UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

IORELLA GUADALUPE ORELLANA PERALTA

Caracterização da interação entre a subunidade do R2TP,
Nop17, e da proteína de transferência de *clusters* de
Fe/S, Dre2, em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação de Mestrado

Versão corrigida da Dissertação

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
07/11/2017

FIGURELLA GUADALUPE ORELLANA PERALTA

**Caracterização da interação entre a subunidade do R2TP,
Nop17, e da proteína de transferência de *clusters* de
Fe/S, Dre2, 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: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo

2017

Aos meus pais, Aida de Guadalupe Peralta Lara e Luis Gino Orellana Ferreyra,
pelo apoio constante e dedicação na realização de minha formação pessoal e
profissional, e pelo amor infinito que me fortalece todos os dias.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abrir caminhos e me fortalecer todos os dias.

À Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, por me oferecer a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela sua orientação, apoio e pela confiança depositada em mim durante todo este tempo. Eu sou extremamente agradecida à senhora pela experiência dada e por ser parte importante em minha formação profissional.

Aos meus pais pela motivação, dedicação e apoio em cada uma das minhas decisões, por sempre me demonstrarem seu amor de diferentes formas. Amo muito vocês. À minha mãe e melhor amiga, por cada conselho e por toda força durante todo o trajeto de preparação. Ao meu pai, por ser esse amigo com quem eu posso contar e por sempre se preocupar com cada coisa que preciso. A meu avô Adolfo, que com seus 91 anos ainda continua me ensinando o que significa ter amor pela profissão. Você é uma motivação constante para mim. Amo muito você.

À minha família, a cada um de meus avós que já partiram (papai Hernán, mamãe Aida e mamãe Yani), obrigada por serem parte fundamental de minha vida. Agradeço aos meus tios, primos e sobrinhos, cada um de vocês são partes importantes dos meus objetivos alcançados. Eu amo muito cada um de vocês.

A todos os meus colegas do laboratório, obrigada pela convivência, discussões e sugestões que me permitiram crescer nestes dois anos.

Ao Fernandito pela orientação e ensino no início do meu mestrado, pela ajuda e apoio em todo este tempo. Você foi muito importante em meu desenvolvimento profissional, muito obrigada pelos lindos momentos compartilhados e por sua amizade. Tenho muita saudade de você Fernandito! À minha Pao Pao por sua ajuda no laboratório, por sua grande amizade e por compartilhar lindos momentos juntas, lembre-se que não importa onde eu estiver, sempre estarei ao seu lado. Eu adoro você! À minha irmãzinha, Ellencita, eu poderia agradecer tanto e não terminar nunca, haha! Muito obrigada por todos os momentos compartilhados no laboratório, por sua ajuda, preocupação e apoio em todo tempo. Obrigada por sua amizade e pelos momentos que disfrutamos juntas, que foram muitos. Eu espero que nossa amizade dure para sempre onde quer que estivermos. Eu adoro você! E obrigada a sua mãe Elisa, e a sua família por fazer me sentir em casa. Minha casa é sua também! À Grisi, muito obrigada pela ajuda e pelo apoio durante este tempo dentro do laboratório, assim como fora dele. Muito obrigada pelos momentos compartilhados. Eu agradeço à Alessandra, Felipe, Thierry e Flavia pela ajuda, brincadeiras e pelos lindos momentos vividos no laboratório.

Ao meu amigo Douglas, muito obrigada por sempre me ajudar e compartilhar tantos lindos momentos de estudo, experimentos, discussões, piadas e conversas. Eu adoro você.

À minha família brasileira (Rau, Leydi, Leandro, Ro, Ed, Luis e Zaqueo), obrigada por me fazer sentir em casa, por cada momento disfrutado e por toda a ajuda. Amo vocês. Ao meu irmão Leandro, muito obrigada por sempre cuidar de mim e pela ajuda neste tempo. Eu vou sentir muita saudade de você! À minha irmã mais nova Raula, que eu não sei como agradecer por tudo, muito obrigada por cuidar de mim. Você sempre terá um espaço em meu coração. Jamais esquecerei de você, forte, perseverante e decidida, muito obrigada por sua amizade e por todos os momentos compartilhados. Adoro muito você. À minha irmã Leydi, muito obrigada por todos os momentos vividos, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas conversas, brincadeiras e loucuras. Eu adoro você. Amizade para sempre!

Ao meu professor Ramsés Salas, pelo apoio desde o início da minha carreira profissional, por confiar na minha capacidade e me oferecer a oportunidade de melhorar e crescer profissionalmente. Sem você nada disso poderia acontecer. Obrigada infinitamente!

Ao professor Frederico Gueiros por ceder o microscópio de fluorescência para meus experimentos.

Agradeço à FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro durante o período do mestrado.

“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda arte e de toda ciência verdadeira”

Albert Einstein

RESUMO

(Orellana Peralta, F.G) **Caracterização da interação entre a subunidade do R2TP, Nop17, e da proteína de transferência de *clusters* de Fe/S, Dre2, em *Saccharomyces cerevisiae*.** 2017. 89 pág. Dissertação Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O complexo R2TP está presente em eucariotos, de leveduras a humanos, e está envolvido no correto dobramento de outras proteínas e montagem de complexos multiproteicos. R2TP é formado pelas proteínas Rvb1, Rvb2, Tah1 e Pih1/Nop17 em levedura, e direciona as chaperonas à proteínas alvo durante a montagem dos complexos.

Os *clusters* Fe/S são sintetizados nas mitocôndrias e posteriormente transferidos para o citoplasma. Dre2 é uma proteína que contém *cluster* Fe/S, e está envolvida na transferência desses *clusters* para outras proteínas citoplasmáticas.

Nosso laboratório identificou a interação entre a subunidade Nop17 do complexo R2TP e Dre2 pelo método de duplo-híbrido, mas o papel desta interação ainda não foi elucidado. O objetivo deste trabalho foi o de estudar o papel funcional da interação entre Dre2 e Nop17 e identificar seus domínios de interação. Nossos resultados mostram que a porção N-terminal de Nop17 interage com a porção C-terminal de Dre2 e esta interação é necessária para a manutenção dos níveis de Dre2 na célula, indicando que o complexo R2TP atue na montagem do complexo CIA, de proteínas citosólicas Fe/S, do qual Dre2 faz parte. Dre2 também afeta a estabilidade de Nop17, sugerindo que Dre2 possa transferir um *cluster* Fe/S para Nop17. Os dados mostrados aqui, portanto, indicam que a interação Nop17-Dre2 seja mutuamente importante para a estabilidade das duas proteínas.

Palavras chaves: Nop17, Dre2, R2TP, *clusters* Fe/S.

ABSTRACT

(Orellana Peralta, F.G) **Characterization of the interaction between the R2TP subunit, Nop17, and the Fe/S cluster transfer protein Dre2 in *Saccharomyces cerevisiae*.** 2017. 89 pages. Master Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The R2TP protein complex is present in eukaryotes from yeast to humans, and is involved in the correct assembly of other protein or ribonucleoprotein complexes. R2TP is formed by proteins Rvb1, Rvb2, Tah1 and Pih1/Nop17 in yeast, and directs chaperones to target proteins during complexes assembly.

Fe/S clusters are synthesized in mitochondria and later transferred to the cytoplasm. Dre2 is a Fe/S cluster protein, involved in transferring of Fe/S clusters to cytoplasmic proteins.

Our laboratory has identified the interaction between the R2TP subunit Nop17 and Dre2 in the two-hybrid system. The aim of this work was to study the functional role of the interaction between Dre2 and Nop17, and to identify their domains of interaction. The results show that the N-terminal portion of Nop17 interacts with the C-terminal region of Dre2, and that this interaction is necessary for maintaining the levels of Dre2 in the cell, which suggests that the R2TP complex affects the cytosolic iron-sulfur protein assembly complex (CIA), of which Dre2 is a subunit. Dre2 also affects Nop17 stability, suggesting that Dre2 may transfer a Fe/S cluster to Nop17. The data here indicate that the interaction Nop17-Dre2 is mutually important for these proteins stabilities.

Keywords: Dre2, Nop17, R2TP, Fe/S clusters.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácido
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dNTPs	desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ETS	Sequência espaçadora externa (<i>External transcribed spacer</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent protein</i>)
GST	Glutathione S-transferase
GR	Glutathione reduzida
His	Seis resíduos de Histidina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
ITS	Sequência espaçadora interna (<i>Internal transcribed spacer</i>)
Kb	Quilobase
KDa	Quilodáton
LB	meio Luria-Bertani
LiOAc	Acetato de lítio
M	Molar
mA	Miliampère (s)
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ncRNAs	RNA não codificante
N-terminal	Amino-terminal
Nt	Nucleotídeo
OD	Densidade óptica
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	polietilenoglicol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Pre-rRNA	Precursor do RNA ribossomal
rDNA	DNA que codifica o RNA ribossomal
rpm	Revoluções por minuto
rRNA	RNA ribossomal
S	Svedberg, medida de coeficiente de sedimentação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
snoRNAs	pequenos RNAs nucleolares (<i>small nucleolar RNAs</i>)
snoRNPs	pequenas Ribonucleoproteínas nucleolares (<i>small nucleolar RNPs</i>)
TAE	Tampão contendo Tris, Acetato e EDTA

TBS	Solução salina contendo Tris-buffer
TBST	Solução salina contendo Tris-buffer e Tween 20
TEMED	N, N, N',N' – tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
tRNA	RNA de transferência
YNB	Yeast nitrogen base (meio mínimo para levedura)
YNB-Gli	Yeast nitrogen base contendo Glicose
YNB-Gal	Yeast nitrogen base contendo Galactose
YPD	Yeast extract peptone dextrose (meio rico para levedura)
YPGAL	Yeast extract peptone galactose (meio rico para levedura)
2YT	Yeast extract and tryptone

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	32
Tabela 2. Lista de Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	32
Tabela 3. Lista de Primers utilizados.	33
Tabela 4. Lista de Plasmídeos utilizados.	34
Tabela 5. Meios de cultura de bactérias utilizados.	35
Tabela 6. Meios de cultura de levedura utilizados.	36
Tabela 7. Condições de Expressão em Células competentes BL21.	39
Tabela 8. Descrição de Cepas Transformantes.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das subunidades do ribossomo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	17
Figura 2. Processamento do rRNA em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	18
Figura 3. snoRNPs de box C/D e box H/ACA em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	21
Figura 4. A Montagem de snoRNP de box C/D em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	22
Figura 5. Representação esquemática do complexo R2TP-Hsp90.	23
Figura 6. Diagrama das regiões e motivos de Nop17 que estão envolvidos na formação do complexo R2TP.	25
Figura 7. Diagrama das regiões e motivos da proteína cluster Fe/S Dre2.	27
Figura 8. Estrutura dos clusters Fe/S em Eucariotos.	28
Figura 9. Um modelo para a montagem de proteínas Fe/S citosólicas e nucleares.	29
Figura 10. Esquema do ensaio de interação proteína-proteína por Pull-down.	47
Figura 11. Princípio da técnica de Thermal shift para interação proteína-proteína.	48
Figura 12. Interação das proteínas Nop17 e Dre2 por Pull-down.	51
Figura 13. Interação da proteína Nop17 com a proteína Dre2 expressada em levedura por Pull-down.	53
Figura 14. Purificação das proteínas GST, GST-Nop17 _N e His-Dre2 _N .	55
Figura 15. Ensaio de Thermal Shift das proteínas purificadas GST, GST-Nop17 _N e His-Dre2 _N .	57
Figura 16. Análise do efeito de Nop17 nos níveis de expressão de Dre2.	59
Figura 17. Quantificação das bandas obtidas por Western blotting de Dre2 nas cepas W303 e Δ nop17 em diferentes temperaturas.	60
Figura 18. Análise de estabilidade de Dre2 em ausência de Nop17.	61
Figura 19. Análise do efeito de Δ tab1 e Δ rsa1 nos níveis de expressão de Dre2.	62
Figura 20. Quantificação das bandas de Dre2 nas cepas W303, Δ tab1 e Δ rsa1.	62
Figura 21. Análise do efeito de Dre2 nos níveis de expressão de Nop17.	63
Figura 22. Quantificação das bandas de Nop17 nas cepas W303 e Δ dre2 em galactose e glicose.	64

Figura 23. Análise do efeito de Dre2 na estabilidade de Nop17.	65
Figura 24. Localização subcelular de GFP-Nop17 _{FL} .	67
Figura 25. Localização subcelular de GFP-Nop17 _C .	68
Figura 26. Localização subcelular de GFP-Nop17 _N .	69
Figura 27. Localização subcelular de GFP-Dre2 _{FL} .	70
Figura 28. Localização subcelular de GFP-Dre2 _C .	71
Figura 29. Localização subcelular de GFP-Dre2 _N .	72
Figura 30. Localização subcelular de GFP-Dre2 em ausência de Tah1 e Rsa1.	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. snoRNPs de box C/D e box H/ACA	19
1.2. Montagem de snoRNPs de box C/D	21
1.3. Complexo R2TP-Hsp90	23
1.3.1. Nop17	24
1.4. Dre2	26
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.1. Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Cepas	32
3.2. Oligonucleotídeos	33
3.3. Plasmídeos	34
3.4. Meio de cultura	35
3.5. Clonagem de DNA	36
3.5.1. PCR	36
3.5.2. Construção de Plasmídeos	37
3.5.3. Sequenciamento de DNA	38
3.6. Manipulação de bactéria	38
3.6.1. Transformação	38
3.6.1.1. Método de PEG	38
3.6.1.2. Método de Cloreto de cálcio	39
3.6.2. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	40
3.7. Manipulação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3.7.1. Transformação	40
3.7.2. Ensaio de determinação de estabilidade de proteínas	42
3.7.3. Localização de proteínas por microscopia de fluorescência	42

3.7.4. Preparação de extrato celular	43
3.7.4.1. Lise mecânica (Ball mil)	43
3.7.4.2. Hidróxido de Sódio	43
3.8. Análise de proteínas	43
3.8.1. Lise celular	43
3.8.2. Purificação de proteínas recombinantes	44
3.8.3. Quantificação de proteínas	45
3.8.4. Separação de proteínas por SDS-PAGE	45
3.8.5. Detecção de proteínas por Western Blotting	46
3.9. Estudo <i>in vitro</i> de interação proteína-proteína por <i>pull-down</i>	46
4.0. Estudo <i>in vitro</i> de interação proteína-proteína por <i>thermal shift</i>	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Determinação dos domínios de interação de Dre2 com Nop17	49
4.2. Análise de interação de Dre2 com Nop17 por <i>thermal shift</i>	54
4.3. Análise do efeito de Nop17 nos níveis de expressão e estabilidade de Dre2	58
4.4. Efeito de Tah1 e Rsa1 nos níveis de Dre2	61
4.5. Análise do efeito de Dre2 nos níveis de expressão e estabilidade de Nop17	63
4.6. Localização subcelular de Nop17	66
4.7. Localização subcelular de Dre2	69
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
LISTA DE ANEXOS	84
-Curriculum vitae	

1. INTRODUÇÃO

Os ribossomos são grandes partículas de ribonucleoproteínas responsáveis pela tradução, catalisando a síntese de todas as proteínas em todos os organismos. Em eucariotos, os ribossomos

são formados por duas subunidades desiguais, a subunidade ribossomal menor 40S, formada pelo RNA ribossomal (rRNA) 18S e 33 proteínas ribossomais diferentes, e a subunidade ribossomal maior 60S, que contém 3 RNAs ribossomais (rRNAs) 5S, 5.8S e 25/28S (levedura/ mamíferos) e 46 proteínas ribossomais diferentes (Venema et al., 1999; Woolford et al., 2013) (**Fig.1**).

A biossíntese destas ribonucleoproteínas é iniciada no nucléolo, onde os pré-rRNAs são transcritos, e inclui várias etapas que ocorrem de forma concomitante ao transporte das partículas pré-ribossomais através do nucleoplasma para o citoplasma (Venema et al., 1999; Woolford et al., 2013)

Fig. 1. Representação esquemática das subunidades do ribossomo de *Saccharomyces cerevisiae*. Subunidade menor 40S e subunidade maior 60S. As proteínas ribossomais das subunidades 40S (verde claro) e 60S (azul claro) são sintetizadas de mRNA transcritos pela RNA polimerase II. (Extraído de Kressler et al., 2017.)

O rDNA é transcrito pela RNA Polimerase I em um precursor pré-rRNA 35S (em levedura) e pela RNA Polimerase III em um precursor pré-rRNA 5S (Kressler et al., 1999; Kressler et al., 2017) (**Fig.2**).

Estes precursores transcritos são submetidos a várias etapas de processamento que incluem clivagens endo- e exo-nucleolíticas, modificações de nucleotídeos em posições específicas, dobramento co-transcricional e associação com proteínas ribossomais, etapas que envolvem pelo menos 170 proteínas acessórias compreendendo endo- e exo-ribonucleases, RNA helicases dependente de ATP, AAA-ATPases, quinases, chaperonas e snoRNPs, além de diversos fatores de montagem. Estes eventos ocorrem de forma coordenada em uma série de etapas que abrangem três compartimentos subcelulares: o nucléolo, o nucleoplasma e o citoplasma (Fromont-Racine et al., 2005; Konikkat et al., 2017).

Fig. 2. Processamento do rRNA em *Saccharomyces cerevisiae*. O 35S pré-rRNA contém seqüências de 18S, 5.8S e 25S rRNAs limitados e separados por espaçadores transcritos internos (ITS) e externos (ETS). O 5S pré-rRNA é transcrito independentemente. Seqüências espaçadoras são removidas do pré-rRNA por uma série de processos endonucleolíticos e exonucleolíticos, dentro da montagem de ribossomos. (Extraído de Konikkat et al., 2017.)

1.1. snoRNPs de box C/D e box H/ACA

Durante o processamento do pré-rRNA e montagem das subunidades ribossomais, os rRNAs sofrem etapas de modificação química que são guiadas por pequenos RNA nucleolares ou também chamados snoRNAs, que funcionam posicionando corretamente as enzimas de modificação no pré-rRNA através de um pareamento de base entre snoRNA e o rRNA (Gonzales et al., 2005). Os snoRNAs são considerados uma das classes de RNA não codificantes (ncRNAs). Os snoRNAs são pequenos RNAs de 60-300 nucleotídeos que se acumulam especificamente no nucléolo. A maioria dos snoRNAs pode ser classificada em snoRNA de box C/D ou snoRNA de box H/ACA, de acordo com suas sequências de nucleotídeos e de sua função (Massenet et al., 2016).

Os snoRNAs de box H/ACA contém duas seqüências conservadas conhecidas como box H(ANANNA) e box ACA(ACA). Os snoRNAs de box H/ACA são compostos por dois *hairpins* de diferentes comprimentos, separados e seguidos por regiões curtas de fita simples, que incluem as seqüências conservadas do box H e do box ACA, respectivamente. Os snoRNPs de box H/ACA contém os snoRNAs desta classe associados a quatro proteínas que formam o *core* do complexo: Nhp2, Nop10, Gar1 e Cbf5 (Watkins et al., 2012; Van Nues et al., 2011). Os snoRNPs de box H/ACA são responsáveis pela isomerização de uridinas para pseudouridinas (Ψ) em posições específicas do pré-rRNA, reação esta catalisada pela pseudouridilase Cbf5 (Massenet et al., 2016) (Fig.3).

Os snoRNAs de box C/D contém duas seqüências conservadas, chamadas box C (5'-RUGAUGA-3', onde R é uma purina) e box D (5'-CUGA-3'), que estão localizadas respectivamente nas extremidades 5' e 3' do RNA. Boxes C e D interagem formando uma estrutura de torção conhecida como *K-turn (stem-internal loop-stem structure)* (Fromont-Racine et al., 2005; Thomson et al., 2013; Rothé et al., 2017). A maioria dos snoRNAs de box C/D contém cópias adicionais bem conservadas, denominadas box C' e D'. Essas seqüências formam uma estrutura conhecida como *K-loop (stem-loop)* (Van Nues et al., 2011).

Estes snoRNAs estão associados a quatro proteínas que fazem parte do *core* do complexo: Snu13, Nop56, Nop58 e Nop1. Os snoRNPs de box C/D são responsáveis pela metilação de riboses em posições específicas no grupo 2'-hidroxila dos rRNA recém sintetizados, sendo esta reação catalisada pela metil-transferase Nop1 (Van Nues et al., 2011; Watkins et al., 2012; Massenet et al., 2016).

Além dessas proteínas do *core*, alguns outros fatores podem se associar a snoRNPs específicos, tais como U3 snoRNP (Prieto et al., 2015) (**Fig.3**).

As proteínas do *core* nos snoRNPs são essenciais para a viabilidade celular, além de serem requeridas para a localização nucleolar dos snoRNAs, tanto em levedura como em humanos. Essa associação entre as proteínas do *core* e os snoRNAs permite que os snoRNP formados sejam estáveis e funcionais, resultando em uma adequada modificação pós-transcricional dos RNA ribossomais (Ellis et al., 2010; Watkins et al., 2012; Calore et al., 2013). As modificações pós-transcricionais dos rRNAs são importantes para a conformação e estabilização de estruturas secundárias e terciárias do rRNA, assim como na atividade das subunidades ribossomais maduras durante a tradução (Fromont-Racine et al., 2005; Thomson et al., 2013).

Fig.3. snoRNPs de box C/D e box H/ACA em *Saccharomyces cerevisiae*. **A.** As proteínas Nop1, Nop58, Nop56 e Snu13 associadas a seqüências conservadas do snoRNA de box C/D. **B.** As proteínas Cbf5, Gar1, Nhp2 e Nop10 associadas a seqüências conservadas do snoRNA de box H/ACA. As seqüências conservadas dos boxes são importantes para as associações com as proteínas do core que são requeridas para formar os complexos snoRNP funcionais no nucléolo. (Modificado de Steve L. Reichow et al., 2007.)

1.2. Montagem de snoRNPs de box C/D

Para formar um complexo enzimático de snoRNP funcional, cada snoRNA de box C/D deve estar montado corretamente, ligado às proteínas do *core* Nop1/Fibrillarin, Snu13/ 15.5K, Nop56 e Nop58 (*S. cerevisiae*/humanos) (Yang et al., 2016). A montagem do snoRNP é iniciada no nucleoplasma e as etapas finais de montagem e maturação ocorrem no nucléolo, compartimento onde os snoRNPs catalisam as modificações do rRNA (Prieto et al., 2015).

Durante a montagem do snoRNP de box C/D, duas moléculas da proteína Snu13 ligam-se aos extremos do snoRNA, reconhecendo as estruturas secundárias conservadas que estão presentes no box C/D. Devido à sua afinidade com o RNA, Snu13 é a primeira subunidade do *core* do snoRNP a se ligar ao snoRNA de box C/D.

As etapas posteriores da montagem não estão tão bem definidas, mas verificou-se que Nop1 e Nop58 se ligam ao snoRNA de forma independente, enquanto que Nop56 depende de Nop1 para se ligar ao complexo. Portanto, depois da interação de Snu13, a proteína Nop58 seria a segunda proteína a se ligar aos snoRNAs (Prieto et al., 2015) (Fig.4).

Devido aos muitos rearranjos estruturais que ocorrem durante a montagem de snoRNPs, um grupo de proteínas denominadas chaperonas é necessário para a maturação destes complexos.

A chaperona Hsp90, associada ao complexo co-chaperone R2TP, é responsável pela montagem de snoRNPs de box C/D (Prieto et al., 2015) (Fig.4). Além da montagem dos snoRNPs de box C/D e box H/ACA, o complexo R2TP-Hsp90 participa da montagem das RNA Polimerases I, II e III, PIKKs, e telomerase (Rothé et al., 2017).

Fig. 4. A Montagem de snoRNP de box C/D em *Saccharomyces cerevisiae*. Complexo R2TP junto com Hsp90, é requerido para a montagem de box C/D snoRNPs e promove sua translocação do nucleoplasma ao nucléolo. (Modificado de Prieto et al., 2015.)

1.3. Complexo R2TP-Hsp90

R2TP é um complexo multiproteico altamente conservado de leveduras a mamíferos. Inicialmente, R2TP foi descoberto em *Saccharomyces cerevisiae* como um complexo associado à chaperona Hsp90, sendo considerado como um complexo co-chaperona envolvido na estabilização e montagem de fosfatidilinositol-3 quinase relacionada com proteína quinase (PIKK) e a montagem da RNA polimerase II (Kakihara et al., 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o complexo R2TP é constituído pelas proteínas Rvb1, Rvb2, Tah1 e Nop17/Pih1 (Kakihara et al., 2014; Eickhoff et al., 2017) (Fig. 5).

Fig. 5. Representação esquemática do complexo R2TP-Hsp90. Proteínas do complexo R2TP em *Saccharomyces cerevisiae*: Rvb1, Rvb2, Tah1 e Nop17. Os domínios DII (rosa) são dispostos assimetricamente em torno de Rvb1-Rvb2 e fornece os sítios de ligação Nop17-Tah1, que garante que apenas um único dímero Hsp90 seja recrutado. A interação de Tah1 com os domínios DII flexíveis aumenta a atividade de ATPase de Rvb1-Rvb2. (Modificado de Rivera et al., 2012.)

Rvb1 e Rvb2 são helicases AAA+ (ATPase associada com diversas atividades celulares) dependentes de ATP altamente conservadas em eucariotos. Essas proteínas são caracterizadas pela presença do módulo AAA+, que contém os motivos Walker A e Walker B altamente conservados, responsáveis para a ligação de nucleotídeos e a hidrólise, respectivamente (Nano et al., 2013).

Estudos estruturais em levedura mostraram que Rvb1 e Rvb2 podem formar juntas um único anel heterohexamérico que sofre mudanças conformacionais dependentes de nucleotídeos (Huen et al., 2010). Tah1 foi encontrada em complexo com a proteína Nop17 e alguns estudos mostraram que Nop17 é capaz de modular a atividade da chaperona Hsp90. O subcomplexo Nop17-Tah1 está fortemente ligado às helicases essenciais Rvb1 e Rvb2 para formar o complexo R2TP (Kakihara et al., 2012; Hořejší et al., 2014; (Zhao et al., 2008). Esse complexo parece adotar diversas conformações até o recrutamento da Hsp90, que já foi mencionado ser importante para o acúmulo correto dos snoRNPs (Gonzales et al., 2005).

Tah1 é uma proteína que contém 111 resíduos de aminoácidos, com 2 motivos tetrapeptídeos repetidos (TPR), os quais são conhecidos pela interação com a chaperona Hsp90 (Kakihara et al., 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a região N terminal de Tah1₍₁₋₉₁₎ se dobra em um pequeno domínio TPR, que é responsável pela interação específica com o motivo MEEVD de Hsp90, enquanto que a região C-terminal de Tah1₍₉₃₋₁₁₁₎ é suficiente para se ligar com Nop17 (Kakihara et al., 2012; Quinternet et al., 2015).

1.3.1. Nop17

Nop17, também conhecida como Pih1, é uma proteína filogeneticamente conservada, localizada principalmente no nucléolo em condições de crescimento normal. Nop17 não é uma proteína essencial para a célula de levedura, embora a deleção de seu gene leve a um fenótipo termo-sensível (Gonzales et al., 2005). Além de *Saccharomyces cerevisiae*, Nop17 já foi identificada em diversos organismos, tais como *Homo sapiens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Mus musculus* e *Drosophila*.

Como mencionado anteriormente, Nop17 faz parte do complexo denominado R2TP (Rvb1, Rvb2, Tah1, Pih1), associado à chaperona HSP90. Esta proteína atua como uma plataforma no complexo R2TP, conectando o complexo heterohexamérico Rvb1-Rvb2 e a proteína Tah1.

A associação de Nop17 com Rvb1/Rvb2 é independente de Tah1 (Paci et al., 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae*, Nop17 é formada por 344 aminoácidos e contém uma região N-terminal com um domínio PIH com uma região intrínseca desordenada denominada IDR1 e um motivo PEST, que podem ser responsáveis pela instabilidade desta proteína, quando esta não está associada ao complexo R2TP. O domínio PIH da

região N-terminal de Nop17 deve estar envolvido na sua interação com proteínas que contém motivos fosforilados pela proteína quinase CK2 (Paci et al., 2012) (**Fig.6**).

Já o domínio C-terminal de Nop17 contém múltiplos fatores de desestabilização e atua como um degron quando são fusionados a outras proteínas. A porção C-terminal de Nop17 contém uma região intrinsecamente desordenada, denominada IDR2, e cinco *clusters* com aminoácidos hidrofóbicos designados como HP1, HP2, HP3, HP4 e HP5 (Paci et al., 2012; Paci et al., 2016) (**Fig.6**).

Fig. 6. Diagrama das regiões e motivos de Nop17 que estão envolvidos na formação do complexo R2TP. Nop17 é representada por um retângulo do 1 até 344 aminoácidos. Sua estrutura é formada por uma região N-terminal₁₋₂₃₀ (azul claro) que contém um domínio PIH₅₁₋₁₈₀ (azul escuro) possivelmente envolvido na interação com proteínas fosforiladas pela CK2, e por uma região C-terminal₂₃₁₋₃₄₄ (turquesa). Nop17 contém duas regiões intrinsecamente desordenadas IDR1(Gly195–Leu227) e IDR2(Asn240–Tyr267). A possível sequência PEST (Arg204–Lys228) é mostrada em itálico. Os cinco *clusters* de aminoácidos hidrofóbicos no domínio C-terminal estão indicados em barras violetas. As regiões IDR2 e HP1, indicadas em vermelho, estão diretamente envolvidas na interação com o domínio C-terminal de Tah1. As regiões de interação com Rvb1/Rvb2 e Tah1 estão indicadas no topo da figura. (Modificado de Paci et al., 2012.)

Nop17 é considerada uma proteína instável que precisa de outras proteínas para manter sua estabilidade. A chaperona Hsp90 junto com sua co-chaperona Tah1 são necessárias para manter sua estabilidade tanto *in vivo* como *in vitro* (Zhao et al., 2008). Estudos demonstraram que a região intrinsecamente desordenada IDR2 e o cluster HP1 do domínio C-terminal de Nop17 são protegidos de degradação pela interação específica com o domínio C-terminal de Tah1(Paci et al., 2012) (**Fig.6**).

Apesar de já se conhecer as interações entre R2TP e Hsp90, e da estrutura do complexo já ter sido determinada, a função molecular de Nop17 permanece desconhecida (Prieto et al.,2015). Nop17 interage com proteínas envolvidas em vários processos celulares, provavelmente direcionando Hsp90 para possibilitar a montagem de diferentes complexos (Prieto et al.,2015). Foram identificadas no nosso laboratório interações de Nop17 com proteínas que participam de etapas diferentes de controle de expressão gênica, tais como Rrp43 (componente do exossomo), Nop53 (proteína essencial nucleolar, envolvida na maturação da subunidade ribossomal 60S), Nop58 (componente de box C/D snoRNPs), Cwc24 (proteína “RING-finger” envolvida em splicing) e com as subunidades do complexo R2TP-Hsp90 (Gonzales et al., 2005; Granato et al.,2005; Goldfeder et al., 2008; Kakihara et al., 2012; Prieto et al., 2015). Além destas interações, foi identificada no nosso laboratório a interação entre Nop17 e Dre2 (Gonzales & Oliveira, tese de doutorado - 2005, e dados não publicados).

1.4. Dre2

Dre2 é uma proteína que contém um *cluster* Fe/S, essencial para a viabilidade da célula de levedura, altamente conservada entre espécies animais. Dre2 foi descrita como tendo localização citoplasmática, embora exista uma fração considerável que está fortemente associada à região inter-membranar da mitocôndria (Soler et al., 2011; Peleh et al., 2014). Dados do nosso laboratório indicam que ela também esteja presente no núcleo (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados).

Dre2 é formada por uma região N-terminal S-adenosilmetionina metiltransferase (SAM-MT) menos conservada, conectada por um *linker* flexível a uma região C-terminal altamente conservada que contém um domínio DUF-689. A função desse domínio ainda é desconhecida, mas se sabe que contém dois motivos com quatro cisteínas conservadas. O motivo I tem uma sequência CX₁₀CX₂CXC(C252, 263, 266, 268) e o motivo II tem uma sequência CX₂C (C311, 314, 322, 325) (Netz et al.,2016; Soler et al.,2011) 7 dos 8 resíduos de cisteínas conservadas nos dois motivos são essenciais para o crescimento celular, como determinado por mutagênese sítio dirigida (Netz et al., 2016) (**Fig.9**).

Dre2 contém 2 clusters Fe/S, $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ e $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ na região C-terminal. Em estudos prévios, descobriram que os quatro resíduos de cisteína do motivo I coordenam o cluster $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, enquanto que os resíduos de cisteína do motivo II ligam o agrupamento $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (Netz et al., 2016). Em *Saccharomyces cerevisiae*, foi mostrado que uma mutação em um único aminoácido nos domínios que montam os clusters Fe/S elimina a função da proteína Dre2, sendo os clusters Fe/S fundamentais para a proteína (Netz et al., 2016) (Fig.9).

Fig.7. Diagrama das regiões e motivos da proteína cluster Fe/S Dre2. Dre2 é representada por um retângulo do 1 até 349 aminoácidos. O domínio N-terminal de Dre2₁₋₁₃₃ (rosa) e o domínio C-terminal de Dre2₁₃₃₋₃₄₉ (rosa claro). Na região C-terminal contém um domínio DUF-689₁₇₃₋₃₂₅ (púrpura claro) com 8 resíduos de cisteínas conservadas formando o motivo I e motivo II indicados em barras púrpuras. A cisteína 252 não é essencial para o crescimento da célula. O motivo I forma o cluster $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ e o motivo II forma o cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. (Modificado de Netz et al., 2016).

Em leveduras e em humanos, Dre2 é uma proteína necessária para a biogênese de *clusters* Fe/S de proteínas citosólicas e na regulação da morte celular em resposta ao estresse oxidativo (Soler et al., 2012). Dre2 humana, também chamada CIAPIN1, é um fator anti-apoptótico e é capaz de substituir Dre2 de forma eficiente quando é expressa em levedura, mostrando a conservação evolutiva de Dre2. Dre2 faz parte do complexo CIA, e pode formar um complexo citosólico estável com a diflavina oxidoreductase Tah18. A proteína Tah18 é uma redutase essencial que exhibe os motivos de ligação para os cofatores FMN, FAD e NAD (Soler et al., 2012).

O complexo Dre2-Tah18 participa de reações de oxido-redução, de modo que o cofator NADPH tem a função de transferir os elétrons à proteína redutase Tah18 para serem recebidos pelos clusters Fe/S na porção C-terminal de Dre2, sendo crucial para a biogênese de proteínas Fe/S citosólicas (Netz et al., 2010; Lill, 2014). O mecanismo pelo qual as proteínas desempenham estas funções ainda não está claro.

Em eucariotos, os *clusters* Fe/S são pequenos cofatores inorgânicos de proteínas, considerados entre os primeiros catalisadores da evolução de biomoléculas. Os clusters Fe/S são encontrados em todos os reinos da vida e fazem parte de muitas proteínas envolvidas em inúmeras funções bioquímicas. O íon ferro do *cluster* é frequentemente coordenado pelo enxofre dos resíduos de cisteína nas proteínas ou do nitrogênio dos resíduos de histidina, mas em raros casos utilizam outros resíduos de aminoácidos como arginina e serina, ou cofatores tais como S-adenosilmetionina (SAM) que são usados como ligantes de coordenação (Stehling et al., 2013). As formas mais comuns e simples dos clusters Fe/S são [2Fe-2S] e [4Fe-4S]. Em algumas proteínas Fe/S, um Fe de um cluster [4Fe-4S] pode ser perdido para gerar o cluster [3Fe-4S], que forma uma estrutura distorcida e alongada (Lill et al., 2008) (Fig.7).

Fig.8. Estrutura dos clusters Fe/S em Eucariotos. A estrutura dos tipos de clusters mais simples são romboide [2Fe-2S] e cúbico [4Fe-4S], o qual contém íon ferroso (Fe^{2+}) ou íon ferrico (Fe^{3+}) e íon sulfureto (S^{2-}), que geralmente são integrados em proteínas através da coordenação dos íons de ferro por resíduos de cisteína ou histidina. (Extraído de Lill, R., 2007).

Em eucariotos, a biogênese de proteínas com *clusters* Fe/S é um processo bem estabelecido, que envolve a participação de um número surpreendente de proteínas. Este processo precisa de duas maquinarias específicas: 1) A maquinaria de montagem do ISC (*Iron-Sulfur Cluster*) mitocondrial, o qual serve como doador de enxofre para a maturação de proteínas Fe/S extramitocondrial. 2) A montagem das proteínas citosólicas Fe/S (CIA), necessária para a geração de todas as proteínas celulares. Ambos sistemas estão

No nosso laboratório, foi mostrado que a redução na expressão da proteína Dre2 causa uma diminuição na concentração dos ribossomos maduros e um acúmulo de pré-rRNAs no núcleo (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados). Este fenótipo foi atribuído à falta de cluster Fe/S em Rli1 na ausência de Dre2, já que Rli1 contém um cluster de Fe/S e está envolvida no transporte de subunidades ribossomais do núcleo para o citoplasma (Kispal et al., 2005). Entretanto, a depleção de Rli1 causa efeitos tardios no processamento de pré-rRNA, levando a um acúmulo do intermediário 7S (Yarunin et al., 2005), diferente do que foi visto com a depleção de Dre2 (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados), o que pode indicar que Dre2 afete outros fatores de processamento de rRNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização do papel funcional da interação da subunidade Nop17 do complexo R2TP com a proteína de *cluster* Fe/S Dre2 para determinar se a proteína Nop17, como parte do complexo R2TP, é importante para a montagem do complexo da maquinaria de proteínas citosólicas Fe/S (CIA), ou se Dre2 estaria envolvida na estabilidade de Nop17 para a formação do complexo R2TP.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar os domínios envolvidos na interação de Nop17 e Dre2.
- Analisar o efeito de Nop17 e Dre2 nos níveis de expressão uma da outra e de seus mutantes de deleção.
- Analisar o efeito de Nop17 e Dre2 na estabilidade uma da outra.
- Analisar o efeito de Nop17 e Dre2 na localização subcelular uma da outra.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae*

As células de *E. coli* foram manipuladas de acordo com os protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 1989. As cepas de bactérias utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Características	Referência
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>LacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983
BL21CodonPlus (DE)-RIL	<i>E.coli</i> B F-ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tet ^r gal I λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Stratagene
BL21(DE3)	Δ (DE) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Stratagene

As cepas de leveduras utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepas	Características	Referência
W303	<i>MATa, trp1-1 leu2-3,112bis3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-</i> <i>100</i>	Sherman <i>et al.</i> , 1986
BY4743	<i>MATa, bis3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0	Euroscarf
Δ <i>nop17</i>	BY4743, <i>MATa, bis3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, <i>NOP17::Kan</i> ^R	Research Genetics
Δ <i>dre2</i> /YCP111- <i>Gal::Dre2</i>	BY4743, <i>Mat</i> ?, <i>bis3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0, YKR071C:: <i>KanMX4;Yc111Gal-071</i>	Euroscarf
Δ <i>tab1</i>	<i>MATa, bis3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0, <i>TAH1::Kan</i> ^R	Euroscarf
Δ <i>rsa1</i>	<i>MATa, bis3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0, <i>RSA1::Kan</i> ^R	Euroscarf

3.2. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados como primers em clonagens e sequenciamento de DNA estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Lista de Primers utilizados

Primers	Sequence	Referência
Nop17BamFor1	5'- <u>GGATCC</u> ATGGCCGATTCTTATTG AGACC-3'	Este estudo
Nop17Rev1035Xho	5'- <u>CTCGAG</u> TATATATATATATAGT GTGCGTTCTTTGCGGATATGG-3'	Este estudo
Nop17Rev690Xho	5'- <u>TCGAGT</u> TAGGAGATTGTTCTCG ATAGGGA-3'	Este estudo
Nop17For691Bam	5'- <u>GGATCC</u> ATGGGAGCCAAGATAGA GGAGATTGA-3'	Este estudo
DRE2NdeFor1	5'- <u>CATATG</u> TCACAATACAAAACCTGGTT TAC-3'	Este estudo
DRE2XhoRev349	5'- <u>CTCGAG</u> CAAGTCATCTGAAATGCTG TCC-3'	Este estudo
DRE2XhoRev133	5'- <u>CTCGAG</u> CAGTGGTATAGAAACAGTT TGG-3'	Este estudo
DRE2NdeFor134	5'- <u>CATATG</u> AAAAAAAAAGAAAACGAACA ATACTAAGCTACAGAG-3'	Este estudo
DRE2BamHFor1	5'- <u>GGATCC</u> ATGTCACAATACAAAACCTG G-3'	Este estudo
DRE2XhoRevStop	5'- <u>CTCGAG</u> TACAAGTCATCTGAAATG CTGTCC-3'	Este estudo
DRE2Xho133RevStop	5'- <u>CTCGAG</u> TACAGTGGTATAGAAACA GTTTGG-3'	Este estudo
DRE2BamHIFor134	5'- <u>GGATCC</u> AAAAAAAAAGAAAACGAACA ATA-3'	Este estudo
Sp6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'	Promega
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Promega

Os sítios de restrição inseridos nas sequências dos primers estão sublinhados.

3.3. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste estudo foram construídos de acordo com as estratégias de clonagem descritas a seguir e listadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Lista de Plasmídeos utilizados

Plasmídeos	Características	Referência
PGEM-T-easy	<i>lacZ</i> , Amp ^R	Promega
PGEM-T	<i>lacZ</i> , Amp ^R	Promega
PGEX-4T1	GST ¹ Tag C-Terminal , Amp ^R	Amersham
PGEX-4T1-Nop17 _{FL}	GST::Nop17 _{FL} [1-344], Amp ^R	Este estudo
PGEX-4T1-Nop17 _N	GST::Nop17 _N [1-230], Amp ^R	Este estudo
PGEX-4T1-Nop17 _C	GST::Nop17 _C [231-344], Amp ^R	Este estudo
pET29a-Dre2 _{FL}	His6::Dre2 _{FL} [1-349], Kan ^R	Este estudo
pET29a-Dre2 _N	His6::Dre2 _N [1-133], Kan ^R	Este estudo
pET29a-Dre2 _C	His6::Dre2 _C [134-349], Kan ^R	Este estudo
pUG34	MET25::yEGFP3 ² , HIS3,CEN6, Amp ^R	Niedenthal <i>et al.</i> ,1996
pUG34-Dre2 _{FL}	MET25::yEGFP3-Dre2 _{FL} [1-349], HIS3,CEN6, Amp ^R	Este estudo
pUG34-Dre2 _N	MET25::yEGFP3-Dre2 _N [1-133], HIS3,CEN6, Amp ^R	Este estudo
pUG34-Dre2 _C	MET25::yEGFP3-Dre2 _C [134-349], HIS3,CEN6, Amp ^R	Este estudo
pUG34-Nop17 _{FL}	MET25::yEGFP3- Nop17 _{FL} [1-344], HIS3,CEN6, Amp ^R	Este estudo
pUG34-Nop17 _N	MET25::yEGFP3- Nop17 _N [1-230], HIS3,CEN6, Amp ^R	Este estudo
pUG34-Nop17 _C	MET25::yEGFP3- Nop17 _C [231-344], HIS3,CEN6, Amp ^R	Este estudo

* Números entre colchetes correspondem aos resíduos de aminoácidos codificados.

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

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

3.4. Meios de Cultura

As cepas de bactérias DH5 α , BL21 CodonPlus, BL21(DE3) foram mantidas em meio LB ou em meio 2YT e suplementadas conforme as necessidades com os antibióticos ampicilina (Amp), cloranfenicol (CHL) e kanamicina (Kan). As cepas foram manipuladas de acordo com os protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 1989. As cepas de bactérias utilizadas neste estudo foram mantidas nos meios descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Meios de cultura de bacterias utilizados

Meios	Composição
LB	1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 2% ágar
2YT	1,6% triptona; 1% extrato de levedura; 1% NaCl
Suplementados requeridos, com:	
Ampicilina	100 μ g/mL
Cloranfenicol	50 μ g/mL
Kanamicina	20 μ g/mL
Lactose	10 mM
IPTG	1mM, 0,7mM

As cepas de levedura foram mantidas em meio rico YPD/YPGAL ou em meio mínimo YNB-Glicose/YNB-Galactose suplementadas com os aminoácidos requeridos dependendo da marca do plasmídeo. As cepas foram manipuladas de acordo com os protocolos descritos por Sherman *et al.*, 1986. As cepas de leveduras utilizadas neste estudo foram mantidas nos meios descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Meios de cultura de levedura utilizados

Meios	Composição
YPD	1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% Glicose; 2% ágar
YPGal	1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% Galactose; 2% ágar
YNB-Glicose	0,7% YNB; 2% Glicose; 2% ágar, suplemento com base nitrogenada e aminoácidos requeridos.
YNB-Galactose	0,7% YNB; 2% Galactose; 2% ágar, suplemento com base nitrogenada e aminoácidos requeridos.
Suplementos requeridos	
Geneticina	200 ug/mL
Lisina	30 ug/mL
Leucina	30 ug/ mL
Metionina	20 ug/ mL
Uracila	20 ug/ mL
Adenina	20 ug/ mL
Triptofano	20 ug/ mL
Histidina	20 ug/ mL

3.5. Clonagem de DNA

Os métodos utilizados neste trabalho foram realizados de acordo com Sambrook *et al.*, 1989.

3.5.1. PCR

Para a amplificação dos fragmentos de interesse, as reações foram realizadas com um volume final de 100µl por reação. A reação foi realizada com 500 ng de DNA genômico de *Saccharomyces cerevisiae*, 20pmol dos primers *forward* e *reverse* específicos para cada fragmento (descritos na Tabela 3), 1U de Taq Polimerase High Fidelity, buffer, 1,5mM de MgCl₂ e 200µM de dNTPs.

As condições das reações de PCR variaram de acordo com as sequências dos primers e tamanhos dos fragmentos amplificados. Os produtos amplificados foram separados em um gel de 1% de agarose por electroforese e purificados através do kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

3.5.2. Construção de plasmídeos

Os plasmídeos neste estudo estão resumidos na **Tabela 4**.

Para a expressão de proteínas recombinantes em bactérias fusionadas com glutathione S-transferase (GST) e cauda de histidina (His), os clones expressando as porções N-terminal de Dre2 (Dre2_N) e *full-length* Dre2 (Dre2_{FL}), foram obtidos através de clivagem com as enzimas de restrição NdeI e XhoI do plasmídeo pGEM-T, e subclonados no vetor de expressão pET-29a. No caso dos clones expressando as porções N-terminal de Nop17 (Nop17_N) e C-terminal de Nop17 (Nop17_C), foram obtidos através de clivagem com BamHI e XhoI do plasmídeo pGEM-T-easy, subsequentemente esse fragmento foi purificado e inserido no vetor de expressão pPGEX-4T1.

Os fragmentos de DNA de *NOP17*, e *DRE2* codificando a porção C-terminal da proteína, foram amplificados por PCR, utilizando os primers Nop17BamFor1 e Nop17Rev1035Xho para Nop17_{FL}, e os primers DRE2NdeFor134 e DRE2XhoRev349 para Dre2_C. Os produtos amplificados foram inseridos no vetor pGEM-T. Em seguida, o fragmento de Nop17_{FL} foi clivado com XhoI e BamHI, purificado e inserido no vetor de expressão pGEX-4T1. No caso do fragmento Dre2_C, foi clivado com XhoI e NdeI e inserido no vetor de expressão pET29a.

Para a construção de GFP-Dre2_{FL}, GFP-Dre2_C e GFP-Dre2_N, os fragmentos de DNA de Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N, foram amplificados por PCR e inseridos no vetor pGEMT-easy, logo foram retirados com as enzimas de restrição BamHI e XhoI para ser subclonados no vetor pUG34, tratados com as mesmas enzimas.

Para a construção de GFP-Nop17_{FL}, GFP-Nop17_C, GFP-Nop17_N, foram usados os mesmos fragmentos purificados e clivados com XhoI e BamHI, que foram usados para subclonar com o vetor de expressão pGEX-4T1.

3.5.3. Sequenciamento

Todos os clones obtidos foram sequenciados utilizando o kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PERKIN ELMER), o qual contém AmpliTaq® DNA Polymerase, BigDye terminadores e todos os componentes requeridos para esta reação.

Na reação foram utilizados os primers SP6 ou T7(3,2 pmol/μl) e 300 a 600ng de plasmídeo como molde na reação. As condições utilizadas foram: 96°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 seg, anelamento a 50°C por 30 seg (variável de acordo com o primer) e elongação a 60°C por 4 min.

Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi precipitado com 25μl do cocktail de precipitação, que contém 23ul EtOH, 1ul NaOAc e 1ul Glicogênio. Logo, homogenizadas e mantidas no gelo por 15 minutos. Depois, foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Logo, adicionou-se 50ul de etanol de 70% gelado por reação, foi centrifugada por 10 min e descartado o excesso. Depois de seco, DNA foi desnaturado lugar protegido da luz, ou 1 minuto a 95°C. Finalmente, as sequências foram enviadas ao serviço de sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP.

3.6. Manipulação de bactéria

3.6.1. Transformação

Foram utilizados dois métodos para a preparação de células de *E. coli* competentes para transformação com DNA plasmidial.

3.6.1.1. Método de PEG

As células competentes DH5α (aproximadamente 100μl de suspensão) juntamente com 80μL de tampão de transformação (0,1M KCl; 0,03M CaCl₂; 0,05M MgCl₂ e 7% PEG) e 50ul da reação de ligação foram incubadas no gelo por 30 minutos. Logo, as células foram submetidas a um choque térmico por incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foi adicionado 1 mL de meio LB, sendo a cultura incubada a 37°C por 1 hora. As células foram coletadas por centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto, ressuspensas em 100μL de meio LB e plaqueadas em meio seletivo(LB-Amp/LB-Kan).

3.6.1.2. Método de Cloreto de cálcio

As células competentes BL21 CodonPlus (DE)-RIL ou BL21(DE3) de *Escherichia coli* foram preparadas ressuspendendo-se células de cultura em OD₅₅₀ = 0,4-0,6 em 0,1 M de CaCl₂ gelado e 15% de glicerol. A suspensão das células competentes foi alíquotada e estocada a -80°C.

Aos 50µl de suspensão das células competentes, adicionou-se DNA plasmidial, seguida da incubação no gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 2 minutos. Logo, foi colocado 1 ml de meio de cultura LB e incubado a 37°C por 1 hora.

Os transformantes foram selecionados em meio LB na presença de antibióticos e as proteínas foram expressas em culturas de células crescidas a 18°C, 30°C e 37°C com adição dos indutores IPTG e Lactose overnight. Observar as diferentes condições de expressão na **Tabela 7**. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação a 8 000rpm por 10 min.

As células competentes BL21 CodonPlus (DE)-RIL ou BL21(DE3) de *Escherichia coli* foram utilizadas para expressão das proteínas de fusão GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C, GST-Nop17_N, His-Dre2_{FL}, His-Dre2_C e His-Dre2_N.

Tabela 7. Condições de Expressão em Células competentes BL21

Clones	Células	Meio de cultura	Antibiótico	[] Indutor	T°
pGEX-4T1	(DE)-RIL	2YT	Amp, CHL	10 mM Lactose	30°C
pGEX-4T1-Nop17 _{FL}	(DE)-RIL	2YT	Amp, CHL	10mM Lactose	30°C
pGEX-4T1-Nop17 _C	(DE)-RIL	2YT	Amp, CHL	10mM Lactose	30°C
pGEX-4T1-Nop17 _N	(DE)-RIL	2YT	Amp, CHL	10mM Lactose	30° C
pET29a-Dre2 _{FL}	(DE3)	LB	Kan	0,7mM IPTG	18°C
pET29a-Dre2 _C	(DE)-RIL	2YT	Kan, CHL	0,7mM IPTG	37°C
pET29a-Dre2 _N	(DE3)	LB	Kan	1mM IPTG	18°C

3.6.2. Extração de DNA plasmidial de *E.coli*

Os plasmídeos foram extraídos de acordo com Sambrook *et al.*, 1989 de 1,5 ml de culturas em meio LB com antibiótico para a seleção. posteriormente DNA obtido foi ressuspensionado em 50µl de TE (10mM Tris-HCl, pH=8.0;1mM EDTA 50,pH=8.0) através da incubação a 45 °C por 5 minutos.

3.7. Manipulação de *Saccharomyces cerevisiae*

3.7.1. Transformação

Uma colônia isolada de levedura foi inoculada em 2ml de meio seletivo, sendo a cultura incubada a 30°C overnight, até atingir uma $OD_{600} \geq 1,0$. Em seguida, 200µl de cultura foram coletadas por centrifugação a 12 000rpm por 1 minuto. Logo, foram lavadas com 200µl de TE(10mM Tris-HCl, pH=8; 1mM EDTA, pH=8) e em seguida ressuspensionadas em 100µl de solução LiAc-PEG-DTT(0,2M de Acetato de Lítio,40% PEG, 100mM DTT). A esta suspensão de células foi adicionado 2-5µg de DNA plasmidial e foi submetida a 42°C por 30 minutos, sendo imediatamente plaqueada em meio seletivo. As cepas transformantes estão descritas abaixo na **Tabela 8**.

Tabela 8. Descrição de Cepas Transformantes

Cepa	Plasmídeos	Cepa Transformante
W303	pUG34-Dre2 _{FL}	<i>W303::GFP-Dre2_{FL}</i>
	pUG34-Dre2 _N	<i>W303::GFP-Dre2_N</i>
	pUG34-Dre2 _C	<i>W303::GFP-Dre2_C</i>
	pUG34-Nop17 _{FL}	<i>W303::GFP-Nop17_{FL}</i>
	pUG34-Nop17 _N	<i>W303::GFP-Nop17_N</i>
	pUG34-Nop17 _C	<i>W303::GFP-Nop17_C</i>
$\Delta nop17$	pUG34	$\Delta nop17::GFP$
	pUG34-Dre2 _{FL}	$\Delta nop17::GFP-Dre2_{FL}$
	pUG34-Dre2 _N	$\Delta nop17::GFP-Dre2_N$
	pUG34-Dre2 _C	$\Delta nop17::GFP-Dre2_C$
$\Delta tab1$	pUG34-Dre2 _{FL}	$\Delta tab1::GFP-Dre2_{FL}$
$\Delta rsa1$	pUG34-Dre2 _{FL}	$\Delta rsa1::GFP-Dre2_{FL}$
$\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2$	pUG34	$\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP$
	pUG34-Nop17 _{FL}	$\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_{FL}$
	pUG34-Nop17 _N	$\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_N$
	pUG34-Nop17 _C	$\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_C$

3.7.2. Ensaio de determinação de estabilidade de proteínas

Para analisar a estabilidade das proteínas deste estudo (Nop17 e Dre2). As cepas transformantes foram inoculadas em 2 ml de meio YNB-Gli/ YNB-Gal com os aminoácidos correspondentes, incubando a 30°C overnight, até atingir uma $OD_{600}=1,0$. O pré-inoculo foi diluído em 30ml no mesmo meio YNB-Gli/ YNB-Gal e incubado a 25°C, 30°C e 37°C, dependendo da cepa transformante.

A cultura foi coletada a 4000 rpm por 10 min e o *pellet* foi ressuspensionado em 6 ml do mesmo meio. Em seguida, foi adicionada cicloheximida (inibidor da síntese proteica) na concentração final de 100µg/ml. Aliquotas da cultura de células foram coletadas a intervalos de tempo pré-definidos (0, 10, 20, 40, 60 e 120 min). As aliquotas coletadas foram lisadas por tratamento com hidróxido de sódio, centrifugadas e analisadas por western blotting.

Para analisar se a ausência de uma proteína afeta a estabilidade da outra, a cepa transformante $\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_{FL}$ foi analisada em condições com meio galactose ou glicose a 30°C, usando como controle a cepa transformada $W303::GFP-Nop17_{FL}$ nas mesmas condições. No caso da cepa transformante $\Delta nop17/GFP-Dre2_{FL}$ foi analisada em diferentes temperaturas, a 25°C, 30°C e 37°C, usando como controle a cepa transformante $W303::GFP-Dre2_{FL}$ nas mesmas condições.

3.7.3. Localização de proteínas por microscopia de fluorescência

A localização celular das foi determinada analisando a fluorescência de proteínas de fusão com GFP *in vivo*. As células foram cultivadas a 30°C em meio mínimo YNB-Gli/YNB-Gal até atingir $OD_{600}=1,0$. Depois foram diluídas em 20 ml no mesmo meio e foi incubado em diversas condições, dependendo da cepa transformante.

Células de 1ml de cultura em $OD_{600}=0,6$ foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos. As células foram ressuspensionadas em 30 µl de PBS e 70 µl de metanol 100 %. Depois da incubação em gelo por 15 minutos, colocou-se 100 µl de PBS, sem ressuspender. Em seguida, foi centrifugada a 2000 rpm por 2 minutos e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 10 µl de RNase (10ug/µl) e foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Logo, lavado com 100 µl de PBS, e em seguida, foi colocado 4µl de PBS na suspensão das células e 4µl de corante DAPI (marcação do

DNA), ressuspensando diretamente em lâminas de polilisina. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência (NIKON eclipse Ti) e as imagens foram editadas pelo programa NIS-Elements Viewer e ImageJ. 4.20.

3.7.4. Preparação de Extrato celular

3.7.4.1. Lise mecânica (ball mill)

As células foram coletadas por centrifugação a 17 000 rpm por 30 minutos, lavadas com tampão PBS, DTT e inibidor de proteases. A suspensão de células foi congelada em nitrogênio líquido em forma de pequenas gotas. As células congeladas, foram lisadas mecanicamente pelo sistema ball mill (Mill MM 200 (Retsch) em 9 ciclos de 15 Hz por 3 minutos. Após do descongelamento das células, adicionou-se 1,5 ml de tampão PBS. Finalmente, para eliminar os resíduos excedentes, foi centrifugado a 17000 rpm por 30 minutos.

3.7.4.2. Hidróxido de Sódio

As células foram coletadas por centrifugação a 4 000 rpm por 10 minutos. O pellet foi ressuspensado em 400µl de água e 400µl de 0,2M de NaOH. Logo, foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 12 000 rpm por 5 minutos. Depois de eliminar o sobrenadante, ressuspender o pellet com 1ml de Tris-HCl 0,06M, pH=8. Em seguida, foram coletados 100 µl da suspensão por centrifugação a 12 000 rpm por 5 min. O pellet foi ressuspensado em 15 µl de tampão de amostra 4X(0,06M Tris-HCl, pH=6,8, 5% de glicerol, 2% SDS, 4% 2mM β-Mercaptoetanol, 0,0025% e azul de Bromofenol) e aquecido a 95°C por 5 min.

3.8. Análise de proteínas

3.8.1. Lise celular

As células de *E. coli* expressando GST, GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C, GST-Nop17_N, Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N foram descongeladas e ressuspensadas em tampão PBS (150mM NaCl; 20mM de Tris-Cl pH8; 0,1% de Nonidet, pH=8, 0,5mM PMSF e 1mM DTT) com inibidor de protease (100ul cada 0,4gr de célula). As células foram lisadas através de 4 a 5 passagens por *french press*, com pressão de aproximadamente 1500 PSIG

(French Pressure Cell Press). Os restos celulares foram separados por centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente, foram coletados os sobrenadantes.

3.8.2. Purificação de proteínas recombinantes

As proteínas extraídas GST, GST-Nop17_N em tampão PBS, com inibidor de protease, foram incubadas por 1 hora na resina Glutathiona-sepharose. Logo, foi coletado 1ml do material que não se ligou à resina (*flow through*) e 1ml de cada lavagem que foi passado pela resina (2 lavagens). Em seguida, as proteínas foram eluídas com Glutathiona reduzida. As frações eluídas foram incubadas com resina Q-sepharose por 1 hora e eluídas em concentrações de 150mM, 250mM, 500mM e 1M de NaCl. Para eliminar NaCl, estas amostras foram dialisadas contra o mesmo tampão das purificações anteriores. Finalmente, as amostras purificadas foram incubadas novamente com a resina Glutathiona-sepharose e eluídas com Glutathiona reduzida.

A proteína extraída Dre2_N, em tampão Fosfato (50mM Fosfato de Sódio, pH=7,8, 200mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1mM PMSF e 2mM β-mercaptoetanol), foi incubada por 1 hora na resina de Níquel-sepharose. Logo, foram coletados 1ml do *flow through* e 1ml de cada lavagem (2 lavagens). Em seguida, as proteínas foram eluídas com Imidazol. As frações eluídas foram incubadas com resina de Q-sepharose durante 1 hora e eluídas em concentrações de 200mM, 300mM, 500mM e 1M de NaCl. Depois de dialisadas, as amostras purificadas foram incubadas novamente na resina de níquel-sepharose e eluídas com Imidazol.

As frações de extrato total, *flow through*, lavagens e eluição de todas as purificações foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Dois tipos de coloração foram utilizados: coloração por Coomassie blue e Nitrato de prata. Imediatamente após do término da eletroforese, o gel foi corado com solução de Coomassie blue (Coomassie Blue R 0,25% em metanol 45% e ácido acético 10%) por 30 minutos. Decorrido este período, a solução corante foi retirada e o excesso de Coomassie foi eliminado através de 2 incubações em solução descorante (etanol 50% e ácido acético 10%). Posteriormente, os géis foram corados com a coloração de Nitrato de prata. A coloração dos géis foi realizada seguindo os procedimentos descritos por *Sambrook et Russell*, 2001.

Os géis foram fixados com uma solução contendo 50% Metanol e 12% Ácido Acético, cada 50 ml de solução foi adicionado 25µl de formaldehído 37% e incubado por 30 minutos no mínimo. Logo, foram lavados com uma solução de etanol 35% por 3 minutos e água destilada para eliminar os restos. Depois, os géis foram sensibilizados em uma solução 0,2% Tiossulfato de sódio por 2 minutos. Os géis foram incubados em 0,25% nitrato de prata cada 50 ml de solução, adicionando 36µl de formaldehído 37% durante 10 minutos, seguido por uma breve lavagem com água, e a visualização das bandas foi possível após a adição de uma mistura de 3g de carbonato de sódio com 25µl de formaldehído 37% e 1ml de tiossulfato de sódio. Para interromper a reação, os géis foram lavados com etanol 35%.

3.8.3. Quantificação de proteínas

Para determinar a concentração das proteínas nos diferentes extratos celulares foi utilizado o método de Ácido bicinconínico, utilizando BCA (50:1) CuSO₄, descrito por Smith *et al.*, 1985. Ao extrato total foi adicionado 5µl de tampão, 1mL da solução 5mM CuSO₄ em BCA e água estéril. Logo, foi incubada por 30 minutos a 37°C.

Para quantificar as proteínas purificadas foi utilizado o método de Bradford, utilizando o corante “Coomassie Brilliant Blue” BG-250.

O reagente de Bradford foi preparado pela diluição de 50 mg do corante Coomassie Brilliant Blue BG-250 em 25 ml de Etanol, em seguida foram adicionados 50 ml de ácido ortofosfórico 85% e diluir com a água Milli-Q até 500mL e armazenada a 4°C. Para quantificar, foi adicionado 1mL do reagente de Bradford e 100µl da proteína purificada.

Os dois ensaios de quantificação foram determinados por comparação com uma curva padrão de BSA (bovine serum albumin), a leitura de absorbância foi medida no comprimento de 562 nm para BCA /CuSO₄, e 595 nm para Bradford.

3.8.4. Separação de proteínas por SDS-PAGE

As proteínas foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo de Sambrook, *et al.*, 1989. As proteínas foram diluídas em tampão de amostra 4X (40mM Tris-HCl, pH 6,8; glicerol 8%; SDS 2%;

100 mM DTT; % β -Mercaptoetanol e azul de Bromofenol 0,1%) e foram incubadas a 95°C por 5 minutos.

O gel é submetido à voltagem de 135 V em tampão de corrida Tris-glicina 1X (25 mM Tris- HCl; mM 250 Glicina; SDS 10%).

3.8.5. Detecção de proteínas por *Western blotting*

Depois da separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (polivinilideno difluoreto, *GE Healthcare*) em tampão de transferência gelado (2M Tris-HCl pH 8,0; 192 mM Glicina; 15% metanol) por um período de 2 horas com uma corrente constante de 250 mA. Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com TBS-T (10mM Tris- pH=7,5, 150mM NaCl e 0,05% Tween 20) contendo 2 % de leite desnatado, e depois incubada com anticorpo primário diluído em solução 0,1% de leite desnatada em TBS por pelo menos 2 horas. Depois de lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário diluído em 0,1% de leite desnatada com TBS por pelo menos 1h 30 minutos.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-His (*GE Healthcare*), anti-GST (*Sigma*), anti-GFP (*Sigma*), anti-Arp2 (*Santa Cruz*) e anti-Dre2. Os anticorpos secundários utilizados, conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*), foram anti-mouse (*GE Healthcare*), anti-coelho (*GE Healthcare* e anti-cabra(*GE*). Para a revelação do Western blot, foi usado o kit Luminata™ Forte Western HRP Substrate. O sinal de quimiluminescência foi visualizado pela exposição do filme de raios-X. Nos ensaios de Western blotting realizados em levedura, a quantidade das proteínas de interesse, Dre2, Nop17 e seus mutantes foi analisada através de quantificação das bandas pelo programa ImageJ.

3.9. Estudo *in vitro* de interação proteína-proteína por *pull-down*

Os experimentos de *pull-down* foram realizados para confirmar interação proteína-proteína (Sambrook et al., 2006). A interação de GST-Nop17 e His-Dre2 foi testada da seguinte maneira: As células de *Escherichia coli* expressando GST, GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C, GST-Nop17_N, Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N foram lisadas independentemente. Os extratos totais foram quantificados pelo método de Ácido bicinconínico (BCA). GST foi utilizada como controle negativo para o ensaio de *pull-down*.

Para o ensaio de *pull-down* foram utilizadas colunas cromatográficas de 10ml (*Bio-Rad*). As colunas utilizadas foram lavadas 3 vezes com 1mL de água estéril e em seguida equilibradas com 2mL de tampão PBS. Depois, foram adicionados 600µl de resina Glutathiona-sepharose (*GE Healthcare*) para cada coluna e lavados duas vezes com 1ml de PBS. Depois de colocar a resina, as proteínas recombinantes GST, GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C e GST-Nop17_N foram incubadas em cada uma das colunas durante 1 hora a 4°C com rotação. O *flow through* foi coletado e a resina lavada com 1ml de PBS. Depois, na mesma coluna foram incubadas as proteínas recombinantes Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N durante 1 hora a 4°C com rotação. Posteriormente, a resina foi novamente lavada com PBS, seguida pela adição de 1ml de Glutathiona reduzida (20mM) em 50mM de Tris-Cl (pH 8) durante 20 minutos. As amostras coletadas nas etapas de extrato total (ET), *flow through* (FT), lavagem (W) e eluição (B) foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por western blotting, utilizando os anticorpos anti-GST para as proteínas GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C e GST-Nop17_N e anti-His para Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N. (**Fig.10**)

Fig. 10. Esquema do ensaio de interação proteína-proteína por *pull-down*. O gene de *NOP17* foi fusionado a GST e o gene de *DRE2* foi fusionado ao His-tag. A proteína GST-Nop17 foi ligada à resina Glutathiona sepharose, seguido pela incubação da outra proteína fusionada ao His-Tag. Finalmente, o material ligado foi eluído pela adição da Glutathiona reduzida. Em todos os ensaios, GST foi utilizada como controle negativo da interação.

4.0. Estudo *in vitro* de interação proteína-proteína por “thermal shift”

A técnica de Thermal Shift™, é um ensaio relativamente simples, sensível e rápido que foi utilizado para monitorar a interação entre as proteínas recombinantes GST-Nop17_N e His-Dre2_N, além de detectar a estabilidade térmica induzida pela mudança dessa interação. Quando uma proteína sofre um aumento de temperatura, as regiões hidrofóbicas são expostas permitindo que o corante Sypro Orange interaja com essas regiões, causando um aumento da fluorescência. A desnaturação térmica está diretamente relacionada com o aumento da fluorescência. Se duas proteínas interagem entre si, à princípio esta interação pode alterar o perfil de desnaturação dessas proteínas. Para o ensaio de interação entre proteínas pela técnica de Thermal Shift™ foram escolhidas as proteínas recombinantes que interagiram mais fortemente no ensaio de *pull-down*.

As proteínas recombinantes GST e GST-Nop17_N foram purificadas com resina Glutathiona-sepharose e His-Dre2_N com resina de Níquel-sepharose. Como controle negativo, foram utilizadas GST e His-Dre2_N.

A reação foi feita em 25µl com PBS, 2,5µl de Sypro Orange 100X e 5µl das proteínas recombinantes purificadas. A reação foi incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente, protegendo da luz. Depois, cada reação foi gradualmente aumentada na velocidade de 0,2°C/30 segundos, de 25°C a 95°C com um corte de 0,5%. O ensaio de desnaturação térmica foi realizado no aparelho Real Time-PCR. O Software Thermal Shift™ foi utilizado para calcular a T_m de cada perfil de fluorescência.

Fig. 11. Princípio da técnica de Thermal shift para desnaturação de proteínas. Com o aumento de temperatura, as proteínas sofrem um processo de desenovelamento, permitindo que as regiões hidrofóbicas sejam expostas para que o corante Sypro Orange interaja com essas regiões, causando um aumento da fluorescência. A desnaturação térmica está diretamente relacionada com o aumento da fluorescência.

4. RESULTADOS

Em *Saccharomyces cerevisiae*, Dre2 é uma proteína com *cluster* Fe/S essencial de 38,5 KDa, que apresenta um domínio conservado que contém 2 clusters Fe/S em sua região C-terminal, essenciais para sua função. Nop17 é uma proteína nucleolar de 39,5 KDa, não essencial para a viabilidade celular, que apresenta um domínio N-terminal envolvido no reconhecimento de motivos DSDD fosforilados, e uma região C-terminal com múltiplos motivos de desestabilização.

Em estudos prévios realizados no laboratório, foram identificadas as interações de Nop17 com diversas proteínas, várias delas envolvidas no processamento de rRNA, confirmando com outros experimentos o papel de Nop17 na montagem de snoRNPs de box C/D, que por sua vez, participam da maturação de rRNAs (Gonzales et al., 2005). Dre2 foi uma das proteínas isoladas por sua interação com Nop17 pelo ensaio de duplo-híbrido. A interação entre essas duas proteínas *in vivo* se dá de forma independente do *tag* utilizado, tanto com o domínio de ligação ao DNA de *lexA* (BD), como com o domínio de ativação da transcrição de *Gal4* (AD) de *Saccharomyces cerevisiae* (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados).

4.1. Determinação dos domínios de interação de Dre2 com Nop17

Com o objetivo de caracterizar o papel funcional da interação entre Nop17 e Dre2 e de se determinar seus domínios de interação, este trabalho foi iniciado com experimentos de confirmação da interação *in vitro* pelo ensaio de *pull-down*, usando proteínas recombinantes fusionadas a glutathione S-transferase (GST) e ao His *tag* (His6). As proteínas recombinantes GST-Nop17_{FL} (1-344), GST-Nop17_N (1-230), GST-Nop17_C (231-344), His-Dre2_{FL} (1-349), His-Dre2_N (1-133) e His-Dre2_C (134-349), representadas na Figura 12.A, foram expressadas em *Escherichia coli* em diferentes condições (Tabela.7).

Os extratos celulares expressando GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C e GST-Nop17_N foram incubadas com a resina Glutathione-sepharose, e após da lavagem da resina foram adicionados os extratos celulares expressando His-Dre2_{FL}, His-Dre2_C e His-Dre2_N. Após da lavagem, as proteínas foram eluídas com a adição de glutathione reduzida (Fig.12).

Os resultados obtidos confirmam que GST-Nop17_{FL} interage com His-Dre2_{FL} *in vitro*. Depois de confirmar a interação das duas proteínas inteiras, o mesmo método de *pull-down* foi utilizado para determinar a interação entre His-Dre2_{FL} com os mutantes GST-Nop17_C e GST-Nop17_N, para conhecer quais são os domínios de Nop17 importantes para a interação com Dre2. Os resultados mostram que os domínios C-terminal e N-terminal de Nop17 interagem com a proteína His-Dre2_{FL} (**Fig.12.B**).

A mesma abordagem foi utilizada para determinar os domínios de Dre2 envolvidos na interação com Nop17_{FL}, através de *pull-down*. Foram testados os mutantes His-Dre2_C e His-Dre2_N com a proteína Nop17_{FL}. Os resultados mostram que só a porção N-terminal de Dre2 interage com a proteína inteira Nop17_{FL} (**Fig.12.C**).

Finalmente, para conhecer os domínios de Nop17 envolvidos na interação com a porção N-terminal de Dre2, foram testadas as interações entre o mutante Dre2_N com os mutantes Nop17_C e Nop17_N. Os resultados mostram que o domínio N-terminal de Dre2 interage com os domínios N-terminal e C-terminal de Nop17, mas a interação mais forte ocorre entre Dre2_N e Nop17_N (**Fig.12.D**). Em paralelo a todos os ensaios, GST foi utilizada como controle negativo da interação.

Fig.12 Interação das proteínas Nop17 e Dre2 por *pull-down*. A) Esquema das proteínas utilizadas no ensaio de *pull-down*. Os mutantes de deleção de Nop17 e Dre2 foram clonados nos vetores pGEX e pET29, respectivamente. B) Interação de Dre2_{FL} com Nop17_{FL}, Nop17_N e Nop17_C. GST ou GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_N e GST-Nop17_C foram ligados na resina de glutationa sepharose, seguido pela incubação de His-Dre2_{FL}. C) Interação de Nop17_{FL} com Dre2_N. GST ou GST-Nop17_{FL}, foram ligadas na resina de glutationa sepharose, seguido pela incubação de His-Dre2_N ou His-Dre2_C. D) Interação de Dre2_N com Nop17_N e Nop17_C. GST, GST-Nop17_N ou GST-Nop17_C, foram ligadas na resina de glutationa sepharose, seguido pela incubação de His-Dre2_N. GST foi usado como controle negativo em todos os experimentos. As frações do Extrato Total (ET), Flow Through (FT), Lavagem (W) ou Eluição (E), foram separados por SDS-PAGE e transferidos para *Western blotting* com anticorpo contra anti-His e anti-GST.

Depois de identificar a interação entre o domínio N-terminal de Dre2 com os dois mutantes de deleção de Nop17 recombinantes nos ensaios *in vitro*, era importante determinar se Nop17 podia interagir com os domínios N-terminal e C-terminal da proteína Dre2 também com as proteínas isoladas de levedura.

Tendo em vista que foi mostrado que a proteína Dre2 pode ser fosforilada em oito resíduos de serina em sua porção C-terminal e em um resíduo de serina na região N-terminal, é possível que essas modificações possam afetar sua interação com Nop17. Para responder esta pergunta, foram utilizadas construções das porções N e C-terminal de Dre2 fusionadas a GFP (Green Fluorescent Protein). As construções GFP-Dre2_N e GFP-Dre2_C foram transformadas na cepa W303 de levedura. As cepas transformantes *W303::GFP-Dre2_N* e *W303::GFP-Dre2_C* foram utilizadas no ensaio de *pull-down* para testar a interação com as proteínas recombinantes GST-Nop17_{FL}, GST-Nop17_C e GST-Nop17_N expressadas em *E. coli*.

Os resultados obtidos do ensaio de *pull-down* confirmaram que Nop17_{FL} interage com o domínio N-terminal de Dre2 expressado tanto em bactéria como em levedura (**Fig.13.A**). Isso indica que o domínio N-terminal de Dre2 interage com Nop17 independentemente de modificações pós-traducionais que possam ocorrer em levedura. Além disso, os resultados mostram que Nop17 interage com o domínio C-terminal de Dre2 quando é expressa em levedura (**Fig.13.A**). Esse resultado mostra que as modificações pós-traducionais na região C-terminal de Dre2 são necessárias para a interação com Nop17_{FL}.

Depois de identificar a interação do domínio C-terminal de Dre2 expressada em levedura com a proteína inteira GST-Nop17_{FL}, foi realizado o ensaio de *pull-down* com o mesmo procedimento do experimento anterior, para conhecer quais são os domínios de Nop17 que interagem com o domínio C-terminal de Dre2 expressado em levedura. Para esse experimento, foram utilizadas as proteínas recombinantes GST-Nop17_C e GST-Nop17_N e *W303::GFP-Dre2_C*.

Os resultados obtidos mostram que só o domínio N-terminal de Nop17 interage com o domínio C-terminal de Dre2 quando é expressa em levedura (**Fig.13.B**). É interessante ressaltar que o domínio N-terminal de Nop17 pode reconhecer o motivo DSDD fosforilado, e que o domínio C-terminal de Dre2 contém uma sequência DSDD, em que a serina pode ser fosforilado. Como a interação entre Nop17_N e Dre2_C purificada de *E. coli* não ocorre, este resultado nos permite propor que o domínio N-terminal de Nop17 possa reconhecer o motivo DSDD somente depois de sua fosforilação.

Fig.13 Interação da proteína Nop17 com a proteína Dre2 expressada em levedura por *pull-down*.

A) Interação de Nop17_{FL} com Dre2_N, e Dre2_C. GST ou GST-Nop17_{FL} foram ligados na resina de glutationa sepharose, seguido pela incubação de GFP-Dre2_N ou de GFP-Dre2_C. **B) Interação de Dre2_N com Nop17_N.** GST ou GST-Nop17_{FL}, foram incubadas com GFP-Dre2_C. GST foi usado como controle negativo. As frações do Extrato Total (ET), Flow Through (FT), Lavagem (W) ou Eluição (E), foram separados por SDS-PAGE e analisadas por *Western blotting* com anticorpo contra anti-GFP e anti-GST.

4.2. Análise de interação de Dre2 com Nop17 por “Thermal Shift”

Os ensaios descritos acima para determinar os domínios de interação das proteínas Nop17 e Dre2 através do método de *pull-down* mostraram a interação direta entre essas proteínas. Com o objetivo de estudar em maior detalhe a interação direta das proteínas recombinantes Nop17 e Dre2, expressadas em bactéria, foi utilizado o ensaio de *thermal shift*. Para este experimento, as proteínas recombinantes GST, GST-Nop17_N e His-Dre2_N, expressadas em *E. coli*, foram purificadas por cromatografia de afinidade.

Para a primeira etapa de purificação, as proteínas recombinantes foram incubadas com resina de Glutathione-sepharose (para GST), ou Ni-sepharose (para His). Em uma segunda etapa de purificação, todas as eluições da primeira purificação foram incubadas com uma resina de Q-sepharose e eluídas com um gradiente de NaCl. As frações de Extrato total, Flow Through, e eluição foram analisadas por SDS-PAGE e coloração com coomassie blue (**Fig.14.A**).

Para uma etapa seguinte de purificação, foram escolhidas as alíquotas de eluição da coluna de Q-sepharose com 500mM de NaCl de GST-Nop17_N e o Flow Through de GST e His-Dre2_N desta coluna para ser dialisadas (**Fig.14.A**) e depois incubadas novamente com as resina de Glutathione-sepharose ou Ni-sepharose para maior purificação. As frações de Extrato total, Flow Through, Lavagem e Eluição de GST, GST-Nop17_N e His-Dre2_N foram separadas por SDS-PAGE e analisadas depois de coloração com nitrato de prata (**Fig.14.B**).

Fig.14 Purificação das proteínas GST, GST-Nop17_N e His-Dre2_N. **A)** Géis com proteínas das frações obtidas nas duas primeiras etapas de purificação por resina de Glutathione-sepharose e N-sepharose, seguidas por Q-sepharose, corado com coomassie **B)** Gel com amostras da última etapa de purificação incubadas novamente por resina de Glutathione-sepharose e Níquel-sepharose corado com nitrato de prata. ET₁ = Input; FT₂ = Material não ligado na resina, L = Lavagem e E₁ = Material eluído.

Os ensaios de *thermal shift* foram então realizados a fim de estudar a interação direta dos domínios N-terminais das proteínas Nop17 e Dre2. Neste experimento, conforme as proteínas recombinantes GST, GST-Nop17_N e Dre2_N são desnaturadas pelo aumento da temperatura, suas regiões hidrofóbicas são expostas e ocorre a interação com o corante Sypro Orange, sendo possível observar um aumento da fluorescência, parâmetro utilizado para monitorar a transição da proteína entre o estado enovelado e o desenovelado. Depois de atingir o pico máximo de emissão, a fluorescência diminui, provavelmente devido à precipitação do complexo do corante fluorescente e da proteína desnaturada.

Nestes testes de interação entre GST-Nop17_N e His-Dre2_N, foram utilizadas quantidades iguais das proteínas purificadas. Como controle negativo de interação, GST foi utilizada. O corante Sypro Orange sozinho foi utilizado como um controle adicional de não emissão de fluorescência (**Fig.15.A**). Os resultados mostraram que no desenovelamento térmico da proteína GST apresentou a T_m de 29,6°C (**Fig.15.B**), que pode corresponder à separação dos monômeros de GST, já que esta proteína forma dímeros (Harper et al., 2011). GST-Nop17_N apresentou uma T_m de 58,58°C, enquanto que Dre2_N apresentou uma T_m de 79,93°C (**Fig.15.D**). No teste de interação das proteínas recombinantes, observou-se que GST com His-Dre2_N o perfil obtido corresponde à soma dos perfis de GST e His-Dre2_N separados e a T_m de 72,55°C é bastante similar à T_m de His-Dre2_N (**Fig.15.E**), confirmando que estas proteínas não interagem. Também na incubação de GST-Nop17_N com His-Dre2_N, o perfil obtido correspondeu à soma dos dois perfis independentes, embora a T_m de 85,17° C, seja maior que a de His-Dre2_N sozinha (**Fig.15.F**). Este resultado pode indicar que a interação com Nop17 possa causar uma mudança conformacional em Dre2_N, o que ainda precisa ser confirmado.

Fig.15 Ensaio de *thermal shift* das proteínas purificadas GST, GST-Nop17_N e His-Dre2_N. **A)** Controle negativo do ensaio de Thermal Shift. Corante Sypro Orange. **B)** Perfil de fluorescência de GST. GST apresentou a T_m de 29,6 °C. **C)** Perfil de GST-Nop17_N. GST-Nop17_N apresentou a T_m de 58,58°C **D)** Perfil de His-Dre2_N. His-Dre2_N apresentou a T_m de 79,93°C **E)** Controle negativo de interação. GST foi incubada com His-Dre2_N. T_m de 72,55°C. **F)** Perfil de GST-Nop17_N com His-Dre2_N. T_m de 85,17°C. A análise da curva de melting determina a T_m (ponto médio da transição do desdobramento). Uma mudança na T_m indica uma mudança de estabilidade. Nas diferentes figuras são observados os perfis de transição do estado enovelado para desenovelado das proteínas.

4.3. Análise do efeito de Nop17 nos níveis de expressão e estabilidade de Dre2

Para estudar o possível efeito de Nop17 nos níveis de Dre2, primeiro foram determinados os níveis de expressão de Dre2 nas cepas selvagens W303 e BY4347, cultivadas a 30°C em meio YPD. O primeiro resultado mostra que as duas cepas apresentam níveis iguais das proteínas Dre2 e Arp2, utilizada como controle interno (**Fig.16.A**). Portanto, as características de cada cepa não influenciariam em nossos resultados.

Para analisar os níveis de expressão de Dre2 na ausência de Nop17, as cepas W303 e $\Delta nop17$, transformadas com os plasmídeos pUG34-Dre2_{FL}, pUG34-Dre2_N e pUG34-Dre2_C, foram cultivadas a temperatura permissiva (25°C) e restritiva (37°C) em meio YNB-Gli suplementado com os aminoácidos necessários. Os extratos celulares das cepas transformantes foram separados por SDS-PAGE e as proteínas analisadas por western blotting. Os resultados na cepa W303 mostram os níveis normais de expressão de Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N a 25°C e 37°C (**Fig.16.B e 17.A**). Este resultado mostra que os níveis de expressão de Dre2_{FL} e os mutantes de deleção diminuem a 37°C, o que não havia sido descrito. Portanto, esses resultados indicam que Dre2 é uma proteína termo-sensível.

Os níveis de expressão de Dre2_{FL} e os mutantes de deleção na cepa $\Delta nop17$ a 25°C e 37°C apresentam padrões de expressão bastante similares aos de W303, o que pode indicar que Nop17 não tenha efeito na expressão de Dre2. (**Fig.17.A**) Para avaliar melhor a termo-sensibilidade de Dre2 e o possível efeito de Nop17 nos seus níveis de expressão, decidimos testar os níveis de Dre2 a 30°C, temperatura ótima de crescimento de *S. cerevisiae*. Os resultados mostram que os níveis de Dre2_{FL}, Dre2_C e Dre2_N diminuem na cepa $\Delta nop17$ a 30°C, comparando-se com a cepa W303 (**Fig.16.C e 17.B**). Este resultado indica que Nop17 influencia os níveis de expressão de Dre2. Portanto, pode ser que Nop17 afete a estabilidade de Dre2.

Fig.16 Análise do efeito de Nop17 nos níveis de expressão de Dre2. **A)** Controle do fenótipo das cepas W303 e BY4347. As amostras foram analisadas por *Western blotting* utilizando anticorpos contra GFP e Arp2, utilizada como controle interno. **B)** Níveis de expressão de Dre2 e mutantes nas cepas selvagem e Δ nop17 a 25°C e 37°C. **C)** Ausência de Nop17 diminui os Níveis de Dre2 a 30°C. Diminuição nos níveis de Dre2 em ausência de Nop17.

A. **B.**

Fig.17 Quantificação das bandas obtidas por *Western blotting* de Dre2 nas cepas W303 e $\Delta nop17$ em diferentes temperaturas. **A)** Níveis de expressão de Dre2 e mutantes nas cepas W303 e $\Delta nop17$ a 25°C e 37°C. Diminuição nos níveis de Dre2 e mutantes de deleção a 37°C. **B)** Ausência de Nop17 diminui os Níveis de Dre2 a 30°C. Diminuição nos níveis de Dre2 em ausência de Nop17. A normalização foi feita com base na quantidade do sinal de Arp2. Para a quantificação foi utilizado o software ImageJ.

Para testar essa hipótese, foi realizado um ensaio de análise de estabilidade proteica. As cepas transformantes *W303::Dre2_{FL}* e *$\Delta nop17$ /GFP-Dre2_{FL}* foram cultivadas aproximadamente por 14 horas a 25°C, 30°C e 37°C e tratadas com cicloheximida para a inibição da síntese de proteínas, ponto a partir do qual foram coletadas alíquotas das culturas nos pontos de 0, 10, 20, 40, 60 e 120 min. Finalmente, as alíquotas foram analisadas por Western blotting.

Os resultados indicam que a estabilidade de Dre2 seja afetada pela ausência de Nop17 a 30°C e 37°C (**Fig.18**). Esses resultados confirmam que Dre2 é instável a 37°C e que Nop17 pode influenciar sua estabilidade.

Fig.18 Análise de estabilidade de Dre2 em ausência de Nop17 em diferentes temperaturas. **A)** 25°C. **B)** 37°C. **C)** 30°C. As amostras foram coletadas nos pontos de tempo indicados acima e analisadas por *Western blotting* com anticorpo contra GFP para a detecção de Dre2. Arp2 foi utilizada como controle interno.

4.4. Efeito de Tah1 e Rsa1 nos níveis de Dre2

Tah1 é uma proteína que faz parte do complexo R2TP e é importante para a estabilidade de Nop17 (Prieto et al., 2015). Como mostrado acima, Dre2 é mais instável na ausência de Nop17. Considerando-se que Tah1 é importante para a estabilidade de Nop17, é possível que Tah1 afete, mesmo que indiretamente, a estabilidade de Dre2.

Além disso, a proteína Rsa1 apesar que não fazer parte do complexo R2TP, esta proteína afeta a estabilidade de Nop17 (Prieto et al.,2015).

Sabendo que Tah1 e Rsa1 desempenham um papel importante na estabilidade de Nop17, os níveis de expressão de Dre2 foram testados nas cepas $\Delta tah1$ e $\Delta rsa1$, transformadas com o plasmídeo pUG34-Dre2_{FL} a 25°C e 37°C. Os resultados mostram que, comparando-se as cepas W303, $\Delta tah1$ e $\Delta rsa1$, os níveis de Dre2 diminuem bastante na ausência de Tah1 a 25°C e decrescem ainda mais a 37°C (Fig.19 e 20). Este resultado indica que o subcomplexo Nop17-Tah1 pode estar envolvido na manutenção dos níveis de Dre2, auxiliando, provavelmente na formação do complexo Dre2-Tah18. Já a depleção de Rsa1 não afetou os níveis de Dre2.

Fig.19 Análise do efeito de $\Delta tah1$ e $\Delta rsa1$ nos níveis de expressão de Dre2 em diferentes temperaturas. As amostras foram analisadas por *Western blotting* com anticorpo contra GFP. Arp2 foi utilizada como controle interno.

Fig.20 Quantificação das bandas de Dre2 nas cepas W303, $\Delta tah1$ e $\Delta rsa1$. Diminuição nos níveis de Dre2 em ausência de Tah1 a 25°C e 37°C. A normalização foi feita com base na quantidade do sinal de Arp2. Para a quantificação foi utilizado o software ImageJ.

4.5. Análise do efeito de Dre2 nos níveis de expressão e estabilidade de Nop17

Para determinar se Dre2 também pode influenciar os níveis de expressão e estabilidade de Nop17, foram usadas as cepas W303 e $\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2$, transformadas separadamente com os plasmídeos pUG34-Nop17_{FL}, pUG34-Nop17_N e pUG34-Nop17_C.

Como controle da expressão de GFP em meio com glicose ou galactose, a cepa $\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2$ foi transformada com o plasmídeo pUG34 vazio. As cepas transformantes foram cultivadas em meio YNB-Glicose e em YNB-Gal a 30°C. A expressão de Dre2 é reprimida em glicose na cepa condicional $\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2$.

O primeiro resultado demonstra que os níveis de expressão de GFP na cepa $\Delta dre2/GAL::Dre2-GFP$ são similares em glicose e galactose (**Fig.21**). Os resultados mostram que na cepa transformante $\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_{FL}$, os níveis de expressão de Nop17_{FL} são mais baixos em glicose (**Fig.21 e 22**). Este resultado indica que Dre2 é importante para a manutenção dos níveis de Nop17.

Fig.21 Análise do efeito de Dre2 nos níveis de expressão de Nop17. O ensaio de níveis de expressão de Nop17 em ausência de Dre2 foi realizado em meio de Glicose e Galactose a 30 °C. As cepas WT transformadas com os plasmídeos pUG34-Nop17_{FL}, pUG34-Nop17_N e pUG34-Nop17_C cultivadas nas mesmas condições foram usadas como controle negativo. As amostras foram analisadas por *Western blotting* com anticorpo contra GFP para a detecção de Nop17. Como controle da proteína total carregada nos geles foi utilizado o anticorpo Arp2.

Fig.22 Quantificação das bandas de Nop17 nas cepas W303 e $\Delta dre2$ em galactose e glicose. Diminuição nos níveis de Nop17 e mutantes de deleção em ausência de Dre2. A normalização foi feita com base na quantidade do sinal de Arp2. Para a quantificação foi utilizado o software ImageJ.

Para testar se Dre2 influencia a estabilidade de Nop17, as cepas transformantes $W303::Nop17_{FL}$ e $\Delta dre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_{FL}$ foram cultivadas aproximadamente por 14 horas em meio de glicose e galactose a 30°C. Depois da adição de cicloheximida, alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo de 0, 10, 20, 40, 60 e 120 min. Os resultados mostram que Nop17 é mais instável na ausência de Dre2 (**Fig.23**).

Fig.23 Análise do efeito de Dre2 na estabilidade de Nop17. A) As células W303 e $\Delta Dre2$ tratadas com ciclohexamida depois de incubadas a 30°C com meio galactose. B) As células W303 e $\Delta Dre2$ tratadas com ciclohexamida depois de incubadas a 30°C com meio glicose. As amostras foram coletadas nos pontos de tempo indicados acima e analisadas por *Western blotting* com anticorpo contra GFP para a detecção de Nop17. Arp2 foi utilizada como controle interno.

Como demonstrado aqui, Dre2 afeta a estabilidade de Nop17. Resta ainda determinar se este efeito é direto, ou seja, se Dre2 transfere um *cluster* de Fe/S para Nop17, ou indireto.

4.6. Localização subcelular de Nop17

Complementando a caracterização do papel funcional da interação de Nop17 e Dre2, estudou-se a localização subcelular de Nop17 na ausência de Dre2, já que Dre2 afeta a estabilidade de Nop17, é possível que ela também afete a localização de Nop17.

Para testar essa hipótese, as cepas transformadas *W303::GFP-Nop17_{FL}*, *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP*, *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_{FL}*, descritas anteriormente, foram incubadas em meio com glicose ou galactose a 30°C. As culturas foram analisadas por microscopia de fluorescência. A localização da proteína Nop17 e mutantes de deleção foram monitoradas na presença e ausência de Dre2, utilizando o meio de glicose para reprimir o promotor Gal1 e o meio galactose para ativar a expressão de Dre2.

A cepa *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP* foi utilizada como controle para mostrar que a localização de GFP não é afetada pela fonte de carbono do meio (**Fig.24.A**). Os resultados de análise de GFP-Nop17 mostram que sua localização não é afetada pela ausência de Dre2, continuando concentrada no núcleo (**Fig.24.B e C**).

Fig.24 Localização subcelular de GFP-Nop17. A) Cepa *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP* incubada a 30°C com meio de Galactose e Glicose, B) Cepas *W303::GFP-Nop17_{FL}* e *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_{FL}* incubadas em meio de Galactose e (C) Glicose a 30°C, foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

A localização dos mutantes de Nop17 também foram testados na ausência de Dre2. Os resultados obtidos mostram que a ausência de Dre2 também não afeta a localização dos mutantes de deleção de Nop17 (Fig.25.A e B).

Fig.25 Localização subcelular de GFP-Nop17_c. A) Cepas *W303::GFP-Nop17_c* e *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_c* incubadas em meio de Galactose e (B) Glicose a 30°C), foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

Fig.26 Localização subcelular de GFP-Nop17_N. A) Cepas *W303::GFP-Nop17_N* e *Δdre2/YCp111-Gal::Dre2/GFP-Nop17_N* incubadas em meio Galactose e (B) Glicose a 30°C, foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

4.7. Localização subcelular de Dre2

Neste trabalho, era importante também determinar se Nop17 pode afetar a localização de Dre2. Para isso, as cepas *W303::GFP-Dre2_{FL}*, *Δnop17::GFP* e *Δnop17::GFP-Dre2_{FL}* foram analisadas por microscopia de fluorescência. Os resultados, ainda preliminares, mostram que Dre2 está concentrada no citoplasma na cepa *W303::GFP-Dre2_{FL}* a 30°C, mas também parece estar presente no núcleo. Na cepa *Δnop17::GFP-Dre2_{FL}* a 30°C, por outro lado, parece haver uma redução de Dre2 no núcleo, concentrando-se no citoplasma (Fig.27.A). Os mesmos resultados foram obtidos com as cepas incubadas em diferentes temperaturas, a 25°C (Fig.27.B).

A 37°C, o sinal mais forte de Dre2 no núcleo não é mais visualizado, evidenciando tem uma alteração na localização de Dre2 nesta condição (Fig.27.B).

Fig.27 Localização subcelular de GFP-Dre2. A) Cepas *W303::GFP-Dre2_{FL}* e *Δnop17::GFP-Dre2_{FL}* incubadas em Glicose a 30°C (B) a temperatura permissiva (25°C) e a temperatura restritiva (37°C), foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

Complementando a análise de localização de Dre2, decidiu-se testar a relação dos mutantes de deleção em ausência de Nop17. Para esse experimento, as cepas *W303::GFP-Dre2_C*, *W303::GFP-Dre2_N*, $\Delta nop17::GFP-Dre2_C$ e $\Delta nop17::GFP-Dre2_N$, foram incubadas em glicose a 25°C, 30°C e 37°C e analisadas por microscopia de fluorescência. Os resultados mostram que na ausência de Nop17, os mutantes de deleção de Dre2 parecem se concentrar em grânulos citoplasmáticos, podendo corresponder a complexos, como o degradossomo (Fig.28).

Fig.28. Localização subcelular de GFP-Dre2_C. Cepas *W303::GFP-Dre2_C* e $\Delta Nop17::GFP-Dre2_C$ incubadas em Glicose a 30°C, 25°C e 37°C foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

Fig.29. Localização subcelular de GFP-Dre2_N. Cepas *W303::GFP-Dre2_N* e *ΔNop17::GFP-Dre2_N* incubadas em Glicose a 30°C, 25°C e 37°C foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

Dre2 também ficou concentrada em grânulos citoplasmáticos na ausência de Tah1, indicando um efeito do complexo R2TP na manutenção da estrutura de Dre2, e possivelmente na estabilização do complexo Dre2-Tah18 (Fig.30).

Fig.30 Localização subcelular de GFP-Dre2 em ausência de Tah1 e Rsa1. Cepas *W303::GFP-Dre2_{FL}*, *Δtah1::GFP-Dre2_{FL}* e *Δrsa1::GFP-Dre2_{FL}* incubadas em Glicose a 30°C, foram analisadas por Microscopia de Fluorescência. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. As sobreposições (merge) foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

5. DISCUSSÃO

Nop17 foi identificada inicialmente em nosso laboratório por sua interação com a subunidade do exossomo, Rrp43 (Gonzales et al., 2005). Nop17 foi também caracterizada como uma subunidade do complexo R2TP, co-chaperone de Hsp90 (Zhao et al., 2005). R2TP é responsável pelo reconhecimento de proteínas alvo e pelo direcionamento de Hsp90 até elas, para a correta montagem de complexos multiproteicos (Eckert et al., 2010). Foram também identificadas no laboratório, várias proteínas interagindo com Nop17, cada uma fazendo parte de um complexo multiproteico nuclear diferente, todos envolvidos em controle de expressão gênica (Gonzales & Oliveira, 2005, tese de doutorado). Entretanto, dentre estas proteínas estava Dre2, uma proteína com *cluster* de Fe/S, que também faz parte de um complexo com várias subunidades, CIA, envolvido na transferência de *clusters* Fe/S para proteínas alvo no citoplasma (Zhang et al., 2008).

Um trabalho inicial de caracterização da função de Dre2 em nosso laboratório mostrou que sua interação com Nop17 se dá de forma direta, independentemente de outras proteínas de levedura (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados). Esse trabalho mostrou ainda que a depleção de Dre2 afeta o processamento de pré-RNA, por defeitos nas etapas iniciais desta via, o que provavelmente deve ser um efeito indireto da deficiência de *clusters* Fe/S em proteínas envolvidas em maturação de ribossomos (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados). Esses dados iniciais nos levaram a perguntar sobre o papel funcional da interação Nop17-Dre2. Nop17 seria importante para direcionar Hsp90 para Dre2 durante a montagem do complexo CIA, ou Dre2 poderia transferir um *cluster* de Fe/S para Nop17? Para responder essas perguntas, este trabalho teve como objetivos caracterizar melhor a interação entre Nop17 e Dre2 e determinar seus domínios de interação para tentar esclarecer o papel funcional desta interação.

Como mostrado aqui, o domínio N-terminal de Nop17, que é responsável pela interação desta proteína com alvos de Hsp90 (Jimenez et al., 2012), também está envolvido na interação com Dre2. A porção C-terminal de Nop17 está envolvida na sua complexação com Tah1 e como mostrado aqui, interagiu muito fracamente com Dre2, provavelmente devido à tendência desta região de Nop17 de formar agregados quando não associada a Tah1 (Jimenez et al., 2012). Estes dados reforçam a hipótese de que Dre2 interage com o

complexo R2TP via Nop17, o que pode indicar que Dre2 seja alvo de Hsp90 durante a montagem do complexo CIA.

Os resultados de determinação dos domínios de Dre2 envolvidos na interação com Nop17 mostraram que somente a porção N-terminal de Dre2 interagiu com Nop17 em ensaios de *pull-down* de proteínas recombinantes. Este resultado foi inesperado porque Nop17 pode reconhecer o motivo DSDD fosforilado em proteínas alvo (Hořejší et al., 2010; Pal et al., 2014; von Morgen et al., 2017) e este motivo está presente na porção C-terminal de Dre2. Entretanto, a interação de Nop17 com a porção C-terminal de Dre2 foi confirmada quando utilizamos em ensaios de *pull-down* Nop17 purificada de *E. coli* e Dre2-C de levedura, o que fortalece a hipótese de que Nop17 somente reconheça este motivo depois dele ter sido fosforilado. Mais experimentos serão realizados para confirmar a fosforilação de Dre2 quando associada a Nop17.

Utilizamos também neste trabalho o método de *thermal shift* para estudar a interação entre Nop17 e Dre2. Os resultados obtidos são ainda preliminares, mas mostraram uma alteração da T_m quando as duas proteínas estão presentes, o que pode indicar uma interação entre elas. Esses ensaios precisam ser repetidos para podermos confirmar a possível interação de Nop17 também com a porção N-terminal de Dre2.

Ainda com o objetivo de determinar o papel funcional da interação entre Nop17 e Dre2, analisamos o efeito da depleção de uma destas proteínas nos níveis de expressão da outra. Como mostrado aqui, Dre2 está presente em níveis mais baixos na ausência de Nop17, efeito ainda exacerbado quando as células são incubadas a 37°C. Estes resultados reforçam ainda mais a hipótese da importância do complexo R2TP para a correta montagem de Dre2 no complexo CIA. Esta hipótese foi ainda mais fortalecida com a demonstração de que a depleção de Tah1, outra subunidade do R2TP, também levou à diminuição dos níveis de Dre2.

De forma muito interessante, a depleção de Dre2 também afetou a estabilidade de Nop17, mais uma vez levando à hipótese de que Nop17 possa receber um *cluster* de Fe/S de Dre2. Outra possibilidade seria a de que a interação Nop17-Dre2 estabilize Nop17. Futuros experimentos vão mostrar se Nop17 também é desestabilizada em células expressando mutantes de Dre2. É importante ressaltar que dados anteriores do laboratório mostraram que His-Nop17 e His-Dre2 purificadas de *E. coli* apresentavam uma coloração amarronzada quando eram imobilizadas em resina de Ni-sepharose, indicando sua ligação a

ferro (Goldfeder & Oliveira, dados não publicados). A porção N-terminal de Nop17 (região de interação com Dre2) contém 10 cisteínas, que potencialmente poderiam se ligar a um *cluster* de Fe/S.

O possível papel da interação Nop17-Dre2 na localização subcelular destas proteínas também foi investigado. Como mostrado aqui, a depleção de Dre2 não afeta a localização predominantemente nuclear de Nop17. Foi interessante observar, entretanto, que os mutantes de deleção de Nop17 também estão concentrados no núcleo, o que indica que esta proteína seja transportada para o núcleo complexada a outra, provavelmente Tah1, ou já ligadas a Rvb1 e Rvb2 na forma do complexo R2TP.

Já Dre2 é uma proteína principalmente citoplasmática, mas também presente no núcleo. Esta localização nuclear parece ser dependente do complexo R2TP, já que a depleção de Nop17 ou de Tah1 levam a uma diminuição do sinal de Dre2 no núcleo. Apesar destes resultados precisarem ser confirmados, eles reforçam a hipótese de que R2TP seja necessário para a interação de Dre2 com outras proteínas, sejam elas subunidades do complexo CIA, ou outras proteínas celulares.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados mostrados aqui, podemos concluir que a subunidade do complexo R2TP, Nop17, interage com Dre2 através de sua porção N-terminal, possivelmente reconhecendo o motivo DSDD fosforilado na porção C-terminal de Dre2. Esta interação é importante para a estabilidade de Dre2 e para a sua interação com outras proteínas celulares, provavelmente durante a montagem do complexo CIA. Além disso, neste trabalho também são mostrados resultados que indicam que Dre2 possa transferir um *cluster* de Fe/S para a porção N-terminal de Nop17, o que ainda precisa ser confirmado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Applied biosystem by life technologies. (2011) Protein Thermal Shift™ technology.
- Back, R., Dominguez, C., Rothé, B., Bobo, C., Beaufils, C., Moréra, S., ... & Manival, X. (2013). High-resolution structural analysis shows how Tah1 tethers Hsp90 to the R2TP complex. *Structure*, 21(10), 1834-1847.
- Bizarro, J., Charron, C., Boulon, S., Westman, B., Pradet-Balade, B., Vandermoere, F., ... & Lamond, A. (2014). Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J Cell Biol*, 207(4), 463-480.
- Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., ... & Lamond, A. I. (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Molecular cell*, 39(6), 912-924.
- Brown, N. M., Anderson, S. A., Steffen, D. W., Carpenter, T. B., Kennedy, M. C., Walden, W. E., & Eisenstein, R. S. (1998). Novel role of phosphorylation in Fe-S cluster stability revealed by phosphomimetic mutations at Ser-138 of iron regulatory protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15235-15240.
- Burroughs, A. M., & Aravind, L. (2014). Analysis of two domains with novel RNA-processing activities throws light on the complex evolution of ribosomal RNA biogenesis. *Frontiers in genetics*, 5.
- Calore, F., Lovat, F., & Garofalo, M. (2013). Non-coding RNAs and cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 17085-17110.
- Dieci, G., Preti, M., & Montanini, B. (2009). Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*, 94(2), 83-88.
- Dos Santos, P. C., & Dean, D. R. (2010). Bioinorganic chemistry: Electrons in Fe-S protein assembly. *Nature chemical biology*, 6(10), 700-701.
- Eickhoff, P., & Costa, A. (2017). Escorting Client Proteins to the Hsp90 Molecular Chaperone. *Structure*, 25(7), 964-965.
- Ellis, J. C., Brown, D. D., & Brown, J. W. (2010). The small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) database. *Rna*, 16(4), 664-666.
- Fernández-Pevida, A., Kressler, D., & de la Cruz, J. (2015). Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(2), 191-209.

- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., & Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313, 17-42.
- Gonzales, F. A., Zanchin, N. I., Luz, J. S., & 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.
- Granato, D. C., Gonzales, F. A., Luz, J. S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G. M., & Oliveira, C. C. (2005). Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS journal*, 272(17), 4450-4463.
- Granato, D. C., Machado-Santelli, G. M., & Oliveira, C. C. (2008). Nop53p interacts with 5.8 S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *The FEBS journal*, 275(16), 4164-4178.
- Granneman, S., & Baserga, S. J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Experimental cell research*, 296(1), 43-50.
- Guthrie, C., & Fink, G. R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*. 194: 3-933
- Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, 259-280.
- Hořejší, Z., Takai, H., Adelman, C. A., Collis, S. J., Flynn, H., Maslen, S., ... & Boulton, S.J. (2010). CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Molecular cell*, 39(6), 839-850.
- Hořejší, Z., Stach, L., Flower, T. G., Joshi, D., Flynn, H., Skehel, J. M., ... & Boulton, S. J. (2014). Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell reports*, 7(1), 19-26.
- Huen, J., Kakiyama, Y., Ugwu, F., Cheung, K. L., Ortega, J., & Houry, W. A. (2010). Rvb1–Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled 8th International Conference on AAA Proteins and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 88(1), 29-40.

- Inoue, M., Saeiki, M., Egusa, H., Niwa, H., & Kamisaki, Y. (2010). PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 403(3), 340-344.
- Jha, S., & Dutta, A. (2009). RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Molecular cell*, 34(5), 521-533.
- Kakihara, Y., & Houry, W. A. (2012). The R2TP complex: discovery and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(1), 101-107.
- Kakihara, Y., Makhnevych, T., Zhao, L., Tang, W., & Houry, W. A. (2014). Nutritional status modulates box C/D snoRNP biogenesis by regulated subcellular relocalization of the R2TP complex. *Genome biology*, 15(7), 404.
- Khanna, M., Wu, H., Johansson, C., Caizergues-Ferrer, M., & Feigon, J. (2006). Structural study of the H/ACA snoRNP components Nop10p and the 3' hairpin of U65 snoRNA. *Rna*, 12(1), 40-52.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janáky, T., ... & Lill, R. (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *The EMBO journal*, 24(3), 589-598.
- Konikkat, S., & Woolford, J. L. (2017). Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochemical Journal*, 474(2), 195-214.
- Kressler, D., Linder, P., & de la Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(12), 7897-7912.
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Lafontaine, D. L., & Tollervey, D. (2000). Synthesis and assembly of the box C+ D small nucleolar RNPs. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2650-2659.
- Lill, R. (2007). Iron-sulfur clusters: Basic building blocks for life. *Int J Parasito*, 1(3), 17-20.
- Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 669-700.
- Lill, R. (2014). Only functional localization is faithful localization. *Microbial Cell*, 1(4), 115.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429.

- Massenet, S., Bertrand, E., & Verheggen, C. (2016). Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA biology*, 1-13.
- Nano, N., & Houry, W. A. (2013). Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 368(1617), 20110399.
- Netz, D. J., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlenhoff, U., Pierik, A. J., & Lill, R. (2010). Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature chemical biology*, 6(10), 758-765.
- Netz, D. J., Genau, H. M., Weiler, B. D., Bill, E., Pierik, A. J., & Lill, R. (2016). The conserved protein Dre2 uses essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly. *Biochemical Journal*, 473(14), 2073-2085.
- Paci, A., Liu, X. H., Huang, H., Lim, A., Houry, W. A., & Zhao, R. (2012). The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43205-43214.
- Paci, A., Liu, P. X., Zhang, L., & Zhao, R. (2016). The Proteasome Subunit Rpn8 Interacts with the Small Nucleolar RNA Protein (snoRNP) Assembly Protein Pih1 and Mediates Its Ubiquitin-independent Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(22), 11761-11775.
- Pal, M., Morgan, M., Phelps, S. E., Roe, S. M., Parry-Morris, S., Downs, J. A., ... & Prodromou, C. (2014). Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure*, 22(6), 805-818.
- Pearl, L. H., & Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 271-294.
- Peleh, V., Riemer, J., Dancis, A., & Herrmann, J. M. (2014). Protein oxidation in the intermembrane space of mitochondria is substrate-specific rather than general. *Microbial Cell*, 1(3), 81.
- Pierik, A. J., Netz, D. J., & Lill, R. (2009). Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nature Protocols*, 4(5), 753-766.
- Prieto, M. B., Georg, R. C., Gonzales-Zubiate, F. A., Luz, J. S., & Oliveira, C. C. (2015). Nop17 is a key R2TP factor for the assembly and maturation of box C/D snoRNP complex. *BMC molecular biology*, 16(1), 7.

- Puerta, C. J. (2008). Implications of Small Nucleolar RNA-Protein Complexes Discoveries. Recent patents on DNA & gene sequences, 2(1), 1-5.
- Quinternet, M., Rothé, B., Barbier, M., Bobo, C., Saliou, J. M., Jacquemin, C., ... & Branlant, C. (2015). Structure/Function Analysis of Protein–Protein Interactions Developed by the Yeast Pih1 Platform Protein and Its Partners in Box C/D snoRNP Assembly. *Journal of molecular biology*, 427(17), 2816-2839.
- Ranatunga, W., Gakh, O., Galeano, B. K., Smith, D. Y., Söderberg, C. A., Al-Karadaghi, S., ... & Isaya, G. (2016). Architecture of the Yeast Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Assembly Machinery THE SUB-COMPLEX FORMED BY THE IRON DONOR, Yfh1 PROTEIN, AND THE SCAFFOLD, Isu1 PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 291(19), 10378-10398.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R., & Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic acids research*, 35(5), 1452-1464.
- Rivera-Calzada, A., Pal, M., Muñoz-Hernández, H., Luque-Ortega, J. R., Gil-Carton, D., Degliesposti, G., ... & Llorca, O. (2017). The structure of the R2TP complex defines a platform for recruiting diverse client proteins to the HSP90 molecular chaperone system. *Structure*, 25(7), 1145-1152.
- Rothé, B., Back, R., Quinternet, M., Bizarro, J., Robert, M. C., Blaud, M., ... & Branlant, C. (2013). Characterization of the interaction between protein Snu13p/15.5 K and the Rsa1p/NUFIP factor and demonstration of its functional importance for snoRNP assembly. *Nucleic acids research*, 42(3), 2015-2036.
- Rothé, B., Saliou, J. M., Quinternet, M., Back, R., Tiotiu, D., Jacquemin, C., ... & Moréra, S. (2014). Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. *Nucleic acids research*, 42(16), 10731-10747.
- Rothé, B., Manival, X., Rolland, N., Charron, C., Senty-Ségault, V., Branlant, C., & Charpentier, B. (2017). Implication of the box C/D snoRNP assembly factor Rsa1p in U3 snoRNP assembly. *Nucleic Acids Research*.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Detection of protein-protein interactions using the GST fusion protein pulldown technique. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3757.
- Sherman, F., Fink, GR and Hicks, JB. (1986). Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold spring harbor laboratory press.
- Soler, N., Delagoutte, E., Miron, S., Facca, C., Baille, D., d'Autreaux, B., ... & Huang, M. E. (2011). Interaction between the reductase Tah18 and highly conserved Fe-S containing Dre2 C-terminus is essential for yeast viability. *Molecular microbiology*, 82(1), 54-67.
- Soler, N., Craescu, C. T., Gallay, J., Frapart, Y. M., Mansuy, D., Raynal, B., ... & Vernis, L. (2012). AS-adenosylmethionine methyltransferase-like domain within the essential, Fe-S-containing yeast protein Dre2. *The FEBS journal*, 279(12), 2108-2119.
- Song, G., Cheng, C., Li, Y., Shaw, N., Xiao, Z. C., & Liu, Z. J. (2014). Crystal structure of the N-terminal methyltransferase-like domain of anamorsin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(6), 1066-1071.
- Stehling, O., & Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), a011312.
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance.
- Tschochner, H., & Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology*, 13(5), 255-263.
- Van Nues, R. W., Granneman, S., Kudla, G., Sloan, K. E., Chicken, M., Tollervey, D., & Watkins, N. J. (2011). Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing. *The EMBO journal*, 30(12), 2420-2430.
- Venema, J., & Tollervey, D. (1995). Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(16), 1629-1650.
- Venema, J., & Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics*, 33(1), 261-311.
- Verheggen, C., Pradet-Balade, B., & Bertrand, E. (2015). SnoRNPs, ZNHIT proteins and the R2TP pathway. *Oncotarget*, 6(39), 41399.

- Vernis, L., Facca, C., Delagoutte, E., Soler, N., Chanet, R., Guiard, B., ... & Baldacci, G. (2009). A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. *PLoS One*, 4(2), e4376.
- von Morgen, P., Hořejší, Z., & Macurek, L. (2015). Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress. *Frontiers in genetics*, 6.
- von Morgen, P., Burdova, K., Flower, T. G., O'Reilly, N. J., Boulton, S. J., Smerdon, S. J & Hořejší, Z. (2017). MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex. *Oncogene*.
- Watkins, N. J., & Bohnsack, M. T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 397-414.
- Woolford, J. L., & Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643-681.
- Yang, Z., Lin, J., & Ye, K. (2016). Box C/D guide RNAs recognize a maximum of 10 nt of substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201604872.
- Zhang, Y., Lyver, E. R., Nakamaru-Ogiso, E., Yoon, H., Amutha, B., Lee, D. W., ... & Dancis, A. (2008). Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 28(18), 5569-5582.
- Zhang, Y., Li, H., Zhang, C., An, X., Liu, L., Stubbe, J., & Huang, M. (2014). Conserved electron donor complex Dre2-Tah18 is required for ribonucleotide reductase metal cofactor assembly and DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), E1695-E1704.
- Zhang, Y., Yang, C., Dancis, A., & Nakamaru-Ogiso, E. (2016). EPR studies of wild type and mutant Dre2 identify essential [2Fe—2S] and [4Fe—4S] clusters and their cysteine ligands. *The Journal of Biochemistry*, mvw054.
- Zhao, R., Kakihara, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., ... & Yip, C. M. (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J Cell Biol*, 180(3), 563-578.
- Zubiate, F. A. G. (2005). Caracterização da função da proteína Nop17p de *Saccharomyces cerevisiae* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

LISTA DE ANEXOS

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Fiorella Guadalupe Orellana Peralta

Nacionalidade: Peruana

Naturalidade: Lima-Perú

Data de nascimento: 06-02-1986

CPF: 07443261179

RG:G1796856

Endereço residencial: Rua Armando d' Almeida, 88, Jardim Rizzo, São Paulo.

CEP: 05587010

Telefone: +55(11)963047474

e-mail: forellanaperalta@gmail.com, fguadalupe@usp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Curso de graduação:

- Biologia pela Faculdade de Ciências Naturais e Matemática – Universidad Nacional Federico Villarreal(UNFV). Período: 2005 - 2009.

- Licenciatura: UNFV

Título da tese: Detección de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis* mediante La Reacción en Cadena de la Polimerasa en pacientes de 0 a 17 años con diagnóstico de Infecciones Respiratorias Agudas. Período: 2010-2012.

Colegio de Biólogos del Perú. Colegiatura- Matrícula N° 10136. 2013

Curso de pós graduação:

- Segunda Especialidade em Biologia Molecular e Genética. Universidad Nacional Federico Villarreal. Período: Setembro 2013 – Novembro 2014

- Mestrado em Bioquímica com ênfase em biologia molecular na Universidade de São Paulo - Departamento de Bioquímica, Instituto de Química.

Título da tese: Caracterização da interação entre a subunidade do R2TP, Nop17, e da proteína de transferência de *clusters* de Fe/S, Dre2, em *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientadora: Dr. Carla C. Oliveira. Período: Setembro 2015- Dezembro 2017. Bolsa de estudos financiada pelo CNPq.

Idiomas

- Francês: Alianza Francesa de Lima (Intermediário-Avançado). Diploma DELF A2.
- Inglês: Centro de Idiomas de San Martin de Porres (Intermediário).

Práticas pré-profissionais

- Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé –Dpto. de Ayuda al Diagnóstico-Servicio de Patología Clínica. Período: Janeiro 2009- Abril 2009.
- Laboratório de Biología Molecular e Celular da Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) - Instituto de Investigación Nutricional (IIN). Período: Setembro 2009-Dezembro 2009

Experiência Laboratorial

- Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) - Instituto de Investigación Nutricional (IIN). **BOLSISTA**. Período: Janeiro 2010 – Dezembro 2012.
- Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) - Instituto de Investigación Nutricional (IIN). Período: Janeiro 2013 – Dezembro 2014.
- Docente Investigador del Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). Período: Março 2013 – Julho 2015.
Docente das disciplinas:
 - Bioquímica, Biología Celular y Molecular II para Medicina.
 - Bioquímica, Biología Celular y Molecular III para Medicina.
 - Bases Moleculares para Odontología.

Prêmio

- Docente Prata-Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. 2015.

Participação em projetos de Pesquisa

- **Diagnóstico de virus respiratorios y gérmenes atípicos en pacientes inmunodeprimido mediante RT-PCR- multiplex.** Ministerio de la Presidencia en el Programa de Ciencia y Tecnología. FINCyT-PIN-2008. Fondos del BID. Período: Outubro 2008 - Março 2011.
- **“Study of the mutations of resistance of the influenza virus to antiviral drugs. Prevalence and implication in the clinic and the nasopharyngeal viral load”. TWAS** (The academy of sciences for the developing world). Período: Abril 2011 – Agosto 2012.
- **Estudio de genes de resistencia GyrA, ParC, rplD, rplV y 23 S para *Bordetella pertussis*.** Financiamiento Interno Laboratorio de Biología Molecular UPC. Período: Janeiro - Agosto 2012.
- **Estudio de pacientes con Gastroenteritis Aguda del Hospital Regional de Cajamarca.** Financiamiento Interno Laboratorio de Biología Molecular UPC. Período: Junho 2012 – Março 2013.
- **Identificación de *Haemophilus influenzae* tipo b en pacientes de 0 a 17 años con diagnóstico de Infecciones Respiratorias Agudas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia.** Período: Outubro 2014-Março 2015.

Congresso

- VI Congreso Nacional de Estudiantes de Biología.2005. (Lima-Perú). **Asistente.**
- VI Congreso Internacional de Estudiantes de Ciencias Biológicas, IX Congreso Nacional de Estudiantes de Biología y II Symposium Nacional de Estudiantes de Educación en Ciencias Biológicas. 2008.(Piura-Perú). **Asistente** Aplicaciones de la Biotecnología en Salud. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. 2013. **Participante**
- I Workshop in Microbial Molecular Biology. 2017.(São Paulo-Brazil). **Participante**
- Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. 2017. (Águas de Lindóia-Brazil). **Participante.**

Pôster

- **Incidence of Respiratory Viruses and atypical pathogens in children in Lima-Perú.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Juana M. del Valle, Denisse C. Champin, Luis J. del Valle, Ronald Nazario, Carmen R. Tinco, Verónica D. Casabona, Wilmer G. Silva, **Fiorella G. Orellana**, Eduardo Verne, Claudia Ugarte, Joaquim Blasquez, Tomas Pumarola.. Período: 4-8 de Dezembro.2011. (USA).
- **Incidencia de agentes virales y bacterianos en pacientes con infecciones respiratorias agudas del Hospital Regional de Cajamarca entre los meses de Agosto 2009 y Julio 2010.** XXVII Congreso Peruano de Pediatría y Curso Internacional de Pediatría. Casabona Oré, Verónica; Tinco Valdez, Carmen; Cornejo Tapia, Angela; **Orellana Peralta, Fiorella**; Silva Caso, Wilmer; Bazán Mayra, Jorge; Zavaleta Gavidea, Victor; Petrozzi Helasvuo, Verónica; del Valle Mendoza, Juana.. Período: 19- 22 de Setembro. 2012. (Perú)
- **Determinar la prevalencia de los Gérmenes atípicos “*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis*” en la Neumonía adquirida en la comunidad. Lima-Perú.** Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Juana del Valle, **Fiorella Orellana Peralta**, Eduardo Verne Martin, Verónica Casabona Oré, Claudia Ugarte, Carmen Rosa Tinco Valdez, Tomás Pumarola Suñe, Luis J. del Valle.2013.(Perú)
- **Determinación de la importancia de NOP17 en el montaje del complejo asociado a la proteína Dre2 en *Saccharomyces cerevisiae*. “II Jornada Científica Internacional en Biociencias”.** **Orellana Peralta, Fiorella**; Mauricio Barbugiani Goldfeder & Carla Columbano Oliveira. 2017.(Lima-Perú)
- **Determination of the functional role of the interaction between the R2TP subunit Nop17 and The Fe/S cluster protein Dre2 in *Saccharomyces cerevisiae*. I Workshop in Microbial Molecular Biology.** **Orellana Peralta, Fiorella**; Mauricio Barbugiani Goldfeder & Carla Columbano Oliveira. 2017.(São Paulo-Brasil)
- **Determination of the functional role of the interaction between the R2TP subunit Nop17 and The Fe/S cluster protein Dre2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology.** **Orellana Peralta, Fiorella**; Mauricio Barbugiani Goldfeder & Carla Columbano Oliveira. 2017. (Águas de Lindóia-Brasil)

Cursos

- III Curso pre Congreso “Western Blot y El Diagnóstico Parasitológico Cisticercosis e Hidatidosis” organizado por el Colegio de Biólogos, Consejo Regional VII Lima-Callao y el VI Congreso Nacional de Estudiantes de Biología. 2005. **Participante**
- Concentración y Memoria. Organización Internacional Nueva Acrópolis Perú. 2008. **Participante**
- Redacción y Ortografía. Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV).2010. **Participante**
- Oratoria. Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV).2010. **Participante**
- Curso Taller de Resistencia Antimicrobiana. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2011. **Participante**
- II Curso Taller Teórico – Práctico en Primeros Auxilios e Inyectables y Emergencias Básicas. Centro de Capacidad para el Profesional, Técnico y Estudiante.2012. **Participante**
- III Conferencia Anual de la Sociedad Norteamericana de Medicina Tropical e Higiene (ASTMH) en el Perú. Complejo Empresarial de la Cámara de Comercio de Lima.2013. **Participante**
- Enfermedades olvidadas –Rol del Instituto Nacional de Salud y el VIH-SIDA. Instituto Nacional de Salud.2013. **Participante**
- Investigator Training Program Workshop. Investigator Training Program. Laboratorio Pfizer.2013. **Participante**
- Curso Aplicaciones de la Biotecnología en Salud. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. (UPC).2013. **Participante**
- I Curso Práctico de Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a Ciencias de la Salud.2015. **Expositor.**
- Curso CRISPR/Cas9. Instituto de Genética Barbara McClintock.2016. **Participante**

Publicações

- **Diarrhoea caused by rotavirus in a regional Peruvian hospital: determination of circulating genotypes.** Espejo PW, **Peralta FO**, Pacheres HC, del Valle LJ, Tapia AC, Mayra JB, Ruiz J, Mendoza Jdel V. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014 Jul;108(7):425-30. doi: 10.1093/trstmh/tru059. Epub 2014 Apr 27. **PMID:24778205**
- **Characterization of two *Acromobacter xylosoxidans* isolates from patients with pertussis-like symptoms.** **Orellana-Peralta F**, Jacinto M, Pons MJ, Gomes C, Bada C, Reyes I, Del Valle Mendoza J, Ruiz J. Asian Pac J Trop Med. 2015 Jun;8(6):464-7. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.05.013. Epub 2015 Jun 25. **PMID:26194831**
- **High Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Children with Acute Respiratory Infections from Lima-Peru.** Del Valle-Mendoza J, **Orellana-Peralta F**, Marcelo-Rodríguez A, Verne E, Esquivel-Vizcarra M, Silva-Caso W, Aguilar-Luis MA, Weilg P, Casabona-Oré V, Ugarte C, Del Valle LJ. PLoS One. 2017 Jan 27;12(1):e0170787. doi: 10.1371/journal.pone.0170787. eCollection 2017. **PMID:28129377.**
- **Molecular etiological profile of atypical bacterial pathogens, viruses and coinfections among infants and children with community acquired pneumonia admitted to a national hospital in Lima, Peru.** Del Valle-Mendoza J, Silva-Caso W, Cornejo-Tapia A, **Orellana-Peralta F**, Verne E, Ugarte C, Aguilar-Luis MA, De Lama-Odría MDC, Nazario-Fuertes R, Esquivel-Vizcarra M, Casabona-Ore V, Weilg P, Del Valle LJ. BMC Res Notes. 2017 Dec 6;10(1):688. doi: 10.1186/s13104-017-3000-3. **PMID:29208015**
- **Etiology, epidemiology and clinical characteristics of acute diarrhea in hospitalized children in rural Peru.** Angela Cornejo-Tapia, **Fiorella Orellana-Peralta**, Pablo Weilg, Jorge Bazán-Mayra, Hernán Cornejo Pacherrres, Gabriella Ulloa-Urizar, Miguel Angel Aguilar-Luis, María Jesus Pons, Juana del Valle Mendoza.