9 através de contatos como as subunidades Csl4-Rrp43-Mtr3 (Figura 1.6). O C-terminal estabiliza a ligação de RNA ligada pelo o *core* do exossomo, estendendo-o transversalmente no canal central do *core* do exossomo (Makino et al., 2013, 2015; Wasmuth and Lima, 2016).

Em ensaios *in vitro*, Rrp6 e Rrp44 podem se ligar ao EXO-9 (*core*) independentemente uma da outra. E o EXO-9 interconecta as propriedades enzimáticas das duas ribonucleases (Liu et al., 2006; Wasmuth and Lima, 2012), por exemplo, durante a maturação de rRNA 5.8S. Rrp44 degrada o extremo 3' do precursor, produzindo um RNA intermediário 5.8S+30 nucleotídeos e Rrp6 executa o subsequente passo para produzir o rRNA 5.8S maduro.

1.2.2 Ligação de RNA pelo exossomo

Como se mencionou anteriormente, o *core* do exossomo eucarioto perdeu sua atividade catalítica, mas durante a evolução manteve sua estrutura semelhante ao exossomo de Arquea. Além disso, em levedura todas as subunidades do *core* são essenciais para a viabilidade das células, portanto, os dados sugerem que o *core* eucariótico do exossomo contém funções diferentes (Mitchell et al., 1997). Estas funções devem estar intimamente ligadas às características estruturais que foram conservadas durante a evolução.

Os ácidos nucleicos passam através da estrutura de barril, resíduos carregados positivamente de Rrp42 e o N-terminal de Mtr3 estabilizam sua ligação. Em arquea, o RNA é direcionado até os sítios catalíticos de Rrp41 (Figura 1.7esquerda) e em leveduras, devido à ausência de sítio catalítico dentro do anel, o RNA passa pelo o anel e nove nucleotídeos de comprimento passam através da região exoribonuclease da Rrp44

expandindo-se desde as regiões CSD1/CSD2 terminando a extremidade 3' do RNA no sítio catalítico RBN (Figura 1.7 direita).

Figura 1.7: Via de degradação de RNA no exossomo nuclear de *S. cerevisiae*. (a) Estrutura do exossomo de arqueia com o RNA (em preto) com um nucleótido ligado ao sítio catalítico, onde o RNA passa pelo exossomo (as subunidades: Rrp41 em azul, Rrp42 em verde e Rrp4 em laranja). Estrutura de exossomo de levedura, mostrando uma similar orientação ao exossomo de arqueia (Rrp41 em azul, Rrp45 em verde, Rrp4 em laranja, as outras subunidades com domínio RNase PH em cinza claro e o RNA em preto). O exossomo eucariótico e exossomo procariótico mostram a mesma ligação ao RNA entre o EXO-9. (b) O exossomo nuclear mostrando o canal central interno, os substratos de RNA se ligam no topo de Rrp6-Rrp47 e atinge o sítio ativo de Rrp6 (painel esquerdo). Alternativamente, o RNA pode ser canalizado através do central canal para o sítio ativo de Rrp44 (painel direito) deixando Rrp6 para estabilizar a ligação do substrato (Retirado de Makino et al. 2013, 2015).

Um recente estudo mostrou como os sítios catalíticos de Rrp44 e Rrp6 podem ser acessados por diferentes vias dependendo a natureza do substrato de RNA (Makino et al.,

2015). Como se mostra na Figura 1.7b, o substrato de RNA liga primeiro ao complexo Rrp6-Rrp47. Alternativamente, o substrato de RNA pode passar através do canal central para o sítio ativo de Rrp44, ligação esta, estabilizada por Rrp6.

1.2.3 Reconhecimento e controle dos RNAs pelo exossomo

O exossomo é responsável pelo processamento e/ou degradação de múltiplos RNAs que se localizam no núcleo e citoplasma (Houseley et al., 2006; Vanacova and Stefl, 2007; Schmid and Jensen, 2008; Lykke-Andersen et al., 2009; Kiss and Andrulis, 2011). O complexo deve identificar e responder acertadamente aos sinais que determinem quais transcritos devem ser completamente degradados, e quais devem ser devidamente processados pelo exossomo. Os múltiplos processos dos quais o exossomo participa já descritos são:

- Os rRNA 18S, 5.8S e 25S são transcritos numa molécula que é clivada e processada por várias nucleases, especificamente o exossomo nuclear junto com fatores Rrp47, Mtr4, Mpp6, Nop53 são requeridos para o processamento e maturação do RNA 5.8S (Figura 1.8,I) (Mitchell et al., 2003; LaCava et al., 2005; Granato et al., 2008; Callahan and Butler, 2008).
- Os tRNAs incorretamente processados são alvos do complexo TRAMP (Trf4/5, Air1/2, Mtr4) que adiciona uma curta cauda poli A e dirige o substrato para uma completa degradação pelo exossomo nuclear (Figura 1.8, II) (Lykke-Andersen et al., 2009; Callahan and Butler, 2010).
- Uma direta interação do exossomo nuclear EXO11 e spliceossomo para degradar introns co-transcricionalmente (Figura 1.8, III) (Lykke-Andersen et al., 2009).
- Degradação de RNAs mensageiros que não podem ser exportados e se acumulam no sítio de transcrição onde o acúmulo é devido ao incorreto processamento da extremidade 3' ou inibição da maquinaria de exportação nuclear (Figura 1.8, IV) (van Hoof et al., 2002; Mitchell et al., 2003; Takahashi et al., 2003).

Figura 1.8: **Resumo dos múltiplos mecanismos de processamento e degradação de RNA realizadas pelo exossomo.** **I.** A Rrp6 é requerida para o processamento do extremo 3' do precursor 7S para maturar o rRNA 5.8S. **II.** Os tRNAs defeituosos são alvo para o complexo TRAMP dirigindo-o ao exossomo para uma completa degradação pela Rrp6. **III.** O Exo-11 interage diretamente com o espliceossomo para degradar os introns co-transcricionalmente. **IV.** Rrp6 degrada os mRNAs que não podem ser exportados e ficam acumulados no sítio de transcrição. **V.** Rrp6 é requerida para a terminação da transcrição. **VI.** Os snRNAs são processados pela Rrp6. **VII.** Os transcritos instáveis crípticos CUTs são degradados pelo exossomo (Retirado de Fox Mélanie 2016).

- O exossomo é requerido para a terminação da transcrição realizada por Ndr1. O mecanismo pelo qual Ndr1 causa a terminação ainda não é conhecido mas se sabe que requer a interação com Rrp6 para terminar corretamente a liberação de DNA, RNA, RNA polimerase II e fatores de transcrição (Figura 1.8, V) (Conrad et al., 2000; Steinmetz et al., 2001; Carroll et al., 2004, 2007).
- O exossomo nuclear está envolvido no processamento da extremidade 3' dos pré-snoRNAs/snRNAs (Figura 1.8, VI) (Schmid and Jensen, 2008).
- Os transcritos instáveis crípticos CUTs e RNAs nucleares instáveis (lncRNAs) são alvos de degradação de EXO11 e complexo TRAMP (Figura 1.8, VI) (Davis and Ares, 2006; Chekanova et al., 2007).

1.2.4 Cofatores do exossomo

O complexo apresenta uma fraca atividade de exonuclease *in vitro*, porém uma rápida degradação *in vivo*, tais características levam à conclusão de que o exossomo tem que se ligar a cofatores para aumentar sua especificidade por alvos e sítios de processamento ou degradação (LaCava et al., 2005). Essas proteínas são organizadas em cofatores gerais e cofatores específicos (tabela 1.1 e Figura 1.8). Os cofatores gerais interagem diretamente ou indiretamente como o *core* do exossomo, e são necessários para diferentes funções do complexo. Os fatores específicos são necessários apenas para um pequeno subconjunto de substratos, sua função frequentemente depende da presença de um cofator para a regulação do exossomo.

Cofatores gerais do exossomo

Complexo Ski2-Ski3-Ski8 (SKI). A proteína Ski2, é uma RNA helicase da família Box DexH. Esta proteína junto com as proteínas Ski3 e Ski8 forma um complexo estável *in vivo* no citoplasma das leveduras (Brown et al., 2000). O complexo interage com o N- terminal da proteína Ski7, que a sua vez ajuda à ligação ao complexo exossomo por interações com

	Proteína	Atividade	Localização	Função
Exossomo-Associado	Ski7	Similar a GTPases transcricionais como eRF3	Citoplasma	Associa-se a Ski2- Ski3- Ski8 e exossomo. Requerido para todas as funções do exossomo no citoplasma.
Cofatores Gerais	Ski2-ski3-ski8	Contêm a helicase box DExH	Citoplasma	Necessária para todas as funções de exossomo citoplasmáticas. Interage com o exossomo pelo N-terminal de Ski7.
	Trf4/5-Air1/2-Mtr4 - complexo TRAMP	Contêm atividade de poliadenilação (Tfr4/5) e de helicase (Mtr4	Núcleo	Necessário para a função nuclear do exossomo. Mtr4 atua independentemente e interage fisicamente com a subunidade catalítica Rrp6.
Cofatores Específicos	Rrp47	Proteína que liga RNA	Núcleo	Interage geneticamente e fisicamente com Rrp6 e liga a RNAs estruturados. Necessária para a degradação de RNAs por Rrp6.
	Mpp6	Proteína que liga RNA	Núcleo	Proteína envolvida na maturação de rRNA 5.8S, a degradação de CUTs e controle de pré-mRNA. Sua ausência é letal nas cepas $\Delta rrp47$ e $\Delta rrp6$.
	Nop53	Proteína que liga RNA, especificamente ao RNA 25S	Núcleo	Proteína envolvida na maturação de rRNA 5.8S.
	Mtr4	Membro da família helicase DExH-box	Núcleo	Participa de reações de degradação e processamento de RNA pelo exossomo

Tabela 1.1: **Resumo de cofatores gerais e específicos de exossomo.**

as subunidades Rrp4, Mtr3, Rrp43 e Csl4 (Araki et al., 2001; van Hoof et al., 2002; Wang et al., 2005). O complexo SKI é necessário para ao menos três diferentes vias de controle de qualidade de mRNA: NMD (*nonsense-mediated decay*), transcritos com códons de parada prematuros (Conti and Izaurralde, 2005; Chang et al., 2007) de transcritos contendo estruturas secundárias bloqueando o ribossomo; NSD (*non stop decay*) de transcritos

que carecem de códon de parada (van Hoof et al., 2000b; Frischmeyer et al., 2002).

Complexo de poliadenilação TRAMP. O complexo TRAMP (**Trf4-Air2-Mtr4** proteínas) é formado por três subunidades que são evolutivamente conservadas em eucariotos: uma polimerase poli-A (Trf4/Trf5), uma segunda proteína que tem domínio de ligação a RNA (Air2/Air1) e uma RNA helicase (Mtr4/Dob1) (LaCava et al., 2005; Holub et al., 2012; Jia et al., 2012).

O TRAMP é particularmente muito importante para as vias de controle no núcleo, o complexo reconhece as características estruturais dos RNAs aberrantes junto com uma variedade de transcritos produzidos pelas três RNA polimerases: RNAs nucleolares e nucleares pequenos (snoRNAs e snRNAs, respectivamente), RNAs ribossomais (rRNAs), RNAs transportadores (tRNAs), rRNA 5S truncado, RNAs teloméricos e transcritos altamente instáveis (CUTs) (Holub et al., 2012). O TRAMP adiciona seletivamente uma curta cauda de poli-A a estes RNAs, seguida pelo recrutamento e ativação do exossomo nuclear para sua degradação (Azzouz et al., 2009).

Nestes processos, acredita-se que o TRAMP e o exossomo trabalhem analogamente em suas funções de processamento e degradação de RNA; assim, a habilidade do exossomo para distinguir entre os diferentes tipos de RNA parece ser dirigida pela poliadenilação promovida pelo TRAMP (Jia et al., 2011).

O TRAMP age de um modo distributivo, o que leva a dissociações frequentes do substrato, permitindo o acesso da exonuclease (exossomo). Isso indica que o comprimento da cauda poli A é uma característica importante da polimerase Trf4 (LaCava et al., 2005; Callahan and Butler, 2010). O complexo TRAMP limita o tamanho da cauda de poli (A) através da modulação das constantes de velocidade da adenilação e da afinidade por ATP. Esta modulação depende do número de adenosinas no 3'-terminal. Mtr4 regula a atividade de poliadenilação do TRAMP, detectando o número de adenosinas no substrato e promovendo o desligamento do complexo do RNA sendo poliadenilado (Jia et al., 2011). Como descrito acima, os componentes do TRAMP desempenham diferentes funções: as proteínas Air1/Air2 reconhecem o substrato, Mtr4 desenovela e reorganiza o

RNA e Trf4/Trf5 são responsáveis pela poliadenilação, logo o substrato não estruturado é apresentado para ser degradado pelo exossomo (Fasken et al., 2011).

Cofatores específicos

Rrp47. Contém um domínio conservado no N-terminal Sas10/C1D que interage com Rrp6, essencial para a função desta proteína. O domínio C-terminal de Rrp47, que é não-estruturado, é requerido para a interação com outros fatores que estão envolvidos na maturação 3' RNAs nucleolares pequenos (snRNAs) (Feigenbutz et al., 2013a). Rrp47 é requerida para a função de Rrp6 dependente e independente do *core*, como degradação do fragmento espaçador transcrito externo 5' do pré-rRNA e da maturação do rRNA 5.8S e RNAs nucleolares pequenos, o que indica que a interação Rrp6-Rrp47 seja importante para a função da Rrp6 (Schuch et al., 2014).

Mpp6. Fosfoproteína6 fase -M ou Mpp6. O homólogo de levedura Mpp6 é uma proteína que liga RNA. Em *Saccharomyces cerevisiae*, Mpp6 está envolvida na maturação de rRNA 5.8S, degradação de CUTs e controle de pré-mRNA. Efeitos de células deletadas de mpp6 ($\Delta mpp6$) são usualmente suaves, o que talvez seja devido à sua redundância funcional com outros fatores do exossomo, por exemplo, a co-deleção de *MPP6* e *RRP47* mostra um efeito sinérgico na estabilização dos CUTs (Milligan et al., 2008).

Mtr4. É um membro da família helicase DExH-box, com atividade de helicase em direção 3' – 5' (Wang et al., 2008; Holub et al., 2012). Recentes dados estruturais mostraram a presença de um domínio *Kyrpides-Ouzounis-Woese* (*KOW*), que é único para esta família de helicases e indispensável para a função Mtr4 (Weir et al., 2010; Holub et al., 2012). A deleção do domínio *KOW* produz o acúmulo de rRNA 5.8S com extensões de 30 nucleotídeos na extremidade 3', da mesma forma que na cepa $\Delta rrp6$, o que indica que o domínio *KOW* seja requerido para degradação/processamento por Rrp6.

No núcleo, Mtr4 participa de todas as funções do exossomo. O gene *MTR4* foi inicialmente descrito em *Saccharomyces cerevisiae* e sua mutação produz um acúmulo de RNAs poliadenilados e defeitos no processamento de RNA ribossomal (rRNA) (Liang et al., 1996; de la Cruz et al., 1998). Além disso, esta helicase contribui para a maturação

de rRNA, sno/snRNAs assim como para a degradação de RNAs não estruturados (Allmang et al., 1999; van Hoof et al., 2000a; Milligan et al., 2005; Callahan and Butler, 2008; Wang et al., 2008). Em muitas destas vias, a função de Mtr4 se encontra acoplada ao complexo TRAMP.

Nop53. Existe um grande número de proteínas envolvidas na montagem das subunidades ribossomais que possuem funções específicas. Nop53 participa de interações proteína-proteína que são importantes para a formação das estruturas dos pré-ribossomos (Thomson and Tollervey, 2005). Nop53 é uma proteína bem conservada em *Saccharomyces cerevisiae* e em humanos (Granato et al., 2005; Sydorsky et al., 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae*, esta proteína é codificada pelo gene *NOP53* (YPL146C) do cromossomo XVI e constitui um gene essencial para a viabilidade celular. É uma proteína de 455 aminoácidos formada em sua maior parte por α -hélice, sendo 43 dos resíduos carregados (DEHKR) e 39 hidrofóbicos (ACFGHILMTVWY) (Thomson and Tollervey, 2005).

Nop53 está localizada no núcleo e concentrada no nucléolo e está associada à montagem inicial das subunidades ribossomais 60S (Granato et al., 2005; Sydorsky et al., 2005; Thomson and Tollervey, 2005). Nop53 associa-se a proteínas envolvidas em processamento de rRNA, como Cbf5, Nop2, Fkb3 e Fkb4 (Sydorsky et al., 2005).

A depleção de Nop53 causa um retardo no processamento do pré-rRNA35S e diminui o processamento do pré-rRNA 27S, o que resulta em baixos níveis dos rRNA 25S e rRNA 5.8S (Granato et al., 2005). Além das interações anteriormente mencionadas, Nop53 interage com o fator de maturação da subunidade 60S, Nip7 e com Nop17, proteína envolvida na montagem e estabilização dos snoRNPs de box C/D, indicando que esta interação ocorra na partícula ribossomal 60S (Granato et al., 2005).

Resultados de co-imunoprecipitações de RNA com Nop53 realizados no nosso laboratório mostraram que Nop53 co-precipita os pré-rRNAs 27S e 7S (Granato et al., 2005) e que a ausência de Nop53 leva ao acúmulo desses pré-rRNAs, confirmando a função desta proteína nos passos iniciais do processamento. O exossomo é o complexo responsável pela degradação exonucleolítica do espaçador ITS2 do pré-rRNA 7S, levando à formação

do RNA maduro 5.8S e o acúmulo deste pré-rRNA foi também observado em células depletadas de Nop53, levando à conclusão de que Nop53 fosse um cofator do exossomo no processamento do pré-rRNA 7S (Granato et al., 2005).

Nip7 interage fisicamente com as proteínas Rrp43 e Nop53. Contrariamente, cepas mutantes para Nip7 não apresentam acúmulo do pré-rRNA 7S, mas sim de seu precursor, 27S (Zanchin and Goldfarb, 1999; Granato et al., 2005; Gonzales et al., 2005; Sydorsky et al., 2005), o que permite concluir que a interação de Nop53 com Nip7, que liga a subunidade do exossomo, podem ativá-lo é dirigí-lo para o processamento do pré-rRNA 7S (Granato et al., 2005). De acordo com os resultados obtidos previamente pela nossa equipe, Nop53 liga-se ao pré-rRNA co-transcricionalmente e influencia seu processamento através da interação direta com o exossomo. Isto foi confirmado através de experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), que mostraram que Nop53 se liga aos rRNAs 7S e 27S. O recrutamento de Nop53 ao rDNA é dependente da atividade transcricional, provando que Nop53 interage diretamente com a subunidade Rrn3 da RNA polimerase I. Ou seja, Nop53 liga-se co-transcricionalmente ao rRNA 5.8S, formando parte do complexo pré-60S, onde afeta o processamento do pré-rRNA 7S catalizado pelo exossomo (Granato et al., 2008).

Através da utilização de mutantes de depleção de Nop53, viu-se que a região N-terminal da proteína liga diretamente ao rRNAs 5.8S, e que a região C-terminal pode interagir com proteínas nucleares, como por exemplo: Nop17, Nip7, Cbf5, Nop2, Fkb3 e Fkb4, que estão implicadas na biogênese do processamento do ribossomo 60S (Granato et al., 2008). Além disso, Nop53 interage também com a proteína Trf4, componente do complexo TRAMP, e Rrp6, subunidade ativa do exossomo, (Granato et al., 2008). Como mencionado anteriormente, a depleção de Nop53 leva ao acúmulo do pré-rRNA 7S e de rRNAs poliadenilados, assim, na ausência da proteína, o exossomo não é efetivamente direcionado ao pré-rRNA, levando ao acúmulo e poliadenilação deste pré-rRNA pelo complexo TRAMP. Pode-se concluir portanto, que Nop53 é um cofator do exossomo (Granato et al., 2008).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivos a caracterização da função molecular da proteína Nop53 isolada em nosso laboratório, continuando os trabalhos descritos resumidamente acima. Com base nos dados anteriores, visamos a determinação do envolvimento de Nop53 na regulação da atividade do exossomo no processamento do rRNA 5.8S.

Nop53 interage com a subunidade Rrp6 do exossomo e com a subunidade Trf4 do TRAMP (Granato et al., 2008), que é responsável pela poliadenilação de RNAs que serão dirigidos para degradação pelo exossomo (LaCava et al., 2005). Um dos objetivos era o de verificar se Nop53 afeta a interação entre o exossomo e o TRAMP por co-purificação de proteínas na presença e ausência de Nop53.

Outro objetivo deste trabalho foi o de analisar a influência de Nop53 na ligação de Rrp6 ao *core* do exossomo e Nop53 através da utilização de mutantes de deleção de *RRP6* para determinar as suas regiões de interação com Nop53 e com o *core* do exossomo.

Materiais e métodos

3.1 Cultura e manipulação de *E. coli*

Para expressão heteróloga de proteínas foi utilizada a cepa BL21 CodonPlus(DE3)-RIL (*Stratagene*) e para os demais experimentos foi utilizada a cepa DH5 α (Hanahan, 1983), cujas características estão descritas na Tabela 3.1 e as bactérias foram mantidas nos meios de cultura descritos na tabela 3.2.

3.1.1 Preparação de células competentes DH5 α

Uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 1 mL de meio TYM (Tabela 3.2) e foi incubada por 16 horas a 37°C. Um dia depois, a cultura foi diluída (400 μ L da cultura inicial em 40 mL de meio) e incubada a 37°C até atingir OD₆₀₀ = 0,2 – 0,6. Os 40 mL de cultura foram então diluídos em 200 mL de TYM, seguindo incubação até OD₆₀₀ = 0,5 – 0,9. Os 200 mL de cultura foram novamente diluídos em 1 L de meio, seguindo incubação até atingir OD₆₀₀ = 0,6. A suspensão de células foi resfriada em banho de gelo e água por 15 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. As células coletadas foram ressuspensas em 100 mL de TFB1 gelado (0,03 M KOAc; 0,05 M MnCl₂; 0,1 M KCl; 0,01 M CaCl₂ e 15% glicerol), coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 8 minutos a 4°C e novamente ressuspensas em 10 mL de TFB2 gelado (0,1 M MOPS, pH = 7,0; 0,75 M CaCl₂; 0,02 M KCl; 15% glicerol). A suspensão de células competentes foi dividida em alíquotas de 100 μ L, que foram congeladas em nitrogênio líquido para serem armazenadas a –80°C.

Cepa	Características	Referência
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> $B F^- ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r$ <i>gal \lambda (DE3) endA Hte [arg Uile Yleu W Cam^r]</i>	Stratagene
DH5 α	<i>supE44 \Delta lacU169 (\varphi 80 lacZ \Delta M15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983

Tabela 3.1: Cepas *E. coli* utilizadas neste estudo.

Meio	Composição
LB	1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 2% ágar
2YT	1,6% triptona; 1% extrato de levedura; 1% NaCl
TYM	2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,58% NaCl; 0,25 MgSO ₄
Suplementados, conforme a necessidade, com:	
Ampicilina	100 μ g/mL
Kanamicina	20 μ g/mL
Cloranfenicol	50 μ g/mL
IPTG	0,5 mM

Tabela 3.2: Meios de cultura de *E. coli* utilizados neste estudo.

3.1.2 Transformação de células competentes DH5 α

Cerca de 400 ng de DNA proveniente de reação de ligação ou aproximadamente 10 ng de DNA plasmidial foram diluídos em água para atingir volume final de 20 μ L. Foram adicionados 80 μ L de tampão de transformação (0,1 M KCl; 0,03 M CaCl₂; 0,05 M MgCl₂ e 7 PEG) e a solução foi incubada por 5 minutos no gelo. Em seguida, 100 μ L de suspensão de células competentes foram adicionados e a reação foi incubada por 30 minutos no gelo. As células foram submetidas a choque térmico por incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e logo 1 mL de meio LB foi adicionado, sendo a cultura incubada por 50 minutos a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, ressuspensas em 100 μ L de meio LB e plaqueadas em meio LB seletivo.

3.1.3 Transformação de células competentes BL21

A 50 μ L de células competentes foram adicionados 10 ng de DNA plasmidial e a suspensão foi incubada por 30 minutos no gelo. As células foram submetidas a choque térmico por 2 minutos a 42°C e, após adição de 1 mL de meio LB, a cultura foi incubada por 1 hora a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto e plaqueadas em meio seletivo (Tabela 3.2).

3.1.4 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Os plasmídeos foram extraídos através de kit QIAprep *Spin Miniprep* (QIAGEN), segundo instruções do fabricante ou através de lise alcalina, como segue. Após incubação por 16 horas a 37°C em meio LB seletivo, células de 1,5 mL de cultura foram coletas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto e ressuspensas em 100 μ L de tampão GET (25 mM Tris-Cl, pH = 8,0; 50 mM EDTA, pH = 8,0 e 1% glicose). As células foram rompidas por incubação por 5 minutos com 200 μ L de solução de lise (200 mM NaOH e 1% SDS, preparada na hora do uso a partir de soluções 10X concentradas) e em seguida foram adicionados 150 μ L de solução 7,5 M NH₄OAc. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado a partir do sobrenadante por adição de 500 μ L de isopropanol e centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi lavado com 500 μ L de etanol 70%, com agitação em vórtex por 1 minuto. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, o etanol foi retirado e o DNA foi seco em bloco a 42°C por 5 minutos, sendo posteriormente ressuspendido em 50 μ L de TE (10 mM Tris-Cl pH = 8,0; 1 mM EDTA pH = 8,0) através de incubação a 42°C por 10 minutos.

3.2 Métodos de manipulação de DNA e construção de plasmídeos

Os métodos de construção de plasmídeos, incluindo reação de polimerase em cadeia (PCR), análise de restrição, separação por eletroforese e demais métodos usuais de biologia

molecular foram conduzidos de acordo com Sambrook et al. (1989) com os detalhes e modificações descritos abaixo.

3.2.1 Purificação de DNA em gel de agarose

Fragmentos de DNA foram recuperados de gel de agarose utilizando o kit Qiaquick *Gel Extraction Kit* (QIAGEN, purificação do DNA por imobilização em coluna de troca iônica), segundo instruções do fabricante.

3.2.2 Amplificação de DNA por PCR

Nas reações de PCR foram utilizados 2 ng de DNA plasmidial ou 500 ng de DNA genômico de *Saccharomyces cerevisiae* e os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3.3. As reações continham 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de dNTPs (desoxi-ribonucleotídeos), 200 nM dos primers e 0,025 U/μL de Taq DNA polimerase em reações de volume final 100 μL. O ciclo utilizado, exceto onde mencionado em contrário, consistiu em: desnaturação a 94°C por um minuto; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização em temperatura 5°C abaixo da T_m (*melting temperature*) dos primers por 1 minuto e extensão por 1 minuto a 72°C; extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos obtidos na amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose e purificados através do kit QIAquick *Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

3.2.3 Sequenciamento de plasmídeos

DNA plasmidial extraído de *E. coli* empregando o kit QIAprep *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, purificação do DNA por imobilização em coluna de troca iônica) foi seqüenciado utilizando o kit ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer), segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados 2,5 pmol de primer e 300 a 600 ng de vetor como molde em reação em 35 ciclos de: desnaturação a 96°C por 20 segundos, hibridização a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

3.2.4 Construção de plasmídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para clonagens e sequenciamento de DNA estão descritos na Tabela 3.3 e os plasmídeos utilizados neste estudo, descritos na Tabela 3.4, foram construídos de acordo com as estratégias de clonagem descritas abaixo.

No	Oligo	Sequência	Referência
01	RRP6XbaI-For	5'- CTCGAG CCTTTTAAATGACAGATTCTTACCTTTGG -3'	Este estudo
02	RRP6Xho-Rev	5'- TCTAGA ATGACTTCTGAAAATCCGGATGTAC -3'	Este estudo
03	TRF4BgI II-For	5'- AGATCT ATGGGGGCAAAGAGTGTAACAGC -3'	Este estudo
04	TRF4Sal I-Rev	5'- GTCGAC AAGGGTATAAGGATTATATCCA -3'	Este estudo
05	TRF4FOR700	5'- TGTATTCGTTAGCAAGCCAT -3'	Este estudo
06	TAPCHindIII -Rev	5'- AGCTTT CATGCCTCAGGTGACTTCCCCGCGGAATTC -3'	Este estudo
07	TAPCXhoI-For	5'- CTCGAG ATGGAAAAGAGAAGATGGAAAAAG -3'	Este estudo
08	NOP53BamHI-For	5'- GGATCC ATGGCTCCAATACTAAC -3'	Este estudo
09	NOP53SalI-Rev	5'- GTCGAC CTATTTGAAGTCCTTATGTGTCCAC -3'	Este estudo
10	GST-For	5'- GGTGATCATGTAACCC -3'	Goldfeder, 2008
11	Sp6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'	Promega
12	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Promega

Sítios de restrição estão destacados em negrito.

Tabela 3.3: Oligonucleotídeos utilizados para clonagens e sequenciamento de DNA.

Plasmídeo	Características	Referência
pMET	<i>MET25</i> ¹ , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Perona, não publicado
pMET- <i>RRP43</i> -TAP	<i>MET25::RRP43</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Oliveira et al. 2002
pMET- <i>rrp43</i> -2-TAP [Cys230Tyr , Ile274Thr , Cys276Tyr]	<i>MET25:: rrp43-2</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Oliveira et al. 2002
pMET- <i>rrp43</i> -3-TAP [Asn78Asp , Val133Met , Ser162Phe , Ala246Thr]	<i>MET25:: rrp43-3</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Oliveira et al. 2002
pGEM-T	<i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^R	<i>Promega</i>
pGEM-T- <i>RRP6</i>	<i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^R	Este estudo
pGEM-T- <i>TRF44</i>	<i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^R	Este estudo
pGEM-T-TAP	<i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^R	Este estudo
pMET-CWC24-TAP	<i>MET25::CWC24</i> <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Perona, não publicado
pMET- <i>RRP6</i> -TAP	<i>MET25::RRP6</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET- <i>TRF4</i> -TAP	<i>MET25::TRF4</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pUG34- <i>RRP42</i>	<i>MET25::yEGFP3</i> ³ - <i>Rrp42</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG34- <i>RRP44</i>	<i>MET25::yEGFP3</i> - <i>RRP44</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG34- <i>RRP45</i>	<i>MET25::yEGFP3</i> - <i>RRP45</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG34- <i>RRP6</i>	<i>MET25::yEGFP3</i> - <i>RRP42</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pGEM-T easy-NOP53	<i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^R	Este estudo

*A mutações no gene da *RRP43* estão destacados em negrito.

*Números entre colchetes representam os resíduos de aminoácidos codificados nos plasmídeos.

1 *MET25*, promotor do gene *MET25* (O-acetil homoserine-O-acetil serina sulfidrilase) de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 GST, glutationa-S-transferase de *S japonicum*.

3 GFP, green fluorescent protein de *A. victoria*.

Continuação....

Plasmídeo	Características	Referência
pGEX	<i>GST</i> ² , <i>lacI</i> , <i>Amp</i> ^R	GE Healthcare
pGEX-NOP53	<i>GST::NOP53</i> , <i>lacI</i> , <i>Amp</i> ^R	Este estudo
pET-His-RRP40	<i>HIS6::RRP40</i> , <i>lacI</i> , <i>Amp</i> ^R	Luz, 2006
pET-His-RRP43	<i>HIS6::RRP43</i> , <i>lacI</i> , <i>Amp</i> ^R	Luz, 2006
pET-His-RRP45	<i>HIS6::RRP45</i> , <i>lacI</i> , <i>Amp</i> ^R	Luz, 2006
pUG34- <i>rrp6</i> _{FL} [1 – 619]	<i>MET25::rrp6</i> _{FL} - <i>yEGFP</i> ³ , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG34- <i>rrp6</i> _{ΔC} [1 – 398]	<i>MET25::rrp6</i> _{ΔC} - <i>yEGFP</i> ³ , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG34- <i>rrp6</i> _N [1 – 106]	<i>MET25::rrp6</i> _N - <i>yEGFP</i> ³ , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG34- <i>rrp6</i> _C [532 – 619]	<i>MET25::rrp6</i> _C - <i>yEGFP</i> ³ , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Gonzales & Oliveira, não publicado
pUG36	<i>MET25::yEGFP</i> ³ , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Goldfeder, 2008
pUG36- <i>rrp6</i> _{FL} [1 – 619]	<i>MET25::rrp6</i> _{FL} - <i>yEGFP</i> ³ , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pUG36- <i>rrp6</i> _{ΔC} [1 – 398]	<i>MET25::rrp6</i> _{ΔC} - <i>yEGFP</i> ³ , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pUG36- <i>rrp6</i> _N [1 – 106]	<i>MET25::rrp6</i> _N - <i>yEGFP</i> ³ , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pUG36- <i>rrp6</i> _C [532 – 619]	<i>MET25::rrp6</i> _C - <i>yEGFP</i> ³ , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo

*A mutações no gene da *RRP43* estão destacados em negrito.

*Números entre colchetes representam os resíduos de aminoácidos codificados nos plasmídeos.

1 *MET25*, promotor do gene *MET25* (O-acetil homoserine-O-acetil serina sulfidrilase) de *Saccharomyces cerevisiae*.2 GST, glutathione-S-transferase de *S japonicum*.3 GFP, green fluorescent protein de *A. victoria*.

Tabela 3.4: Plasmídeos utilizados neste estudo.

Para ensaios de crescimento, expressão e purificação do exossomo e complexo TRAMP na cepa mutante condicional $\Delta nop53$ de *Saccharomyces cerevisiae* pelos métodos de cromatografia de afinidade TAP-tag (*Tandem affinity purification*) e gradiente de glicerol. Os DNAs correspondentes às ORF (*open reading frame*) YOR001W / RRP6 e YOL115W / TRF4 foram amplificados por PCR utilizando como molde DNA genômico de

Saccharomyces cerevisiae e os primers correspondentes para cada gene descritos na Tabela 3.3, com sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição: *RRP6*: *XbaI-XhoI* e *Trf4*: *BglII* e *SalI*. Simultaneamente, foi amplificado o TAP utilizando DNA plasmidial pBS 1479 e os primers 06 e 07, com sítios de restrição *HindIII* e *XhoI*. Separadamente, os genes foram clonados no vetor pGEM-T (*promega*), gerando os plasmídeos: **pGEM-T-RRP6**, **pGEM-T-TAP** e **pGEM-T-TRF4** que foram sequenciados. Estes vetores foram clivados com as enzimas de restrição adequadas para cada gene e os fragmentos purificados de gel de agarose foram subclonados no vetor pMET25-CWC24-TAP (Perona, 2013), usando as seguintes estratégias:

- Vetor linearizado por clivagem com *XbaI* e *XhoI* foi ligado com dois fragmentos RRP6 e TAP, gerando o plasmídeo pMET-RRP6-TAP.
- Vetor linearizado por clivagem com *BamHI* e *SalI* foi ligado com dois fragmentos: TRF4 e TAP, gerando o plasmídeo pMET-TRF4-TAP.

Para estes mesmos ensaios, foram usados os plasmídeos: **pMET-RRP43-TAP**, **pMET-rrp43-2-TAP** e **pMET-rrp43-3-TAP**, obtidos anteriormente no laboratório (Oliveira et al., 2002) que expressam Rrp43 (selvagem ou mutante) em fusão com as proteínas CBP (*camodulin binding protein*) e Proteína A de *Staphylococcus aureus* na extremidade carboxi-terminal.

Para os ensaios de co-imunoprecipitação de mutantes de Rrp6 com Rrp43-TAP e Nop53-TAP na cepa mutante $\Delta nop53$ de *Saccharomyces cerevisiae*, foram utilizadas as construções realizadas por Gonzales & Oliveira (não publicado), descritos na Tabela 3.3. Essas construções expressam porções truncadas da Rrp6 fusionadas à N-terminal da proteína verde fluorescente (GFP *Green Fluorescent protein*): *rrp6_N* (resíduos 1 – 106), *rrp6_{ΔC}* (resíduos 1 – 398), *rrp6_C* (resíduos 532 – 619) e Rrp6_{FL} (*full-length* resíduos 1 – 619). Os mutantes de Rrp6 foram excisados de clones nos plasmídeos pUG34 através de clivagem com *EcoRI* e *SalI*, com o objetivo de trocar a marca de seleção de auxotrofia de Histidina para Uracila. Em seguida, os fragmentos purificados de gel de agarose foram

subclonados no vetor pUG36, originado os plasmídeos: **pUG36-*r***

Rrp6_{FL}[1-619], **pUG36-*rrp6*_{ΔC}[1-398]**, **pUG36-*rrp6*_N[1-106]**, **pUG36-*rrp6*_C[532-619]**.

Para a expressão de proteínas recombinantes em bactérias para o ensaio de *pull down*, o gene de *NOP53* (YPL146C) foi amplificado com o DNA genômico e os primers 08 e 09 (tabela 3.3), O produto foi clonado no vetor pGEM-T easy, gerando o plasmídeo pGEM –T easy-NOP53, Após de sequenciamento, foi digerido nos sítios de restrição com enzimas *Bam*HI e *Sal*I. O fragmento purificado foi subclonados no vetor pGEX previamente linearizado como *Bam*HI e *Sal*I, gerando o plasmídeo **pGEX-NOP53** que permite a expressão da proteína de fusão GST-Nop53 em *E.coli*. Para mesmo ensaios foram utilizados, os genes *RRP40* (ORF YOL142W), *RRP43* (ORF YCR035C) e *RRP45* (ORF YDR280W) já estavam disponíveis no laboratório na fusão pET-His-RRP40, pET-His-RRP43, pET-His-RRP45 (Luz, 2006), utilizados para expressão da proteína recombinante como His₆.

3.3 Cultura e manipulação de *S. cerevisiae*

Métodos de cultura e manipulação de leveduras foram realizados como descrito por Sheman et al. (1986). As cepas de levedura utilizadas neste estudo foram mantidas nos meios descritos na tabela 3.6 e suas principais características genéticas estão descritas na tabela 3.5.

3.3.1 Transformação de leveduras

Para a expressão condicional da proteína Nop53, em levedura, foi utilizada a cepa *Δnop53/Ycp111GAL::His-NOP53*, já disponível no laboratório (Granato et al., 2005), com o gene Nop53 clonado no vetor centromérico Ycp111GAL sob controle do promotor regulável GAL1 fusionado com uma curta cauda de Histidina (His₆). Para analisar a função de Nop53 sob o exossomo, a cepa foi transformada com os plasmídeos expressando as subunidades do exossomo e complexo TRAMP fusionadas à TAP e à GFP, originando

as cepas denominadas na tabela 3.7.

Cepa	Característica	Referência
$\Delta nop53/Ycp111 GAL::His-NOP53$	<i>n MATa, MET15, hisΔ, leu2Δ0, ura3Δ0, NOP53::KAN/Ycp111 Gal-His-NOP53</i>	Granato et al., 2005
Mtr3-TAP	<i>MATa; ura3-52; leu2-3,112; YGR158c::TAP-KIURA3</i>	<i>Euroscarf</i>
$\Delta nop53/pMET-Nop53-TAP$	<i>n MaTa, MET15, hisΔ, leu2Δ0, ura3Δ0</i>	Bagatelli, não publicado
$\Delta rrp6$	<i>BY;4741 MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YOL001w::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
W303	<i>MATa, trip1 leu2-3,112 his 3-11,15 ade 2-1 ura 3-1 can-100</i>	Sherman et al., 1986

Tabela 3.5: Cepas de levedura utilizadas neste estudo.

Meio	Composição
YNB	0,7% YNB (yeast nitrogen base); 2% Galactose/Glicose; 2% ágar,
Galactose/Glicose	suplemento com base nitrogenada e aminoácidos necessários
YPD/YPDGal	1extrato de levedura; 2% peptona; 2% Galactose/Glicose; 2 ágar
Suplementos conforme as necessidades, com:	
Lisina	30 µg/mL
Metionina	20 µg/mL
Uracila	20 µg/mL
Adenina	20 µg/mL
Triptofano	20 µg/mL
Histidina	20 µg/mL

Tabela 3.6: Meios de cultura de levedura utilizados neste estudo.

Essas cepas foram usadas em ensaios de crescimento, co-imunoprecipitação e separação de complexos no gradiente de glicerol. Além disso, usou-se as cepas $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$ e $\Delta nop53/pMET-TAP-NOP53$ para transformar com mutantes de Rrp6 originando as cepas denominadas na tabela 3.7, que foram utilizados em ensaios de co-imunoprecipitação. O procedimento de transformação é explicado como segue.

Cepa	Plasmídeo	Cepa transformada
$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53$	<i>pMET-RRP43-TAP</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-TAP$
	<i>pMET-rrp43-2-TAP</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-2-TAP$
	<i>pMET-rrp43-3-TAP</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-3-TAP$
	<i>pMET-RRP6-TAP</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP6-TAP$
	<i>pMET-TRF4-TAP</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / TRF4-TAP$
	<i>pUG34-RRP42</i>	$\Delta nop53 GAL::GFP-RRP42$
	<i>pUG34-RRP44</i>	$\Delta nop53 GAL::GFP-RRP44$
	<i>pUG34-RRP45</i>	$\Delta nop53 GAL::GFP-RRP45$
	<i>pUG34-RRP6</i>	$\Delta nop53 GAL::GFP-RRP6$
$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-TAP$	<i>pUG36-rrp6_{FL}[1 – 619]</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-TAP / GFP-rrp6_{FL}$
	<i>pUG36-rrp6_{ΔC}[1 – 398]</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-TAP / GFP-rrp6_{\Delta C}$
	<i>pUG36-rrp6_N[1 – 106]</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-TAP / GFP-rrp6_N$
	<i>pUG36-rrp6_C[532 – 619]</i>	$\Delta nop53 / GAL::His-NOP53 / RRP43-TAP / GFP-rrp6_C$
$\Delta nop53 / NOP53-TAP$	<i>pUG36-rrp6_{FL}[1 – 619]</i>	$\Delta nop53 / NOP53-TAP / GFP-rrp6_{FL}$
	<i>pUG36-rrp6_{ΔC}[1 – 398]</i>	$\Delta nop53 / NOP53-TAP / GFP-rrp6_{\Delta C}$
	<i>pUG36-rrp6_N[1 – 106]</i>	$\Delta nop53 / NOP53-TAP / GFP-rrp6_N$
	<i>pUG36-rrp6_C[532 – 619]</i>	$\Delta nop53 / NOP53-TAP / GFP-rrp6_C$

Tabela 3.7: Denominação de cepas transformadas.

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

3.3.2 Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

A cepa $\Delta nop53/Ycp111GAL::His-NOP53$ transformada foi inoculada inicialmente em meio mínimo YNB contendo galactose como fonte de carbono acrescido de uracila, lisina e metionina e desprovido de leucina e histidina (tabela 3.6), a fim de evitar a perda dos plasmídeos. As cepas foram incubadas a 30°C até atingir a OD₆₀₀ 1,0. A partir de então, as células foram transferidas para meio contendo glicose e galactose mantendo as mesmas condições de aminoácidos, com o propósito de inibir (glicose) o induzir (galactose) a expressão da Nop53. Além disso, foi analisada a super-expressão das subunidades de exossomo excluindo no meio a metionina para o controle do promotor MET. A cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$ transformada (Seção 3.3.1), foi crescida nas mesmas condições antes descritas, exceto que o meio foi desprovido de uracila, para evitar a perda dos plasmídeos contendo os genes mutantes de *RRP6*.

O crescimento destas culturas nas diferentes condições foram acompanhados com medição da densidade óptica OD₆₀₀ a cada 2 horas durante 24 horas em espectrofotômetro espectramax (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader), sendo os dados expressos em curva de crescimento em termos de log(OD₆₀₀/OD₆₀₀ no tempo zero). Simultaneamente, das culturas foram coletados os volumes de cada cultura necessários para que, após ressuspensão em 100 µL de água estéril, fosse obtida uma OD₆₀₀ equivalente a 10 ODUs (*optical density units*). Partindo desta suspensão de células, foram feitas diluições para 1; 0,1; 0,01 e 0,001 ODUs. Foram gotejados em placa de YNB galactose e glicose 5 µL de cada diluição e as placas foram incubadas por 3 dias a 30°C.

3.4 Análise de proteínas

3.4.1 Quantificação de proteínas pelo método do ácido binciconínico (BCA)

A quantificação de extratos de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Smith et al. (1985). Um mililitro de solução de 5 mM CuSO₄ em BCA (*Bicinchoninic Acid Solution*, SIGMA) foi adicionado a 10 µL de extrato protéico e incubado por 30

minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, a absorbância (562 nm) foi medida e a concentração de proteínas determinada por comparação a uma curva padrão feita para BSA (*Bovine Serum Albumin*).

3.4.2 Separação de Proteínas por SDS-PAGE

Os extratos proteicos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo protocolo em Sambrook et al. (1989). O gel para empacotamento continha acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 5% pH = 6,8; 0,1% SDS; 0,1% persulfato de amônio; 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de TEMED e o gel de separação continha acrilamida: bis-acrilamida (29 : 1) 10 ou 12 ou 15%; 380 mM Tris-HCl pH = 8,8; 0,1% ; 0,1 persulfato de amônio ; 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de TEMED. As amostras em tampão de amostra 6X (40 mM Tris-HCl pH = 6,8; 8% glicerol , 2% SDS ; 100 mM DTT ; 0,1% azul de bromofenol) foram incubadas a 94°C por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel é submetido à voltagem de 150 V em tampão de corrida Tris-glicina 1X (25 mM Tris-HCl ; 250 mM glicina ; 0,1% SDS).

3.4.3 Coloração de proteínas por “Coomassie Blue”

O gel de poli-acrilamida foi incubado em solução de Coomassie Blue R 0,25% em metanol 45% e ácido acético 10% por 2 horas e descorado em solução de etanol 50% e ácido acético 10%.

3.4.4 Análise de proteínas por *western blot*

Após SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Towbin et al., 1979) em tampão de transferência gelado (25 mM Tris pH = 8,3; 192 mM glycine; 15% metanol) por um período de 2 horas com uma corrente constante de 250 mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com TBS-T (10 mM Tris-HCl pH = 8,0; 150 mM NaCl , 0,2% Tween20) contendo 5% de leite desnatado, sob leve agitação por duas horas a 25°C.

Transcorrido este tempo, a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS-T e posteriormente incubada por 2 horas em TBS-T 5% de leite desnatado contendo o

anticorpo primário. A membrana foi lavada novamente com TBS-T e em seguida transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário por 2 horas. A membrana foi então submetida à lavagem final com TBS-T antes da revelação.

Foram utilizados anticorpos primários: α -poli-histidina (*GE Healthcare*, camundongo, diluição 1 : 5000) e antisoros α -GST (Sigma, coelho, diluição 1 : 2000), α -Rr6 (cabra, diluição 1 : 750), α -CBP (coelho, diluição 1 : 5000), e α -RPL5 (camundongo, diluição 1 : 2000). Os anticorpos secundários utilizados, conjugados com HRP (*horse radish peroxidase*), foram α -coelho (*GE Healthcare*; diluição 1 : 12000) e α -cabra (*GE Healthcare*, diluição 1 : 12000), α -camundongo (*GE Healthcare*, diluição 1 : 10000).

Para revelação do *Western blot* foi utilizado o ECL *Western Blotting Detection System* (*GE Healthcare*) ou *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (*Thermo Scientific*), ambos baseados na quimioluminescência produzida durante a oxidação do luminol pela HRP na presença de peróxido, em meio alcalino. O sinal obtido foi visualizado por exposição a filme de raio-X.

3.4.5 Purificação do complexo do exossomo na cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ por cromatografia de afinidade com TAP-tag

A purificação de amostras de exossomo por ensaio de co-imunoprecipitação TAP-tag (*Tandem affinity purification*) foi realizada conforme descrito por Lourenço et al., 2013. A figura 3.1, esquematiza o ensaio de co-imunoprecipitação, O TAP-tag consiste em dois domínios da Proteína A de *Staphylococcus aureus* (que é reconhecida por IgG), fusionada a um peptídeo que se liga à proteína calmodulina (CBP, *calmodulin binding peptide*). Estas porções de Proteína A e CBP são separadas por um sítio de clivagem da protease TEV.

As cepas de mutante condicional $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ expressando Rrp43-TAP (Selvagem e mutante) e Rrp6-TAP descritos tabela 3.7, foram crescidas conforme o descrito na seção 3.3.2. As células foram transferidas para 5 L de meio contendo glicose ou galactose com o propósito de inibir (glicose) o induzir (galactose) a expressão de

Nop53. Previamente à passagem a volume maior, avaliou-se presença de contaminação por microscopia óptica (aumento 400X).

Células foram coletadas por centrifugação, lavadas com H₂O, ressuspensas em tampão exossomo (50 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 10 glicerol e 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) e congeladas em formas de gotas diretamente em N₂ líquido. Ainda congeladas, as células foram lisadas mecanicamente no sistema Mill MM 200 (*Retsch*). Após o descongelamento, células intactas e restos celulares foram retirados por ultracentrifugação a 40.000 rpm por 1 hora a 4°C.

O sobrenadante (ET) foi incubado por 2 horas a 4°C sob agitação com IgG Sepharose 6 *Fast Flow* (*GE Healthcare*) previamente equilibrada em 50 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl e 10 glicerol. Após, a resina foi centrifugada coletando-se o extrato total não ligado (FT). A resina foi lavada três vezes com tampão exossomo sem PMSF. A eluição (E) foi feita em 50 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 10, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT e a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*). Material das diferentes frações, foram separadas em PAGE-SDS e transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas no *western blot* usando os anticorpos: anti-Rrp6 e anticorpo anti-CBP. As eluições foram precipitadas com TCA (ácido tricloroacético) 10% para serem analisadas por espectrometria de massas.

As cepas $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$ e $\Delta nop53/NOP53-TAP$ transformadas com mutantes de Rrp6 conforme descrito nas seções 3.3.1 e 3.3.2 foram crescidas em YNB glicose com histidina e metionina (Tabela 3.6), incubadas a 30°C até atingir a OD₆₀₀ 1,0, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm e congeladas em formas de gotas diretamente em N₂ líquido. Ainda congeladas, as células foram lisadas mecanicamente. Após o descongelamento, células intactas e restos celulares foram retirados por ultracentrifugação a 40.000 rpm por 1 h a 4°C. Com estas células foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação, tal como foi descrito anteriormente.

Figura 3.1: **Esquema de purificação por cromatografia de afinidade com TAP-tag (*Tandem affinity purification*)**. Purificação por cromatografia de afinidade Consiste em três componentes: um peptídeo de ligação à calmodulina (CBP), um sítio para TEV protease de *Tobacco etch virus* e proteína A que contém um domínio de ligação para a inmonoglobulina G (IgG). O extrato total é incubado com Beads IgG-sefarose por 2 horas sob agitação. Depois de lavagens com tampão, uma solução de TEV é colocada para obter a eluição de proteínas de interação específica à proteína alvo (Modificado de Huber, 2003).

3.4.6 Espectrometria de massas MS/MS

Amostras precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% foram enviadas para processamento *in solution* com tripsina e análise MS/MS na *Proteomic Core Facility* do CHU de Québec, Canadá. O software Scaffold (versão Scaffold 4.4.5, Proteome Software Inc., Portland, OR) foi usado para validar as identificações de peptídeos e proteínas por MS/MS, empregando como critério de aceitação de peptídeos, aqueles identificados com probabilidade maior que 7,0% de alcançar FDR (*false discovery rate*) menor que 1,0% pelo algoritmo Scaffold Local FDR. Para proteínas, foram aceitas aquelas com probabilidade maior que 92% de alcançar um FDR menor que 1,0%, contendo pelo menos 2 peptídeos identificados.

3.4.7 Software de análise de dados de espectrometria de massas

A lista de proteínas identificadas por massas no experimento de co-imunoprecipitação foi analisada na plataforma bioinformática *David Bioinformatics Resources*. David é uma ferramenta de acesso livre que consiste de uma base de conhecimento biológico integrado e ferramentas analíticas com o objetivo de extrair sistematicamente o significado biológico de uma lista de genes e proteínas. Nesta plataforma, realizamos as análises de anotação funcional que classifica os genes da lista dentro de grupos de processos biológicos. Nesse módulo o programa faz um enriquecimento dos dados de anotação e agrupa genes de acordo com sua importância estatística, destas análises se explorou ontologia gênica e anotação por categoria de processos biológicos (Prosdocimi et al., 2002)

3.4.8 Gradiente de glicerol 10 – 30 %

Ensaio de separação isopícnica em gradiente de glicerol, 400 μ L de extrato proteico total clarificado obtido e quantificado pelo método de BCA, foi colodado no topo de gradiente de glicerol de 10% a 30%, previamente linearizado em equipamento Gradient Master (Biocomp), (Biocomp®). Os tubos equilibrados em balança semianalítica, foram centrifugados a 40000 rpm por 16 h a 4°C. O perfil de separação foi obtido através de

análise da amostra no *EconoSystem* (*GE Healthcare*), com monitoramento da absorbância em 280 nm e coleta de frações de 500 μ L em coletor de amostras com injeção linear de glicerol 40% pelo fundo do tubo (Figura 3.2). As proteínas presentes em cada uma das frações foi precipitada por adição de 10% TCA (ácido tricloroacético), separadas por SDS-PAGE e identificadas por *western blot*.

Figura 3.2: **Esquema de separação isopícnica em gradiente de glicerol.** Preparação do gradiente de glicerol em proporção 10%-30%. O gradiente foi linearizado obtendo-se na parte inferior o glicerol mais concentrado e no topo o glicerol menos concentrado. No topo coloca-se a amostra em seguida foi centrifugado por 16 horas a 4°C. Os tubos foram fracionados, obtendo-se uma separação de complexos: na parte superior monômeros, na parte intermediária complexos multiproteicos menores e no fundo complexos multiproteicos maiores (Modificada de Lin et al. (2012)).

3.4.9 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

A expressão de proteínas recombinantes foi realizada na cepa BL21(DE3)- RIL, que carrega um fago em estado lisogênico que codifica a T7 RNA polimerase e um plasmídeo que expressa tRNAs para arginina, isoleucina e leucina. Foram utilizados os plasmídeos pGEX (*GE Healthcare*) para produção de proteínas de fusão com GST sob controle do promotor ptac, ou pET (*Novagen*) para expressão de proteínas de fusão com cauda de

poli-histidina, sob controle do promotor T7.

Para a expressão de proteínas recombinantes, as células foram transformadas conforme descrito na Seção 3.1.3 e inoculadas em 5 mL de meio LB, com 50 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol, a 37°C por 18 horas. Para células transformadas com o vetor pGEX foram adicionados ao meio 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e para células transformadas com pET foram adicionados 20 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina. A partir desta cultura, 5 mL foram diluídos em 500 mL de meio 2YT (Tabela 3.2) suplementado conforme descrito acima e a cultura foi incubada até $\text{OD}_{600} \sim 0,5$. Após, coleta-se células de 1 mL de cultura para comparação posterior da proteína não induzida NI (centrifugação por 12000 rpm por 1 minuto), foi induzida a expressão da proteína recombinante por adição de 0,5 mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo). A proteína GST-Nop53 foi expressa por 3 horas a 30°C. As proteínas do exossomo His-Rrp40, His-Rrp43, His-Rrp45 e GST foram expressas no mesmo tempo, porém a 37°C. Após a indução, as células foram coletadas em gelo e centrifugadas a 10000 rpm conservado a temperatura a 4°C. Alíquotas de 1 mL coletadas foram ressuspensas em 50 μL de tampão de amostra para proteína, fervidas a 95°C por 5 minutos e 5 μL destas amostras foram aplicados em SDS-PAGE. A expressão da proteína recombinante foi identificada por coloração com Coomassie, através de comparação com as bandas do extrato total de células não induzidas e induzidas.

3.4.10 Estudo *in vitro* de interação proteína-proteína por *pull-down*

Células de *E. coli* expressando GST, GST-Nop53 e His-Rrp40, His-Rrp43, His-Rrp45 foram descongeladas e ressuspensas em Tampão de lise (20 mM Hepes pH = 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF). As células foram quebradas através de 3 passagens em *French press*, com pressão aproximadamente igual a 1000 PSIG, com intervalos de 1 minuto de incubação da amostra no gelo entre as passagens. Os restos celulares foram separados por centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C.

O extrato total (ET) de células de *E. coli* expressando GST ou GST-Nop53 foi incubado com 250 μL de glutathione-sepharose (*GE Healthcare*, previamente lavada por

2 vezes com 12 mL de água e equilibrada com 12 mL de tampão de lises) por 1 hora a 4°C com rotação dos tubos. A resina foi centrifugada a 4000 rpm e coletado o extrato não ligado (FT). Após imobilização de GST ou GST-Nop53 na coluna a resina foi lavada (cinco lavagens com 12 mL de tampão de lises) e incubada com extrato total de células His-Rrp40 ou His-Rrp43 ou His-Rrp45. Após, as resinas foram lavados com tampão três vezes aumentando a concentração de sal NaCl (W1 : 100 mM, W2 : 250 mM e W3 : 500 mM NaCl). As proteínas foram eluídas da resina por adição de 1 mL de solução contendo 10 mM glutathione reduzida, 50 mM Tris-HCl pH = 8 e 1 mM PMSF. As proteínas presentes foram secadas com *speed vacuum*. Material das diferentes frações (ET, FT, W, E) foram separadas em PAGE-SDS e transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas no *western blotting* usando os anticorpos: anti GST e anti His.

3.5 Análise de processamento de RNA

A análise do processamento de RNA foi feita através de *northern blot*.

3.5.1 Extração de RNA total de *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas de mutante condicional $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ expressando as subunidades de exossomo, descritos tabela 3.7 e crescidas conforme a seção 3.3.2. RNA total das cepas foi extraído pelo método modificado de fenol-quente (Oliveira and McCarthy, 1995). A partir de 50 mL de cultura foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas com 1 mL de água gelada, coletadas novamente e congeladas a -20°C até o início da extração de RNA. Depois de descongeladas, as células foram ressuspensas em 500 μL de tampão acetato de sódio (50 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA, pH = 5,0). Foram adicionados: 1 volume de pérolas de vidro, 100 μL de 10 e 500 μL de fenol / acetato de sódio pré-aquecido a 65°C . A lise das células foi realizada por 3 ciclos sucessivos de incubação a 65°C por 1 minuto, agitação em vórtex por 1 minuto e incubação a 65°C por 1 minuto. Após este período, foi feita incubação por 5 minutos a 65°C , agitação em vórtex por 1 minuto e incubação por mais 1 minuto a 65°C . As amostras foram resfriadas

em gelo por 2 minutos, centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo. A extração com fenol/acetato de sódio foi repetida uma vez. Em seguida, foi realizada extração a temperatura ambiente com 500 μ L fenol/clorofórmio através de agitação em vórtex por 3 minutos. Após centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo novo, foram adicionados 50 μ L de 3 M NaOAc pH = 5,3 e a extração com fenol/clorofórmio foi repetida. O RNA foi precipitado da fase aquosa por adição de 1 mL de etanol absoluto gelado e incubação a -20°C por 1 hora. Após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, o RNA precipitado foi lavado por agitação com 500 μ L de etanol 75%, seco a 42°C por 5 minutos e ressuspensionado em 50 μ L de água previamente tratada com DEPC (dietil pirocarbonato).

3.5.2 Separação de RNA total em gel de agarose ou poliacrilamida

Para a separação em gel de agarose, 20 μ g de RNA total foram desnaturados em solução contendo 2 M glicoxal, 25% e 10 mM fosfato de sódio pH = 7,0 a 50°C por 1 hora e em seguida foram incubados no gelo por 5 minutos. Foi adicionado tampão de amostra (tampão 6X concentrado: 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilenocianol; 30% glicerol) e as amostras foram separadas em gel de agarose 1,3%, em tampão fosfato de sódio pH = 7,0, entorno de 1 hora a 150 V, com circulação de tampão entre as câmaras. Os RNAs separados no gel foram transferidos para membranas de *nylon* (*Hybond N+*, *GE Healthcare*) por capilaridade, utilizando tampão 20X SSC (3,0 M NaCl; 0,3 M citrato de sódio). Alternativamente, foi adicionado tampão de amostra com formamida (tampão 6X concentrado: 95% formamida, 20 mM EDTA pH = 8,0; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xileno-cianol), os RNAs foram desnaturados por incubação a 95°C por 5 minutos, seguida de incubação no gelo por 5 minutos. Foi feita a separação em gel de 6% poliacrilamida desnaturante (6 poliacrilamida; 8 M uréia; 1 X TBE: 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH = 8,0) em tampão TBE a 250 V por cerca de 2 horas. Os RNAs separados foram transferidos para membranas de *nylon* a 250 mA por 2 horas em tampão TBE.

3.5.3 Marcação radioativa de DNA

Os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de *northern blot* estão descritos na Tabela 3.8. As reações de marcação continham 10 pmol de oligonucleotídeo, 5 μ L de γ -³²P-ATP, 3U T4 PNK (polinucleotídeo quinase, USB) em tampão de marcação (10 mM MgCl₂; 5 mM DTT, 70 mM Tris-Cl pH = 7,6) e foram incubadas por 20 minutos a 37°C.

3.5.4 Análise por *northern blot*

Para hibridização com oligonucleotídeos marcados, membranas de *nylon* foram pré-hibridizadas por 2 horas, a 37°C em solução de hibridização (5X SSPE; 5X Denhardt; 50; 0,1; 0,05 μ g/mL de DNA desnaturado de esperma de salmão). A solução de hibridização foi feita a partir das soluções de estoque: 20X SSPE (3,0 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,002 M EDTA) e 50X Denhardt (1; 1% polivinil pirrolidona; 1 BSA). Em seguida a solução foi descartada e substituída por 10 mL de solução de hibridização nova, à qual foi adicionado o oligonucleotídeo marcado. Após a membrana ser incubada por 18 horas a 37°C, foram feitas três lavagens sucessivas de 15 minutos, a 25°C, com 30 mL de soluções: 2X SSPE; 2X SSPE com 0,1% e 0,2X SSPE com 0,1. A membrana foi então envolvida em filme plástico e exposta a uma tela sensível à radiação β por 18 horas e a imagem foi analisada em *Phosphorimager* (*Molecular Dynamics*).

3.5.5 Co-imunoprecipitação de RNA

As cepas de mutante condicional $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ expressando a Rrp43-TAP e Rrp6-TAP, descritos tabela 8, e crescidas conforme a seção 3.3.2. Células de cultura de 500 mL foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm e congeladas em formas de gotas diretamente N₂ líquido. Ainda congeladas, as células foram lisadas mecanicamente. Após o descongelamento, células intactas e restos celulares foram retirados por ultracentrifugação a 40.000 rpm por 1h a 4°C. Em seguida, foi feita quantificação de proteína total no extrato pelo método do CuSO₄/BCA e quantidades iguais de extrato foram incubadas por 2 horas a 16°C com 250 μ L de resina IgG-Sepharose

No	Oligo	Sequência	Referência
01	DE-2 (Rev)	5'-CTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGG-3'	Allmang et al., 1999
02	5.8S (For2865)	5'- CTT TCA ACA ACG GAT CTC TTG G -3'	Allmang et al., 1999
03	5.8 (Rev)	5'-CGTATCGCATTTTCGCTGCGTTC-3'	Allmang et al., 1999

Tabela 3.8: Oligonucleotídeos de DNA utilizados para ensaios de *northern blot*.

(*GE Healthcare*), previamente lavada com 12 mL de água e equilibrada em 12 mL de tampão A. A resina foi lavada com 10 volumes de tampão exossomo e o RNA precipitado foi isolado por adição de fenol diretamente à resina, seguindo os mesmos passos utilizados para extração de RNA total de levedura descrito na Seção 3.5.1. Após precipitação, o RNA foi analisado por RT-PCR.

3.5.6 RT-PCR

A preparação da fita de cDNA foi feita pela Superscript II reverse transcriptase (*Invitrogen*). Amplificação por PCR foi feita pela Taq DNA polymerase (*Amersham*). Os pares de primers usados para a análise por PCR foram descritos na tabela 3.8. PCRs foram realizados em 30 ciclos a 94°C.

Resultados

4.1 Superexpressão de Rrp43 suprime a ausência de Nop53

Com o objetivo de caracterizar a função de Nop53, iniciamos uma análise do efeito de depleção de Nop53 sobre o complexo exossomo. Para esse fim, foi usada a cepa mutante condicional $\Delta nop53/Ycp111-GAL::His-NOP53$ (Granato et al., 2005) que contém uma cópia do gene *NOP53* sob controle do promotor regulável *GAL1*, e sua expressão é ativa na presença de galactose, mas é reprimida na presença de glicose. Esta a cepa mutante foi transformada com os plasmídeos pMET-RRP43-TAP e pMET-rrp43-2-TAP, que super-expressa a subunidade Rrp43 (selvagem e mutante) do exossomo sob controle do promotor constitutivo *MET25*, e com o plasmídeo pMET vazio como controle negativo.

Em estudos prévios realizados por Oliveira et al., 2002 obtiveram cepas de levedura mutantes termo-sensíveis do gene *RRP43* denominados como: *rrp43-2* e *rrp43-3*. Esses mutantes apresentam substituições de resíduos de aminoácidos na região central de Rrp43 e afetam a degradação e o processamento de RNA. Adicionalmente, Lourenço et al., 2013 mostrou que esses mutantes diminuem a estabilidade com que Rrp43 interage com as demais subunidades do exossomo, particularmente com Mtr3 levando a desestabilização do complexo e afetando sua função catalítica.

As cepas obtidas $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/pMET-RRP43-TAP$, $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/pMET-rrp43-TAP$ e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/pMET$ foram crescidas em meio líquido seletivo mínimo contendo galactose (YNB-Gal) a 30°C e e depois transferidas para meio contendo glicose (YNB-Gli) por 16 horas. Depois disso, a densidade óptica (OD₆₀₀)

das culturas foi determinada e foi realizada uma diluição seriada seguida por plaqueamento com o propósito de visualizar o crescimento nestas diferentes condições. Outra parte das culturas foi coletada na fase logarítmica (OD_{600} 1,0), lisada e extrato total foi separado por SDS-PAGE e a expressão de duas das subunidades do exossomo foi analisada por *western blot*. Os resultados mostram que a super-expressão de Rrp43 suprime parcialmente o crescimento na ausência de Nop53 (glicose) (Figura 4.1a). Os resultados foram confirmados através da análise de curva de crescimento em meio líquido na presença de glicose (Figura 4.1b). É interessante notar que o mutante *rrp43-2* também suprime parcialmente o crescimento de $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ em glicose (Figura 4.1a).

Por causa do efeito da super-expressão de Rrp43-TAP no crescimento da cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ em glicose, fomos analisar os níveis de expressão das subunidades do exossomo, Rrp43 (plasmídeo) e Rrp6 (endógena) nesta cepa depois da depleção de *NOP53* (glicose). O resultado, surpreendente, mostra que há uma sinal mais intensa nas bandas correspondentes as duas subunidades do exossomo (Rrp6 e Rrp43) em glicose, ou seja, estas proteínas estão presentes em níveis mais altos nas células na ausência de Nop53 (Figura 4.1d). Isto pode indicar que Nop53 afete a estabilidade do exossomo, pois, na sua ausência duas subunidades do exossomo estão presentes em níveis mais altos, embora já tenha sido mostrado que nestas mesmas condições, o exossomo é menos ativo no processamento de rRNA (Granato et al., 2005).

Com este resultado surge a questão de se a super-expressão de outras subunidades do exossomo também podem suprimir o crescimento de $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ em glicose. Para testar isto, a cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ foi transformada separadamente com plasmídeos que expressam as subunidades de exossomo Rrp41, Rrp42, Rrp44, Rrp45, e Rrp6, fusionadas a GFP. Além disso, $\Delta nop53/GAL::NOP53$ foi transformada também com um plasmídeo que codifica a subunidade do complexo TRAMP, Trf4, fusionada ao TAP tag. O crescimento destas cepas em galactose e glicose foi então analisado. Os resultados mostram que as outras subunidades do exossomo ou do TRAMP não levam ao mesmo fenótipo de supressão (Figura 4.1c), indicando que este

seja um efeito específico de Rrp43.

Estes dados são muito interessantes, porque Rrp43 suprime parcialmente a ausência de Nop53, mas Rrp43 não é uma subunidade ativa do exossomo, embora seja importante para a manutenção do complexo de forma estável (Lourenço et al., 2013). Além disso, a super-expressão de Rrp6 na ausência de Nop53 não é suficiente para suprimir o crescimento da cepa condicional. Esta é a primeira evidência de que a super-expressão de uma subunidade do *core* do exossomo possa suprimir parcialmente a falta de um cofator do exossomo, no caso, Nop53.

Figura 4.1: Na ausência da Nop53 a subunidade Rrp6 é mais expressa. (a) cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$, $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/rrp43-2-TAP$ e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/pMET$ foram inoculadas em meio YNB-Gal e YNB-Glu e crescidas em placa por 3 dias a 30°C. (b) As mesmas cepas foram analisadas em curva de crescimento em meio líquido YNB-Gal e YNB-Glu crescidas em 24 horas a 30°C. (c) $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ transformada com subunidades de exossomo Rrp41, Rrp42, Rrp44, Rrp45, inoculadas em meio YNB-Gal e YNB-Glu e crescidas em placa por 3 dias a 30°C. (d) Extrato total foi submetido a SDS-PAGE e *western blot* usando anticorpos anti-Rrp6 e anti-CBP.

4.2 A cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ transformada com *Rrp43* selvagem e mutante apresenta uma aparente diminuição do defeito no processamento do RNA maduro 5.8S.

Como Nop53 participa do processamento do pré-rRNA e está envolvida nas etapas finais de clivagem que levam à síntese dos rRNAs maduros 25S e 5.8S, decidimos analisar o efeito da super-expressão das subunidades de exossomo *Rrp43* selvagem e do mutante termo-sensível *rrp43-2* (Oliveira et al., 2002), *Rrp6* e *Rrp44* nesta via de processamento na cepa $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ através de *northern blot* e hibridização com sondas específicas para os rRNAs 7S (intermediário) e 5.8S (maduro).

Como já mostrado anteriormente (Granato et al., 2008), a ausência de Nop53 causa um acúmulo dos dos pré-RNAs 27S e 7S e uma consequente diminuição do rRNA maduro 5.8S (Figura 4.2a). Perfil semelhante é observado na cepa $\Delta rrp6$, embora haja um acúmulo ainda maior do intermediário 5.8S+30. A super-expressão de *Rrp43* reverte parcialmente este fenótipo, confirmando os dados de análise de crescimento em meio com glicose. Embora o efeito seja pequeno, o mutante *rrp43-2* também suprime parcialmente a ausência de Nop53, o que não acontece quando as subunidades ativas do exossomo (*Rrp44* e *Rrp6*) são super-expressas (Figura 4.2a). A quantificação das bandas obtidas confirma esta conclusão, já que ao se correlacionar os níveis do pré-RNA 7S em relação ao rRNA maduro 5.8S (7S/5.8S; Figura 4.2b), pode-se ver que a super-expressão de *Rrp43* suprime parcialmente o defeito da ausência de Nop53 no processamento do pré-rRNA 7S.

4.3 Nop53 afeta a estabilidade do exossomo

Como mostrado anteriormente, os níveis das proteínas das subunidades do exossomo foram diferentes ao comparar as amostras em presença e ausência de Nop53, sugerindo que este cofator possa afetar a estabilidade do complexo, alterando a interação entre

(a)

(b)

Figura 4.2: **Análise do processamento de pré-RNA através de *northern blot*.** (a) O RNA foi extraído das cepas transformadas e hibridizado contra sondas de pré-RNAs 27S e 7S e RNA maduro 5.8S que estão indicadas à direita. As cepas $\Delta rrp6$ e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$ foram usadas como controle positivo. (b) Quantificação relativa do *northern blot* usando imagem J, normalizando o sinal as bandas de $\Delta nop53/GAL::His-NOP53$.

as suas subunidades. Para confirmar esta hipótese, o exossomo foi purificado por ensaio de co-imunoprecipitação com TAP-tag (*Tandem affinity purification*) a partir das cepas $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$ (selvagem e mutantes *rrp43-2* e *rrp43-3*) e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP6-TAP$, nas quais, as subunidades do exossomo Rrp43 e Rrp6 estão fusionadas ao TAP, respectivamente, na presença e ausência de Nop53.

Para o ensaio de co-imunoprecipitação, extrato total foram submetidos à cromatografia de afinidade com resina de IgG-*sepharose*. O material ligado foi eluído por clivagem com a enzima TEV protease para a obtenção da subunidade de exossomo fusionada ao domínio de CBP do TAP e proteínas interagindo com este complexo (Figura 4.3).

Material das diferentes frações (ET, FT, B, E) foram analisadas por *western blot* usando os anticorpos específicos para Rrp6 (detecta Rrp6 endógena) e CBP (detecta Rrp43-CBP e Rrp6-CBP).

Nas frações eluídas, observa-se que Rrp6 foi co-imunoprecipitada com Rrp43-TAP tanto na presença como na ausência de Nop53, e tanto com Rrp43 selvagem como com os mutantes *rrp43-2* e *rrp43-3* (Figura 4.3). De forma muito interessante, e como mostrado acima, Rrp43 e Rrp6 estão mais concentradas nas amostras crescidas em glicose, o que indica que a ausência de Nop53 leva a um aumento de expressão ou estabilidade das subunidades do exossomo.

Além disso, bandas que correspondem a Rrp43-CBP e Rrp6-CBP foram detectadas nas frações de eluição, tanto das culturas em galactose como de glicose (Figura 4.3; Rrp43-CBP de 53 KDa e Rrp6 de 94 KDa). Estes resultados indicam que a ausência de Nop53 não altera a estabilidade do exossomo, pois Rrp43 e Rrp6 não interagem diretamente no complexo e para sua co-purificação, o exossomo deve estar intacto. A co-purificação do exossomo com uma de suas subunidades nos incentivou a continuar com o procedimento para a identificação de outras proteínas sendo co-purificadas com o exossomo na presença ou ausência de Nop53.

Figura 4.3: **Western Blot anti-Rrp6 de proteínas co-imunoprecipitadas com Rrp43-TAP e com Rrp6-TAP.** Co-imunoprecipitação na cepa $\Delta nop53/Gal::His-NOP53$ com Rrp43-TAP (selvagem e mutantes *rrp43-2* e *rrp43-3*) e Rrp6-TAP em presença (galactose) e ausência (glicose) de Nop53. Western blot com anticorpo anti-CBP e anti-Rrp6 das eluições feitas com protease TEV coletadas nas co-imunoprecipitações (* indica quebras de Rrp6).

Resultados de espectrometria de massas

Depois da co-purificação com Rrp43-TAP e Rrp6-TAP, as proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) na Proteomics Platform de CHU de Québec – Université Laval, Canadá. Foram identificadas um total de 448 proteínas em Rrp43-galactose, 741 proteínas em Rrp43-glicose, 402 proteínas em Rrp6-galactose e 592 proteínas em Rrp6-glicose. Embora tenha sido identificado um grande número de proteínas nas eluições, em galactose, Nop53 não foi identificada nas co-purificações feitas com as duas proteínas alvo do complexo exossomo (Rrp43-TAP e Rrp6-TAP). Isso foi oposto ao esperado, já que a interação direta de Rrp6 com Nop53 foi identificado por *pull down* nosso laboratório (Granato et al., 2008). Este resultado pode significar que sua associação com o exossomo não é suficientemente estável e não resiste a uma purificação

por afinidade nas condições usadas durante o procedimento, ou que tais interações sejam transitórias e, portanto, mais difíceis de serem detectadas.

Os espectros foram obtidos usando o software Mascot. O software Scaffold foi utilizado para validar as identificações de proteínas por MS/MS, empregando como critério de aceitação proteínas com probabilidade maior que 92% de alcançar um FDR (*false discovery rate*) menor que 1,0%, contendo pelo menos 2 peptídeos identificados de *Saccharomyces cerevisiae*.

Depois de identificar as proteínas no software Scaffold, foi adotada uma segunda abordagem, uma análise funcional com a ferramenta de base de dados *DAVID* (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, Resources 6.8*) que permitiu categorizar as proteínas obtidas em termos do *Gene Ontology* (GO) de acordo com o processo biológico (*GOTERM-BP-Direct*). Nesta ferramenta foram avaliados os dados com base em seu valor estatístico de Fisher P (*P-Value*), um alto valor $-\log$ (P) corresponde a uma alta significância estatística. Para uma análise mais específica, as proteínas relacionadas a metabolismo foram excluídas por serem consideradas interações inespecíficas já que são proteínas abundantes e frequentemente identificadas com diferentes iscas.

Como resultado, foram obtidas ao redor de 31 grupos funcionais em cada amostra, das quais seis foram significativamente enriquecidos (Figura 4.4a). Comparando as proteínas obtidas nas diferentes eluições, observou-se que em galactose (presença de Nop53) os processos biológicos exossomo e processamento de rRNA foram significativamente enriquecidos ($P\text{-value} < 0,05$) comparadas as outras categorias, o que significa uma associação específica com esses processos biológicos quando Nop53 está presente. Em contraste, outras categorias funcionais, tais como fatores de tradução, ribonucleoproteínas e proteínas ribossomais foram mais enriquecidas nas amostras em glicose (ausência de Nop53) (Figura 4.4 b). Estes resultados mostram que na ausência de Nop53, o exossomo interage mais estavelmente com as subunidades ribossomais e que interações adicionais, e talvez menos específicas, podem acontecer durante a purificação deste complexo nestas condições.

Na categoria exossomo, comparando o número de peptídeos únicos de cada proteína identificada nas diferentes amostras, como se mostra na figura 4.4a e tabela 4.1, as 9 subunidades do *core* e as duas subunidades catalíticas do exossomo foram eficientemente co-purificadas com os dois alvos estudados (Rrp43-TAP e Rrp6-TAP) e nas duas condições de crescimento (presença e ausência de Nop53). Na purificação do exossomo com Rrp43, todas as subunidades foram identificadas e um número maior de peptídeos foi obtido na ausência de Nop53. Como o que foi observado por *western blot*, estes resultados indicam níveis mais altos de expressão do exossomo, mas não uma alteração na estabilidade do complexo na ausência de Nop53. Apesar dos níveis mais altos das subunidades do exossomo na ausência de Nop53, quando o complexo foi purificado com Rrp6, não foi observado um aumento correspondente no número de peptídeos das outras subunidades. Estes resultados podem indicar que a interação entre Rrp6 e as outras subunidades do exossomo seja menos estável na ausência de Nop53, explicando o defeito no processamento do pré-rRNA 7S.

Mesmo não tendo sido estabelecido um efeito direto de Nop53 na conformação do exossomo, foi observada uma diferença na quantidade de espectros de massas identificados no Scaffold, sendo que maiores quantidades de peptídeos foram obtidas na ausência de Nop53 (glicose), com ambos alvos (Figura 4.4b). Peptídeos mais abundantes irão produzir uma maior quantidade de espectros de MS/MS, e serão proporcionais à quantidade de proteína presente na célula. Este resultado confirma as análises por *western blot*, mostrando um aumento nos níveis de expressão das subunidades de exossomo Rrp43 e Rrp6 quando Nop53 está ausente (Figura, 4.1c e 4.3). Coincidentemente, Feigenbutz et al. (2013a) demonstrou que Rrp47 também desempenha um papel importante na estabilidade proteica e transcrição de Rrp6. É importante ressaltar que as subunidades do exossomo utilizadas aqui como iscas, Rrp43 e Rrp6, co-purificaram o complexo tanto na presença, como na ausência de Nop53, o que indica que o complexo estava intacto nas duas condições.

A diferença observada entre as duas proteínas iscas foi a de que Rrp6 purifica menos eficientemente o *core* do exossomo, confirmando dados anteriores do laboratório (Lourenço

Figura 4.4: **Análise de proteínas identificadas por espectrometria de Massas.** (a) Encontram-se representadas as categorias (processos biológicos, *Gene Ontology* - GO) significativas, oriundas da análise pelo banco de dados *DAVID*, e organizadas em grupos mais amplos. Considerando que a análise foi feita separadamente para proteínas identificadas por scaffold de co-purificações com Rrp43-TAP e com Rrp6-TAP em presença (galactose) e ausência (glicose) de Nop53. A relevância de tais categorias foram determinadas pelo o *P-value* enriquecido encontra-se representado em escala de $-\log_{10}$, variando de 1.3 ($p = 0.05$) a 16 ($p = 1E^{-16}$). (b) Comparação de contagem de espectros identificados por Espectrometria de Massas do exossomo na presença (galactose) e ausência (glicose) de Nop53.

et al., 2013; Gonzales-Zubiate et al., 2017). Como mostrado aqui, Rrp43 co-purifica mais proteínas citoplasmáticas envolvidas em outras etapas de processamento e/ou degradação de RNAs (Tabela 4.1), interações que não são afetadas por Nop53, uma proteína nucleolar. Este resultado confirma a especificidade das interações detectadas aqui. Por outro lado, Rrp6, uma subunidade do exossomo nuclear, co-purificou mais proteínas envolvidas em processamento de rRNA do que Rrp43, confirmando, mais uma vez a validade destes experimentos. Mais importante ainda, foi a detecção de mais peptídeos de Rrp47 e Mpp6, dois cofatores nucleares do exossomo, sendo co-purificadas com Rrp6 na ausência de Nop53 (Tabela 4.1), o que pode indicar que Nop53 compita com essas proteínas pela interação com Rrp6.

Dentre os cofatores do exossomo, Mpp6 foi co-imunoprecipitada com Rrp6-TAP, confirmando sua interação com o exossomo nuclear (Schuch et al., 2014). O número de peptídeos de Mpp6 identificados aumentou na ausência de Nop53, o que poderia indicar uma competição entre estas proteínas pela ligação ao exossomo, o que precisa ainda ser investigado. Ski7 foi co-purificada com Rrp43-TAP, o que também confirma sua interação com o exossomo citoplasmático (Araki et al., 2001; Kowalinski et al., 2016). Rrp47 foi co-purificada com os dois alvos, que também era esperado, já que esta proteína interage diretamente com Rrp6, mas como nos casos citados aqui, sua interação com o exossomo foi mais estável na ausência de Nop53. Um único peptídeo correspondente de Mtr4 foi identificado com Rrp43-TAP na ausência de Nop53. Estes resultados demonstram que as interações entre as subunidades do complexo e interações específicas de exossomo-cofatores são estáveis mesmo nas condições de purificação, mas estas interações parecem ser mais fortes na ausência de Nop53, o que pode indicar que Nop53 possa competir com outros cofatores para sua ligação ao exossomo. Alternativamente, estes dados podem indicar que Nop53 seja um fator de liberação do exossomo. Na sua ausência, o exossomo continua ligado a outros complexos que participam da formação da subunidade ribossomal 60S.

Em relação às proteínas envolvidas nos outros processos, na Tabela 4.1, são mostrados alguns exemplos de proteínas obtidas na análise de GO (*gene ontology*),

observam-se fatores de início e terminação da tradução, proteínas das subunidades maior 60S e menor 40S do ribossomo, ribonucleoproteínas pertencentes ao *core* do snoRNPs de box H/ACA e a snoRNPs de box C/D. O exossomo co-purificou proteínas ribossomais, com as duas iscas, Rrp43 e Rrp6 (Tabela 4.1). Nos dois casos, houve uma maior co-imunoprecipitação de proteínas ribossomais na ausência de Nop53, o que pode significar que Nop53, ao invés de recrutar o exossomo como imaginado inicialmente, atue na liberação deste complexo do pré-60S, o que ainda precisa ser determinado.

CONTAGEM DE ESPECTROS ^c <i>Δnop53/ GAL::His-NOP53</i>						
<i>Gene ontology</i> ^a processo biológico	Identificação ^b	Rrp43-TAP		Rrp6-TAP		Complexo-Função
		Galactose	Glicose	Galactose	Glicose	
Exossomo	Rrp44	31	47	2	3	Subunidade catalítica de exossomo-endoribonuclease exoribonuclease 3'-5'
	Rrp6	12	22	4	12	
	Rrp4	11	14	5	6	Core-CAP do exossomo
	Csl4	11	14	5	7	
	Rrp40	8	10	1	2	
	Rrp45	11	13	4	6	
	Rrp43	8	11	4	4	Core do exossomo
	Rrp46	7	10	3	6	
	Rrp42	6	8	4	2	
	Rrp41	8	11	2	2	
RNA degradação	Mtr3	3	7	2	2	
	Ski7	7	18	0	0	Cofator de exossomo citoplasmático- envolvida no processamento 3'-5' de mRNA
	LSM5	1	1	1	2	
	LSM6	0	3	0	3	Proteína associada ao snRNA U6-degradação de mRNA
	HSP60	4	7	1	9	Chaperona molecular dependente de ATP
	Pab1	4	10	1	4	Complexo de processamento de RNA-liga a RNA poliadenilado
	HSC82	20	19	3	5	Chaperona molecular dependente de ATP

Continuação.....

CONTAGEM DE ESPECTROS ^c						
<i>Δnop53</i> / <i>GAL::His-NOP53</i>						
<i>Gene ontology</i> ^a processo biológico	Identificação ^b	<i>Rrp43-TAP</i>		<i>Rrp6-TAP</i>		Complexo-Função
		Galactose	Glicose	Galactose	Glicose	
Processamento de rRNA	Rrp47	2	5	2	9	Cofator de Exossomo nuclear- envolvido na degradação, controle-processamento de RNA
	Mpp6	0	0	1	6	Cofator de Exossomo nuclear-envolvido processamento de rRNA 5.8S
	Mtr4	0	1	0	0	Complexo TRAMP- Processamento e degradação de RNAs
	Nsr1	2	4	0	2	Proteína nucleolar- necessária para o processamento de rRNA e biogêneses de ribossomo
	Nop58	0	5	0	0	Proteína nucleolar- necessária para o processamento de rRNA 18S e snoRNAs
	Nop56	1	11	0	1	Complexo snoRNP box C/D- necessária para o processamento de rRNA
Ribossomo	S1A	1	6	9	4	Proteína ribossomal da subunidade menor 40S
	S2	1	3	0	0	
	S3	1	3	1	2	
	S4A	1	5	0	1	
	S5	1	3	0	4	
	S6A	0	0	0	4	
	S7A	0	4	0	3	
	S12	0	5	0	6	
	S17A	0	3	0	3	
	S18A	0	3	0	3	
	S19A	2	1	1	3	

Continuação.....

CONTAGEM DE ESPECTROS ^c <i>Δnop53/ GAL::His-NOP53</i>						
<i>Gene ontology</i> ^a processo biológico	Identificação ^b	Rrp43-TAP			Rrp6-TAP	
		Galactose	Glicose	Galactose	Glicose	Complexo-Função
Ribossomo	S19A	2	1	1	3	Proteína ribossomal da subunidade menor 40S
	S21B	0	1	0	4	
	S22A	0	5	0	5	
	S27A	4	6	3	4	
	LA0	0	7	0	5	Proteína ribossomal da subunidade maior 60S
	L2A	1	4	3	5	
	L4A	2	3	4	4	
	L7A	0	4	0	0	
	L8B	1	2	0	4	
	L12A	0	1	0	5	
	L13A	0	0	0	4	
	L28	0	1	0	3	
	L31A	1	1	0	4	
	L35A	0	1	0	4	
	SSZ1	4	12	0	0	
Ribonucleoproteínas	KRI1	0	0	0	4	Proteína Hsp70 interagem com chaperona Zuol
	GAR1	0	2	0	1	Biogêneses de subunidade 40S
	SNU13	0	2	0	3	Complexo snoRNP box H/ACA necessária para modificação e clivagem de rRNA 18S
	Cbf5	0	3	0	0	Parte do snoRNP U3-envolvido no processamento de rRNA
						Complexo snoRNP box H/ACA-subunidade catalítica sintase pseudouridina

Continuação.....

CONTAGEM DE ESPECTROS ^c <i>Δnop53/ GAL::His-NOP53</i> Rrp43-TAP Rrp6-TAP						
<i>Gene ontology</i> ^a processo biológico	Identificação ^b	Galactose	Glicose	Galactose	Glicose	Complexo-Função
Ribonucleoproteínas	Nop3	1	2	0	2	Requerida para splicing mRNA
	Rrp5	0	2	0	0	Envolvida na sínteses de rRNAs 18S e 5.8S
Transporte	IMB4	4	10	0	1	Importina- subunidade beta 4
	IMA1	1	6	0	0	Importina- subunidade alfa
	NSR1	2	4	0	2	Proteína liga a sequência de localização nuclear
	SEC31	0	2	0	4	Proteína de transporte
	SEC24	0	1	0	0	
	NTF2	3	3	1	3	Fator de transporte nuclear
	DBP3	0	3	0	0	Helicase da familia box DEXD/H-Envolvido em clivagem A3 durante o processamento de rRNA
Helicases	SUB2	2	3	0	0	Helicase da familia box DEAD-Envolvido em etapas iniciais e tardias da montagem do spliceossomo durante o processamento de rRNA
	DED1	1	11	0	0	Helicase RNA DEAD- necessária para o início da tradução
	IF4A	11	12	0	1	Helicase dependente de ATP
Tradução	IF5A1	1	4	2	6	Fator de iniciação na tradução
	IF2P	0	10	0	3	
	GICN1	0	4	0	0	
	IF4B	2	3	0	3	
	IF5	0	1	0	1	
	IF1A	0	3	0	3	

Continuação.....

CONTAGEM DE ESPECTROS ^c <i>Δnop53/ GAL::His-NOP53</i>						
<i>Gene ontology</i> ^a processo biológico	Identificação ^b	Rrp43-TAP		Rrp6-TAP		Complexo-Função
		Galactose	Glicose	Galactose	Glicose	
Tradução	EIF3A	0	3	0	5	Fator de iniciação na tradução
	EIF3J	0	1	0	5	
	IF2G	0	5	0	0	
	IF4E	1	3	0	3	
	EF1A	8	13	4	7	Fator de elongação na tradução
	EF3A	17	28	2	6	
	EF2	19	30	1	4	
	EF1B	4	6	2	5	
	EF1G2	6	7	0	0	
	SYQ	0	6	0	0	
Metabolismo	WTM1	3	7	0	3	Glicólise- Fosfoglicerol quinase Enolase Glicólise-Glicose 6 fosfato isomerase Biossínteses de ácidos Graxos-Acetil coA carboxilase Glicólise-Piruvato quinase
	PGK	8	20	11	18	
	ENO2	9	19	5	16	
	G6PI	9	16	1	22	
	ACAC	3	12	0	17	
	KPYK1	21	24	5	14	

Tabela 4.1: Principais grupos de proteínas co-imunoprecipitadas com TAP-Rrp43 e TAP Rrp6 na presença e ausência de Nop53. ^a Proteínas agrupadas no programa DAVID em categorias (processos biológicos, *Gene Ontology* - GO). ^b As proteínas identificadas por espectrometria de massas no programa Scaffold Q+ 3.4.5. ^c Número de espectros correspondentes a cada proteínas (peptídeos únicos). Valores normalizados foram calculados no programa Scaffold Q+ 3.4.5.

4.4 Nop53 não influencia a interação de Rrp6_{FL} com o core do exossomo

Experimentos prévios de *pull down* de proteínas realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstraram que Rrp6 e Nop53 interagem diretamente (Granato et al., 2005) e resultados obtidos neste trabalho, mostraram diferença na co-purificação de subunidades do exossomo com Rrp6 na ausência de Nop53. Por isso, decidimos testar se a interação Nop53-Rrp6 é importante para a ligação de Rrp6 ao exossomo e determinar o domínio de Rrp6 responsável pela sua interação com Nop53 através de ensaios de co-imunoprecipitação de proteínas.

Para tanto, foram realizadas construções de plasmídeos expressando porções truncadas de Rrp6 fusionadas à proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent protein*): *rrp6_N* (resíduos 1-106), *rrp6_{ΔC}* (resíduos 1-398), *rrp6_C* (resíduos 532-619) e Rrp6_{FL} (*full-length*, resíduos 1-619) (Figura 4.5a). Essas construções foram transformadas separadamente na cepa mutante condicional $\Delta nop53/Gal::His-NOP53/RRP43-TAP$ que expressa Rrp43-TAP, usada como isca para a purificação do exossomo. As cepas foram inoculadas em meio contendo glicose ou galactose com o propósito de inibir ou induzir a expressão de Nop53 e o exossomo foi purificado com Rrp43-TAP por cromatografia de afinidade, como descrito acima.

O resultado mostrou que Rrp6 e os mutantes truncados *rrp6_{ΔC}* e *rrp6_C*, foram co-imunoprecipitados com Rrp43-TAP nas duas situações (presença e ausência de Nop53). Já o mutante N-terminal (*rrp6_N*) foi co-imunoprecipitado unicamente em galactose (Figura 4.5b). No caso da deleção *rrp6_C* em galactose, é observado um sinal mais fraco, possivelmente por proteólise, já que os resíduos CTD são mais vulneráveis à degradação (Wasmuth and Lima, 2016).

Além disso, análises estruturais do exossomo podem explicar as interações observadas dos mutantes de deleção de Rrp6 com o exossomo purificado com Rrp43, já que mostram que o domínio EXO contido no mutante *rrp6_{ΔC}* interage fortemente com duas subunidades de exossomo a Rrp4 e Rrp40 (Makino et al., 2015) e o domínio

C-terminal no mutante rrp6_C, associa-se com EXO9 através de contatos como Csl4-Rrp43-Mtr3 (Wasmuth et al., 2014; Wasmuth and Lima, 2016). Além disso, dados estruturais mostram que a porção N-terminal de Rrp6 não interage com o *core*, mas localiza acima do canal central do exossomo, numa posição ideal para interagir com cofatores nucleares como Nop53, Rrp47 (para estabilizar a ligação com o RNA) e Mtr4 (importante para o arranjo da região ITS2 do pré-rRNA).

Estes dados nos permitem inferir que Nop53 não é requerida para a associação de Rrp6 ao exossomo já que a Rrp6 *full-length*, e especificamente o domínio C-terminal foram ligados ao *core* do exossomo tanto na ausência como na presença de Nop53, confirmando os resultados obtidos no *western* de purificação do exossomo com Rrp43-TAP e de espectrometria de massas (Figura 4.3). Supreendentemente, a co-imunoprecipitação de N-terminal da Rrp6 com o *core* do exossomo na presença de Nop53 sugere que Nop53 interaja também com outra subunidade do exossomo, além de Rrp6 (Fig. 4.5b). Todos os clones, Rrp6_{FL}, rrp6_{ΔC}, rrp6_N, rrp6_C, foram eluídos com Rrp43-TAP na presença de Nop53 (Fig. 4.5b), mas na ausência de Nop53, rrp6_N não é co-imunoprecipitada, fortalecendo a hipótese de que Nop53 possa interagir com outra subunidade do exossomo, permitindo a co-purificação da porção N-terminal de Rrp6.

Foram também realizados outros testes de co-imunoprecipitação de proteínas para identificar que domínio de Rrp6 é suficiente para sua interação com Nop53. Para isso, foi usada a cepa mutante condicional $\Delta nop53/pMET-TAP-NOP53$, transformada separadamente com os clones de Rrp6 fusionados a GFP (Rrp6_{FL}, rrp6_{ΔC}, rrp6_N, rrp6_C). Todos os mutantes de Rrp6, Rrp6_{FL}, rrp6_{ΔC}, rrp6_N, rrp6_C, foram eluídos com Nop53-TAP mas o sinal do mutante N-terminal foi mais forte, fortalecendo a hipótese de que Nop53 interaja com a porção N-terminal de Rrp6 (Fig. 4.5d).

Figura 4.5: **Western Blot** anti-*Rrp6* de proteínas co-imunoprecipitadas com *Rrp43-TAP* e com *Rrp6-TAP* (a) Esquema da sequência de *Rrp6* e os domínios estruturais desta proteína. Mutantes de deleção são mostrados abaixo. (b) Co-imunoprecipitação com *Rrp6*-TAP dos mutantes da *Rrp6* em presença e ausência de *Nop53*. *Western blot* com anticorpo anti-CBP e anti-gGFP das frações coletadas na co-imunoprecipitação. (c) Expressão dos mutantes de deleção de *Rrp6*, fusionados a GFP, nas cepas W e *nop53/NOP53-TAP*. (d) Co-imunoprecipitação de *Rrp6* e mutantes de deleção com *Nop53*-TAP. Extrato total (ET), beads de IgG-sepharose (B), flow-through (FT), lavagem (L) e eluição com protease TEV (Elu).

4.5 As subunidades Rrp40 e Rrp45 interagem fisicamente com Nop53

Como visto nos ensaios de co-imunoprecipitação, Nop53 pode interagir com outras subunidades de exossomo, além de Rrp6. Para identificar essas subunidades, foram realizados ensaios de *pull-down* com proteínas expressas em *E. coli*. A proteína de fusão GST-Nop53 foi utilizada como isca testada com três proteínas do *core* fusionadas a cauda His, Rrp40, Rrp4 e Rrp45, já que esses plasmídeos já estavam disponíveis no laboratório (Luz, 2006). A figura 4.6a, mostra a expressão obtida destas proteínas.

Neste experimento, extratos totais (ET₁) das células de bactérias expressando GST-Nop53 ou GST foram passados por uma coluna contendo resina de glutationa-sefaroze. Depois de lavagem da resina, em cada ensaio, o extrato total (ET₂) de células expressando His-Rrp43, His Rrp40, His-Rrp45 foram incubadas com a mesma resina. Depois de lavagens com diferentes concentrações de sal NaCl (100 mM, 250 mM e 500 mM NaCl) para testar a estabilidade das interações. As proteínas foram eluídas como glutationa reduzida, e as diferentes frações (ET, FT, W, E) foram separadas em PAGE-SDS e submetidas a *western blot* usando os anticorpos contra os *tags* de GST e His.

O resultado mostra GST-Nop53 e GST nas frações de eluição, indicando que estas proteínas se ligaram eficientemente na resina. As proteínas His-Rrp40 e His-Rrp45 estavam presentes na eluição, o que evidencia sua interação direta com Nop53 na ausência de qualquer outro fator de levedura (Figura 4.6b). His-Rrp43 também estava presente na fração de eluição, mas em quantidades bem menores, o que indica que esta proteína também possa interagir com Nop53, mas de uma forma menos estável (Figura 4.6b). É importante ressaltar que no exossomo, Rrp45 (uma proteína com domínio inativo de RNase PH e presente no anel central do complexo) interage diretamente com Rrp40 (uma proteína com domínio de ligação a RNA presente na porção do “cap” do complexo) e Rrp6 liga à porção do “cap”. As evidências de interação de Nop53 com Rrp6, Rrp40 e Rrp45 nos dá indicação da região do complexo à qual Nop53 se liga, reforçando a ideia de que Nop53 regule o recrutamento do exossomo para a subunidade pré-60S.

(a)

(b)

Figura 4.6: **As subunidades Rrp40 e Rrp45 interagem fisicamente com a Nop53.** (a) Expressão em *E. coli* das proteínas recombinantes GST-Nop53 e His-Rrp43, His Rrp40, marcadas com *. (b) *Pull-down* das fusões GST-Nop53 e His-Rrp43, His-Rrp40, His-Rrp45 verificado por *western blot* com antisoros contra His e GST. TE: extrato total; FT: material não ligado; W: lavagem.

4.6 Nop53 afeta a interação do exossomo com outros complexos

Outra abordagem utilizada neste estudo foi a análise de ligação do exossomo às subunidades pré-ribossomais por separação isopícnica em gradiente de glicerol. As cepas $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$, $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP6-TAP$, $Mtr3-TAP$, e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/TRF4-TAP$ foram inoculadas em meio contendo galactose ou glicose por 16 horas e depois coletadas para a preparação de extratos totais clarificados (ET) com o mesmo o procedimento descrito anteriormente.

Alíquotas contendo 10 mg de proteína total de cada um dos extratos obtidos foram aplicadas separadamente em 12 mL de gradiente de glicerol 10-30% (*v/v*) previamente linearizado e submetidos à centrifugação a 40.000 rpm, 4°C por 16 horas. As proteínas presentes nas frações obtidas foram precipitadas com TCA 10% e separadas em PAGE-SDS e submetidas a *western blot* para a detecção de proteínas fusionadas ao TAP *tag*. A proteína ribossomal da subunidade 60S, Rpl5, foi utilizada como controle.

Em paralelo, em um tubo adicional, foi aplicada uma mistura de padrões de proteínas de peso molecular conhecido para controle de sedimentação de complexos no gradiente. As frações obtidas deste controle foram analisadas por separação em PAGE-SDS corado com prata (figura 4.7). A separação dos padrões no gradiente mostrou um perfil esperado, BSA (66 kDa) ficou perto do topo no gradiente nas frações 2-8; na parte de densidade intermediária, a β -amilose (200 kDa) foi detectada nas frações 8-14; e apoferritina (443 kDa) ficou nas frações 15-18 (apoferritina é um complexo que é separado em suas frações monoméricas em condições redutoras. Por isso uma banda de 40 kDa é visualizada no gel). Este resultado mostra que a separação no gradiente foi feita corretamente e que o complexo exossomo que se deseja purificar deve encontrar-se entre as frações 9-18.

Na separação das proteínas no gradiente, foram observadas diferenças entre as cepas crescidas em galactose comparada com as crescidas em glicose, sendo que na presença de Nop53, as proteínas do exossomo Rrp6, Rrp43 e Mtr3 estavam mais concentradas

entre as frações 11-17, correspondendo ao complexo do exossomo, de aproximadamente 400 KDa (Figura 4.8a,b), o que indica que o exossomo esteja montado quando Nop53 está presente. Na ausência de Nop53, as subunidades do exossomo são visualizadas em complexos maiores, nas frações 17-23 (Figura 4.8 a). Estes complexos maiores devem corresponder às partículas pré-ribossomais, ou à subunidade ribossomal maior, 60S, já que Rpl5 e Nop53 estão concentradas nestas frações da porção final do gradiente (Figura 4.8 a, c). A subunidade do complexo TRAMP, Trf4, também está presente nas porções finais do gradiente, mas sua interação com o pré-60S não é tão fortemente afetada pela ausência de Nop53 quanto o exossomo (Figura 4.8 a). Estes dados permitem concluir que o exossomo se associa de forma mais estável ao pré-60S na ausência de Nop53, fortalecendo a hipótese de que Nop53 possa ser um fator de liberação do exossomo do pré-60S.

Figura 4.7: **Separação de padrões de peso molecular por gradiente de glicerol.** (a) análise de perfil de padrões moleculares apoferritina, β -amilose e BSA através de gradiente de glicerol. (b). frações obtidas foram precipitadas com TCA 10%, separadas em PAGE-SDS e coradas com prata.

Figura 4.8: **Análise de separação do exossomo por gradiente de glicerol.** O extrato proteico obtido da cepa $\Delta Nop53/GAL::His-NOP53$ expressando proteínas de exossomo fusionadas à TAP (a) Rrp6-TAP Rrp43-TAP e complexo TRAMP com subunidade Trf4. (b). Mtr3-TAP e (c) Nop53-TAP. O clarificado foi fraccionado em gradiente de glicerol (10-30%) Iguais quantidades das fracções foram separadas em PAGE-SDS e analisadas por *western blot* usando os anticorpos anti-CBP e anti-Rpl5.

4.7 O exossomo liga-se ao pré-RNA 7S na ausência de Nop53

Como proposto acima, o exossomo associa-se a partículas pré-ribossomais na ausência de Nop53. Nestas mesmas condições, há um acúmulo do pré-RNA 7S que é acompanhado por uma redução nos níveis de 5.8S rRNA maduro e subsequente redução de subunidades

ribossomais maduras (Granato et al., 2005). Para confirmar a hipótese de ligação mais estável do exossomo ao pré-60S na ausência de Nop53, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação de RNA utilizando as cepas $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP43-TAP$ e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP6-TAP$, crescidas em galactose e glicose. Extratos totais destas cepas foram incubados com IgG-sepharose e depois de lavagem, RNA foi extraído das beads e analisado por RT-qPCR.

A quantificação relativa de pré-RNA 7S foi normalizada com o gene de expressão constitutiva, o RNA maduro 5S. Controles para contaminação com DNA genômico (NTC – no template control) foram também utilizados. Para cada amostra foram realizadas três réplicas técnicas. Depois de normalizado, os níveis do pré-RNA 7S foram calculados em relação ao rRNA maduro 5.8S (7S/5.8S, Figura 4.9).

Os níveis de pré-RNA 7S foram quantificados nas duas cepas nas condições mencionadas (galactose e glicose) e comparados com o rRNA 5.8S maduro (7S/5.8S). Os níveis de pré-RNA 7S co-imunoprecipitado com o exossomo foram particularmente maiores em glicose (ausência de Nop53), confirmando a hipótese de que o exossomo está mais estavelmente associado à partícula pré-60S, que contém o pré-RNA 7S, na ausência de Nop53.

Figura 4.9: **Quantificação relativa por RT-qPCR da co-imunoprecipitação de RNA.** Utilizando as cepas $\Delta nop53/Gal::His-NOP53/RRP43-TAP$ e $\Delta nop53/GAL::His-NOP53/RRP6-TAP$, crescidos em galactose e glicose. Triplicatas técnicas para cada cepa cultivada por 17 horas em glicose e galactose foram empregadas e normalizadas com rRNA 5S.

Discussão

A proteína nucleolar Nop53 foi caracterizada como um fator essencial na biogênese do ribossomo por ser uma proteína central na partícula pré-60S que interage com as *r*-proteínas L35, L22, L7, L8, L13 e fatores os fatores de processamento Nip7, Nop17, Cbf5, Nop2 e Fkb3 e Fkb4 (Granato et al., 2005; Thomson and Tollervey, 2005; Thoms et al., 2015; Wu et al., 2016). Especificamente, Nop53 participa da maturação do rRNA 5.8S ligando-se ao rRNA 25S próximo da região ITS2, interage com Mtr4 e ativa o exossomo durante o processamento do pré-rRNA 7S. A depleção de Nop53 (cepa $\Delta nop53/Gal::His-NOP53$) leva ao acúmulo dos pré-rRNAs 7S, 27S e 35S, fenótipo muito semelhante àquele causado pela ausência do exossomo (Granato et al., 2005; Sydorsky et al., 2005; Granato et al., 2008).

O mecanismo pelo qual o exossomo é recrutado ainda não foi esclarecido, apesar de algumas interações do exossomo com cofatores nucleares, como Mtr4, Rrp47 e Mpp6, que afetam a maturação de rRNA 5.8S, já terem sido descritas. Durante o desenvolvimento desta pesquisa uma das questões fundamentais foi a de esclarecer o mecanismo de como o cofator Nop53 regula a função do exossomo e como esta proteína afeta o reconhecimento e direcionamento do complexo durante o processamento do rRNA maduro 5.8S.

Para isso, a cepa condicional $\Delta nop53/Gal::His-NOP53$ foi transformada com um plasmídeo codificando a proteína de fusão Rrp43-TAP. A análise de crescimento desta cepa em galactose (expressão de Nop53) e glicose (inibição da expressão de Nop53), mostrou um fenótipo de supressão parcial do crescimento pela superexpressão de Rrp43 ou do mutante *rrp43-2*, mas outras subunidades do exossomo não tiveram o mesmo efeito. Rrp6, subunidade cataliticamente ativa do exossomo e com a qual Nop53 interage,

também não teve o mesmo efeito. Este resultado confirma o importante papel de Rrp43 na manutenção da estrutura do exossomo (Lourenço et al., 2013), mas como a superexpressão de Rrp43 suprime parcialmente a falta de Nop53, esta pode também ser uma indicação de que Nop53 tenha um papel na estabilidade deste complexo, ou que afete a interação do exossomo com outros fatores de processamento de rRNA. Além disso, os resultados mostram que a ausência de Nop53 leva a uma maior expressão de Rrp6, explicando porque a superexpressão de Rrp6 não complementou o crescimento de $\Delta nop53/Gal::His-NOP53$ em glicose. A análise de processamento de pré-rRNA nestas cepas confirmou o resultado de crescimento em glicose, mostrando que a superexpressão de Rrp43 ou de *rrp43-2* suprime parcialmente o defeito de processamento do pré-rRNA 7S na ausência de Nop53.

Recentemente, foi mostrado que um importante cofator nuclear de Rrp6, Rrp47, desempenha um papel importante na estabilidade proteica e transcrição de Rrp6 (Feigenbutz et al., 2013b)). Ensaios suplementares mostraram que super-expressão de Rrp6 foi capaz de complementar duplo mutantes de $\Delta rrp47$ e $\Delta rrp6$ suprime o defeito no processamento de snoRNA box C/D, mas não o defeito na maturação de rRNA 5.8S, processo no qual também atua Rrp47. Entretanto, foi apresentado que a super-expressão do domínio *arch* de Mtr4 (do complexo TRAMP), suprime o defeito no crescimento da cepa $\Delta rrp6$ (Klauer and van Hoof, 2013), reforçando o papel de Mtr4 de recrutar o exossomo durante a maturação do 5.8S.

Dado que Nop53 pode afetar a interação do complexo exossomo com outros fatores, era importante identificar o conjunto de proteínas que são diferencialmente co-purificadas com o complexo na cepa mutante $\Delta nop53/Gal::His-NOP53$. Para esse fim, usou-se a cromatografia de afinidade com as subunidades de exossomo Rrp43 e Rrp6 fusionadas ao TAP *tag*. As eluições obtidas foram analisadas por espectrometria de massas e mostraram que Nop53 não foi eficientemente purificada nas condições experimentais empregadas. Em certo ponto, isso não era esperado, já que que esta proteína estava sendo expressa em altos níveis (sob controle do promotor *GAL1*) e interage diretamente com Rrp6 *in vitro* (Granato et al., 2008). As lavagens durante a purificação do exossomo possivelmente

levaram à perda de interações proteína-proteína mais fracas. Estudos explicam que o exossomo interage com cofatores que estão presentes em níveis subestequiométricos *in vivo* e muitos destes podem ser fracamente associados como o complexo tornando difícil a sua detecção (Schneider and Tollervey, 2013; Makino et al., 2015). Seria conveniente para estudos posteriores realizar o mesmo ensaio acoplado com *cross-linking*, que permitirá confirmar a existência *in vivo* da interação deste complexo com a Nop53 nestas preparações.

O efeito de Nop53 foi analisado na purificação do exossomo, mostrando que o exossomo se mantém estável na ausência de Nop53, já que todas as subunidades do complexo foram co-imunoprecipitadas na presença ou ausência de Nop53. Mais peptídeos de Rrp6 foram identificados co-imunoprecipitados com Rrp43 na ausência de Nop53. Como há uma maior expressão de Rrp6 na ausência de Nop53, com este experimento não é possível concluir se Rrp6 se liga mais estavelmente ao *core* do exossomo na ausência de Nop53, ou se o maior número de peptídeos de Rrp6 reflete os níveis mais altos desta proteína na célula. Adicionalmente, como mostrado nos resultados de co-imunoprecipitação de proteínas com Rrp43-TAP e Rrp6-TAP, a interação do exossomo com proteínas ribossomais ou envolvidas em maturação de ribossomo, aumentou na ausência de Nop53 tanto com Rrp43 como com Rrp6, indicando que Nop53 afeta a interação do exossomo com outras proteínas.

A diferença na expressão de Rrp6 com a depleção de Nop53, pode sugerir que a expressão de Rrp6 seja fortemente dependente da sua capacidade de interagir com Nop53 e abre a possibilidade de que estas duas proteínas possam formar um subcomplexo. Era importante, portanto, estudar o efeito desta interação na ligação de Rrp6 ao exossomo e determinar o domínio de Rrp6 responsável pela sua interação com Nop53 através de ensaios de co-imunoprecipitação com Rrp43-TAP e Nop53-TAP, usando mutantes da Rrp6. Os ensaios mostraram que Nop53 não é necessária para a interação de Rrp6 com o *core* do exossomo, descartando assim a hipótese de formação de um subcomplexo Nop53-Rrp6, mas mostraram também que Nop53 pode interagir com subunidades do *core* do

exossomo.

Dados estruturais e funcionais, revelam que o N-terminal da proteína Rrp6 está posicionado acima do *core*, direcionado para interagir com cofatores que controlam sua atividade (Makino et al., 2013; Liu et al., 2014; Schuch et al., 2014; Mitchell, 2014; Wasmuth et al., 2014; Makino et al., 2015; Wasmuth and Lima, 2016). O N-terminal de Rrp47 interage com o N-terminal de Rrp6, formando o complexo Rrp47_N-Rrp6_N. Este complexo está exposto à superfície interagindo como o N-terminal do cofator Mtr4, que por sua vez, interage com N-terminal de Nop53 (Mitchell et al., 2003; Schuch et al., 2014; Hiraishi et al., 2015; Thoms et al., 2015). Como mostrado aqui, Nop53 interage com outras subunidades do exossomo, além da porção N-terminal de Rrp6. Esta hipótese foi confirmada através de ensaios de *pull-down* de proteínas, que mostraram que Nop53 interage diretamente com Rrp40, uma subunidade da porção do “cap” do exossomo, e com Rrp45, uma subunidade do anel de RNase PH do exossomo.

Outra abordagem utilizada neste estudo foi a separação de complexos por centrifugação em gradiente de glicerol com amostras de extratos totais de células expressando Rrp43-TAP ou Rrp6-TAP mostraram que o exossomo está presente em complexos maiores, provavelmente a pré-subunidade ribossomal 60S na ausência de Nop53. Estes resultados indicam que Nop53 afete a interação do exossomo com outros fatores. Uma possibilidade pode ser a de que Nop53 seja importante para a liberação do exossomo do complexo pré-60S depois do processamento do pré-RNA 7S. Na ausência de Nop53, o exossomo continua ligado ao pré-60S, não sendo reciclado para processar outras moléculas de 7S. Esta hipótese foi confirmada através de ensaios de co-imunoprecipitação de RNAs, seguida de RT-qPCR, que mostraram que o exossomo precipita mais 7S na ausência de Nop53.

Recentemente, Wu et al. (2016) demonstraram a estrutura parcial de Nop53 no pré-ribossomo 60S por crio-microscopia eletrônica associada a espectrometria de massas de proteínas depois de *cross-link*. Nop53 está inserida na superfície da partícula pré-ribossomal 60S e apresenta uma estrutura alongada com duas α -hélices (resíduos 231-

266 e 187-192) no N-terminal, que interagem com proteínas ribossomais L35 e L27, e uma curta α -hélice (426-455) no C-terminal interagindo com L25. Estas observações estruturais indicam que Nop53 possa ser uma proteína adaptadora responsável por formar uma plataforma para recrutar fatores de processamento, como o exossomo.

Os dados obtidos neste trabalho, as estruturas do complexo exossomo (Makino et al., 2013, 2015) e as estruturas de Nop53 e Mtr4 (Thoms et al., 2015; Wu et al., 2016) descritas na literatura, nos permitiu propor um modelo, mostrado na figura 5.1. Nop53 posiciona o exossomo na partícula ribossomal 60S, de maneira que, Nop53 interage como as proteínas de exossomo pela região de Rrp45 e Rrp44, logo, Nop53 passa através da parte superior do *core* interagindo com Rrp40. Rrp40 interage como Rrp6. Esses contatos produzem a orientação do exossomo para a região ITS2 de rRNA. Finalmente, o N-terminal de Nop53 liga ao domínio *Kow* de Mtr4 e ao N-terminal de Rrp6, estabilizando a interação do exossomo com o substrato. Este modelo resume os dados de caracterização da função de controle de Nop53 sobre o exossomo, que deve ser analisada em detalhe em estudos posteriores.

Figura 5.1: Modelo de subunidade ribossomal 60S contendo a partícula Nop53 que recruta o exossomo EXO11 Rrp6-Rrp47-Mtr4 através de interações com Rrp45-Rrp40-Rrp6. Acoplado de estruturas determinadas por Makino et al. (2015); Wu et al. (2016).

Conclusões

Nop53 interage com três subunidades do exossomo, duas do *core* do complexo, Rrp40 e Rrp45, e com a subunidade cataliticamente ativa, Rrp6. Dados anteriores do laboratório e da literatura indicam que Nop53 se ligue à partícula pré-60S e recrute o exossomo para o processamento do pré-rRNA 7S para a formação do rRNA maduro 5.8S. Como mostrado aqui, Nop53 também tem um importante papel na liberação do exossomo depois desta etapa de processamento de rRNA. Na ausência de Nop53, o exossomo não é liberado da partícula pré-60S para o processamento de outras moléculas de 7S. Uma importante pergunta a ser respondidas em trabalhos futuros será a de como o processo de recrutamento e posterior liberação do exossomo é regulado.

Referências

- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999). Functions of the exosome in rna, snrna and snrna synthesis. *The EMBO Journal*, 18(19):5399–5410. 24, 34, 61
- Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S.-i., and Katada, T. (2001). Ski7p g protein interacts with the exosome and the ski complex for 3'-to-5' mrna decay in yeast. *The EMBO journal*, 20(17):4684–4693. 31, 73
- Azzouz, N., Panasenko, O. O., Colau, G., and Collart, M. A. (2009). The ccr4-not complex physically and functionally interacts with tramp and the nuclear exosome. *PLoS One*, 4(8):e6760. 32
- Beltrame, M., Henry, Y., and Tollervey, D. (1994). Mutational analysis of an essential binding site for the u3 snrna in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rna. *Nucleic acids research*, 22(20):4057–4065. 21
- Ben-Shem, A., de Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062):1524–1529. 17
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel rna substrates for degradation. *Cell*, 139(3):547–559. 24
- Brown, J. T., Bai, X., and Johnson, A. W. (2000). The yeast antiviral proteins ski2p, ski3p, and ski8p exist as a complex in vivo. *Rna*, 6(3):449–457. 30
- Burkard, K. T. and Butler, J. S. (2000). A nuclear 3'- 5' exonuclease involved in mrna degradation interacts with poly (a) polymerase and the hnRNA protein npl3p. *Molecular and cellular biology*, 20(2):604–616. 24
- Büttner, K., Wenig, K., and Hopfner, K.-P. (2005). Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in rna processing. *Molecular cell*, 20(3):461–471. 23
- Callahan, K. P. and Butler, J. S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease rrp6p. *Nucleic acids research*, 36(21):6645–6655. 28, 34
- Callahan, K. P. and Butler, J. S. (2010). Tramp complex enhances rna degradation by the nuclear exosome component rrp6. *Journal of biological chemistry*, 285(6):3540–3547. 28, 32

- Carroll, K. L., Ghirlando, R., Ames, J. M., and Corden, J. L. (2007). Interaction of yeast rna-binding proteins nrd1 and nab3 with rna polymerase ii terminator elements. *Rna*, 13(3):361–373. 30
- Carroll, K. L., Pradhan, D. A., Granek, J. A., Clarke, N. D., and Corden, J. L. (2004). Identification of cis elements directing termination of yeast nonpolyadenylated snorna transcripts. *Molecular and cellular biology*, 24(14):6241–6252. 30
- Chang, Y.-F., Imam, J. S., and Wilkinson, M. F. (2007). The nonsense-mediated decay rna surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 76:51–74. 31
- Chekanova, J. A., Gregory, B. D., Reverdatto, S. V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., et al. (2007). Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the arabidopsis transcriptome. *Cell*, 131(7):1340–1353. 30
- Conrad, N. K., Wilson, S. M., Steinmetz, E. J., Patturajan, M., Brow, D. A., Swanson, M. S., and Corden, J. L. (2000). A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with rna polymerase ii. *Genetics*, 154(2):557–571. 30
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mrna decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current opinion in cell biology*, 17(3):316–325. 31
- Davis, C. A. and Ares, M. (2006). Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit rrp6p in *saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9):3262–3267. 30
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998). Dob1p (mtr4p) is a putative atp-dependent rna helicase required for the 3' end formation of 5.8 s rna in *saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(4):1128–1140. 33
- DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40:82–92. 18
- Estevez, A. M., Kempf, T., and Clayton, C. (2001). The exosome of *trypanosoma brucei*. *The EMBO journal*, 20(14):3831–3839. 23
- Fasken, M. B., Leung, S. W., Banerjee, A., Kodani, M. O., Chavez, R., Bowman, E. A., Purohit, M. K., Robinson, M. E., Robinson, E. H., and Corbett, A. H. (2011). Air1 zinc knuckles 4 and 5 and a conserved iwrx motif are critical for the function and integrity of the trf4/5-air1/2-mtr4 polyadenylation (tramp) rna quality control complex. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43):37429–37445. 33
- Feigenbutz, M., Garland, W., Turner, M., and Mitchell, P. (2013a). The exosome cofactor rrp47 is critical for the stability and normal expression of its associated exoribonuclease rrp6 in *saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 8(11):e80752. 33, 71

- Feigenbutz, M., Jones, R., Besong, T. M., Harding, S. E., and Mitchell, P. (2013b). Assembly of the yeast exoribonuclease rrp6 with its associated cofactor rrp47 occurs in the nucleus and is critical for the controlled expression of rrp47. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22):15959–15970. 92
- Frank, J. (2000). The ribosome—a macromolecular machine par excellence. *Chemistry & biology*, 7(6):R133–R141. 17
- Frischmeyer, P. A., van Hoof, A., O’donnell, K., Guerrierio, A. L., Parker, R., and Dietz, H. C. (2002). An mrna surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*, 295(5563):2258–2261. 32
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313:17–42. 21, 22
- García-Gómez, J. J., Babiano, R., Lebaron, S., Froment, C., Monsarrat, B., Henry, Y., and De La Cruz, J. (2011). Nop6, a component of 90s pre-ribosomal particles, is required for 40s ribosomal subunit biogenesis in *saccharomyces cerevisiae*. *RNA biology*, 8(1):112–124. 17
- Goldfeder, M. B. (2008). *Caracterização funcional da proteína Cwc24p de Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis, Universidade de São Paulo. 43
- Gonzales, F. A., Zanchin, N. I., Luz, J. S., and Oliveira, C. C. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* nop17p, a novel nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. *Journal of molecular biology*, 346(2):437–455. 35
- Gonzales-Zubiate, F. A., Okuda, E. K., Da Cunha, J. P., and Oliveira, C. C. (2017). Identification of karyopherins involved in the nuclear import of rna exosome subunit rrp6 in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, pages jbc–M116. 73
- Granato, D. C., Gonzales, F. A., Luz, J. S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G. M., and Oliveira, C. C. (2005). Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with nop17p and nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 272(17):4450–4463. 34, 35, 47, 48, 63, 64, 80, 88, 91
- Granato, D. C., Machado-Santelli, G. M., and Oliveira, C. C. (2008). Nop53p interacts with 5.8 s rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS journal*, 275(16):4164–4178. 28, 35, 37, 66, 69, 91, 92
- Greber, B. J. (2016). Mechanistic insight into eukaryotic 60s ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *RNA*, 22(11):1643–1662. 17, 19
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4):557–580. 39
- Hiraishi, N., Ishida, Y.-i., and Nagahama, M. (2015). Aaa-atpase nvl2 acts on mtr4-exosome complex to dissociate the nucleolar protein wdr74. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(3):534–540. 94

- Holub, P., Lalakova, J., Cerna, H., Pasulka, J., Sarazova, M., Hrazdilova, K., Arce, M. S., Hobor, F., Stefl, R., and Vanacova, S. (2012). Air2p is critical for the assembly and rna-binding of the tramp complex and the kow domain of mtr4p is crucial for exosome activation. *Nucleic acids research*, 40(12):5679–5693. 32, 33
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). Rna-quality control by the exosome. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(7):529–539. 28
- Huber, L. A. (2003). Is proteomics heading in the wrong direction? *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(1):74–80. 54
- Hughes, J. and Ares Jr, 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. *The EMBO journal*, 10(13):4231. 21
- Jia, H., Wang, X., Anderson, J. T., and Jankowsky, E. (2012). Rna unwinding by the trf4/air2/mtr4 polyadenylation (tramp) complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19):7292–7297. 32
- Jia, H., Wang, X., Liu, F., Guenther, U.-P., Srinivasan, S., Anderson, J. T., and Jankowsky, E. (2011). The rna helicase mtr4p modulates polyadenylation in the tramp complex. *Cell*, 145(6):890–901. 32
- Kiss, D. L. and Andrulis, E. D. (2011). The exozyme model: a continuum of functionally distinct complexes. *Rna*, 17(1):1–13. 28
- Klauer, A. A. and van Hoof, A. (2013). Genetic interactions suggest multiple distinct roles of the arch and core helicase domains of mtr4 in rrp6 and exosome function. *Nucleic acids research*, 41(1):533–541. 92
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., and Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in biochemical sciences*, 37(5):189–198. 17
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I., and Aravind, L. (2001). Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome research*, 11(2):240–252. 23
- Kowalinski, E., Kögel, A., Ebert, J., Reichelt, P., Stegmann, E., Habermann, B., and Conti, E. (2016). Structure of a cytoplasmic 11-subunit rna exosome complex. *Molecular Cell*, 63(1):125–134. 73
- Kressler, D., Linder, P., and de la Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12):7897–7912. 17, 19
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). Rna degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, 121(5):713–724. 28, 30, 32, 37

- Liang, S., Hitomi, M., Hu, Y.-H., Liu, Y., and Tartakoff, A. M. (1996). A dead-box-family protein is required for nucleocytoplasmic transport of yeast mrna. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9):5139–5146. 33
- Lin, C., Perrault, S. D., Kwak, M., Graf, F., and Shih, W. M. (2012). Purification of dna-origami nanostructures by rate-zonal centrifugation. *Nucleic acids research*, page gks1070. 56
- Liu, J.-J., Bratkowski, M. A., Liu, X., Niu, C.-Y., Ke, A., and Wang, H.-W. (2014). Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by em. *Nature structural & molecular biology*, 21(1):95–102. 94
- Liu, Q., Greimann, J. C., and Lima, C. D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic rna exosome. *Cell*, 127(6):1223–1237. 23, 26
- Lorentzen, E., Walter, P., Fribourg, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Klug, G., and Conti, E. (2005). The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nature structural & molecular biology*, 12(7):575–581. 23
- Lourenço, R. F., Leme, A. F., and Oliveira, C. C. (2013). Proteomic analysis of yeast mutant rna exosome complexes. *Journal of proteome research*, 12(12):5912–5922. 52, 63, 65, 71, 92
- Luz, J. S. d. (2006). *Análise estrutural e funcional de cofatores do exossomo em Saccharomyces cerevisiae e Pyrococcus*. PhD thesis, Universidade de São Paulo. 45, 47, 83
- Lykke-Andersen, S., Brodersen, D. E., and Jensen, T. H. (2009). Origins and activities of the eukaryotic exosome. *Journal of cell science*, 122(10):1487–1494. 28
- Makino, D. L., Baumgärtner, M., and Conti, E. (2013). Crystal structure of an rna-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature*, 495(7439):70–75. 23, 24, 25, 26, 27, 94, 95
- Makino, D. L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015). Rna degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature*, 524(7563):54–58. 25, 26, 27, 80, 93, 94, 95
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6):560–567. 17
- Midtgaard, S. F., Assenbolt, J., Jonstrup, A. T., Van, L. B., Jensen, T. H., and Brodersen, D. E. (2006). Structure of the nuclear exosome component rrp6p reveals an interplay between the active site and the hrhc domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32):11898–11903. 26
- Milligan, L., Decourty, L., Saveanu, C., Rappsilber, J., Ceulemans, H., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2008). A yeast exosome cofactor, mpp6, functions in rna surveillance and in the degradation of noncoding rna transcripts. *Molecular and cellular biology*, 28(17):5446–5457. 33

- Milligan, L., Torchet, C., Allmang, C., Shipman, T., and Tollervey, D. (2005). A nuclear surveillance pathway for mrnas with defective polyadenylation. *Molecular and cellular biology*, 25(22):9996–10004. 34
- Mitchell, P. (2014). Exosome substrate targeting: the long and short of it. *Biochemical Society Transactions*, 42(4):1129–1134. 94
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable rnas. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19):6982–6992. 28, 94
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic rna processing complex containing multiple 3'–5' exoribonucleases. *Cell*, 91(4):457–466. 24, 26
- Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal rna. *Current opinion in genetics & development*, 14(2):210–217. 18
- Navarro, M. V., Oliveira, C. C., Zanchin, N. I., and Guimarães, B. G. (2008). Insights into the mechanism of progressive rna degradation by the archaeal exosome. *Journal of Biological Chemistry*, 283(20):14120–14131. 23
- Oliveira, C. C., Gonzales, F. A., and Zanchin, N. I. (2002). Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit rrp43p show a deficiency in mrna degradation and no longer interact with the exosome. *Nucleic acids research*, 30(19):4186–4198. 44, 46, 63, 66
- Oliveira, C. C. and McCarthy, J. E. (1995). The relationship between eukaryotic translation and mrna stability a short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mrna degradation in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(15):8936–8943. 58
- Phillips, S. and Butler, J. S. (2003). Contribution of domain structure to the rna 3' end processing and degradation functions of the nuclear exosome subunit rrp6p. *Rna*, 9(9):1098–1107. 26
- Prosdocimi, F., Coutinho, G., Ninnecw, E., Silva, A. F., dos Reis, A. N., Martins, A. C., dos Santos, A. C. F., Júnior, A. N., and Camargo Filho, F. (2002). Bioinformática: manual do usuário. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 29:12–25. 55
- Ramesh, M. and Woolford, J. L. (2016). Eukaryote-specific rna expansion segments function in ribosome biogenesis. *RNA*, 22(8):1153–1162. 20
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., et al. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Number Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press. 42, 51
- Schmid, M. and Jensen, T. H. (2008). The exosome: a multipurpose rna-decay machine. *Trends in biochemical sciences*, 33(10):501–510. 28, 30
- Schneider, C. and Tollervey, D. (2013). Threading the barrel of the rna exosome. *Trends in biochemical sciences*, 38(10):485–493. 93

- Schuch, B., Feigenbutz, M., Makino, D. L., Falk, S., Basquin, C., Mitchell, P., and Conti, E. (2014). The exosome-binding factors rrp6 and rrp47 form a composite surface for recruiting the mtr4 helicase. *The EMBO journal*, 33(23):2829–2846. 33, 73, 94
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76–85. 50
- Steinmetz, E. J., Conrad, N. K., Brow, D. A., and Corden, J. L. (2001). Rna-binding protein nrd1 directs poly (a)-independent 3'-end formation of rna polymerase ii transcripts. *Nature*, 413(6853):327–331. 30
- Strunk, B. S. and Karbstein, K. (2009). Powering through ribosome assembly. *Rna*, 15(12):2083–2104. 21
- Sydorsky, Y., Dilworth, D., Halloran, B., Yi, E., Makhnevych, T., Wozniak, R., and Aitchison, J. (2005). Nop53p is a novel nucleolar 60s ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochem. J*, 388:819–826. 34, 35, 91
- Takahashi, N., Yanagida, M., Fujiyama, S., Hayano, T., and Isobe, T. (2003). Proteomic snapshot analyses of preribosomal ribonucleoprotein complexes formed at various stages of ribosome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Mass spectrometry reviews*, 22(5):287–317. 28
- Thoms, M., Thomson, E., Baßler, J., Gnädig, M., Griesel, S., and Hurt, E. (2015). The exosome is recruited to rna substrates through specific adaptor proteins. *Cell*, 162(5):1029–1038. 91, 94, 95
- Thomson, E. and Tollervy, D. (2005). Nop53p is required for late 60s ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *Rna*, 11(8):1215–1224. 34, 91
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9):4350–4354. 51
- Tschochner, H. and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology*, 13(5):255–263. 17, 19
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., and Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mrnas lacking a termination codon. *Science*, 295(5563):2262–2264. 28, 31
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000a). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of u4 small nuclear rna and small nucleolar rnas. *Molecular and cellular biology*, 20(2):441–452. 34
- van Hoof, A., Staples, R. R., Baker, R. E., and Parker, R. (2000b). Function of the ski4p (csl4p) and ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mrna. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21):8230–8243. 32

- Vanacova, S. and Stefl, R. (2007). The exosome and rna quality control in the nucleus. *EMBO reports*, 8(7):651–657. 28
- Venema, J. and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics*, 33(1):261–311. 17, 19, 21
- Wang, L., Lewis, M. S., and Johnson, A. W. (2005). Domain interactions within the ski2/3/8 complex and between the ski complex and ski7p. *Rna*, 11(8):1291–1302. 31
- Wang, X., Jia, H., Jankowsky, E., and Anderson, J. T. (2008). Degradation of hypomodified trna^{met} in vivo involves rna-dependent atpase activity of the dexh helicase mtr4p. *Rna*, 14(1):107–116. 33, 34
- Wasmuth, E. V., Januszyk, K., and Lima, C. D. (2014). Structure of an rrp6-rna exosome complex bound to poly (a) rna. *Nature*, 511(7510):435–439. 81, 94
- Wasmuth, E. V. and Lima, C. D. (2012). Exo-and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear rna exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. *Molecular cell*, 48(1):133–144. 26
- Wasmuth, E. V. and Lima, C. D. (2016). The rrp6 c-terminal domain binds rna and activates the nuclear rna exosome. *Nucleic Acids Research*, page gkw1152. 26, 80, 81, 94
- Weir, J. R., Bonneau, F., Hentschel, J., and Conti, E. (2010). Structural analysis reveals the characteristic features of mtr4, a dexh helicase involved in nuclear rna processing and surveillance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27):12139–12144. 33
- Woolford, J. L. and Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3):643–681. 17, 18, 20
- Wu, S., Tutuncuoglu, B., Yan, K., Brown, H., Zhang, Y., Tan, D., Gamalinda, M., Yuan, Y., Li, Z., Jakovljevic, J., et al. (2016). Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60s ribosomes. *Nature*, 534(7605):133–137. 91, 94, 95
- Zanchin, N. I. and Goldfarb, D. S. (1999). Nip7p interacts with nop8p, an essential nucleolar protein required for 60s ribosome biogenesis, and the exosome subunit rrp43p. *Molecular and cellular biology*, 19(2):1518–1525. 35
- Zuo, Y. and Deutscher, M. P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic acids research*, 29(5):1017–1026. 26