**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAURICIO BARBUGIANI GOLDFEDER

**Caracterização funcional da proteína Cwc24p
de *Saccharomyces cerevisiae***

**São Paulo
01/08/2008**

MAURICIO BARBUGIANI GOLDFEDER

**Caracterização funcional da proteína Cwc24p de
*Saccharomyces cerevisiae***

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências Biológicas
(Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo
2008

**Aos meus pais, Maria do Carmo Barbugiani Goldfeder e Artur Jaques
Goldfeder.**

**Aos meus avós, Rachel Amoroso Barbugiani e Guerino Barbugiani (*in
memoriam*).**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por sua acessibilidade incondicional e pela orientação tanto na bancada do laboratório, como fora dela. Especialmente, porém, agradeço pelo exemplo de dedicação incansável à pesquisa.

Aos meus pais pelo apoio em todos os momentos. À minha mãe, pela paciência e apoio nos momentos difíceis, motivação, dedicação e, mais recentemente, pelo exemplo de força ao enfrentar obstáculos. Ao meu pai, pela confiança inabalável, incentivo constante e pelo exemplo de profissionalismo e perfeccionismo. Ao meu irmão, pela descontração e amizade. À Maynara Fornazari, pelo companheirismo e compreensão.

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Fernando A. Gonzales, pela amizade e pela ajuda no meu ingresso no laboratório e na iniciação aos métodos de biologia molecular. Agradeço à Daniela C. Granato, que se tornou uma amiga para todos os momentos, fornecendo grande incentivo, auxílio constante e idéias sobre os experimentos e sobre a vida. À Juliana S. Luz, ao Celso R. Romero, ao José Roberto Tavares, à Márcia C. T. Santos e à Raphaela C. Georg pela convivência, sugestões e troca de experiências no laboratório.

Aos Profs. Drs. José Roberto C. Piqueira e Thales Trigo, os quais despertaram meu interesse em ingressar na carreira científica.

À Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria e ao Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seus laboratórios durante minha iniciação científica.

À Profa. Dra. Beatriz Castilho, pelo auxílio com os experimentos de separação de extrato celular em gradiente de sacarose e análise de perfil polissomal.

Ao Prof. Dr. Nilson Zanchin, pelo auxílio com experimentos de microscopia de fluorescência, doação de plasmídeos e doação de anticorpo anti-Nip7p. À Tereza Lima pelo seqüenciamento de plasmídeos.

Ao Prof. Dr. Sandro Valentini, pelo anti-corpo anti-Rpl5p.

À Profa. Dra. Bettina Malnic, pelo uso do microscópio de fluorescência.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, da Secretaria de Bioquímica e da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Agradeço a FAPESP e a CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Goldfeder, M.B. **Caracterização funcional da proteína Cwc24p de *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. (133p). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em eucariotos, a formação das subunidades ribossomais envolve múltiplos fatores, responsáveis pelas etapas de maturação dos rRNAs e por sua associação a proteínas ribossomais. A via de processamento de pré-rRNA é bastante complexa e inclui várias etapas de modificação de nucleotídeos e clivagens endo- e exonucleolíticas. As modificações de nucleotídeos são dirigidas por snoRNPs, formados por snoRNAs e proteínas, que são divididos em duas classes gerais, de box H/ACA (pseudouridilação) e de box C/D (metilação). Dentre os snoRNP de box C/D está o U3, que embora apresente as seqüências características e se associe a proteínas desse grupo de snoRNPs, não dirige metilações no rRNA, mas sim as clivagens iniciais no pré-rRNA 35S.

O snoRNA U3 de *Saccharomyces cerevisiae* é codificado por dois genes que contêm introns, snR17A e snR17B. Embora a via de montagem do snoRNP U3 ainda não tenha sido determinada com precisão, sabe-se que algumas proteínas do core de box C/D ligam-se ao pré-snoRNA U3 co-transcricionalmente, afetando o splicing e o processamento da extremidade 3' deste snoRNA. A proteína Cwc24p, cuja caracterização funcional foi o objetivo deste trabalho, foi isolada em nosso laboratório interagindo com Nop17p, um fator de montagem dos snoRNPs de box C/D. Cwc24p possui um domínio RING conservado e foi isolada previamente em um complexo contendo o fator de splicing Cef1p. Os resultados aqui obtidos mostram que, de maneira condizente com os dados de interação, Cwc24p é uma proteína nuclear e sua depleção leva ao acúmulo do pré-snoRNA U3, o que acarreta uma diminuição da velocidade de processamento do pré-rRNA 35S. O modelo aqui proposto prevê o recrutamento de Cwc24p para o pré-snoRNA U3 por Nop17p, onde atua como um fator de eficiência do splicing. Estes resultados levaram à conclusão de que Cwc24p está envolvida no splicing do pré-snoRNA U3, afetando indiretamente o processamento do pré-rRNA.

Palavras-chave: processamento de rRNA, splicing, ribossomo, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Goldfeder, M.B. **Functional characterization of Cwc24p in *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. (133p). PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In eukaryotes, the ribosome biogenesis involves a large number of factors, that are responsible for the rRNAs maturation and for their association with ribosomal proteins. The pre-rRNA processing pathway is very complex and includes many steps of nucleotide modifications and endo- and exonucleolytic cleavage reactions. The nucleotide modifications are directed by snoRNPs that are formed by snoRNAs and proteins, divided in two major groups, of box H/ACA (which direct pseudouridilation), or of box C/D (methylation). Although the snoRNP U3 presents the snoRNA sequences and the proteins characteristics of box C/D class, it is not involved in methylation, but rather in the early cleavages of pre-rRNA 35S.

U3 snoRNA is transcribed from two intron-containing genes in yeast, snR17A and snR17B. Although the assembly of the U3 snoRNP has not been precisely determined, at least some of the core box C/D proteins are known to bind pre-U3 co-transcriptionally, thereby affecting splicing and 3'-end processing of this snoRNA. We identified the interaction between the box C/D assembly factor Nop17p and Cwc24p, a novel yeast RING-finger protein which had been previously isolated in a complex with the splicing factor Cef1p. Here we show that, consistently with the protein interaction data, Cwc24p localizes to the cell nucleus, and its depletion leads to the accumulation of both U3 pre-snoRNAs. U3 snoRNA is involved in the early cleavages of 35S pre-rRNA, and the defective splicing of pre-U3 detected in cells depleted of Cwc24p causes the accumulation of the 35S precursor rRNA. These results led us to the conclusion that Cwc24p is involved in pre-U3 snoRNA splicing, indirectly affecting pre-rRNA processing.

Keywords: rRNA processing, splicing, ribosome, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -Gal	β -galactosidase
aa	aminoácido
AD	domínio de ativação da transcrição
BCA	ácido bicinconínico
BD	domínio de ligação ao DNA
BSA	albumina de soro bovino
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETS	<i>external transcribed spacer</i> , seqüência espaçadora externa
<i>GAL1</i>	promotor do gene <i>GAL1/YBR020W</i> (galactoquinase) de <i>S. cerevisiae</i>
GFP	proteína verde fluorescente
GST	glutathione-S-transferase
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> , seqüência espaçadora interna
kb	quilobase
kDa	quilodáton
LSU	<i>large subunit</i> , subunidade ribossomal maior
nt	nucleotídeo
NTPs	ribonucleotídeos (ATP, CTP, TTP, GTP)
NTS	<i>non-transcribed spacer</i> , seqüência espaçadora não transcrita
OD	densidade óptica
ODU	unidade de densidade óptica
ONPG	O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	<i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato

PCR	reação de polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
pol	polimerase
Pré-rRNA	precursor do RNA ribossomal
ProtA	domínio ZZ da proteína A de <i>S. aureus</i>
rDNA	DNA que codifica o RNA ribossomal
RNP	ribonucleoproteína
rpm	rotações por minuto
r-proteínas	proteínas ribossomais
rRNA	RNA ribossomal
S	svedberg, coeficiente de sedimentação
SDS	dodecil sulfato de sódio
snoRNAs	<i>small nucleolar RNAs</i> (processamento de rRNA)
snoRNPs	<i>small nucleolar ribonucleoproteins</i> (processamento de rRNA)
snRNAs	<i>small nuclear RNAs</i> (<i>splicing</i>)
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i> (<i>splicing</i>)
SSC	solução salina com citrato de sódio
SSPE	solução salina com fosfato de sódio e EDTA
SSU	<i>small subunit</i> , subunidade ribossomal menor
TAE	tampão contendo tris, acetato e EDTA
TBE	tampão contendo tris, borato e EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampão contendo tris e EDTA
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletineldiamina
Tris	tris-hidroximetilaminometano
tRNA	RNA transportador
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> (meio mínimo para levedura)
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> (meio rico para levedura)
YPGAL	<i>yeast extract peptone galactose</i> (meio rico para levedura)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas neste estudo.....	36
Tabela 2. Meios de cultura de <i>E. coli</i> utilizados neste estudo.....	36
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para clonagens e seqüenciamento de DNA.....	40
Tabela 4. Plasmídeos utilizados neste estudo.....	42
Tabela 5. Estratégias de clonagem de mutantes de <i>CWC24</i>	44
Tabela 6. Meios de cultura de levedura utilizados neste estudo.....	47
Tabela 7. Cepas de levedura utilizadas neste estudo.....	48
Tabela 8. Oligonucleotídeos de DNA utilizados para ensaios de <i>Northern blot</i> , <i>primer extension</i> , <i>DNA shift</i> e co-imunoprecipitação de cromatina (ChIP).....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da subunidade ribossomal maior (50S) de <i>Haloarcula marismortui</i>	15
Figura 2. Modelo da biogênese de ribossomos em <i>S. cerevisiae</i>	17
Figura 3. Processamento de rRNA em <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 4. snoRNAs envolvidos no processamento e modificação do pré-rRNA 35S.....	22
Figura 5. Formação do SSU processomo.....	25
Figura 6. Comparação das vias de maturação das subunidades 40S e 60S.....	27
Figura 7. Splicing.....	32
Figura 8. Esquema de obtenção de cepa haplóide com expressão condicional do gene <i>CWC24</i>	53
Figura 9. Sistema do duplo-híbrido.....	58
Figura 10. Interação de Cwc24p com Nop17p.....	72
Figura 11. Análise da localização subcelular de Cwc24p.....	74
Figura 12. Caracterização da cepa haplóide $\Delta cwc24$	77
Figura 13. <i>Pulse-chase labeling</i>	79
Figura 14. Análise de processamento de rRNA por <i>Northern blot</i>	81
Figura 15. Análise das clivagens iniciais do pré-rRNA por <i>primer extension</i>	84
Figura 16. Análise das clivagens tardias do pré-rRNA por <i>primer extension</i>	85
Figura 17. Análise de perfil polissomal na cepa $\Delta cwc24$	87
Figura 18. Análise da sequência de Cwc24p.....	89
Figura 19. Mapeamento de regiões essenciais para a função de Cwc24p.....	91
Figura 20. Co-imunoprecipitação de cromatina (ChIP).....	94
Figura 21. Purificação de GST-Cwc24p.....	96
Figura 22. Ensaios de ligação de GST-Cwc24p a DNA.....	97
Figura 23. Ensaios de ligação de Cwc24p a RNA.....	99
Figura 24. Análise de interação entre Cwc24p e Cef1p.....	101
Figura 25. Análise de splicing em escala global na cepa $\Delta cwc24$	102
Figura 26. Cwc24p influencia o splicing dos pré-snoRNAs U3.....	104
Figura 27. Cwc24p apresenta homologia com proteínas de humanos.....	106
Figura 28. Análise de complementação da cepa $\Delta cwc24$ com a proteína	

codificada pelo gene humano ZNF113A, uma potencial ortóloga de Cwc24p.....	107
Figura 29. Modelo da função de Cwc24p.....	115

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Fatores de processamento de rRNA.....	18
1.2 Modificações de resíduos de nucleotídeos são guiadas por snoRNPs...21	
1.3 Maturação da partícula pré-90S e o SSU processomo.....	23
1.4 Maturação da subunidade ribossomal 40S.....	26
1.5 Maturação da subunidade ribossomal 60S.....	28
1.6 Montagem dos snoRNPs.....	29
1.7 Splicing e biogênese dos ribossomos.....	31
1.8 Caracterização de novos fatores envolvidos em processamento de rRNA.....	34
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Cultura e manipulação de <i>E. coli</i>	36
3.1.1 Preparação de células competentes DH5 α	37
3.1.2 Transformação de células competentes DH5 α	37
3.1.3 Preparação de células competentes BL21.....	37
3.1.4 Transformação de células competentes BL21.....	38
3.1.5 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	38
3.2 Métodos de manipulação de DNA e construção de plasmídeos.....	39
3.2.1 Purificação de DNA a partir de gel de agarose.....	39
3.2.2 Amplificação de DNA por PCR.....	39
3.2.3 Seqüenciamento de plasmídeos.....	39
3.2.4 Construção de plasmídeos.....	40
3.3 Cultura e manipulação de <i>S. cerevisiae</i>	47
3.3.1 Transformação de alta eficiência de <i>S. cerevisiae</i>	49
3.3.2 Transformação rápida de <i>S. cerevisiae</i>	50
3.3.3 Extração de DNA plasmidial de <i>S. cerevisiae</i>	50
3.3.4 Extração de DNA total de <i>S. cerevisiae</i>	50
3.3.5 Esporulação de levedura e isolamento de esporos.....	51
3.4 Obtenção da cepa condicional $\Delta cwc24$	52
3.4.1 Comprovação do genótipo da cepa $\Delta cwc24$ por PCR.....	52

3.4.2	Análise de crescimento da cepa $\Delta cwc24$	52
3.4.3	Deteção da proteína Cwc24p na cepa $\Delta cwc24$	54
3.5	Análise de proteínas.....	55
3.5.1	Quantificação de proteína total utilizando ácido bicinconínico (BCA) e CuSO_4	55
3.5.2	Análise de proteínas por <i>Western blot</i>	55
3.6	Análise <i>in vivo</i> de interação entre proteínas pelo método do duplo-híbrido.....	56
3.6.1	Teste de atividade de β -galactosidase utilizando X-GAL como substrato.....	57
3.6.2	Teste de atividade de β -galactosidase utilizando ONPG como substrato.....	57
3.7	Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	59
3.7.1	Teste de expressão em pequena escala.....	59
3.7.2	Expressão em grande escala.....	60
3.8	Estudo <i>in vitro</i> de interação proteína-proteína por <i>pull-down</i>	60
3.9	Localização subcelular por microscopia de fluorescência.....	61
3.10	Alinhamento da seqüência de Cwc24p contra os bancos de dados.....	61
3.11	Análise de processamento de RNA.....	61
3.11.1	Extração de RNA total de <i>S. cerevisiae</i>	61
3.11.2	Separação de RNA total em gel de agarose ou poliacrilamida..	62
3.11.3	Marcação radioativa de DNA.....	63
3.11.4	Análise por <i>Northern blot</i>	63
3.11.5	Análise por <i>pulse-chase labeling</i>	65
3.11.6	Análise por <i>primer extension</i>	65
3.11.7	<i>Microarray</i>	66
3.12	Ensaio de complementação da cepa $\Delta cwc24$	66
3.13	Ensaio de ligação a ácidos nucleicos.....	66
3.13.1	Co-imunoprecipitação de RNA.....	67
3.13.2	Ligação a RNA <i>in vitro</i>	67
3.13.3	Ensaio de ligação a DNA (<i>band shift</i>).....	68
3.13.4	Co-imunoprecipitação de cromatina (ChIP).....	68
3.14	Gradiente de polissomos.....	69

4. RESULTADOS.....	70
4.1 Cwc24p interage com Nop17p através de sua porção central.....	70
4.2 A proteína Cwc24p está localizada no núcleo.....	73
4.3 Obtenção de uma cepa mutante condicional $\Delta cwc24$	75
4.4 Análise do papel de Cwc24p no processamento de pré-rRNA.....	78
4.4.1 O processamento do pré-rRNA torna-se mais lento na ausência de Cwc24p.....	78
4.4.2 A depleção de Cwc24p leva ao acúmulo de pré-rRNAs na célula.....	80
4.4.3 Cwc24p é necessária para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S.....	82
4.5 A depleção de Cwc24p causa uma diminuição na produção de ribossomos.....	86
4.6 A proteína Cwc24p possui um zinc-finger e um domínio RING, essenciais para sua função.....	88
4.7 Cwc24p é capaz de ligar DNA <i>in vitro</i> , porém com baixa eficiência e de maneira inespecífica.....	92
4.8 Cwc24p não é capaz de ligar-se a RNA.....	98
4.9 Cwc24p influencia o splicing do pré-snoRNA U3.....	100
4.10 Cwc24p é conservada evolutivamente, apresentando uma possível ortóloga em <i>H. sapiens</i>	105
5. DISCUSSÃO.....	108
6. CONCLUSÃO.....	118
7. REFERÊNCIAS.....	119

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Súmula Curricular

ANEXO B – Artigo Científico

Goldfeder, M.B. e Oliveira, C.C. (2008) Cwc24p, a novel *Saccharomyces cerevisiae* nuclear ring finger protein, affects pre-snoRNA U3 splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 2644-2653

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos RNAs em eucariotos é transcrita na forma de precursores, que devem sofrer processamento para dar origem a moléculas maduras funcionais. Esta é uma etapa importante do controle pós-transcricional da expressão gênica e envolve, no caso dos RNAs ribossomais (rRNAs), modificações de resíduos de nucleotídeos e clivagens endo- e exonucleolíticas. No caso dos mRNAs, as etapas incluem adição de cap, splicing, clivagem e poliadenilação na extremidade 3'. De maneira similar, os tRNAs, snoRNAs (*small nucleolar RNAs*, que atuam no processamento de rRNA) e snRNAs (*small nuclear RNAs*, envolvidos em splicing) também sofrem clivagens e splicing, além de modificações de resíduos de nucleotídeos (Decker, 1998; Filipowicz e Pogacic, 2002).

A biogênese dos ribossomos é um processo altamente complexo, que envolve a maturação dos rRNAs a partir de transcritos primários e sua associação com as proteínas ribossomais, dando origem aos ribossomos maduros no citoplasma (Venema e Tollervey, 1999). A importância do correto processamento do rRNA tornou-se mais evidente após a determinação da estrutura do ribossomo de *Haloarcula marismortui* (Nissen et al., 2000), que mostrou que o sítio com atividade peptidil-transferase é composto exclusivamente por rRNA. A formação das ligações peptídicas, portanto, é fruto da atividade de uma ribozima, o ribossomo (Cech, 2000; Figura 1).

Os recursos celulares empregados na síntese de ribossomos são notáveis. Células de *S. cerevisiae* em fase exponencial de crescimento apresentam 60% de toda a transcrição devotada aos rRNAs e 50% da transcrição pela RNA polimerase II corresponde aos mRNAs das proteínas ribossomais (r-proteínas). Além disso, a transcrição das 150 cópias dos genes que codificam os rRNAs e dos 137 genes que codificam as r-proteínas tem que ocorrer de maneira coordenada (Warner, 1999). Dado o papel fundamental dos ribossomos na célula, defeitos em sua biogênese estão relacionados ao desenvolvimento de doenças em humanos, como a anemia de Diamond-Blackfan (Choesmel et al., 2007), síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (Hesling et al., 2007), Disqueratose Congenita (Kirwan e Dokal, 2008), síndrome Polimiosite Escleroderma (Allmang et al., 1999a), entre outras.

Figura 1. Estrutura da subunidade ribossomal maior (50S) de *Haloarcula marismortui*. Os rRNAs 23S e 5S estão representados com as bases em branco e o esqueleto de ribose e fosfato em laranja. As proteínas ribossomais estão numeradas e representadas em azul. Dois substratos sintéticos ligados aos sítios P e A estão representados em vermelho e encontram-se no interior de uma cavidade formada exclusivamente por rRNA, revelando que o ribossomo é uma ribozima. Extraído de Niessen et al., 2002.

Grande parte dos estudos de biogênese de ribossomos vem sendo conduzida utilizando como organismo modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que é uma espécie que possui seu genoma seqüenciado e que permite a utilização de ferramentas genéticas extremamente versáteis. Além disso, os dados obtidos com esta levedura podem freqüentemente ser extrapolados para outros eucariotos, na medida em que mecanismos de controle da expressão gênica identificados em levedura parecem ser conservados em mamíferos (Fromont-Racine et al., 2003).

A transcrição e as etapas iniciais de processamento de rRNA em eucariotos ocorrem no nucléolo, um subcompartimento nuclear. Em *S. cerevisiae*, o RNA ribossomal é transcrito a partir de 100 a 200 cópias de unidades do rDNA (DNA que codifica os rRNAs), presentes no braço longo do cromossomo XII. Cada unidade é formada por um operon, que codifica as seqüências dos rRNAs 18S, 5.8S e 25S, e pelo gene do rRNA 5S, que é transcrito no sentido oposto (Kressler et al., 1999; Figura 2). A partir do rDNA, a RNA polimerase I gera um transcrito primário, denominado pré-rRNA 35S, que contém os rRNAs 18S, 5.8S e 25S, intercalados por espaçadores internos ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*) e flanqueados por espaçadores externos 5'ETS e 3'ETS (*external transcribed spacer*). A RNA polimerase III, por sua vez, gera um transcrito primário que contém a seqüência do rRNA 5S (Venema e Tollervey, 1999).

O processamento do pré-rRNA 5S é feito por uma via independente e de cinética mais rápida. O extremo 5' do rRNA 5S maduro corresponde àquele presente no transcrito primário e a extremidade 3' é gerada por clivagem exonucleolítica 3'→5', que remove um segmento de 7 a 13 nucleotídeos (Piper et al., 1983, 1984).

O pré-rRNA 35S, por sua vez, sofre um extenso processamento. Logo após sua transcrição, ocorrem modificações em resíduos de nucleotídeos guiadas por snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoproteins*), incluindo isomerização de uridinas em pseudouridinas e metilação do grupo hidroxila 2' (2'-OH) de riboses. Além disso, endo- e exonucleases atuam na remoção dos espaçadores internos e externos, para gerar os rRNAs maduros. Estima-se que cerca de 180 fatores estejam envolvidos na via de biogênese dos ribossomos, que podem ser divididos em diversas classes: endo- e exonucleases, RNA helicases, GTP/ATPases, proteínas de montagem e fatores de exportação, além dos snoRNPs (revisto em Venema e Tollervey, 1999;

Figura 2. Modelo da biogênese de ribossomos em *S. cerevisiae*. O pré-rRNA 35S, sofre metilações (CH₃), pseudouridilações (ψ) e associa-se a proteínas ribossomais e fatores de processamento dando origem à partícula pré-90S. O snoRNA U3, representado em azul, é essencial para que as clivagens iniciais no pré-rRNA 35S ocorram. A clivagem no sítio A₂ dá origem às partículas pré-40S e pré-60S. A maturação final da subunidade 40S ocorre no citoplasma, através da clivagem no sítio D. As subunidades 40S e 60S maduras associam-se no citoplasma para formar o ribossomo (80S). O pré-rRNA 5S é transcrito pela RNA polimerase III e processado por uma via independente. Baseado em Kressler et al., 1999.

Kressler et al., 1999; Warner, 2001; Fatica e Tollervey, 2002a; Fromont-Racine et al., 2003; Granneman e Baserga, 2004; Nazar, 2004)

Em *S. cerevisiae*, a subunidade ribossomal menor, 40S, é composta pelo rRNA 18S associado a 32 r-proteínas, enquanto a subunidade maior, 60S, é composta pelos rRNAs 25S, 5.8S e 5S associados a 46 r-proteínas (Venema e Tollervey, 1999; Kressler et al., 1999). Além das r-proteínas, os fatores de processamento ligam-se ao pré-rRNA de maneira transiente, formando partículas pré-ribossomais com diversas composições, observadas até ser atingida a maturação final do ribossomo (Nissan et al., 2002; Grandi et al. 2002; Granneman e Baserga, 2004; Figura 2).

O pré-rRNA 35S está associado à partícula pré-ribossomal 90S, que inclui predominantemente fatores necessários para a maturação da subunidade ribossomal 40S (Grandi et al., 2002; Pérez-Fernández et al., 2007). As clivagens iniciais nos sítios A₀, A₁ e A₂, promovem uma separação física e funcional: a partícula pré-ribossomal 40S possui o pré-rRNA 20S e fatores que atuam na maturação da subunidade ribossomal menor, enquanto a partícula pré-60S contém o pré-rRNA 27S e fatores que atuam na biogênese da subunidade ribossomal maior (Udem e Warner, 1972; Trapman et al., 1975; Fromont-Racine et al., 2003; Figura 2).

1.1 Fatores de processamento de rRNA

Dentre os fatores envolvidos em processamento de rRNA está o exossomo, um complexo com atividade 3'→5' exonucleolítica, conservado desde archaea até humanos, composto por 11 subunidades em *S. cerevisiae*: Rrp4p, Rrp40p, Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p, Csl4p e Rrp6p (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999a, 1999b, 2000). Este complexo existe no citoplasma e no núcleo com a mesma composição, exceto por Rrp6p, que está presente apenas na forma nuclear. Seis destas proteínas possuem homologia com RNase-PH de *E. coli* e estão organizadas em um anel hexamérico (Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp45p, Rrp46p e Mtr3p), enquanto três subunidades com domínios de ligação a RNA estão ligadas a um dos lados do anel (Rrp4p, Rrp40p e Csl4p; Mitchell et al., 1997; Luz et al., 2007). Embora este complexo possua 6 subunidades com domínios conservados de RNase, dados recentes indicam que apenas as proteínas Rrp6p e Rrp44p tenham atividade exonucleolítica, o que sugere que as demais proteínas no complexo tenham um papel estrutural ou de controle desta atividade (Dziembowski

et al., 2007). Na via de processamento de rRNA, o exossomo participa diretamente da maturação da extremidade 3' do pré-rRNA 7S, gerando o rRNA 5.8S maduro, além de ser responsável pela degradação do espaçador externo 5'-ETS, liberado após a clivagem no sítio A₁ (Allmang et al., 1999b; Allmang et al., 2000; Figura 3). A forma nuclear do complexo também está envolvida na maturação de RNAs precursores, através do processamento da extremidade 3' de pré-mRNAs, pré-snoRNAs e pré-snRNAs (Allmang et al., 1999b), além de atuar no controle de qualidade, degradando pré-mRNAs, pré-rRNAs e pré-tRNAs aberrantes (Allmang et al., 1999a; Van Hoof et al., 2000a; Dez et al., 2006). Os RNAs destinados à degradação pelo exossomo recebem a adição de uma cauda curta de poli(A) pela ação do complexo TRAMP, que é composto pelas proteínas Trf4p / Trf5p, Air1p, Air2p e Mtr4p (LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wyers et al., 2005). No citoplasma, o exossomo atua na degradação de mRNAs (Van Hoof et al., 2000b; Oliveira et al., 2002).

Além do exossomo, participam do processamento de rRNA as endonucleases Rnt1p e RNase MRP e as exonucleases 5' → 3' Rat1p e Xrn1p (Venema e Tollervey, 1999). A endonuclease Rnt1p, homóloga à RNase III de *E. coli*, é responsável pela clivagem na extremidade 3' do transcrito primário da RNA polimerase I, gerando o pré-rRNA 35S (Kufel et al., 1999; Figura 3) e atua na maturação de snoRNAs, reconhecendo um *stem-loop* conservado em seus substratos (Chanfreau et al., 1998). A RNase MRP é um snoRNP, composto por um snoRNA associado a nove proteínas: Pop1p, Pop3-Pop8p, Rpp1p e Snm1p (Chamberlain et al., 1998; Salinas et al., 2005), que promove a clivagem endonucleolítica no sítio A₃ do pré-rRNA 35S (Shmitt et al., 1993; Chu et al., 1994; Lygerou et al., 1996), gerando o pré-rRNA 27SA₃. A atividade 5' → 3' das exonucleases Xrn1p e Rat1p promove a formação da extremidade 5' do rRNA 5.8S e a degradação da maioria dos espaçadores removidos durante o processamento do pré-rRNA (Henry et al., 1994; Johnson et al., 1997; Venema e Tollervey, 1999).

Figura 3. Processamento do rRNA em *S. cerevisiae*. (A) Esquema de uma das cópias do rDNA. (B) O pré-rRNA 35S sofre processamento em doze sítios de clivagem, gerando diversos intermediários. As clivagens iniciais requerem o pareamento do snoRNA U3 com o pré-rRNA 35S. A clivagem em A₂ leva à separação entre o rRNA 20S, que origina o rRNA 18S e o pré-rRNA 27S, que origina os rRNAs 5.8S e 25S. A via de processamento e os fatores destacados em vermelho estão descritos em detalhe no texto. Adaptado de Kressler et al., 1999 e Venema e Tollervey, 1999.

1.2 Modificações de resíduos de nucleotídeos são guiadas por snoRNPs

O pré-rRNA 35S sofre modificação em resíduos de nucleotídeos específicos, que envolvem isomerização de uridinas em pseudouridinas (ψ) e metilação do 2'-OH de riboses (Kiss-Laszlo et al., 1996; Ni et al., 1997; Ganot et al., 1997; Kiss 2001). A função destas modificações ainda não foi totalmente estabelecida, sendo que, apesar de nenhuma delas ser essencial para a maturação dos ribossomos, sua inibição geral leva a uma diminuição na taxa de crescimento da levedura (Tollervey et al., 1993; Zebajadian et al., 1999; King et al., 2003). Além disso, sabe-se que as modificações ocorrem nas regiões correspondentes aos rRNAs maduros, o que indica que sejam importantes para a estrutura e função dos ribossomos (Decatur e Fournier, 2003).

As metilações e pseudouridilações são feitas por snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoproteins*), complexos compostos por diversas proteínas e por um snoRNA (*small nucleolar RNA*) que, através de pareamento de bases com o pré-rRNA 35S, determinam qual o resíduo de nucleotídeo deve ser modificado. Os snoRNPs podem ser classificados em dois grupos, baseados na presença de motivos conservados nos snoRNAs e nas proteínas com as quais eles se associam: snoRNPs de *box* H/ACA e snoRNPs de *box* C/D (revisto em Maxwell e Fournier, 1995; Balakin et al., 1996; Smith e Steitz, 1997; Kiss, 2001; Bachellerie et al., 2002; Kiss, 2002; Filipowicz e Pogacic, 2002; Terns e Terns, 2002; Decatur e Fournier, 2003; Reichow et al., 2007).

Os snoRNPs de *box* H/ACA são formados por snoRNAs contendo os motivos H e ACA, que estão presentes nas regiões de fita simples existentes entre dois *hairpins*. Ambos *hairpins* são interrompidos por *loops* denominados *pseudouridilation pockets*, onde ocorre o pareamento do pré-rRNA com cerca de 10 resíduos de nucleotídeos do snoRNA (Figura 4A). O resíduo de nucleotídeo do snoRNA que dista entre 14 e 16 nucleotídeos dos *boxes* determina o sítio de modificação no pré-rRNA (Ni et al., 1997; Ganot et al., 1997; Ofengand, 2002; Filipowicz e Pogacic, 2002). As proteínas do *core* dos snoRNPs de *box* H/ACA são Cbf5p, Gar1p, Nhp2p e Nop10p, sendo Cbf5p a enzima responsável pela pseudouridilação (Lafontaine et al., 1999; Henras et al., 1998; Zebajadian et al., 1999; King et al., 2003).

Os snoRNPs de *box* C/D são formados por snoRNAs que apresentam seqüências conservadas denominadas *boxes* C (UGAUGA) e D (CUGA), e formam estruturas secundárias características do grupo (Figura 4B). Alguns snoRNAs

Figura 4. snoRNAs envolvidos no processamento e modificação do pré-rRNA 35S. Modelo da estrutura secundária dos snoRNAs, destacando os motivos conservados e regiões onde ocorre pareamento com o pré-rRNA 35S (*target* RNA) **(A)** snoRNAs de box H/ACA promovem a pseudouridilação de nucleotídeos. **(B)** snoRNAs de box C/D estão envolvidos em metilação de riboses. **(C)** Os snoRNAs podem ser codificados em unidades independentes, monocistrônicas ou policistrônicas e também no interior de introns de outros genes. As caixas coloridas representam genes que codificam snoRNAs e as caixas brancas representam exons. Adaptado de Filipowicz e Pogacic, 2002 e Reichow et al. 2007.

apresentam também regiões menos conservadas chamadas de *boxes* C' e D'. Os snoRNAs de *box* C/D associam-se às proteínas Nop1p, Nop58p, Nop56p e Snu13p, sendo que Nop1p é responsável pelas metilações (Shimang et al., 1989; Tollervey et al., 1991, 1993; Lafontaine e Tollervey, 2000). A metilação é guiada através do pareamento de bases do pré-rRNA com uma região contendo dez a vinte nucleotídeos localizados a montante dos *boxes* D e D', sendo que o nucleotídeo posicionado a 5 pares de base em relação ao início do *box* sofre a metilação. (Kiss-Laszlo et al., 1996; Cavaille et al., 1996; Bachellerie e Cavaille, 1997; Kiss-Laszlo et al., 1998; Filipowicz e Pogacic, 2002)

Os snoRNAs estão distribuídos no genoma, podendo ser codificados em unidades independentes, com promotor e terminador próprios (monocistrônicas ou policistrônicas), mas também são codificados no interior de introns, geralmente de genes relacionados à biogênese de ribossomos (Filipowicz e Pogacic, 2002; Figura 4C).

1.3 Maturação da partícula pré-90S e o SSU processomo.

O snoRNP U3 participa das clivagens iniciais do pré-rRNA 35S (sítios A₀, A₁ e A₂; Hughes et al., 1987; Hughes e Ares, 1991). O snoRNA U3 apresenta seqüências que pareiam com o 5'ETS e com a extremidade 5' do rRNA 18S (Figura 3). Mutações que rompem este pareamento impedem que as clivagens iniciais ocorram, o que pode ser revertido através de mutações compensatórias no pré-rRNA 35S, que re-estabeleçam a complementariedade com o snoRNA. Além disso, a mutação ou depleção das proteínas que compõem o snoRNP U3 também impede que as clivagens iniciais ocorram (Hughes e Ares, 1991; Beltrame e Tollervey, 1995; Sharma e Tollervey, 1999).

O processamento do pré-rRNA 35S é iniciado de maneira co-transcricional, ou seja, alguns fatores de processamento ligam-se ao pré-rRNA enquanto o mesmo ainda está associado ao rDNA. Através de microscopia eletrônica de oócitos de *Xenopus*, foi observado que os transcritos nascentes de pré-rRNA apresentam estruturas esféricas em sua extremidade 5' (Miller e Beatty, 1969; Mougey et al., 1993). Estudos posteriores mostraram que, em *S. cerevisiae*, estas esferas correspondem a um complexo de cerca de 2 MDa, denominado SSU (*small subunit*) processomo, que contém o snoRNP U3 associado a fatores de processamento do pré-rRNA 35S e da subunidade ribossomal 40S (Dragon et al., 2002; Bernstein et al.,

2004; Osheim et al., 2004; Granneman e Baserga, 2004; Figura 5). Na ausência do snoRNA U3 ou de proteínas componentes do snoRNP, há o desaparecimento destas esferas terminais (Dragon et al. 2002; Figura 5A).

O SSU processomo é composto por 34 proteínas não ribossomais que se ligam ao snoRNA U3: as proteínas do core de snoRNPs de *box* C/D (Nop1p, Nop56p, Nop58 e Snu13); as Utps 1-18 e 20-22 (*U-three proteins*); as proteínas Noc4p, Mpp10p, Imp3p, Imp4p, Dhr1p, Rrp9p, Rrp5p, Emg1p e Krr1p; além de cinco proteínas ribossomais da subunidade 40S: Rps4p, Rps6p, Rps7p, Rps9p e Rps14p (Dragon et al., 2002). Dentre as Utps, foi caracterizado um subgrupo denominado de t-Utps que poderiam atuar como fatores de transcrição da RNA polimerase I (Gallagher et al., 2004), mostrando que a transcrição e o processamento do pré-rRNA são processos coordenados.

Juntamente com o snoRNA U3, o snoRNA de *box* C/D U14 (Li et al., 1990, Morrissey et al., 1997) e os snoRNAs de *box* H/ACA snR10 (Tollervey, 1987) e snR30 (Atzorn et al., 2004) também estão envolvidos nas clivagens iniciais e, curiosamente, estes são os únicos snoRNAs essenciais para a viabilidade celular. Entretanto, é interessante notar que, embora tenha sido comprovada a necessidade destes snoRNPs, ainda não foi determinada a identidade dos fatores que promovem as clivagens endonucleolíticas nos sítios A₀, A₁ e A₂ (Fromont-Racine, 2003).

Ao contrário do que poderia ser esperado, a partícula pré-90S possui uma composição assimétrica, pois é composta principalmente por fatores que atuam na maturação da subunidade 40S, enquanto poucos fatores envolvidos na formação da subunidade 60S estão presentes (Grandi et al., 2002; Pérez-Fernandez, 2007). Após as clivagens iniciais, que ocorrem rapidamente, formam-se as partículas pré-ribossomais 43S e 66S, que são processadas por vias distintas (Nissan et al., 2002; Schäfer et al., 2003; Figura 2).

Figura 5. Formação do SSU processomo. (A) Microscopia eletrônica mostra esferas na extremidade 5' do pré-rRNA 35S, originadas pela associação co-transcricional do snoRNP U3 e fatores de processamento, formando o SSU processomo. Na ausência do snoRNA U3 ou da proteína Utp7p as esferas não são formadas. (B) Representação de diferentes estágios de maturação: esferas pequenas em cinza, esferas recém-formadas em rosa e esferas maduras em vermelho. Esferas em azul correspondem ao LSU (*large subunit*) processome. Extraído de Dragon et al., 2002 e Osheim et al., 2004.

1.4 Maturação da subunidade ribossomal 40S

Após a clivagem no sítio A_0 , a maioria dos fatores do SSU processomo permanece associada ao 5'ETS, que foi removido, portanto a partícula pré-40S apresenta uma composição relativamente simples. Apenas alguns fatores presentes no pré-90S continuam associados ao pré-rRNA 20S e podem ser divididos em dois grupos: proteínas que se associam precocemente ao pré-90S (Enp1p, Dim1p, Hrr25p e Rrp12p), e proteínas que se associam somente após as clivagens em A_0 e A_2 (Nob1p, Rio2p e Tsr1p; Schäfer et al., 2003).

A composição simples do pré-40S em relação ao pré-60S é justificada, pois a maturação do pré-rRNA 20S envolve somente uma clivagem, que remove a extremidade 3' do pré-rRNA, dando origem ao rRNA 18S maduro (Schäfer et al., 2003). Para que esta clivagem ocorra, é necessária a dimetilação de adeninas em duas posições da extremidade 3' do rRNA 18S, que é feita pela proteína Dim1p (Lafontaine et al., 1998), porém a identidade da endonuclease que atua no sítio D ainda é desconhecida (Fromont-Racine et al., 2003). A proteína Rio1p também é essencial para que ocorra esta clivagem (Vanrobays et al., 2003).

Tanto a dimetilação como a clivagem do pré-rRNA 20S ocorrem no citoplasma (Stevens et al., 1991), sendo que o transporte da partícula pré-40S do nucléolo para o citoplasma é mais rápido do que o transporte da partícula pré-60S (Udem e Warner, 1973; Gleizes et al., 2001; Figura 6). Na verdade, a partícula pré-40S parece passar rapidamente pelo nucleoplasma, sofrendo poucas modificações neste subcompartimento. Além disso, a ausência de GTPases e AAA-ATPases no pré-40S, proteínas essas relacionadas ao remodelamento da partícula pré-ribossomal 66S, indica que o pré-40S sofre poucas alterações estruturais durante seu estágio final de maturação (Schäfer et al., 2003).

Figura 6. Comparação das vias de maturação das subunidades 40S e 60S. O pré-ribossomo 90S contém fatores de processamento da subunidade 40S, mas poucos fatores da subunidade 60S. Após a clivagem em A₂, diversas proteínas ribossomais associam-se ao pré-rRNA 27S formando a partícula pré-60S. O processamento da partícula pré-40S envolve um menor número de etapas, sendo a última dimetilação e clivagem no sítio D, no citoplasma. A maturação da subunidade 60S é mais complexa, envolvendo partículas pré-60S com diferentes composições (*early*, *intermediate* e *late*), que são processadas e transportadas do nucléolo para o nucleoplasma, periferia nuclear e citoplasma. Adaptado de Nissan et al., 2002 e Schäfer et al., 2003.

1.5 Maturação da subunidade ribossomal 60S

A partícula pré-60S contém o pré-rRNA 27SA₂, cuja maturação é feita por duas vias. Cerca de 85% dos pré-rRNAs sofrem clivagem no sítio A₃, realizada pela RNase MRP, gerando o pré-rRNA 27SA₃, que é rapidamente processado na extremidade 5' pelas exonucleases Xrn1p / Rat1p para formar o pré-rRNA 27SB_S. Os 15% restantes sofrem clivagem diretamente no sítio B1_L, originando o pré-rRNA 27SB_L. Simultaneamente ao processamento em B₁, ocorre a clivagem no sítio B₂, gerando o extremo 3' do rRNA 25S (Fromont-Racine et al., 2003; Figura 3).

A maturação dos pré-rRNAs 27SB_S (*short*) e 27SB_L (*long*) ocorre por vias idênticas. Processamento no sítio C₁ gera o rRNA 25S maduro e clivagem exonucleolítica 3'→5' dos pré-rRNAs 7S_S e 7S_L, realizada pelo exossomo, resulta nos rRNAs 5.8S_S e 5.8S_L maduros (ambos funcionais, sendo o primeiro mais abundante; Venema e Tollervey, 1999).

Embora estudos pioneiros houvessem identificado apenas uma partícula precursora da subunidade maior (pré-66S; Trapman et al., 1975), uma situação mais complexa foi identificada posteriormente. Utilizando diferentes proteínas como isca em experimentos de co-precipitação, foi identificada a existência de diversas partículas pré-60S, presentes em três estágios de processamento: inicial, intermediário e tardio (Baßler et al., 2001; Harnpicharnchai, et al., 2001; Saveanu, et al., 2001; Fatica et al., 2002b; Nissan et al., 2002; Figura 6). Após a clivagem em A₂, que separa os precursores das subunidades 40S e 60S, aproximadamente 50 proteínas associam-se ao pré-rRNA 27S formando uma partícula pré-60S localizada no nucléolo. Na medida em que ocorre a maturação, há uma migração progressiva do nucléolo para o nucleoplasma, periferia nuclear e finalmente para o citoplasma (Nissan et al., 2002). Durante este processo, são formados os rRNAs 25S, 5.8S e 5S maduros e diminui o número de fatores de processamento no complexo (Nissan et al., 2002). Com base na presença de fatores específicos para cada estágio da maturação e na localização das partículas, foi proposta uma via de processamento (Nissan et al., 2002), determinada pela observação de:

1. Partículas contendo Nsa3p e Nop7p, restritas ao nucléolo;
2. Partículas contendo Nug1p, presentes tanto no nucléolo como no núcleo;
3. Partículas contendo Rix1p e Sda1p, localizadas somente no núcleo;
4. Partículas contendo Arx1p, presentes tanto no núcleo como no citoplasma;
5. Partículas contendo Kre35p, localizadas apenas no citoplasma.

Conforme os dados acima, ao contrário do que ocorre com a partícula pré-40S, as partículas pré-60S apresentam drásticas mudanças estruturais e de composição no interior do núcleo, onde ocorre a maior parte da maturação. Na etapa final, ocorre a exportação da subunidade 60S para o citoplasma, que depende da ligação de Nmd3p, uma proteína adaptadora que contém um sinal de exportação nuclear (NES) e ocorre através do sistema de transporte que envolve Xpo1p/Crm1p/Ran-GTP (Ho et al., 2000; Gadad et al., 2001). A exportação da subunidade 40S utiliza a mesma maquinaria, porém não se sabe qual fator apresenta o sinal de exportação.

1.6 Montagem dos snoRNPs

Dado que os snoRNPs U3, U14, snR10 e snR30 são essenciais para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S, a montagem eficiente destes complexos é um importante pré-requisito para o processamento de RNA ribossomal. Como mencionado anteriormente, os snoRNAs podem ser codificados em unidades independentes, monocistrônicas e policistrônicas, ou no interior de introns (Figura 4). Independente do local onde estão codificados, os pré-snoRNAs têm que sofrer processamento para atingir a forma madura (Filipowicz e Pogacic, 2002). A excisão dos snoRNAs codificados em unidades policistrônicas é feita pela Rnt1p (Chanfreau et al., 1998), cuja atividade de endonuclease fornece um sítio de entrada para que o pré-snoRNA seja processado no sentido 5' → 3' pela Rat1p e Xrn1p e no sentido 3' → 5' pelo exossomo (Allmang et al., 1999a; Van Hoof et al., 2000a). Em alguns RNAs, que não possuem o *hairpin* reconhecido por Rnt1p, o sítio de entrada é gerado pela própria maquinaria de clivagem e poliadenilação associada à RNA polimerase II (Fatica et al., 2000). Os snoRNAs intrônicos podem sofrer maturação por duas vias: a mais comum, envolve a liberação do snoRNA após o splicing, através da ação da enzima Dbr1p (*debranching*) sobre intron em forma de laço, seguida de digestão exonucleolítica para formar as extremidades 5' e 3'; a via minoritária consiste na liberação do snoRNA a partir de clivagem endonucleolítica (Tollervey e Kiss, 1997; Weinstein e Steitz, 1999).

Os *boxes* C, D, H e ACA são necessários para que os pré-snoRNAs sejam processados e para que ocorra sua associação com as proteínas do *core*, o que estabiliza os snoRNAs. Foi mostrado que a maturação e estabilidade dos snoRNAs U16 e U18, codificados em introns em *Xenopus*, depende dos *boxes* C e D

(Caffarelli et al., 1996). A ligação de Nop1p e das outras proteínas do *core* depende da presença destes domínios conservados (Baserga et al., 1991; Huang et al., 1992).

A associação co-transcricional das proteínas do *core* aos snoRNAs é essencial para a maturação dos snoRNPs. A primeira proteína a se ligar nos snoRNAs de *box C/D* é Snu13p, o que torna possível a associação de Nop56p e Nop58p (Watkins et al., 2002; Clery et al., 2007). No caso do snoRNA U18, que não possui sítio de reconhecimento para Rnt1p, a ligação de Nop1p ao snoRNA recruta esta endonuclease, permitindo a maturação da extremidade 3' deste snoRNA (Giorgi et al., 2001). Além disso, a depleção de qualquer uma das proteínas do *core* de *box C/D* (Nop1p, Nop56p, Nop58p e Snu13p) impede a localização dos snoRNPs no nucléolo (Wu et al., 1998). A depleção de Nop58p, por exemplo, leva à perda da localização nucleolar de Nop1p, que passa a ser detectada no núcleo e no citoplasma (Verheggen et al., 2001). A proteína Nop17p é um fator de montagem e estabilidade dos snoRNPs de *box C/D*, cuja depleção leva à perda da localização de todas as proteínas do *core* e, conseqüentemente, alteração no padrão de metilação dos rRNAs 18S e 25S (Gonzales et al., 2005).

O snoRNA U3 é particularmente importante, uma vez que compõe o SSU processomo, que atua na maturação do pré-ribossomo 90S. Este snoRNA é transcrito pela RNA polimerase II a partir de dois genes que possuem introns em *S. cerevisiae*, portanto sua maturação envolve splicing, além de clivagem na extremidade 3' pela Rnt1p, seguida de digestão exonucleolítica pelo exossomo (Kufel et al., 2000).

1.7 Splicing e biogênese de ribossomos

A biogênese de ribossomos e o processo de splicing estão intimamente ligados através de pelo menos duas classes de RNAs: os snoRNAs e os mRNAs que codificam r-proteínas. Dentre os 137 genes que as codificam, 102 (70%) possuem introns e respondem por 90% dos mRNAs que sofrem splicing em *S. cerevisiae* (Ares et al., 1999; Warner, 1999). A presença de introns na maioria dos genes que codificam proteínas ribossomais pode ser explicada pela necessidade de controle do nível dos mRNAs e coordenação com a transcrição dos rRNAs, ou pelo aumento da eficiência de tradução de mRNAs que sofrem splicing (Ares et al, 1999).

O splicing é dirigido por snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), complexos formados por um snRNA (*small nuclear RNA*) associado a proteínas conservadas. Os snRNAs U1, U2, U4 e U5 associam-se a 8 proteínas Sm, enquanto o snRNA U6 associa-se às proteínas Lsm1-8p. Os snoRNPs associam-se ao mRNA formando um complexo denominado spliceossomo. O snRNP U1 associa-se ao sítio de splicing 5' (5'SS) e o U2 liga-se na região do *branch site* (Madhani e Guthrie, 1994; Figura 7A). O passo de ativação consiste na ligação do tri-snRNP U4/U6.U5 ao spliceossomo, seguida pela dissociação do U1 e U4, o que provoca mudanças conformacionais no complexo que o levam à forma ativa (Staley e Guthrie, 1998). A dissociação do snRNP U4, permite que o U6 associe-se com U2, o que forma o centro catalítico da reação de splicing. Além disso, U6 parece com o 5'SS (Jurica e Moore, 2003; Valadkhan, 2005). O snRNP U5 liga-se aos exons nos sítios de splicing 5' e 3', alinhando-os para a formação da *exon junction* (Chan e Cheng, 2005). O complexo que contém os fatores de splicing Prp19p e Cef1p, denominado NTC (*nineteen complex*), não faz parte do *core* da maquinaria de splicing, mas é necessário para estabilizar a ligação do U5 e U6 ao spliceossomo após a dissociação de U1 e U4 (Tsai et al., 1999; Ohi e Gould, 2002; Chan et al., 2003; Chan e Cheng, 2005; Chen et al., 2006; Figura 7A).

A análise da distribuição de introns em genes de *S. cerevisiae* revela diversas particularidades deste organismo em relação a outros eucariotos. Dentre os cerca de 6500 genes desta levedura, apenas 250 (5%) são interrompidos por introns (Hostelge et al., 1998; Spingola et al., 1999; Ares et al., 1999), enquanto 95% dos pré-mRNAs em humanos sofrem splicing (Lander et al., 2001). Além disso, a grande maioria dos mRNAs em *S. cerevisiae* apresenta apenas um intron, que possui no máximo 1 kb, enquanto que em humanos a maioria dos mRNAs é interrompida por

A **B**

Figura 7. Splicing. (A) Esquema da montagem do spliceossomo sobre o mRNA. Os snRNPs U1 e U2 reconhecem a extremidade 5' do intron e o *branch site*, respectivamente. Na etapa seguinte, o complexo U4/U6.U5 se liga. Esta ligação é seguida por um rearranjo estrutural que leva à liberação do U1 e U4 e à ligação do complexo NTC. O spliceossomo é liberado do RNA maduro e o intron é processado ou degradado. Adaptado de Chen et al., 2006. (B) Comparação do grau de conservação das seqüências no sítio de splicing 5' (5'SS), *branchpoint* (BP) e sítio de splicing 3' (3'SS) em diferentes organismos. Adaptado de Lim e Burge, 2001.

vários introns, que podem chegar a 10 kb (Ares et al., 1999; Landerd et al., 2001). Por outro lado, apesar de representarem a minoria do genoma de levedura, os genes contendo introns são altamente expressos e regulados (Warner, 1999; Ares et al., 1999).

Em humanos, as seqüências presentes nos sítios de splicing 5' e 3' e na região do *branch point* apresentam diferentes graus de conservação entre os mRNAs. Proteínas da família SR ligam-se a seqüências no exon ou intron denominadas *splicing enhancers*, aumentando a eficiência de splicing nos mRNAs que possuem seqüências canônicas pouco conservadas (Graveley, 2000; Blencowe, 2000; Hastings e Kreiner, 2001). Em *S. cerevisiae*, por outro lado, estas mesmas seqüências são extremamente conservadas e, embora tenham sido identificadas três proteínas de levedura homólogas às SR, nenhuma delas atua em splicing (Lim e Burge, 2001; Shen e Green, 2006; Figura 7B). Estes dados haviam levado à hipótese de que o splicing em *S. cerevisiae* seria pouco controlado. Entretanto, a análise do perfil global de splicing em cepas mutantes para diversos componentes desta via, utilizando *microarrays* com sondas para os 250 genes que contém introns em levedura, demonstrou a existência de algum grau de especificidade da maquinaria de splicing para diferentes mRNAs (Pleiss et al., 2007). Observando o efeito dos mutantes *prp2-1*, *prp8-1* e *prp5-1* sobre o splicing dos mRNAs, foram observadas três classes de transcritos. A primeira classe é composta por mRNAs que tiveram o splicing igualmente afetado nos três mutantes. O splicing dos mRNAs da segunda classe, da qual fazem parte os genes das proteínas ribossomais, também são afetados pelos três mutantes, porém, a intensidade do efeito varia entre os mutantes. Adicionalmente, uma terceira classe foi identificada, contendo mRNAs que, surpreendentemente, têm o splicing afetado apenas em algumas das cepas mutantes (Pleiss et al., 2007). Estes experimentos indicam que a maquinaria de splicing consegue discriminar entre os transcritos, o que indica a possibilidade de existirem fatores similares às proteínas SR de mamíferos em levedura, que poderiam modular o splicing de mRNAs específicos.

1.8 Caracterização de novos fatores envolvidos no processamento de rRNA

Atualmente, as vias de processamento de rRNA e seus intermediários são bem conhecidos, porém a identificação e a caracterização estrutural e funcional dos cerca de 180 fatores que atuam nesta via permanece um campo de investigação em desenvolvimento. Adicionalmente, a interconexão entre as vias de processamento de rRNA e splicing tornam a caracterização dos fatores envolvidos ainda mais complexa. Buscando identificar novos fatores que atuassem na biogênese de ribossomos, foram realizadas em nosso laboratório varreduras de uma biblioteca de cDNAs utilizando o método do duplo-híbrido. Empregando como isca a proteína Rrp43p, um componente do exossomo, foi isolada Nop17p, cuja função no processamento de rRNA foi caracterizada. Nop17p é uma proteína nucleolar que interage com a proteína do core de snoRNPs de *box C/D*, Nop58p, e está envolvida na montagem e estabilização destes complexos (Gonzales et al., 2005).

Utilizando Nop17p como isca, foi isolada a proteína Cwc24p, alvo do presente estudo. Cwc24p é uma proteína nuclear, essencial para a viabilidade celular, cuja função era até então desconhecida. Neste trabalho, mostramos que Cwc24p interage diretamente com Nop17p e também com Cef1p, que faz parte do complexo NTC de splicing. Condizente com estes dados de interação e como demonstrado aqui, Cwc24p atua como um fator de eficiência de splicing do snoRNA U3, essencial para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S, influenciando indiretamente o processamento do RNA ribossomal.

2. OBJETIVOS

Os dados preliminares de interação indicavam que Cwc24p estivesse envolvida em processamento de RNA. Com base nisso, o objetivo geral deste trabalho de doutorado foi a caracterização funcional da proteína Cwc24p de *Saccharomyces cerevisiae*, investigando seu envolvimento na biogênese de ribossomos. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Obtenção de uma cepa mutante condicional $\Delta cwc24$ para análise dos efeitos da depleção de Cwc24p sobre o metabolismo de RNA.
- b) Determinação da localização subcelular de Cwc24p.
- c) Análise do possível efeito de Cwc24p no processamento de RNA.
- d) Investigação da interação de Cwc24p com outras proteínas.
- e) Identificação de domínios ou regiões de Cwc24p funcionalmente importantes.
- f) Realização de ensaios de atividade *in vitro* com Cwc24p.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Métodos usuais de biologia molecular foram realizados de acordo com Sambrook et al. (1989) e métodos de cultura e manipulação de *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados como descrito por Sherman et al. (1986), de acordo com os detalhes e modificações descritos abaixo.

3.1 Cultura e manipulação de *E. coli*

Para expressão heteróloga de proteínas foi utilizada a cepa BL21 CodonPlus(DE3)-RIL (*Stratagene*) e para os demais experimentos foi utilizada a cepa DH5 α (Hanahan, 1983), cujas características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *E. coli* utilizadas neste estudo

Cepa	Características	Referência
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r]	Stratagene
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1983

As bactérias foram mantidas nos meios de cultura descritos abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Meios de cultura para *E. coli* utilizados neste estudo.

Meio	Composição
LB	1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 2% ágar
2YT	1,6% triptona; 1% extrato de levedura; 1% NaCl
TB	1,2% triptona; 2,4% extrato de levedura; 0,4% (v/v) glicerol; 0,17M KH ₂ PO ₄ ; 0,72M K ₂ HPO ₄
TYM	2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,58% NaCl; 0,25% MgSO ₄
Suplementados, conforme a necessidade, com:	
Ampicilina	100 μ g/mL
Kanamicina	20 μ g/mL
Cloranfenicol	50 μ g/mL
IPTG	0,5 mM
X-GAL	80 μ g/mL

3.1.1 Preparação de células competentes DH5 α

Uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 1mL de meio TYM (Tabela 2) e a cultura foi incubada por 16 horas a 37°C. No dia seguinte a cultura foi diluída (400 μ L da cultura inicial em 40mL de meio) e incubada a 37°C até atingir OD₆₀₀=0,2-0,6. Os 40mL de cultura foram então diluídos em 200mL de TYM, seguindo incubação até OD₆₀₀=0,5-0,9. Os 200mL de cultura foram novamente diluídos em 1L de meio, seguindo incubação até atingir OD₆₀₀=0,6. A suspensão de células foi resfriada em banho de gelo e água por 15 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. As células coletadas foram ressuspensas em 100mL de TFB1 gelado (0,03M KOAc; 0,05M MnCl₂; 0,1M KCl; 0,01M CaCl₂ e 15% glicerol), coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 8 minutos a 4°C e novamente ressuspensas em 10mL de TFB2 gelado (0,1M MOPS, pH=7,0; 0,75M CaCl₂; 0,02M KCl; 15% glicerol). A suspensão de células competentes foi dividida em alíquotas de 100 μ L, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.1.2 Transformação de células competentes DH5 α

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

3.1.3 Preparação de células competentes BL21

Cultura de 2mL em meio LB, iniciada a partir de uma colônia de bactéria isolada, foi incubada a 37°C por 16 horas. Em seguida, 100 μ L da suspensão de células foram diluídos em 10mL de LB e a cultura foi incubada a 37°C até atingir OD₆₀₀=0,6, sendo então transferida para tubos de centrifuga e incubada no gelo por

15 minutos. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 5mL de solução 0,1M CaCl₂ gelada. Após incubação por 30 minutos no gelo, as células foram novamente coletadas e ressuspensas em 0,5mL de solução gelada contendo 0,1 M CaCl₂ e 15% glicerol. A suspensão de células competentes foi dividida em alíquotas de 50µL, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.1.4 Transformação de células competentes BL21

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

3.1.5 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina, como descrito abaixo, ou através do *kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN)*, segundo instruções do fabricante.

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

3.2 Métodos de manipulação de DNA e construção de plasmídeos

Os métodos de construção de plasmídeos, incluindo reação de polimerase em cadeia (PCR), análise de restrição, separação por eletroforese e demais métodos usuais de biologia molecular foram conduzidos de acordo com Sambrook et al. (1989) com os detalhes e modificações descritos abaixo.

3.2.1 Purificação de DNA em gel de agarose

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

3.2.2 Amplificação de DNA por PCR

Nas reações de PCR foram utilizados 2ng de DNA plasmidial ou 500ng de DNA genômico de *S. cerevisiae* e os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3. As reações continham 1,5mM MgCl₂, 200μM de dNTPs (desoxi-ribonucleotídeos), 200nM dos *primers* e 0,025U/μL de Taq DNA polimerase em reações de volume final 100μL. O ciclo utilizado, exceto onde mencionado em contrário, consistiu em: desnaturação a 94°C por um minuto; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização em temperatura 5°C abaixo da T_m (*melting temperature*) dos *primers* por 1 minuto e extensão por 1 minuto a 72°C; extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos obtidos na amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose e purificados através do *kit QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

3.2.3 Seqüenciamento de plasmídeos

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

3.2.4 Construção de plasmídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para clonagens e seqüenciamento de DNA estão descritos na Tabela 3 e os plasmídeos utilizados neste estudo, descritos na Tabela 4, foram construídos de acordo com as estratégias de clonagem descritas abaixo.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para clonagens e seqüenciamento de DNA.

	Oligo.	Seqüência	Referência
O1	LR323Eco5	5'-CAAAGCTCCAG GAATTC ATG-3'	Este estudo
O2	LR323Bam3	5'-GTTGATATG GGATCCT CCAT-3'	Este estudo
O3	LR323Rev185	5'-CCTTCATTCTCATGTGAAAG-3'	Este estudo
O4	323ZNFor	5'-CC GATATC CTGCAAAGATTACAAACAGA CGG-3'	Este estudo
O5	323C144AFor	5'-CC GATATC CGCCAAAGATTACAAACAGA CG-3'	Este estudo
O6	323RINGFor	5'-CC AGCTG GTGCACTCTTTGTAAGGAAG-3'	Este estudo
O7	323C199AFor	5'-CC AGCTG GGCCACTCTTTGTAAGGAAG AT-3'	Este estudo
O8	MR213F	5'-GGAATTCCAGCTGACCACCATG-3' *	<i>Research Genetics</i>
O9	MR213R	5'-GATCCCCGGGAATTGCCATG-5' *	<i>Research Genetics</i>
O10	MR213For273	5'-GGCCAGGGCTGCACAG-3'	Este estudo
O11	MR213Rev1460	5'-TGCTGCATACGCGACTC-3'	Este estudo
O12	323Sma432Rev	5'-GCA ACCCGGGG GGCTGAAAATCC-3'	Este estudo
O13	323C213PFor	5'-CCAGTGGTCACAAAC CCCGGG CAT-3'	Este estudo
O14	323C213PRev	5'-ATG CCCGGGG TTTGTGACCACTGG-3'	Este estudo
O15	ExsnR17ASalF	5'- GTCGAC GTA CTTCATAGGATC-3'	Este estudo
O16	ExsnR17AXhoR	5'-GG CTCGAG ACTTGT CAGACTGCCATTTG TACCC-3'	Este estudo
O17	ExU3ABamSalF	5'-CCC GGATCCGTCGAC GTA CTTCATAGGA TCATTTCTATAGGAATCGTCACTC-3'	Este estudo
O18	ExU3AXbaXhoR	5'-GGG TCTAGACTCGAG ACTTGT CAGACTG CCATTTGTACCC-3'	Este estudo
O19	RPS2BamFor	5'-CC GGATCC ATGTCTGCTCCAGAAGCTC-3'	Este estudo
O20	RPS2SalRev	5'-CC GTCGAC TTAGAATCTCTTCTTTTGAG CAG-3'	Este estudo
O21	PRsnR17aEcoF	5'- CGAATTC CCCCGTCTACCGGTAAAGC-3'	Este estudo
O22	PRsnR17aSalR	5'-GTAC GTCGAC ACAGATTTTAAG-3'	Este estudo

O23	TERsnR17aPstR	5'-CC CTGCAG GCACGTAAGGATGCAAAGC G-3'	Este estudo
O24	113Bam5	5'- CCCGGGATCC ATGGCAGAGCAGCTTTCT CC-3'	Este estudo
O25	113Sal3	5'-GGAG TCGAC CTAAGTAATGGGAATTGCA TCC-3'	Este estudo
O26	113ZNFFor	5'-CC GATATC CTGTAAGGACTACAAAGAGA CTGG-3'	Este estudo
O27	113C202A	5'-CC GATATC CGCTAAGGACTACAAAGAGA CTGG-3'	Este estudo
O28	113RINGFor	5'-CC AGCTG GTGTTTCATCTGTCGCCAGA GC-3'	Este estudo
O29	113C262A	5'-CC AGCTG GGGCTTTCATCTGTCGCCAGA GC-3'	Este estudo
O30	pUGSeq	5'-CAGTCTTGTTACCAGACAACC-3'	Este estudo
O31	PMET25SEQ	5'-CATAATAACCGAAGTGTCG-3'	Este estudo
O32	GSTFor	5'-GGTGATCATGTAACCC-3'	Este estudo
O33	GFPNFUSFor	5'-GGCGATGGCCCTGTCC-3'	Este estudo
O34	PNFUSFor	5'-TCTAGTGGATCCCCC-3'	Este estudo
O35	PNFUSRev	5'-GGGACCTAGACTTCAG-3'	Este estudo
O36	LexAseq	5'-CTTCGTCAGCAGAGC-3'	Oliveira, não publicado
O37	RevBTMSeg3	5'-GTCACCTTTAAAATTTGTATACAC-3'	Oliveira, não publicado
O38	GALACTD	5'-TACCACTACAATGGATG-3'	Oliveira, não publicado
O39	SEQ3GAD	5'-GAGGTTACATGGCCAACATTG-3'	Oliveira, não publicado
O40	GAL1	5'-GCTGCATAACCACTTTAAC-3'	Oliveira, não publicado

Sítios de restrição estão destacados em negrito.

* Coleção de *primers* para amplificação de genes de levedura (*Research Genetics*). Apenas a região comum entre os *primers* da coleção está indicada.

Tabela 4. Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Características	Referência
pGEMT	<i>lacZ</i> , <i>Amp^R</i>	<i>Promega</i>
pBS	<i>lacZ</i> , <i>Amp^R</i>	<i>Stratagene</i>
pBTM116	<i>BDlexA</i> ¹ , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Bartel e Fields, 1995
pBTM-CWC24	<i>BDlexA::CWC24</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM-cwc24 [1-164]	<i>BDlexA::cwc24</i> [1-164] *, <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM- cwc24 [86-164]	<i>BDlexA::cwc24</i> [86-164], <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM- cwc24 [86-260]	<i>BDlexA::cwc24</i> [86-260], <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM- cwc24 [144-260]	<i>BDlexA::cwc24</i> [144-260], <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM- cwc24 [144-260] (C144A)	<i>BDlexA::cwc24</i> [144-260] (C144A) , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM- cwc24 [199-260]	<i>BDlexA::cwc24</i> [199-260], <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM- cwc24 [199-260] (C199A)	<i>BDlexA::cwc24</i> [199-260] (C199A) , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este estudo
pBTM-NOP17	<i>BDlexA::NOP17</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Gonzales et al., 2005
pACT	<i>ADGAL4</i> ² , <i>LEU2</i> , 2 μ m	
pACT-cDNA	<i>ADGAL4::cDNA library</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	ATCC, 87002
pACT-cwc24 [6-260]	<i>ADGAL4::CWC24</i> [6-260], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD	<i>ADGAL4</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	James et al., 1996
pGAD-CWC24	<i>ADGAL4::CWC24</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD-cwc24 [1-85]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [1-85], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [1-164]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [1-164], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [86-164]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [86-164], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [86-260]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [86-260], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [165-260]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [165-260], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [144-260]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [144-260], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [144-260] (C144A)	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [144-260] (C144A), <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [199-260]	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [199-260], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD- cwc24 [199-260] (C199A)	<i>ADGAL4:: cwc24</i> [199-260] (C199A), <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD-NOP17	<i>ADGAL4::NOP17</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Gonzales et al., 2005
pGAD-ZNF113A	<i>ADGAL4::ZNF113A</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD-znf113a [202-343]	<i>ADGAL4::znf113a</i> [202-343], <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
pGAD-QUIMERA	<i>ADGAL4::QUIMERA</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este estudo
YCplac111	<i>pUC19-MCS</i> , <i>LEU2</i> , <i>CEN4</i>	Gietz e Sugino, 1998
YCp111GAL	<i>GAL1</i> ³ , <i>LEU2</i> , <i>CEN4</i>	Este estudo
YCp111GAL-CWC24	<i>GAL1::CWC24</i> , <i>LEU2</i> , <i>CEN4</i>	Este estudo
YCplac33	<i>pUC19-MCS</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	Gietz e Sugino, 1998

YCp33GAL	<i>GAL1, URA3, CEN4</i>	Este estudo
YCp33GAL-CWC24	<i>GAL1::CWC24, URA3, CEN4</i>	Este estudo
YCp33GAL-A	<i>GAL1::ProtA⁴, URA3, CEN4</i>	Este estudo
YCp33GAL-A-CWC24	<i>GAL1::ProtA-CWC24, URA3, CEN4</i>	Este estudo
pGFP-N-FUS	<i>MET25::GFP, URA3, CEN6⁵</i>	Niedenthal et al., 1996
pGFP-N-CWC24	<i>MET25::GFP-CWC24, URA3, CEN6⁶</i>	Este estudo
pUG34	<i>MET25::yEGFP3, HIS3, CEN6</i>	Guedener e Hegemann, não publicado
pUG34-CWC24	<i>MET25::yEGFP3-CWC24, HIS3, CEN6</i>	Este estudo
pUG34-cwc24 [1-144]	<i>MET25::yEGFP3-cwc24 [1-144], HIS3, CEN6</i>	Este estudo
pUG34-cwc24 [144-260]	<i>MET25::yEGFP3-cwc24 [144-260], HIS3, CEN6</i>	Este estudo
pGEX	<i>GST⁷, lacI, Amp^R</i>	GE Healthcare
pGEX-CWC24	<i>GST::CWC24, lacI Amp^R</i>	Este estudo
pET	<i>HIS₆, lacI, Kan^R</i>	Novagen
pET-His-NOP17	<i>HIS₆::NOP17, lacI, Amp^R</i>	Gonzales et al., 2005
pET-His-CEF1	<i>HIS₆::CEF1, lacI, Amp^R</i>	Este estudo

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

¹ *BDlexA*, *lexA* DNA binding domain de *E. coli*.

² *ADGAL4*, *Gal4p* transcription activation domain de *S. cerevisiae*.

³ *GAL1*, promotor do gene *GAL1* de *S. cerevisiae* (galactokinase).

⁴ *ProtA*, domínio ZZ da proteína A de *S. aureus*.

⁵ *MET25*, promotor do gene *MET25* (O-acetil homoserine-O-acetil serina sulfidrilase) de *S. cerevisiae*.

⁶ *GFP*, *green fluorescent protein* de *A. victoria*.

⁷ *GST*, glutathione-S-transferase de *S. japonicum*.

Para ensaios de interação entre proteínas pelo método do duplo-híbrido, o DNA correspondente à ORF (*open reading frame*) YLR323c / *CWC24* foi amplificado por PCR utilizando como molde DNA genômico de *S. cerevisiae* e os *primers* O1 e O2 (Tabela 3), com sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O gene foi clonado no vetor pBTM116 (Bartel e Fields, 1995), gerando o plasmídeo **pBTM-CWC24**, que expressa a proteína de fusão BDlexA-Cwc24p (fusão N-terminal com o domínio de ligação a DNA de *lexA* de bactéria). Também utilizando os sítios de *EcoRI* e *BamHI*, o gene *CWC24* foi clonado no vetor pGAD (James et al., 1996), gerando o plasmídeo **pGAD-CWC24**, que permite a expressão da proteína de fusão AD-Cwc24p (fusão N-terminal com o domínio de ativação da transcrição do fator de transcrição *Gal4p* de levedura). Em seguida, foram clonados nestes mesmos vetores porções truncadas e / ou mutadas do gene *CWC24*, para mapear regiões de interação e para ensaios de complementação da cepa

condicional $\Delta cwc24$ utilizando as estratégias de clonagem sumarizadas abaixo (Tabela 5).

Tabela 5. Estratégia de clonagem de mutantes de *CWC24*.

Plasmídeo	Obtenção do fragmento	Sítios de clonagem no pBTM ou pGAD
pGAD-cwc24 [1-85]	pBTM-CWC24, <i>EcoRI BglII</i> *	<i>EcoRI BamHI</i>
pBTM-cwc24 [1-85]	pGAD-cwc24 [1-85], <i>EcoRI PstI</i> *	<i>EcoRI PstI</i>
pBTM-cwc24 [1-144]	O1 e O12, <i>EcoRI SmaI</i> **	<i>EcoRI SmaI</i>
pBTM-cwc24 [1-164]	pBTM-CWC24, <i>EcoRI XhoI</i> *	<i>EcoRI Sall</i>
pGAD-cwc24 [86-164]	pBTM-CWC24, <i>BglII XhoI</i> *	<i>BamHI Sall</i>
pBTM-cwc24 [86-164]	pGAD-cwc24, [86-164], <i>EcoRI PstI</i> *	<i>EcoRI PstI</i>
pGAD-cwc24 [86-260]	pBTM-CWC24, <i>BglII BamHI</i> *	<i>BamHI</i>
pBTM-cwc24 [86-260]	pBTM-CWC24, <i>BglII BamHI</i> *	<i>BamHI</i>
pGAD-cwc24 [165-260]	pBTM-CWC24, <i>XhoI BamHI</i> *	<i>Sall BglII</i>
pGAD-cwc24 [144-260]	O4 e O2, <i>EcoRV BamHI</i> **	<i>SmaI BamHI</i>
pBTM-cwc24 [144-260]	O4 e O2, <i>EcoRV BamHI</i> **	<i>SmaI BamHI</i>
pGAD-cwc24 [144-260] (C144A)	O5 e O2, <i>EcoRV BamHI</i> **	<i>SmaI BamHI</i>
pGAD-cwc24 [199-260]	O6 e O2, <i>PvuII BamHI</i> **	<i>SmaI BamHI</i>
pBTM-cwc24 [199-260]	O6 e O2, <i>PvuII BamHI</i> **	<i>SmaI BamHI</i>
pGAD-cwc24 [199-260] (C199A)	O7 e O2, <i>PvuII BamHI</i> **	<i>SmaI BamHI</i>

* Fragmento obtido por clivagem do plasmídeo indicado com as enzimas mencionadas.

** Fragmento obtido por amplificação com os oligonucleotídeos citados (Tabela 3), seguida de clivagem com as enzimas de restrição indicadas.

Para expressão condicional da proteína Cwc24p em levedura, o gene *CWC24* foi clonado em vetor de expressão centromérico sob controle do promotor regulável *GAL1* (promotor do gene *GAL1*, galactoquinase, de *S. cerevisiae*), que fica reprimido quando a levedura é incubada em meio contendo glicose como fonte de carbono. Para tanto, um fragmento contendo o gene *CWC24* foi obtido a partir de clivagem do vetor **pBTM-CWC24** com *EcoRI*, tratamento com T4 DNA polimerase e clivagem com *PstI*. Em seguida, este fragmento foi clonado no plasmídeo YCplac111-GAL, clivado com *NdeI*, tratado com T4 DNA polimerase e clivado com *PstI*, gerando o plasmídeo **YCp111GAL-CWC24**. A mesma estratégia foi utilizada para construção do plasmídeo **YCp33GAL-CWC24**, que possui as mesmas características do vetor anteriormente mencionado, exceto por apresentar como marca de seleção o gene *URA3*, enquanto o primeiro possui o gene *HIS3*.

Um vetor que expressa em levedura a proteína Cwc24p em fusão N-terminal com o domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus* (ProtA-Cwc24p) foi construído para ensaios de co-imunoprecipitação. Para tanto, o plasmídeo **pBTM-CWC24** foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, sendo o fragmento gerado subclonado no vetor pBS (Stratagene) clivado com as mesmas enzimas. O fragmento foi retirado do pBS com as enzimas *SmaI* e *Hind III* e clonado no vetor **YCplac33-GAL-ProtA** clivado com os mesmos sítios gerando **YCp33GAL-ProtA-CWC24**.

A expressão heteróloga da proteína Cwc24p em *E. coli* foi feita utilizando o vetor **pGEX-CWC24**, que possibilita a expressão da proteína de fusão GST-Cwc24p (fusão N-terminal com GST, glutationa-S-transferase de *Schistosoma japonicum*). Este plasmídeo foi construído através de clonagem de fragmento de DNA no vetor de interesse usando os sítios de *EcoRI* e *BamHI*.

Nos ensaios de localização subcelular por microscopia de fluorescência, foram utilizadas proteínas de fusão N-terminal GFP-Cwc24p (*green fluorescent protein* de *Aequorea victoria*). Para isso, um fragmento contendo o gene *CWC24*, obtido por clivagem do vetor pBTM-CWC24 com as enzimas *EcoRI* e *Sall*, foi clonado no vetor pBS. Em seguida, este vetor foi clivado com *SmaI* e *Sall* e o fragmento obtido foi clonado no vetor pGFP-N-FUS (Niedenthal et al., 1996) clivado com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo **pGFP-N-FUS-CWC24**. Além disso foi observada a localização das porções N-terminal e C-terminal da proteína Cwc24p utilizando o vetor pUG34 (Gueldener e Hegemann, dados não publicados), que possui o gene *yEGFP3*, que codifica uma proteína fluorescente verde modificada. A partir da clivagem do vetor YCp33GAL-ProtA-CWC24 com as enzimas *SmaI* e *Sall*, foi obtido um fragmento contendo o gene *CWC24*, que foi clonado no vetor pUG34 clivado com as mesmas enzimas, gerando o vetor **pUG34-CWC24** (expressando a proteína inteira). A porção do gene *CWC24* correspondente ao N-terminal foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos O1 e O12 (Tabela 3) e o fragmento obtido, clivado com as enzimas *EcoRI* e *SmaI*, foi clonado no vetor pUG34 clivado com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*, gerando o vetor **pUG34-cwc24 [1-144]**. A porção correspondente ao C-terminal foi obtida por clivagem do vetor pBTM-cwc24 [144-260] com as enzimas *EcoRI* e *Sall*, sendo o fragmento obtido clonado no vetor pUG34 clivado com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo **pUG34-cwc24 [144-260]**.

Através da comparação da sequência da proteína Cwc24p de levedura com bancos de dados foi encontrada uma possível proteína ortóloga em humanos, ZNF113A. Para ensaios de duplo-híbrido e complementação da cepa $\Delta cwc24$, o gene que codifica a proteína ZNF113A foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos O24 e O25 (Tabela 3) e DNA total de linfócitos de humanos como molde. O fragmento obtido foi clivado com *BamHI* e *Sall* e clonado no vetor pGAD clivado com as mesmas enzimas, gerando **pGAD-ZNF113A**. Uma porção correspondente ao C-terminal da proteína de humanos, que possui dois domínios conservados evolutivamente, foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos O26 e O25 e o vetor pGAD-ZNF113A como molde. Após clivagem com as enzimas *EcoRV* e *Sall*, o fragmento foi clonado no vetor pGAD clivado com *SmaI* e *Sall*, gerando o plasmídeo **pGAD-znf113a [202-343]**.

Foi construído um plasmídeo que expressa uma proteína quimérica, contendo a porção N-terminal da proteína Cwc24p de levedura e o C-terminal da proteína ZNF113A de humanos. Para tanto, a porção correspondente ao N-terminal de Cwc24p (obtida como descrito acima) foi fundida à porção C-terminal de ZNF113A. Ambos fragmentos foram clonados no vetor pGAD clivado com *EcoRI* e *Sall*, gerando um plasmídeo que foi denominado **pGAD-QUIMERA**.

Para ensaios de interação, um fragmento contendo o gene *CEF1* (YMR213w) foi obtido por PCR utilizando os *primers* O8 e O9 (Tabela 3) e clonado no vetor pGEMT (Promega). Este vetor foi clivado com *PvuII* e *Sall* e o fragmento obtido foi clonado no vetor pBS (Stratagene) clivado nos sítios de *SmaI* e *Sall*. Em seguida, este vetor foi clivado com *BamHI* e *Sall* e o fragmento foi clonado no vetor pET28a (Novagen) clivado com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo **pET-CEF1**, que permite a expressão da proteína de fusão His₆-Cef1p em *E. coli*.

3.3 Cultura e manipulação de *S. cerevisiae*

Métodos de cultura e manipulação de leveduras foram realizados conforme descrito por Sherman et al. (1986), exceto quando indicada outra referência.

As cepas de levedura utilizadas neste estudo foram mantidas nos meios de cultura descritos na Tabela 6 e suas principais características genéticas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 6. Meios de cultura de levedura utilizados neste estudo.

Meio	Composição
YNB Glicose / Galactose (meio mínimo)	0,7% YNB (<i>yeast nitrogen base</i>); 2% glicose / galactose; 2% ágar; suplementado com bases nitrogenadas e aminoácidos necessários
YPD / YPGal (meio rico)	1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose / galactose; 2% ágar
Pré-Esporulação 1	0,8% Extrato de Levedura; 0,3% Peptona; 1% Glicose; 2% Agar
Pré-Esporulação 2 (GNA)	5% Glicose; 3% Difco <i>nutrient broth</i> ; 1% Extrato de levedura; 2% Agar
Esporulação 1	0,25% Extrato de Levedura e 1,5% Acetato de Potássio
Esporulação 2	1% Acetato de Potássio; 2% Agar
Esporulação 3	1% Acetato de Potássio; 0.1% Extrato de Levedura; 0.05% Glicose; 2% Agar
Esporulação 4	1% Acetato de Potássio e 0,005% Acetato de Zinco
Suplementados, conforme a necessidade, com:	
Geneticina (G418)	200 µg/mL
Adenina	20 µg/mL
Uracila	20 µg/mL
Histidina	20 µg/mL
Triptofano	20 µg/mL
Leucina	30 µg/mL
Lisina	30 µg/mL

Tabela 7. Cepas de levedura utilizadas neste estudo.

Cepa	Características	Referência
L40	<i>MATa, his3Δ200, trp1-901, leu2-3,311, ade2, LYS2::(lexAop)₄-HIS3, URA3::(lexAop)₈-lacZ</i>	Vojtek e Hollenberg, 1995
L40-41	L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP8	Zanchin e Goldfarb, 1999
YFG-131	L40, pBTM-NOP17, pGAD	Gonzales et al., 2005
YFG-247	L40, pBTM-NOP17, pACT-cwc24 [6-260] *	Este estudo
YMG-222	L40, pGAD, pBTM-CWC24	Este estudo
YMG-223	L40, pGAD-NOP17, pBTM-CWC24	Este estudo
YMG-224	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [1-85]	Este estudo
YMG-225	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [1-164]	Este estudo
YMG-226	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [86-164]	Este estudo
YMG-227	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [86-260]	Este estudo
YMG-228	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [144-260]	Este estudo
YMG-229	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [199-260]	Este estudo
CWC24	<i>Mata, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, CWC24</i>	<i>Research Genetics</i>
CWC24/cwc24::KAN ^R	<i>MAT a/α, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, ura3Δ0/ura3Δ0, MET15/met15Δ0, CWC24/CWC24c::KAN^R</i>	Euroscarf
Δcwc24/GAL1::CWC24	<i>his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, CWC24::KAN^R, YCp111GAL-CWC24</i>	Este estudo
YMG-241	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24	Este estudo
Δcwc24/GAL1::CWC24, AD	Δcwc24/GAL1::CWC24, YCp33GAL-CWC24, pGAD	Este estudo
Δcwc24/GAL1::CWC24, AD-CWC24	Δcwc24/GAL1::CWC24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-CWC24	Este estudo
YMG-230	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pACT-cwc24 [6-260]	Este estudo
YMG-231	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [1-85]	Este estudo
YMG-232	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [1-164]	Este estudo
YMG-233	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [86-164]	Este estudo
YMG-234	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [86-260]	Este estudo
YMG-235	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [165-260]	Este estudo
YMG-236	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [144-260]	Este estudo
YMG-237	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [144-260] (C144A)	Este estudo
YMG-238	Δcwc24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-cwc24 [199-260]	Este estudo

YMG-239	$\Delta cwc24$, YCp33GAL-CWC24 pGAD-cwc24 [199-260] (C199A)	Este estudo
YMG-240	$\Delta cwc24$, YCp33GAL-CWC24, pGAD-ZNF113A	Este estudo
YMG-241	$\Delta cwc24$, YCp33GAL-CWC24 pGAD-znf113a [202-343]	Este estudo
YMG-242	$\Delta cwc24$, YCp33GAL-CWC24 pGAD-cwc24 [199-260] (C199A)	Este estudo
W303	<i>MATa ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	
YMG-243	W303, pGFP-N-FUS	Este estudo
YMG-244	W303, pGFP-N-FUS-CWC24	Este estudo
YMG-245	W303, YCp33GAL-A	Este estudo
YMG-246	W303, YCp33GAL-A-CWC24	Este estudo
YMG-247	CWC24, pUG34	Este estudo
YMG-248	CWC24, pUG34-CWC24	Este estudo
YMG-249	CWC24, pUG34-cwc24 [1-144]	Este estudo
YMG-250	CWC24, pUG34-cwc24 [144-260]	Este estudo

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

3.3.1 Transformação de alta eficiência de *S. cerevisiae*

Uma colônia isolada de levedura foi inoculada em 10mL de meio seletivo, sendo a cultura incubada a 30°C até atingir OD₆₀₀=0,8. Em seguida, 6mL da suspensão de células foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, as células foram lavadas com 2mL de água estéril por agitação em vórtex por 1 minuto, coletadas novamente por centrifugação e ressuspensas em 200μL de solução 0,1M LiOAc em tampão TE (10mM Tris-Cl pH=8,0; 1mM EDTA pH=8,0). A 100μL desta suspensão de células foram adicionados 5μg de DNA plasmidial e 200 μg de DNA de esperma de salmão desnaturado (Gibco). Em seguida foram adicionados 600μL de solução de transformação (0,1M LiOAc, 50% PEG₃₅₀₀ em TE; PEG, polietilenoglicol) e a reação foi incubada a 30°C por 30 minutos. As células foram então submetidas a choque térmico por incubação a 42°C por 15 minutos, coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão TE e plaqueadas em meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por 2 dias ou até o aparecimento de colônias.

3.3.2 Transformação rápida de *S. cerevisiae*

Células de 200 μ L de cultura em OD₆₀₀ $\approx$ 1,0 foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, lavadas com 100 μ L TE (10mM Tris-HCl pH=8; 1mM EDTA pH=8), coletadas novamente e ressuspensas em 100 μ L de solução de transformação (0,2M LiOAc; 40% PEG; 100mM DTT). Após adição de 2 a 5 μ g de DNA plasmidial, as células foram submetidas a choque térmico por 30 minutos a 42°C, sendo em seguida plaqueadas em meio seletivo por dois dias ou até o aparecimento de colônias.

3.3.3 Extração de DNA plasmidial de *S. cerevisiae*

Para extração de DNA plasmidial, uma cultura de levedura foi incubada a 30°C até atingir OD₆₀₀ $\approx$ 1,0. Células de 3mL desta cultura foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto e ressuspensas em 200 μ L de solução de lise (1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-Cl, pH=8,0 e 1mM EDTA). Foram adicionados 200 μ L de fenol-clorofórmio pH=7,5; 1 volume de pérolas de vidro e o tubo foi agitado em vórtex por 2 minutos. Após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo novo e nova extração com 200 μ L de fenol-clorofórmio foi realizada. O DNA foi precipitado da fase aquosa por adição de 200mM de NaCl e 1 mL de etanol gelado com incubação a -20°C por 30 minutos. O DNA, obtido após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado, com agitação por 1 minuto em vórtex, seco em bloco a 42°C por 5 minutos e ressuspensado em 20 μ L de tampão TE.

3.3.4 Extração de DNA total de *S. cerevisiae*

Células de 10mL de cultura em fase estacionária foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, lavadas com 2mL de água e incubadas em 10mL de 1M sorbitol com 14mM de β -mercaptoetanol, por 30 minutos a 30°C. As células foram coletadas e ressuspensas em 800 μ L de tampão de esferoplastização (0,9M Sorbitol; 50mM tampão fosfato de sódio, pH=7,5 e 14mM β -mercaptoetanol). Para formação de esferoplastos, foram adicionados 10 μ L de liticase (10mg/mL) e, após incubação por 30 minutos a 37°C, a digestão da parede celular foi checada em microscópio. Os esferoplastos foram coletados por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, ressuspensos em 500 μ L de solução de

lise (50mM Tris-HCl, pH=8,0; 20mM EDTA e 1% SDS) e incubados a 65°C por 20 minutos. A reação foi terminada por resfriamento em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 200µL de 5M KOAc e a suspensão foi incubada em gelo por 1 hora. Após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo novo e o DNA foi precipitado pela adição de 750µL de isopropanol e incubação a -20°C por 30 minutos. O DNA foi coletado por centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, lavado com 1mL de etanol 70%, seco em bloco a 42°C por 5 minutos e ressuspendido em 50µL de tampão TE, por incubação a 42°C por 10 minutos.

3.3.5 Esporulação de levedura e isolamento de esporos

A cepa diplóide $\Delta cwc24$ (CWC24/*cwc24::KAN^R*) obtida da EUROSCARF, transformada com o plasmídeo YCp111GAL-CWC24, foi cultivada em meio de pré-esporulação (5% glicose; 3% *Difco nutrient broth*; 1% extrato de levedura e 2% agar) a 30°C por 18h. As células foram coletadas do meio sólido por arraste com 1 mL de água estéril e transferidas para 1 mL de meio de esporulação (1% acetato de potássio e 0,005% Acetato de Zinco) por cerca de 15 dias, até o aparecimento de tétrades. Os esporos são mais hidrofóbicos do que as células diplóides e foram separados pelo processo a seguir, modificado de Sherman et al. (1986). Células de 1mL de cultura em meio de esporulação foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, lavadas com 1 mL de água estéril e ressuspendidas em 50µL de água. Após adição de 10µL de liticase (10mg/mL) e incubação por 30 minutos a 30°C, a formação de esferoplastos foi checada em microscópio. Os esferoplastos coletados foram ressuspendidos em 500µL de água e agitados em vórtex por 1 minuto, sendo este passo repetido por mais três vezes. Durante este processo, os esporos, por serem mais hidrofóbicos, têm maior probabilidade de ficarem aderidos às paredes do tubo, enquanto as células diplóides têm maior probabilidade de permanecerem no meio aquoso, que é descartado. Os esporos foram retirados da parede do tubo por adição de 800µL de solução 0,01% Tween e agitação em vórtex por 3 minutos. Em seguida, para separar os 4 esporos da tétrade, a suspensão foi submetida a ultra-som (3 pulsos de 20 segundos com amplitude 20%, intercalados por intervalos de 30 segundos de incubação em gelo). Frações de 100µL da solução resultante foram plaqueadas em meio YPGal contendo geneticina (200µg/mL). As células que cresceram em meio contendo galactose e geneticina e que não

cresceram em meio contendo glicose foram isoladas e caracterizadas, como descrito a seguir (Figura 8).

3.4 Obtenção da cepa condicional $\Delta cwc24$

Após esporulação da cepa diplóide $CWC24/cwc24::KAN^R$, $YCp111GAL::CWC24$, foram selecionadas inicialmente as cepas que cresciam em meio contendo galactose e geneticina, indicando que estas cepas possuíam uma cópia do gene $CWC24$ interrompida (podendo ser células diplóides, que não foram separadas $CWC24/cwc24::KAN^R$ ou as células haplóides $cwc24:KAN^R$). Em um segundo passo de seleção, foram identificadas as cepas que cresciam em meio contendo galactose (condição na qual o promotor $GAL1$ está ativo e expressa o gene $CWC24$), mas que não cresciam em meio contendo glicose como fonte de carbono (condição na qual o promotor $GAL1$ está reprimido). Estas cepas possuem o genótipo desejado, $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$, uma vez que necessariamente possuem a cópia do gene $CWC24$ endógena interrompida e dependem da expressão do gene selvagem a partir do plasmídeo (Figura 8).

3.4.1 Comprovação do genótipo da cepa $\Delta cwc24$ por PCR

Para comprovar a obtenção da cepa haplóide contendo o genótipo desejado, DNA total foi extraído de uma das cepas selecionadas conforme descrito acima e utilizado como molde em reação de PCR com *primers* O1 e O2, que hibridizam a montante do códon de iniciação da tradução de $CWC24$ e a jusante do códon de terminação, conforme descrito na seção de resultados.

3.4.2 Análise de crescimento da cepa $\Delta cwc24$

A análise do crescimento da cepa $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ em relação à cepa selvagem $CWC24$, foi feita por curva de crescimento em meio líquido. Para isso, uma cultura inicial de 10mL em meio rico YPGal (contendo galactose, condição permissiva) foi incubada a 30°C até atingir $OD_{600} \approx 1,0$. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, lavadas com 1mL de água estéril e ressuspensas em meio YPD (contendo glicose, condição restritiva), com volume suficiente para atingir uma $OD_{600} \approx 0,01$ (tempo zero). O crescimento desta cultura foi

Figura 8. Esquema de obtenção de cepa haplóide com expressão condicional do gene *CWC24*. Cepa diplóide $\Delta cwc24$ contendo um plasmídeo com o gene selvagem *CWC24* sob o controle do promotor *GAL1* foi submetida a condições de esporulação. Os esporos obtidos foram testados para crescimento em meio contendo galactose (promotor *GAL1* induzido) ou glicose (*GAL1* inibido). Um cepa haplóide (n) $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ somente é capaz de crescer em meio contendo galactose.

acompanhado com medição da OD₆₀₀ a cada 5 horas, sendo os dados expressos em curva de crescimento em termos de $\log(OD_{600}/OD_{600} \text{ no tempo zero})$.

O crescimento da cepa $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ foi também analisado por diluição seriada. Neste ensaio, células da cepa selvagem e da cepa mutante foram incubadas em meio YPGal até atingir OD₆₀₀≈1,0. A partir da medida da OD₆₀₀, foram coletados os volumes de cada cultura necessários para que, após ressuspensão em 100µL de água estéril, fosse obtida uma OD₆₀₀ equivalente a 10 ODUs (*optical density units*). Partindo desta suspensão de células, foram feitas diluições para 1; 0,1; 0,01; 0,01 e 0,001 ODUs. Foram gotejados em placa de YPD 5µL de cada diluição e as placas foram incubadas por 18h a 30°C.

3.4.3 Detecção da proteína Cwc24p na cepa $\Delta cwc24$

O nível da proteína Cwc24p em células incubadas por diferentes tempos em condição restritiva foi determinado por *Western blot*. Para isso, células das cepas CWC24 e $\Delta cwc24$ foram inoculadas em 60mL de meio YPGal (contendo galactose, condição permissiva), até atingir OD₆₀₀≈1,0. Células de 50mL de cultura foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas com 1mL de água gelada e congeladas, sendo este o tempo zero do ensaio. Os 10 mL restantes de cultura foram centrifugados, as células foram lavadas e ressuspensas em meio contendo YPD (contendo glicose, condição restritiva). Foram coletados 50mL de cultura em OD₆₀₀≈1,0 a cada 3 horas até 12 horas após a incubação em condição restritiva e mais 50mL após 24 horas de incubação em meio com glicose. As células coletadas foram ressuspensas em 300µL de tampão PBS com 1mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila, inibidor de proteases). Foi adicionado um volume de pérolas de vidro e as células foram quebradas por agitação no vórtex (1 minuto de agitação no vórtex, seguido de 1 minuto de incubação no gelo) até obtenção de aproximadamente 80% de lise. O extrato total foi quantificado pelo método do BCA/CuSO₄ e foram separados em SDS-PAGE 100µg de extrato total de cada amostra. A presença da proteína foi detectada através de *Western blot* utilizando antisoro α -Cwc24p. Como controle interno foi utilizado antisoro α -Nip7p.

3.5 Análise de proteínas

Métodos de quantificação de proteína total e análise por *Western blot* utilizados neste estudo estão descritos abaixo.

3.5.1 Quantificação de proteína total utilizando ácido bicinconínico (BCA) e CuSO_4

A quantificação de proteína total em extratos celulares foi feita de acordo com método colorimétrico descrito por Smith et al. (1985). Ao extrato total (5 μL -30 μL , dependendo da concentração do extrato) foi adicionado 1mL de solução 5mM CuSO_4 em BCA (*bicinchoninic acid solution*, *Sigma*), sendo a reação incubada por 30 minutos a 37°C. Foi medida a absorbância em 562nm e a concentração de proteínas no extrato foi determinada por comparação com curva padrão feita para BSA (*bovine serum albumin*).

3.5.2 Análise de proteínas por *Western blot*

Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (polivinilideno difluoreto, *GE Healthcare*) A membrana foi bloqueada por incubação por 2 horas com 10mL de solução 5% BSA (*bovine serum albumin*) em tampão PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na_2HPO_4 ; 2mM KH_2PO_4 ; pH=7,4), lavada por 3 vezes por incubação de 10 minutos com 10mL de tampão PBS e incubada com o anticorpo primário diluído em solução 0,1% BSA em PBS, por 2 horas a 4°C, com agitação. Após lavagem da membrana como descrito acima, a mesma foi incubada com anticorpo secundário diluído em 0,1% BSA em PBS por 2 horas e lavada novamente com PBS.

Foram utilizados anticorpo α -poli-histidina (*GE Healthcare*, camundongo, diluição 1:3000) e antisoros α -GST (*Sigma*, coelho, diluição 1:2000), α -Nop17p (camundongo, diluição 1:1000), α -Cwc24p (camundongo, diluição 1:1000), α -Nip7p (camundongo, diluição 1:2000) e α -RPL5 (camundongo, diluição 1:2000). Os anticorpos secundários utilizados, conjugados com HRP (*horse radish peroxidase*), foram α -coelho (*GE Healthcare*; diluição 1:12000) e α -camundongo (*GE Healthcare*, diluição 1:7500). Para revelação do *Western blot* foi utilizado o *ECL Western Blotting Detection System* (*GE Healthcare*) ou *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (*Thermo Scientific*), ambos baseados na quimioluminescência produzida

durante a oxidação do luminol pela HRP na presença de peróxido, em meio alcalino. O sinal obtido foi visualizado por exposição a filme de raio-X.

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

No sistema utilizado neste trabalho (Figura 9), genes das proteínas iscas foram clonados no vetor pBTM116 (Bartel e Fields, 1995), que permite a expressão, sob controle do promotor constitutivo *ADH1*, de proteínas de fusão com o domínio de ligação ao DNA de *lexA* (BD-LexA), um fator de *E. coli* que se liga a regiões do genoma da bactéria denominadas de operador *lexA* (*lexAop*), inibindo a transcrição de genes destes operons.

Genes que codificam proteínas alvo foram clonados no vetor pGAD (James et al., 1996), que permite expressar, também sob controle do promotor *ADH1*, proteínas de fusão com o domínio de ativação da transcrição (AD) de Gal4p (AD-Gal4), um fator de transcrição de leveduras que permite a expressão de genes relacionados ao metabolismo de galactose, quando este dissacarídeo está presente, desde que não haja glicose no meio.

Neste trabalho foi utilizada a levedura L40 (Vojtek e Hollenberg, 1995), que possui integrados em seu genoma dois genes repórteres: o gene *HIS3* de levedura, codifica a enzima imidazol-glicerol-fosfato desidratase, que catalisa o sexto passo de biossíntese da histidina e o gene *lacZ* de bactéria, que codifica a enzima β -galactosidase. A montante destes genes, existem quatro ou oito cópias do operador de *lexA* [(*lexAop*)₄-*HIS3*, (*lexAop*)₈-*lacZ*], portanto a proteína de fusão contendo o BD-*lexA* liga-se a estas seqüências de DNA. A interação com proteínas fundidas com o AD-Gal4p leva ao recrutamento da RNA polimerase para transcrever estes genes repórteres (Figura 9).

A cepa L40 (auxotrófica para adenina, histidina, leucina e triptofano) foi transformada com os plasmídeos pBTM (marca de seleção para triptofano) e pGAD (marca de seleção para leucina) e a seleção foi feita em placas de meio mínimo seletivo. Interações entre proteínas foram identificadas pelo crescimento de colônias em meio privado de histidina, triptofano e leucina, sendo viáveis apenas células expressando o gene repórter *HIS3* (Figura 9). Estas células foram replicadas e foi realizado teste de atividade de β -galactosidase, utilizando como substratos 5-bromo-

4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-GAL) e orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), como descrito a seguir.

3.6.1 Teste de atividade de β -galactosidase utilizando X-GAL como substrato

Este método foi modificado de Vojtek e Hollenberg (1955). Células foram inoculadas em 1 mL de meio YNB glicose suplementado com adenina e histidina e incubadas a 30°C até atingir $OD_{600} \approx 1,0$. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto e ressuspensas em 100 μ L do mesmo meio, de maneira a obter uma OD_{600} equivalente a 10 ODUs. Sobre uma membrana de nitrocelulose, colocada sobre meio seletivo sólido privado de histidina, foram gotejados 5 μ L da suspensão concentrada de células, sendo esta placa incubada por 24 horas a 30°C. A lise das células foi realizada por imersão da membrana em nitrogênio líquido por 1 minuto. Após deixar a membrana a temperatura ambiente por cerca de 5 minutos para regeneração, a mesma foi umedecida com solução contendo X-GAL (0,5 μ g/mL X-Gal em tampão Z: 60mM Na_2HPO_4 ; 40mM NaH_2PO_4 ; 10mM KCl e 1mM $MgSO_4$; pH=7,0) e incubada a 37°C até o aparecimento de coloração azul.

3.6.2 Teste de atividade de β -galactosidase utilizando ONPG como substrato

De acordo com Vojtek e Hollenberg (1955), células foram inoculadas em 3mL de meio YNB glicose suplementado com adenina e histidina e incubadas a 30°C até atingir $OD_{600} \approx 1,0$. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto e ressuspensas em 800 μ L de tampão Z. A lise foi realizada por agitação com 1 volume de pérolas de vidro (1 minuto de agitação no vórtex, seguido de 1 minuto de incubação no gelo, pelo período de uma hora). A um volume de 400 μ L do sobrenadante foram adicionados 160 μ L de solução contendo ONPG (4mg/mL ONPG em 100mM tampão fosfato pH = 7,0; 38mM β -mercaptoetanol), sendo a reação incubada por 2h a 30°C. A utilização de ONPG como substrato pela β -galactosidase leva à geração orto-nitrofenol, um composto de coloração amarela, cuja concentração foi analisada pela medida da absorbância em 420nm. Como controle foi feita a quantificação de proteína no extrato total pelo método do BCA / $CuSO_4$, sendo obtida a medida de absorbância em 562nm. O valor final obtido para o ensaio de ONPG foi então calculado pela razão A_{420} / A_{562} .

Figura 9. Sistema do duplo-híbrido. Esquema do sistema do duplo-híbrido de levedura, no qual o gene da proteína isca é clonado no plasmídeo pBTM116, em fusão com o domínio de ligação a DNA de *lexA*, e o gene da proteína alvo é clonado no plasmídeo pGAD, em fusão com o domínio de ativação da transcrição de Gal4p. Os dois plasmídeos são transformados na cepa L40, que contém sítios de ligação de *lexA* nos promotores dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. Quando a proteína isca interage com a proteína alvo, a transcrição dos genes repórteres é ativada.

3.7 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

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

3.7.1 Teste de expressão em pequena escala

Para realizar teste de expressão em pequena escala, as células foram transformadas conforme descrito na Seção 3.1.4 e inoculadas em 1 mL de meio LB, com 50µg/mL de cloranfenicol, a 37°C por 18h. Para células transformadas com o vetor pGEX foram adicionados ao meio 100µg/mL de ampicilina e para células transformadas com pET foram adicionados 20µg/mL de kanamicina. A partir desta cultura, 100µL foram diluídos em 10mL de meio 2YT (Tabela 2) suplementado conforme descrito acima e a cultura foi incubada até OD₆₀₀≈0,6. Após coleta de células de 1mL de cultura para comparação posterior (centrifugação por 12000 rpm por 1 minuto), foi induzida a expressão da proteína recombinante por adição de 0,5mM IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo). Foram coletadas células em intervalos de 1 hora até 4 horas após a indução. As células coletadas foram ressuspensas em 50µL de tampão de amostra para proteína, fervidas a 95°C por 5 minutos e 5µL destas amostras foram aplicados em SDS-PAGE. A expressão da proteína recombinante foi identificada por coloração com Comassie, através de comparação com as bandas do extrato total de células não induzidas e o tempo ótimo de incubação foi determinado. As proteínas GST e GST-Cwc24p foram expressas em meio 2YT com indução com 0,5mM IPTG por 3 horas a 37°C. A proteína His-Nop17p foi expressa no mesmo meio, porém por 2 horas a 30°C para aumentar a fração da proteína na fase solúvel. No caso da proteína His-Cef1p, cuja expressão em meio 2YT foi muito baixa, determinou-se que a condição ótima de indução era em meio TB com 1mM IPTG, por 3 horas a 37°C.

3.7.2 Expressão em grande escala

Para a expressão de proteína em larga escala, após a transformação das células BL21, uma cultura de 5mL em LB com os antibióticos necessários foi incubada por 18h a 37°C. A cultura de 5mL foi diluída em 500mL de 2YT (ou TB) e incubada até atingir $OD_{600} \approx 0,6$. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida de acordo com as condições ótimas determinadas e a expressão foi checada por SDS-PAGE conforme descrito para o teste de expressão. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C e congeladas.

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

Células de *E. coli* expressando GST, GST-Cwc24 e His-Nop17p ou His-Cef1p foram descongeladas e ressuspensas em PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na_2HPO_4 ; 2mM KH_2PO_4 ; pH=7,4) com 1mM PMSF. As células foram rompidas através de 3 passagens em *French press*, com pressão aproximadamente igual a 1000 PSIG, com intervalos de 1 minuto de incubação da amostra no gelo entre as passagens. Os restos celulares foram separados por centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C.

O extrato total de células de *E. coli* expressando GST ou GST-Cwc24p foi incubado com 250µL de glutathiona-sepharose (*GE Healthcare*, previamente lavada por 2 vezes com 12mL de água e equilibrada com 12mL de PBS) por 1 hora a 4°C com rotação dos tubos. Após imobilização de GST ou GST-Cwc24p na coluna a resina foi lavada com PBS (cinco lavagens com 12mL de PBS) e incubada com extrato total de células expressando His-Nop17p ou His-Cef1p. Após lavagem com PBS, as proteínas foram eluídas da resina por adição de 1mL de solução contendo 10mM glutathiona reduzida, 50mM Tris-HCl pH=8 e 1mM PMSF. A eluição foi repetida por mais 3 vezes. As proteínas presentes nos 4 mL de eluição obtidos foram precipitadas por adição de TCA (ácido tricloroacético, 10% concentração final) e incubação no gelo por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, o *pellet* obtido foi lavado com 500µL de etanol absoluto gelado, seco por incubação em bloco a 42°C por 5 minutos e ressuspendido em 10µL de tampão de amostra para proteínas. As amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos, separadas em *SDS-PAGE* e transferidas para membranas de PVDF. As proteínas

foram detectadas por *Western blot* utilizando antisoros α -GST, α -Cwc24p, α -Nop17 e anticorpo α -poli-histidina (Seção 3.5.2).

3.9 Localização subcelular por microscopia de fluorescência

A localização subcelular da proteína inteira ou das porções do N-terminal e C-terminal de Cwc24p foi determinada analisando a fluorescência de proteínas de fusão N-terminal com GFP *in vivo* (GFP, *green fluorescent protein* de *Aequorea victoria*). As regiões N-terminal e C-terminal foram definidas arbitrariamente, sendo que no C-terminal encontram-se os domínios conservados zinc-finger e RING.

Para isso a cepa de levedura W303, que possui cópia selvagem do gene *CWC24*, foi transformada com os plasmídeos pGFP-CWC24, pGFP-cwc24 [1-144] ou pGFP-cwc24 [144-260]. As células foram cultivadas a 30°C em meio YNB com pH=7,0 até atingir OD₆₀₀≈1. Células de 1mL de cultura foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, lavadas com 500μL, coletadas novamente e ressuspendidas em 100μL de água. Em seguida foi feita incubação com o corante Hoechst (em concentração final 10μg/mL) por meia hora, para marcação do DNA. Foram depositados em lâminas de microscópio 5μL da suspensão de células. A fluorescência foi observada em microscópio invertido *Nikon TE300* e as imagens foram capturadas utilizando câmera *Roper CoolSnap HQ*. Como controle, foi observada a localização da proteína GFP sozinha (sem fusão).

3.10 Alinhamento da sequência de Cwc24p contra os bancos de dados

A sequência de Cwc24p foi alinhada contra os bancos de dados utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994) através dos recursos disponibilizados no NPS@ (*network protein sequence analysis*; Combet et al., 2000).

3.11 Análise de processamento de RNA

A análise do processamento de RNA foi feita através de *Northern blot*, *pulse-chase labeling*, *primer extension* e *microarray* conforme descrito abaixo.

3.11.1 Extração de RNA total de *S. cerevisiae*

Células da cepa *CWC24* ou Δ *cwc24* foram inicialmente cultivadas em meio YPGAL, condição permissiva na qual o gene *CWC24* é expresso, sendo este o

tempo zero de todos os experimentos. Em seguida, as células foram lavadas com água estéril e cultivadas em meio YPD, condição restritiva, por diferentes tempos.

O RNA total foi isolado destas células através de um método empregando fenol a quente (Gonzales et al., 2005). A partir de 50mL de cultura em $OD_{600} \approx 1,0$, células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas com 1 mL de água gelada, coletadas novamente e congeladas a -20°C até o início da extração de RNA. Depois de descongeladas, as células foram ressuspensas em 500 μL de tampão acetato de sódio (50mM acetato de sódio, 10mM EDTA, pH=5,0). Foram adicionados: 1 volume de pérolas de vidro, 100 μL de 10% SDS e 500 μL de fenol / acetato de sódio pré-aquecido a 65°C . A lise das células foi realizada por 3 ciclos sucessivos de incubação a 65°C por 1 minuto, agitação em vórtex por 1 minuto e incubação a 65°C por 1 minuto. Após este período, foi feita incubação por 5 minutos a 65°C , agitação em vórtex por 1 minuto e incubação por mais 1 minuto a 65°C . As amostras foram resfriadas em gelo por 2 minutos, centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo. A extração com fenol/acetato de sódio foi repetida uma vez. Em seguida, foi realizada extração a temperatura ambiente com 500 μL fenol/clorofórmio através de agitação em vórtex por 3 minutos. Após centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo novo, foram adicionados 50 μL de 3M NaOAC pH=5,3 e a extração com fenol/clorofórmio foi repetida. O RNA foi precipitado da fase aquosa por adição de 1mL de etanol absoluto gelado e incubação a -20°C por 1 hora. Após centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, o RNA precipitado foi lavado por agitação com 500 μL de etanol 75%, seco a 42°C por 5 minutos e ressuspensado em 50 μL de água previamente tratada com DEPC (dietil pirocarbonato).

3.11.2 Separação de RNA total em gel de agarose ou poliacrilamida

Para a separação em gel de agarose, 20 μg de RNA total foram desnaturados em solução contendo 2M glioxal, 25% DMSO e 10mM fosfato de sódio pH=7,0 a 50°C por 1 hora e em seguida foram incubados no gelo por 5 minutos. Foi adicionado tampão de amostra (tampão 6X concentrado: 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilenocianol; 30% glicerol) e as amostras foram separadas em gel de agarose 1,3%, em tampão fosfato de sódio pH=7,0, por cerca de 1 hora a 150V, com circulação de tampão entre as câmaras. Os RNAs separados no gel foram

transferidos para membranas de *nylon* (*Hybond N+*, *GE Healthcare*) por capilaridade, utilizando tampão 20X SSC (3,0M NaCl; 0,3M citrato de sódio).

Alternativamente, foi adicionado tampão de amostra com formamida (tampão 6X concentrado: 95% formamida, 20mM EDTA pH=8,0; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xileno-cianol), os RNAs foram desnaturados por incubação a 95°C por 5 minutos, seguida de incubação no gelo por 5 minutos. Foi feita a separação em gel de 6% poliacrilamida desnaturante (6% poliacrilamida; 8M uréia; 1X TBE: 90mM Tris-borato, 2mM EDTA, pH=8,0) em tampão TBE a 250V por cerca de 2 horas. Os RNAs separados foram transferidos para membranas de nylon a 250mA por 2 horas em tampão TBE.

3.11.3 Marcação radioativa de DNA

Os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de *Northern blot* e *primer extension* estão descritos na Tabela 8. As reações de marcação continham 10pmol de oligonucleotídeo, 5µL de γ -³²P-ATP, 3U T4 PNK (polinucleotídeo quinase, USB) em tampão de marcação (10mM MgCl₂; 5mM DTT, 70mM Tris-Cl pH=7,6) e foram incubadas por 20 minutos a 37°C.

Fragmentos de DNA foram marcados utilizando o *kit Random Primer DNA Labeling System (Invitrogen)* conforme instruções do fabricante. Foram utilizados 30ng do fragmento de DNA, 5µL de α -³²P-dATP e 3U do fragmento Klenow.

3.11.4 Análise por *Northern Blot*

Para hibridização com oligonucleotídeos marcados, membranas de nylon foram pré-hibridizadas por 2 horas, a 37°C em solução de hibridização (5X SSPE; 5X Denhardt; 50% formamida; 0,1% SDS; 0,05µg/mL de DNA desnaturado de esperma de salmão). A solução de hibridização foi feita a partir das soluções de estoque: 20X SSPE (3,0M NaCl; 0,2M NaH₂PO₄; 0,002M EDTA) e 50X Denhardt (1% w/v Ficoll 400; 1% w/v polivinil pirrolidona; 1% w/v BSA). Em seguida a solução foi descartada e substituída por 10mL de solução de hibridização nova, à qual foi adicionado o oligonucleotídeo marcado. Após a membrana ser incubada por 18h a 37°C, foram feitas três lavagens sucessivas de 15 minutos, a 25°C, com 30mL de soluções: 2X SSPE; 2X SSPE com 0,1% SDS e 0,2X SSPE com 0,1% SDS. A membrana foi então envolvida em filme plástico e exposta a uma tela sensível à

radiação β por 18h e a imagem foi analisada em *Phosphorimager* (*Molecular Dynamics*).

O procedimento para hibridização com fragmento de DNA marcado foi feito conforme acima, exceto pela temperatura de hibridização a 42°C e pelas três lavagens sucessivas com: 1X SSPE a 42°C; 1X SSPE com 0,1%SDS a 42°C e 0,1%SSPE com 0,1%SDS a 25°C.

Tabela 8. Oligonucleotídeos de DNA utilizados para ensaios de *Northern blot*, *primer extension*, *DNA shift* e imunoprecipitação de cromatina (CHIP).

	Oligo.	Seqüência	Referência
P1	UA0	5'-GGT CTC TCT GCT GCC GGA AAT G - 3'	Zanchin et al., 1999
P2	18S	5'-CAT GGC TTA ATC TTT GAG AC - 3'	Fatica et al., 2002b
P3	UA2	5'-GCT CTC ATG CTC TTG CCA AAA C - 3'	Zanchin et al., 1999
P4	5.8S	5'-CGT ATC GCA TTT CGC TGC GTT C - 3'	Zanchin et al., 1999
P5	DE-2	5'-CTC ACT ACC AAA CAG AAT GTT TGA GAA GG -3'	Oliveira et al., 2002
P6	UC1	5'-GTT CGC CTA GAC GCT CTC TTC - 3'	Zanchin et al., 1999
P7	25S	5'-GCC GCT TCA CTC GCC GTT ACT AAG GC - 3'	Gonzales et al., 2005
P8	DA2	5'- TGT TAC CTC TGG GCC CCG - 3'	Zanchin et al., 1999
P9	DA3-2	5'- AAT TTC CAG TTA CGA AAA TTC TTG TTT TTG AC - 3'	Zanchin et al., 1999
P10	anti-U3	5'- ATG GGG CTC ATC AAC CAA GTT GG - 3'	Dez et al., 2002
P11	INsnR17aR	5'-CTG TAG AAT GTG TTA GTC AAA AGC -3'	Este estudo
P12	INsnR17bR	5'-CTG TTG AAT GTG TTA GTC AAA ACC -3'	Este estudo
P13	INsnR17aF	5'-GTA TGT AAT ATA CCC CAA ACA TTT TAC C -3'	Este estudo
P14	INsnR17bF	5'-GTA TGT TTT ATA CCA TAT ACT TTA TTA G - 3'	Este estudo
P15	5'ETSFor	5'ATGCGAAAGCAGTTGAAGAC-3'	Este estudo
P16	pr35SF	5'- ATG TTA CTT TCC TGT TAT GG -3'	Este estudo
P17	pr35SR	5'- GAA GTA CCT CCC AAC TAC - 3'	Este estudo
P18	PRsnR17aF	5'-CAG TAG TAT GTA TGG GCT GAT TG -3'	Este estudo
P19	PRsnR17aR	5'-TGA AGT ACG TGC ACA CAG ATT TTA AG -3'	Este estudo
P20	CrVintergenicFor 9216	5'-GGA AAT GCG TAG GGA AGA CCA ATT TCA TGA CG-3'	Granato et al., 2008
P21	CrVintergenicRev 9963	5'-GAT GCC TCT TTA GAA CAA GGT TAC AAA TCC TG-3'	Granato et al., 2008

3.11.5 *Análise por pulse-chase labeling*

A análise de processamento de rRNA por *pulse-chase labeling* foi feita como descrito previamente por Zanchin et al. (1997). Culturas de 200mL das cepas CWC24 e $\Delta cwc24$, em meio mínimo contendo glicose, foram incubadas a 30°C por 30. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 4mL de meio mínimo sem uracila. Após receberem um pulso com 50 μ Ci de 3 H-uracila por mL, foram incubadas a 30°C por 3 minutos e foi adicionada uracila não marcada para concentração final de 300 μ g/mL. Células foram coletadas após 0, 3, 10, 30 e 60 minutos do pulso de 3 H-uracila e congeladas em banho de gelo-seco/ etanol. O RNA total extraído das células foi separado em gel de agarose e transferido para membrana de nylon. A membrana foi exposta em tela para trítio por 18h e analisada em *Phosphorimager* (*Molecular Dynamics*).

3.11.6 *Análise por primer extension*

Nas análises por primer extension, 10 μ g de RNA total extraído de células da cepa selvagem e da cepa $\Delta cwc24$ cultivadas por diferentes tempos na condição restritiva, foram hibridizados com 1pmol dos oligonucleotídeos marcados radioativamente em tampão para transcrição reversa (tampão 5X: 250mM Tris-HCl pH 8.3, 395mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT). A hibridização foi feita por aquecimento das amostras a 65°C por 10 minutos, seguido de resfriamento a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida foi feita a extensão com 100U de transcriptase reversa MMLV (*Invitrogen*) e 0,5mM dNTPs por 30 minutos a 37°C. O cDNA transcrito foi precipitado por adição de 100 μ L de etanol absoluto, incubação a -20°C por 1 hora e centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O cDNA foi então ressuspensado em 5 μ L de 1mg/mL RNaseA, com incubação por 5 minutos a 37°C. As amostras foram separadas em gel de seqüenciamento de 6% poliacrilamida desnaturante, que foi seco e analisado em *Phosphorimager*. A reação de seqüenciamento foi feita utilizando o *kit Thermo-sequenase* (*GE Healthcare*), de acordo com as instruções do fabricante.

3.11.7 Microarray

O experimento de microarray foi realizado no laboratório da Dra. Christine Guthrie (UCSF, Universidade da Califórnia – São Francisco, CA, USA), utilizando lâminas de microarray contendo sondas para todos RNAs de *S. cerevisiae* que sofrem splicing (aproximadamente 250), confeccionadas na UCSF (Pleiss et al., 2007). RNA total das cepas *CWC24* ou $\Delta cwc24$, incubadas por diferentes períodos de tempo em meio contendo glicose, foi utilizado para síntese de cDNA e marcação com fluoróforo (Cy3, ou Cy5 – GE). cDNAs marcados foram purificados através de colunas Zymo-25 e depois hibridizados contra lâminas de microarray. Análise das imagens foi realizada através de um *scanner Axon Instruments GenePix 4000B*, com leituras nos comprimentos de onda 635 nm ou 532 nm.

3.12 Ensaios de complementação da cepa $\Delta cwc24$

A proteína Cwc24p possui dois domínios conservados em sua região C-terminal, um *zinc finger* e um domínio *RING*. Para investigar se estas regiões eram essenciais para a função da proteína, foram construídos plasmídeos que expressam porções truncadas e mutadas de Cwc24p em levedura, conforme descrito na Seção 3.2.4. Estes plasmídeos possuem a expressão do gene clonado sob controle do promotor *ADH1*, que é um promotor constitutivo de *S. cerevisiae* e foram transformados na cepa $\Delta cwc24$, que possui o gene *CWC24* sob controle do promotor *GAL1*. O ensaio de complementação consistiu na análise de crescimento destas cepas em meio contendo glicose, condição na qual o promotor *GAL1* está reprimido, tornando possível analisar o efeito da expressão das porções truncadas e mutadas sobre a taxa de crescimento das cepas. A análise do crescimento das diferentes cepas em relação à cepa selvagem *CWC24*, foi feita por curva de crescimento em meio líquido e diluição seriada conforme descrito na Seção 3.4.2.

3.13 Ensaios de ligação a ácido nucléico

Dado que os domínios da proteína Cwc24p poderiam estar envolvidos em ligação a ácidos nucléicos, foram realizados ensaios de ligação a DNA e a RNA, tanto *in vitro* como *in vivo*, conforme descrito abaixo.

3.13.1 Co-imunoprecipitação de RNA

Células de cultura de 500mL da levedura W303 expressando Proteína A (ProtA, domínio ZZ da proteína A de *S. aureus*) ou a fusão ProtA-Cwc24p, incubadas em meio YPGAL até atingir $OD_{600} \approx 1$, foram coletadas e ressuspensas em 3mL de tampão A (20mM Tris/HCl pH = 8,0; 5mM acetato de magnésio; 0,2% Triton X-100; 150mM acetato de potássio; 1mM ditioneitol e 1mM PMSF). As células foram rompidas por agitação em vórtex na presença de 1 volume de pérolas de vidro, por 40 minutos a 16°C. Após centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos para separação dos restos celulares, foi feita quantificação de proteína total no extrato pelo método do $CuSO_4$ / BCA e quantidades iguais de extrato foram incubadas por 2 horas a 16°C com 250 μ L de resina *IgG-Sepharose* (GE Healthcare, previamente lavada com 12 mL de água e equilibrada em 12mL de tampão A). A resina foi lavada com 10 volumes de resina de tampão A e o RNA precipitado foi isolado por adição de fenol diretamente à resina, seguindo os mesmos passos utilizados para extração de RNA total de levedura. Após precipitação, o RNA foi desnaturado, e separado em gel de agarose 1,5% ou 6% poliacrilamida, transferido para membrana de nitrocelulose e analisado por *Northern blot*. Os RNAs co-imunoprecipitados foram também analisados através de marcação da extremidade 3' com ^{32}P -pCp. A reação de marcação continha: 5 μ L do RNA recuperado da co-imunoprecipitação, 2 μ L de ^{32}P -pCp, 600 μ g/mL BSA e 40U de T4 RNA ligase (*Amersham*) em tampão de ligação fornecido pelo fabricante. A reação foi incubada por 18h a 4°C, os RNAs marcados foram separados em gel de seqüenciamento de 7% poliacrilamida com uréia.

3.13.2 Ligação a RNA *in vitro*

Para os ensaios de ligação a RNA *in vitro*, as proteínas recombinantes GST e GST-Cwc24p foram expressas em *E. coli* e purificadas em coluna de glutationa-sepharose conforme descrito para os experimentos de *pull-down* (Seção 3.8). Como a purificação em uma só coluna resultou na presença de diversas proteínas contaminantes, os 4mL obtidos foram incubados com 500 μ L de resina com heparina. Após lavagens sucessivas com tampão A (50mM Tris-Cl, pH=8,0; 50mM NaCl; 0,5mM DTT, 1mM PMSF), foi feita eluição com gradiente de NaCl (150mM, 200mM, 250mM, 300mM e 1M). Em seguida, as frações obtidas com eluição com 300mM de

NaCl foram combinadas e concentradas em filtro *Amicon Ultra-4* (10,000 NMWL, Millipore), fazendo a troca pelo tampão de ligação (50mM Tris-Cl pH=7,5; 50mM KCl; 10% (w/v) glicerol; 0,5mM ZnSO₄; 2mM DTT; 1mM PMSF). Quantidades crescentes de proteína foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 1pmol do RNA correspondente ao pré-snoRNA U3A transcrito *in vitro*. As amostras foram separadas em gel nativo de poliacrilamida 6%, que foi seco e analisado por *Phosphorimager*. Um vetor contendo a seqüência do pré-snoRNA U3A, linearizado com a enzima *HpaI*, foi utilizado como molde para transcrição *in vitro* (*run-off*) com T7 RNA polimerase. A reação de transcrição continha: 35μM UTP; 400μM ATP; 400μM CTP; 400μM GTP; 500ng de DNA; 5μM DTT; 0,5mM de análogo do cap (Promega); 5μL α-³²P-UTP; 0,7U RNasin (Promega) e 20U T7 RNA polimerase (Promega).

3.13.3 Ensaio de ligação a DNA (*band shift*)

Quantidades crescentes das proteínas GST e GST-Cwc24p, purificadas conforme descrito acima, foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 0,25 ng de fragmentos de DNA marcados com ³²P. Os seguintes fragmentos de DNA foram obtidos por amplificação por PCR: região do 5'ETS (*primers* P15 e P1, Tabela 8); promotor do pré-rRNA 35S (P16 e P17); promotor do snR17A (DNA que codifica o snoRNA U3A, P18 e P19) e, como controle, DNA de uma região intergênica do cromossomo V (P20 e P21). As amostras foram separadas em gel nativo de poliacrilamida 6%, que foi seco e analisado por *Phosphorimager*.

3.13.4 Co-imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

A co-imunoprecipitação de cromatina foi realizada conforme descrito por Kuras e Struhl (1999). Cepas expressando ProtA e ProtA-Cwc24p foram cultivadas em meio mínimo contendo galactose até OD₆₀₀=0,2-0,5. A 100mL de cultura foi adicionado 2% formaldeído para realizar *cross-link* por incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em *FA lysis buffer* (50mM HEPES-KOH, pH=7,3; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 0,1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 1mM PMSF) e quebradas por agitação com 1 volume de *glass-beads*. O sobrenadante foi submetido a ultra-som (amplitude 11%, 4 ciclos de 15s com intervalo de 15s) e incubado por 2 horas a 4°C com 75μL de IgG *Sepharose* (Amersham Biosciences). O *reverse-crosslink* foi

realizado por incubação *overnight* a 65°C com 50mM NaCl. Isolamento da cromatina foi realizado por tratamento com 20µg de proteinase K por 1 hora a 45°C, seguido de extração do DNA com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. As reações de PCR foram realizadas de acordo com a Seção 3.2.2, em volume final de 25µL. Os primers utilizados para as regiões do 5'ETS, promotor do rRNA 35S, promotor do snoRNA U3A e região intergênicas estão descritos na seção anterior.

3.14 Gradiente de polissomos

A separação de extrato celular em gradiente de sacarose e análise de polissomos foi realizada como descrito por Ramirez et al. (1991). Células de 300mL de cultura das cepas CWC24 ou $\Delta cwc24$, cultivadas por 12 horas em meio contendo galactose (condição permissiva) e 12 horas em meio contendo glicose (condição restritiva) até atingir $OD_{600} \approx 1$, foram incubadas com 100µg/mL de cicloheximida por 5 minutos. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, ressuspensas em 3mL de tampão BBA (20mM Tris-Cl, pH=7,5; 50mM NaCl; 10mM $MgCl_2$; 1mM DTT; 1mM PMSF) e quebradas por agitação com 1 volume de pérolas de vidro em vórtex (8 vezes: 30 segundos de agitação no vórtex, seguido de 30s de incubação em gelo). Após centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C. Após descongelar o extrato, 20 ODU foram aplicadas no topo de gradientes de sacarose de 5% a 47%, preparados em equipamento *Gradient Master* (Biocomp), que foram centrifugados por 2 horas a 39000 rpm utilizando rotor SW41 (Beckman). O perfil de polissomos foi obtido através de análise da amostra no *EconoSystem* (GE Healthcare), com monitoramento da absorbância em 254nm e coleta de frações de 1mL a cada minuto. As proteínas presentes em cada uma das frações foi precipitada por adição de 10% TCA (ácido tricloroacético), separadas por SDS-PAGE e identificadas por *Western blot*.

4. RESULTADOS

A proteína Cwc24p, codificada pela ORF YLR323c de *S. cerevisiae*, é essencial para a viabilidade celular. Possui 30 kDa e apresenta dois domínios conservados em sua extremidade C-terminal, um *zinc-finger* e um domínio *RING*. Cwc24p havia sido isolada em nosso laboratório em ensaios de duplo-híbrido, nos quais Nop17p (Gonzales et al., 2005) foi utilizada como isca contra uma biblioteca de cDNA. Com o objetivo de caracterizar a função de Cwc24p, este trabalho foi iniciado com experimentos de confirmação da interação Nop17p-Cwc24p.

4.1 Cwc24p interage com Nop17p através de sua porção central.

A interação Nop17p-Cwc24p foi identificada inicialmente com as fusões BD-Nop17p (Nop17p fusionada ao domínio de ligação a DNA de *lexA*) e AD-Cwc24p (Cwc24p fusionada ao domínio de ativação da transcrição de Gal4p). O clone de Cwc24p obtido na varredura da biblioteca de cDNA não estava completo, mas codificava uma proteína truncada, que não possuía os cinco primeiros aminoácidos (AD-Cwc24 [6-260]). Para confirmar a interação entre essas duas proteínas, as fusões foram invertidas, sendo expressas em levedura BD-Cwc24p (clone completo de Cwc24p) e AD-Nop17p. A expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* foi analisada através de crescimento das leveduras transformantes em meio sem histidina (- His) e em placas contendo X-Gal (Figura 10A, B). Os resultados mostram que a interação Nop17p-Cwc24p ocorre independentemente da fusão, mas é mais forte quando BD-Nop17p e AD-Cwc24p são utilizadas (Figura 10A-C). Esse resultado provavelmente se deve a alterações na estrutura terciária das proteínas, causadas pelas fusões com os diferentes domínios.

Para mapear a região mínima de Cwc24p necessária para a interação com Nop17p, foram construídos plasmídeos que expressam porções truncadas de Cwc24p em fusão com o domínio de ligação a DNA de *lexA*. As construções estão representadas na Figura 10A, nas quais os resíduos de aminoácidos de Cwc24p presentes em cada caso estão indicados entre colchetes. Os mutantes truncados possuíam deleções da porção N-terminal ou dos domínios *zinc-finger* (ZN) e *RING*, presentes na porção C-terminal de Cwc24p, cujas características e possíveis funções serão discutidas mais adiante.

Foi possível observar que a porção central da proteína Cwc24p, BD-Cwc24 [86-164], que inclui o domínio *zinc-finger*, é suficiente para que haja interação com Nop17p, enquanto porções do C-terminal, contendo o domínio RING, não apresentaram interação (Figura 10A-C). Além disso, a porção N-terminal, BD-Cwc24 [1-144], também mostrou interação com Nop17p, porém com menor intensidade. Estes resultados indicam que a porção central da proteína Cwc24p esteja envolvida na ligação com Nop17p, enquanto os domínios *zinc-finger* e RING, podem desempenhar outras funções, como ligação a ácidos nucleicos ou ligação a outras proteínas, como discutido mais adiante.

Como demonstrado acima, a interação Nop17p-Cwc24p é independente da fusão utilizada. Entretanto, o sistema do duplo-híbrido não é suficiente para estabelecer se a interação entre essas proteínas é direta. Para responder esta pergunta, foram realizados ensaios de *pull-down* utilizando proteínas recombinantes expressas em *E. coli*. Para tanto, extrato total de células de bactéria expressando GST ou GST-Cwc24p foi incubado com resina glutationa-sepharose, imobilizando estas proteínas na coluna. Após lavagem, a resina foi incubada com extrato contendo His-Nop17p. As proteínas ligadas à coluna, eluídas por incubação com solução contendo glutationa reduzida, foram separadas por *SDS-PAGE*, transferidas para membrana de *PVDF* e analisadas por *Western blot* utilizando antisoros anti-His, anti-Nop17p, anti-Cwc24p e anti-GST. Observou-se que His-Nop17p foi co-precipitada com GST-Cwc24p, mas não com GST (Figura 10D). A incubação da membrana com antisoro anti-GST mostra a presença de GST e GST-Cwc24p nas frações eluídas, indicando que as proteínas foram realmente imobilizadas na coluna. Tanto GST-Cwc24p como His-Nop17p mostraram-se instáveis durante o ensaio, tendo sido detectados produtos de quebra devido aos processos de lise das células e eletroforese, embora utilizando antisoro anti-GST apenas uma banda referente a GST-Cwc24p tenha sido detectada. Esses resultados confirmaram a interação entre Nop17p e Cwc24p e mostraram que as duas proteínas interagem diretamente na célula.

Figura 10. Interação de Cwc24p com Nop17p. (A) Mapeamento de regiões essenciais para a interação por duplo-híbrido. Fusões com o domínio de ligação a DNA de *lexA* indicadas por *BD* e fusões com domínio de ativação da transcrição de *Gal4p* indicadas por *AD*. Números referem-se aos aminoácidos da proteína Cwc24p selvagem. (B) Teste de expressão dos genes repórteres *HIS3*, em placa sem histidina (*HIS*⁻), e *lacZ*, através da atividade de β -galactosidase com o substrato X-Gal. BD-Cwc24+AD, controle negativo; L40-41, controle positivo. (C) Quantificação das interações anteriores utilizando ONPG como substrato de β -gal. (D) Pull-down das fusões GST-Cwc24p e His-Nop17p verificado por imuno-blot com anti-soros anti-His, anti-Nop17p, anti-Cwc24 e anti-GST. TE: extrato total; FT: material não ligado; W: lavagem; B: eluição.

4.2 A proteína Cwc24p está localizada no núcleo

A interação de Cwc24p com Nop17p, uma proteína nucleolar envolvida na montagem de snoRNPs de box C/D (Gonzales et al., 2005), indicava que Cwc24p fosse uma proteína nuclear. Para investigar sua localização subcelular, foi obtida a proteína de fusão GFP-Cwc24p para análise por microscopia de fluorescência. Os resultados demonstram que Cwc24p está localizada no núcleo, como esperado (Figura 11). A observação de que Cwc24p não está concentrada no nucléolo levantou a hipótese de que seu envolvimento no processamento de rRNA poderia ser indireto, como apresentado mais adiante. Como controle, a mesma cepa foi transformada com plasmídeo que expressa apenas GFP, sendo observada fluorescência espalhada por toda a célula (Figura 11).

Outro aspecto a ser investigado a respeito da localização de Cwc24p era a maneira pela qual a proteína seria direcionada para o núcleo, dado que não havia sido encontrado sinal de localização nuclear em sua sequência através de ferramentas de bioinformática (dados não mostrados). Foram então construídas fusões das porções N-terminal e C-terminal de Cwc24p com GFP e a localização destas proteínas truncadas foi monitorada. Observou-se que a porção N-terminal de Cwc24p é direcionada para o núcleo, enquanto a sua porção C-terminal permanece no citoplasma (Figura 11). Dado que a porção N-terminal contém a região responsável pela interação de Cwc24p com Nop17p, é possível que esta última seja a responsável por direcionar Cwc24p para o núcleo.

4.3 Obtenção de uma cepa mutante condicional $\Delta cwc24$

O primeiro passo para determinar a função de Cwc24p foi a obtenção de uma cepa mutante condicional, que permitisse analisar os efeitos da depleção da proteína na célula (Figura 8). Com este objetivo, foi obtida uma cepa diplóide que apresenta a cópia do gene *CWC24* em um dos alelos interrompida pelo gene de resistência a geneticina (*CWC24/cwc24::KAN^R*, EUROSCARF). Como a proteína Cwc24p é essencial para a viabilidade celular (Giaever et al., 2002), a cepa diplóide foi transformada com o plasmídeo YC111-GAL1::*CWC24*, que possui uma cópia do gene *CWC24* sob controle do promotor regulável *GAL1*. Este promotor é ativado na presença de galactose, mas é reprimido na presença de glicose (Lohr et al., 1995). A cepa *CWC24/cwc24::KAN^R/YC111-GAL1::*CWC24** foi submetida a esporulação e os esporos foram separados e plaqueados em meio contendo galactose e geneticina. A cepa haplóide $\Delta cwc24/GAL1::*CWC24*$ teve seu genótipo confirmado através PCR utilizando DNA genômico e *primers* complementares ao gene *CWC24*, resultando na amplificação das bandas referentes ao alelo selvagem (780 pb) e ao alelo mutado (1540 pb) na cepa mutante diplóide, mas apenas da banda correspondente ao alelo interrompido na cepa $\Delta cwc24/GAL1::*CWC24*$ (Figura 12A). Para simplificar a nomenclatura, a cepa $\Delta cwc24/GAL1::*CWC24*$ será referida como $\Delta cwc24$ no texto a partir daqui. $\Delta cwc24$ foi selecionada pela deficiência de crescimento em meio contendo glicose, condição restritiva na qual a cópia do gene *CWC24* presente no plasmídeo não é expressa, o que comprova que Cwc24p é realmente essencial para a viabilidade celular (Figura 12B). Esta cepa foi utilizada em todos os ensaios subsequentes.

Em seguida, foi feita uma curva de crescimento em meio líquido, que mostrou uma diminuição da taxa de crescimento da cepa $\Delta cwc24$ após incubação por 12 horas em meio contendo glicose (Figura 12C). Para confirmação de que o defeito de crescimento em glicose se devia à depleção de Cwc24p, a cepa $\Delta cwc24$ foi transformada com um plasmídeo contendo o gene *CWC24* sob controle do promotor constitutivo *ADH1* ($\Delta cwc24/GAL1::*CWC24*/AD-*CWC24*$). A curva de crescimento desta cepa em glicose demonstrou que a expressão de AD-Cwc24p resgatou o

crescimento (Figura 12C), confirmando ser a deleção de *CWC24* a responsável pelo defeito de crescimento em meio contendo glicose.

A expressão da proteína Cwc24p também foi analisada na cepa $\Delta cwc24$ cultivada por diferentes períodos de tempo em meio contendo glicose. Através de *Western blot*, foi possível detectar a proteína até 12 horas após a mudança de meio para glicose, o que corresponde ao período no qual a cepa $\Delta cwc24$ começou a apresentar diminuição da taxa de crescimento (Figura 12C,D). Este resultado também mostrou que a proteína Cwc24p é bastante estável na célula, sendo detectada até 12 horas após a repressão do promotor *GAL1*. A expressão da proteína Nip7p, não alterada ao longo do experimento, foi analisada como controle interno.

Figura 12. Caracterização da cepa haplóide $\Delta cwc24$. (A) PCR para confirmação do genótipo da cepa $\Delta cwc24$ haplóide mostra a presença do amplificado referente à ORF interrompida pelo gene KAN^R e a ausência do alelo selvagem. (B) Diluição seriada de cultura após 24h de mudança de meio contendo galactose para glicose mostra a inibição de crescimento na ausência de Cwc24p. (C) Curva de crescimento apresenta aumento do tempo de geração 12 horas após a mudança de meio. (D) Imuno-blot utilizando anti-soro anti-Cwc24 mostra que a proteína é detectável até 12 horas após mudança de meio. Anti-soro anti-Nip7p foi utilizado como controle interno.

4.4 Análise do papel de Cwc24p no processamento de pré-rRNA

Dado que Cwc24p está localizada no núcleo e interage com Nop17p, um fator necessário para a correta montagem dos snoRNPs de box C/D e, conseqüentemente, para as clivagens iniciais no pré-rRNA 35S (Gonzales et al., 2005), foi investigado o envolvimento de Cwc24p no processamento de rRNA, através da análise dos efeitos da depleção da proteína sobre esta via.

4.4.1 O processamento de pré-rRNA torna-se mais lento na ausência de Cwc24p

Para analisar a cinética do processamento de rRNA, foi realizado experimento de *pulse-chase labeling*, utilizando ^3H -uracila. Após incubação das cepas *CWC24* e Δcwc24 por 30 horas em glicose, as células receberam um pulso com ^3H -uracila, seguido de adição de uracila não marcada. A análise do RNA extraído de células coletadas em diferentes tempos após o pulso mostrou que o processamento do pré-rRNA 35S é mais lento na cepa Δcwc24 em condição restritiva. Os pré-rRNAs 35S e 27S foram detectados até 30 minutos após o pulso na cepa mutante, enquanto na cepa selvagem, os mesmos precursores foram processados mais rapidamente, sendo detectados apenas até 10 minutos após a marcação (Figura 13). Embora tenha sido observada uma diminuição na velocidade de processamento dos pré-rRNAs 35S e 27S, não há uma diminuição significativa da quantidade dos RNAs maduros 18S e 25S na cepa mutante. Isto indica, portanto, que a depleção de Cwc24p leva a um fenótipo moderado, no qual o processamento de rRNA ocorre com menor velocidade, porém não é bloqueado.

Figura 13. *Pulse-chase labeling*. Células das cepas *CWC24* e $\Delta cwc24$ foram incubadas por 30 horas em meio contendo glicose. Em seguida, foram submetidas a um pulso com ^3H -uracila, seguido de adição de uracila não marcada. Células foram coletadas em diferentes tempos e o RNA total foi extraído, desnaturado, separado por eletroforese em gel de agarose e analisado depois de exposição a filme de raios X.

4.4.2 A depleção de Cwc24p leva ao acúmulo de pré-rRNAs na célula

O nível basal dos pré-rRNAs e rRNAs maduros foi analisado por *Northern blot*. Para isso, o RNA extraído de células das cepas *CWC24* e $\Delta cwc24$, incubadas por diferentes intervalos de tempo em meio contendo glicose, foi analisado utilizando sondas complementares a diferentes regiões dos RNAs ribossomais maduros e de seus precursores (Figura 14).

Na ausência de Cwc24p, foi possível observar um acúmulo do pré-rRNA 35S (acúmulo de 2,2 vezes em relação à cepa selvagem), assim como dos rRNAs intermediários 23S (1,3 vezes) e 20S (1,3 vezes), precursores do rRNA 18S, e do pré-rRNA 27S (3 vezes), precursor do rRNA 25S (Figura 14). O nível dos rRNAs maduros 18S e 25S apresentou uma modesta redução (cerca de 30% em relação à cepa selvagem). Estes resultados confirmam os dados obtidos por *pulse-chase labeling*, indicando novamente que há uma diminuição da eficiência do processamento do pré-rRNA ribossomal, porém não há um bloqueio da via, o que resultaria em uma redução significativa dos rRNAs maduros 18S e 25S. É importante ressaltar que existem exemplos na literatura para ambos os cenários. Foi mostrado, por exemplo, que a depleção de Nop58p, uma proteína do *core* dos snoRNPs de box C/D, resulta em drástica diminuição do rRNA 18S maduro (Lafontaine e Tollervey, 1999), enquanto a ausência de Nop1p e Nop56p, proteínas do mesmo complexo, confere um fenótipo semelhante ao observado para Cwc24p (Gautier et al., 1997; Tollervey et al., 1991).

Figura 14. Análise de processamento de rRNA por *Northern blot*. (A) RNA total foi extraído de células das cepas *CWC24* e $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ depois de incubadas por diferentes períodos de tempo em meio contendo glicose. O processamento de rRNA foi analisado através de hibridização com sondas específicas para diferentes regiões do pré-rRNA 35S, como indicado em B. RNA scR1 foi utilizado como controle interno do experimento. (B) Esquema da via de processamento de pré-rRNA em eucariotos, no qual o rRNA precursor 35S passa por várias clivagens endo- e exonucleolíticas para dar origem aos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S. Posições relativas das sondas utilizadas em A estão indicadas.

4.4.3 Cwc24p é necessária para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S

A observação do acúmulo dos pré-rRNAs 35S, 23S, 20S e 27S na cepa $\Delta cwc24$, sem o concomitante acúmulo do pré-rRNA 7S e sem diminuição drástica dos níveis dos rRNAs maduros 18S, 25S e 5.8S indica que Cwc24p atue nas etapas iniciais do processamento do pré-rRNA 35S. Para confirmar estes dados e analisar o processamento de pré-rRNA em maior detalhe, a eficiência das clivagens nos diversos sítios de processamento do pré-rRNA 35S foi analisada por *primer extension*. Nestes ensaios, RNA extraído de células CWC24 ou $\Delta cwc24$ incubadas por 0, 24 e 36 horas em meio contendo glicose foi utilizado como molde em reação com transcriptase reversa, empregando os *primers* indicados na Figura 15A, complementares a diferentes regiões do pré-rRNA.

Inicialmente, foram realizados ensaios para verificar a eficiência das clivagens iniciais do pré-35S (sítios A₀, A₁, A₂). Utilizando um *primer* complementar à região 5' do rRNA 18S (Figura 15, P2), foi possível observar que a clivagem no sítio A₁ foi pouco afetada pela depleção de Cwc24p, o que confirma os resultados apresentados acima. Entretanto, há uma diminuição da eficiência da clivagem em A₀ na ausência de Cwc24p, e conseqüente acúmulo de um produto maior, correspondendo à extremidade 5' do pré-rRNA 35S (Figura 15, P2). De maneira similar, utilizando os *primers* P8 e P9, foi detectado o acúmulo de produtos estendidos na cepa $\Delta cwc24$, devido ao acúmulo de pré-rRNAs não processados, embora a eficiência das clivagens em A₂ e A₃ tenha sido pouco afetada. Além de confirmar as análises de processamento de pré-rRNA por *pulse-chase labeling* e *Northern blot*, os resultados de *primer extension* demonstram que, embora os rRNAs maduros sejam formados na ausência de Cwc24p, as clivagens iniciais no pré-rRNA 35S, principalmente em A₀ e A₂, ocorrem mais lentamente.

Em seguida, foram realizados ensaios para investigar as clivagens mais tardias (sítios B, C₁ e C₂). Utilizando *primers* que hibridizam na extremidade 5' dos rRNAs 5.8S e 25S, não foi possível observar diferença significativa na eficiência das clivagens na cepa $\Delta cwc24$ em relação à cepa selvagem, tampouco a presença de formas não processadas dos pré-rRNAs (Figura 16). Cabe destacar que fenótipos semelhantes foram observados em mutantes de Nop58p (deficiência da clivagem em A₀, acúmulo de formas estendidas de rRNA e pequeno efeito nas clivagens mais

tardias; Wu et al., 1998; Lafontaine e Tollervey, 1999). A coincidência de fenótipos entre Nop58p e Cwc24p é interessante principalmente porque ambas proteínas interagem com Nop17p.

Em resumo, os resultados obtidos por *pulse-chase labeling*, *Northern blot* e *primer-extension* confirmaram o envolvimento de Cwc24p no processamento de rRNA ribossomal. Na ausência da proteína, há uma diminuição da eficiência nas clivagens em A₀, A₁ e A₂. Como as clivagens acontecem em ordem temporal, há um acúmulo dos pré-rRNAs 35S, 27S, 23S e 20S. Entretanto, após estas clivagens serem realizadas, o pré-rRNA 27S é processado normalmente, uma vez que a eficiência das clivagens em C1 e C2 não foi afetada e não há acúmulo do pré-rRNA 7S, tampouco diminuição do rRNA maduro 5.8S.

Figura 15. Análise das clivagens iniciais do pré-rRNA por *primer extension*. (A) Posição dos primers utilizados em relação aos sítios de clivagem A₀, A₁, A₂, e A₃. Células foram incubadas por 24 e 36 horas em meio contendo glicose. A partir do RNA total extraído destas cepas, foi realizada transcrição reversa utilizando os primers P2 (B) P8 (C) e P9 (D). Clivagens endonucleolíticas do pré-rRNA não ocorrem eficientemente na cepa $\Delta cwc24$.

Figura 16. Análise de clivagens tardias do pré-rRNA por *primer extension*. (A) Posição dos primers utilizados em relação aos sítios de clivagem analisados, B₁ e C₁. Células foram incubadas por 24 e 36 horas em meio contendo glicose. A partir do RNA total extraído destas cepas, transcrição reversa foi realizada utilizando os primers P4 (B) e P7 (C). A formação das extremidades 5' dos rRNAs 5.8S e 25S não é muito alterada na cepa $\Delta cwc24$.

4.5 A depleção de Cwc24p causa uma diminuição na produção de ribossomos

Uma vez determinado o envolvimento de Cwc24p no processamento de rRNA, fomos investigar alterações associadas à depleção de Cwc24p na quantidade das subunidades ribossomais 40S e 60S e no perfil polissomal. Para isso, células das cepas *CWC24* e $\Delta cwc24$ incubadas por 12 horas em galactose ou por 24 horas em glicose foram tratadas com cicloheximida. O extrato total destas células foi separado em gradiente de sacarose 5% a 47% e o perfil polissomal foi obtido através da leitura de absorbância em 254nm. Foi possível observar que, na ausência de Cwc24p, há uma diminuição da quantidade das subunidades ribossomais 40S e 60S, o que acarreta uma diminuição da fração de 80S, correspondente ao ribossomo maduro e também no nível de polissomos (Figura 17). Esse resultado mostra que, embora através da análise de processamento de rRNAs não tenha sido detectada uma grande diminuição da concentração de rRNAs maduros, a depleção de Cwc24p causa uma diminuição nos níveis das subunidades ribossomais maduras.

Em seguida, as proteínas presentes em cada uma das frações foram precipitadas, separadas por *SDS-PAGE* e analisadas por *Western blot*. A proteína Cwc24p foi detectada em maior quantidade na fração solúvel e também na fração que contém a subunidade 40S, porém isto pode ser decorrente da super-expressão do gene *CWC24*, sob controle do promotor GAL1. (Figura 17B). A proteína Rpl5p, utilizada como controle, foi detectada nas frações correspondentes ao 60S, 80S e polissomos, como esperado.

A **B**

Figura 17. Análise de perfil polissomal na cepa $\Delta cwc24$. A cepa *CWC24* foi incubada por 12 horas em meio contendo glicose, e cepa $\Delta cwc24$ foi incubada por 12 horas em meio contendo galactose, ou por 24 horas em glicose. **(A)** Análise de perfil polissomal através de gradiente de sacarose. A cepa $\Delta cwc24$ apresenta níveis mais baixos das subunidades 40S e 60S, quando incubada em glicose. **(B)** Proteínas recuperadas das frações obtidas dos gradientes de sacarose foram submetidas a *Western blot* para verificação da sedimentação de Cwc24p. Cwc24p está concentrada na fração solúvel do gradiente. Proteína ribossomal da subunidade maior, Rpl5p, foi utilizada como controle.

4.6 A proteína Cwc24p possui um *zinc-finger* e um domínio RING, essenciais para sua função

Com os dados obtidos até então, havia sido possível determinar o envolvimento de Cwc24p no processamento de RNA ribossomal, entretanto o mecanismo pelo qual esta proteína exerce seu efeito ainda necessitava ser investigado. Buscando informações que pudessem fornecer indícios sobre sua função, foi realizado alinhamento da seqüência de aminoácidos de Cwc24p contra os bancos de dados, utilizando o algoritmo ClustalW. Esta análise não revelou proteínas de outros organismos com alto grau de similaridade a Cwc24p, porém foram identificados dois domínios conservados, um *zinc-finger* e um domínio RING na porção C-terminal de Cwc24p (Figura 18, os retângulos correspondem aos domínios; cisteínas e histidinas conservadas estão destacadas em cinza). Além disso, é interessante notar que a justaposição destes dois domínios na porção C-terminal também ocorre em proteínas de outros organismos, o que poderia indicar uma função específica para este arranjo.

O *zinc-finger* identificado possui a estrutura C_3H_1 , comumente encontrada em proteínas que ligam DNA, na qual um átomo de zinco encontra-se coordenado tetraedricamente por três resíduos de cisteína e um de histidina. O domínio RING, por sua vez, apresenta uma estrutura diferente, representada por C_3HC_4 , ou mais precisamente, $Cys-X_2-Cys-X_{(9-39)}-Cys-X_{(1-3)}-His_{(2-3)}-Cys-X_{(2)}-Cys-X_{(4-48)}-Cys-X_2-Cys$, na qual estão coordenados dois átomos de zinco (Borden e Freemont, 1996). Este motivo foi originalmente descrito por análise de seqüência de um gene denominado *Really Interesting New Gene 1*, *RING1* (Lovering et al., 1983). Em seguida, foram obtidas as primeiras estruturas tridimensionais por ressonância paramagnética nuclear (1H) do domínio *RING* de *IEEHV* (*immediate early equine herpes virus*) e do PML (Borden e Freemont, 1996), revelando a presença de uma estrutura *cross-brace* característica (Figura 18B).

Figura 18. Análise da sequência de Cwc24p. A sequência de Cwc24p (*Sc*, *S. cerevisiae*) foi alinhada com proteínas de outros organismos. *Sp*, *S. pombe*; *Ca*, *C. albicans*; *Ce*, *C. elegans*; *Bt*, *B. taurus*; *Hs*, *H. sapiens*. *, identidade; :, alta similaridade; ., baixa similaridade. O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW. Regiões em preto correspondem a alta similaridade ou identidade. Retângulos correspondem aos motivos zinc finger e do RING finger. Regiões em cinza correspondem a cisteínas e histidinas conservadas nestes motivos.

Com o objetivo de analisar a importância destes domínios para a função de Cwc24p, a cepa $\Delta cwc24$ foi transformada com plasmídeos expressando porções truncadas ou mutadas do gene *CWC24*, sob controle do promotor constitutivo *ADH1* (por serem derivados do vetor pGAD-CWC24, os plasmídeos expressam proteínas de fusão com o domínio de ativação da transcrição de Gal4p, AD). Foi feita análise do crescimento das cepas em meio contendo glicose, condição na qual os genes mutantes são expressos (sob controle do promotor constitutivo *ADH1*), mas o gene selvagem está silenciado (repressão do promotor *GAL1*).

A expressão da proteína inteira, AD-Cwc24 [1-260], resgatou o crescimento da cepa $\Delta cwc24$, enquanto células expressando apenas AD não cresceram. A retirada dos cinco primeiros aminoácidos da proteína, AD-Cwc24 [6-260], ou dos aminoácidos 1 ao 85, AD-Cwc24 [86-260], ainda permitiu complementação da cepa $\Delta cwc24$, indicando que os elementos essenciais para a função de Cwc24p deveriam estar na região C-terminal (Figura 19). De fato, a expressão de um mutante contendo o *zinc-finger* e o domínio RING, AD-Cwc24 [144-260], mostrou complementação parcial da cepa $\Delta cwc24$, enquanto a substituição de uma cisteína do *zinc-finger* por alanina, AD-Cwc24 [144-260-(C144A)] impediu o crescimento da cepa em glicose (estes dados podem ser observados com maior clareza na curva de crescimento em meio líquido; Figura 19B). Esses resultados comprovam a importância dos domínios *zinc finger* e RING para a função de Cwc24p.

Figura 19. Mapeamento de regiões essenciais para a função de Cwc24p. Teste de complementação da cepa $\Delta cwc24$. **(A)** Diluição seriada em meio contendo glicose mostra complementação com a expressão da proteína Cwc24p inteira e complementação parcial com proteínas truncadas contendo diferentes porções da região C-terminal de Cwc24p em fusão com o domínio de ativação de Gal4p (indicada por AD). Os números referem-se aos aminoácidos codificados nas construções. Asteriscos indicam mutação de resíduos de cisteína conservados. **(B)** Curva de crescimento das mesmas cepas em meio líquido contendo glicose.

4.7 Cwc24p é capaz de ligar DNA *in vitro*, porém com baixa eficiência e de maneira inespecífica

Após ter sido mostrada a complementação da cepa $\Delta cwc24$ pelas proteínas mutantes truncadas, foram realizados ensaios para investigar a função dos domínios de Cwc24p. Diversas proteínas que atuam no processamento do RNA ribossomal são capazes de ligar pré-rRNAs, rRNAs maduros ou snoRNAs. Apesar dos *zinc-fingers* estarem relacionados principalmente com ligação a DNA, já foi demonstrado que estes domínios podem também mediar ligação a RNA e a outras proteínas (Gamsjaeger et al., 2006). De maneira similar, o domínio RING foi inicialmente implicado em ligação a ácido nucléico, por homologia com os *zinc-fingers*. Quando este domínio foi identificado primeira vez, foi mostrada a ligação de um peptídeo sintético contendo a seqüência do RING a um fragmento de DNA marcado (Lovering et al., 1993). Entretanto, evidências posteriores mostraram seu papel em mediar ligações proteína-proteína (Gamsjaeger et al., 2006).

Para investigar a possível ligação de Cwc24p a DNA *in vivo*, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação de cromatina (ChIP, *chromatin immunoprecipitation*). Nestes ensaios, Cwc24p foi expressa em levedura como uma proteína de fusão N-terminal com o domínio ZZ da proteína A de *S. aureus* (ProtA-Cwc24p). Células de levedura expressando ProtA ou ProtA-Cwc24p foram incubadas com 2% formaldeído para promover a formação de ligações covalentes entre as proteínas e regiões da cromatina eventualmente ligadas a ela. O extrato total obtido destas células foi submetido a ultra-som para fragmentar a cromatina e posteriormente incubado com resina *IgG-sepharose* para isolar ProtA-Cwc24p e DNAs a ela ligados. As frações recuperadas foram incubadas com 50mM NaCl a 65°C para quebrar as ligações entre proteína e DNA. As amostras foram então tratadas com proteinase K e o DNA, extraído com fenol, foi utilizado como molde em reações de PCR utilizando *primers* para regiões selecionadas do genoma. Levando em conta o acúmulo do pré-rRNA 35S na cepa $\Delta cwc24$, foi levantada a hipótese de que Cwc24p poderia ligar-se à região do rDNA (DNA que codifica o pré-rRNA 35S) na região do 5'ETS (espaçador externo 5'), onde poderia agir no processamento deste RNA de maneira co-transcricional. Alternativamente, Cwc24p poderia ligar-se à região promotora do rDNA (promotor do pré-rRNA 35S), onde atuaria como um

fator de transcrição. Por último, seria possível que Cwc24p atuasse no promotor do snR17A, um dos genes que codifica o snoRNA U3, que é essencial para as clivagens iniciais no pré-rRNA 35S. Utilizando primers complementares a regiões do 5'ETS, não foi possível observar ligação de ProtA-Cwc24p a este DNA acima dos níveis basais (Figura 20A, comparar as canaletas referentes à eluição, ELU, de ProtA e ProtA-Cwc24p). Também não foi observada ligação de Cwc24p à região promotora do rDNA (Figura 20B), tampouco à região promotora do snR17A (Figura 20C). Como controle, foram utilizados primers que amplificam uma região intergênica do cromossomo V (Figura 20D).

Figura 20. Co-imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Ensaio de co-imunoprecipitação de cromatina com a fusão ProtA-Cwc24p (A-Cwc24p) ou somente ProtA (A), utilizando primers específicos para as regiões do 5'ETS, promotor do pré-rRNA 35S e promotor do snR17A. **(A)** DNA foi extraído a partir do material eluído da coluna de IgG-sepharose. IN: *input* (extrato total de células tratadas com formaldeído); SH: *sheared* (extrato submetido a quebra por ultra-som) e ELU: eluição da coluna. **(B-D)** DNA extraído diretamente da resina, sem eluição. **(D)** Amplificação com primers para uma região intergênica do cromossomo V, utilizados como controle. Três diluições do DNA utilizado como molde estão indicadas (0,25X; 0,5X; 1X). T: controle (reação de PCR utilizando DNA total de *S. cerevisiae* como molde)

Com o objetivo de investigar se Cwc24p era capaz de ligar DNA *in vitro*, foram realizados experimentos para a obtenção da proteína recombinante GST-Cwc24p purificada. Extrato total de células de *E. coli* expressando GST-Cwc24p foi passado por coluna de glutationa-sepharose, o que permitiu uma purificação parcial da proteína (Figura 21A). Etapas posteriores de purificação foram realizadas através de cromatografia de afinidade em coluna de heparina e eluição com gradiente de sal (Figura 21B). GST-Cwc24p foi eluída em frações contendo concentrações maiores que 250 mM de NaCl. As frações a partir de 300mM de NaCl foram combinadas e o tampão de purificação foi trocado pelo tampão de ligação a DNA, descrito anteriormente por Lovering et al. (1993).

GST-Cwc24p obtida como descrito acima foi utilizada em ensaios de *band-shift*, utilizando fragmentos de DNA correspondentes às regiões do genoma testadas nos ensaios de ChIP. Quantidades crescentes da proteína GST-Cwc24p purificada foram incubadas com 0,25ng dos fragmentos DNAs marcados radioativamente por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida nativo. Observou-se o deslocamento da banda referente aos DNAs marcados para região de maior peso molecular conforme GST-Cwc24p é adicionada à reação, mostrando que a proteína era capaz de ligar os fragmentos de DNA (Figura 22, canaletas 1 a 4). Entretanto, a adição de DNA de espermatozoário de salmão como competidor inespecífico mostrou que a ligação não é específica para os DNAs marcados radioativamente (Figura 22, canaletas 6 a 8). Tais experimentos levaram à conclusão de que Cwc24p liga-se com baixa afinidade a DNA (pelo menos 1 µg de proteína tem que ser adicionado à reação) e de maneira inespecífica. Com os resultados apresentados acima, concluiu-se que Cwc24p não se liga *in vivo* às regiões da cromatina testadas e liga-se a DNA *in vitro*, porém de maneira inespecífica e com baixa afinidade.

A

B

Figura 21. Purificação de GST-Cwc24p. (A) Purificação em coluna de glutathione-sepharose. (B) Purificação por cromatografia em coluna de heparina. As bandas correspondentes à GST-Cwc24p estão indicadas. IN: *input*; FT: *flow-through*; L: lavagem; E: eluição.

Figura 22. Ensaios de ligação de GST-Cwc24p a DNA. Quantidades crescentes de GST-Cwc24p foram incubadas com fragmentos de DNA marcados radioativamente. (A) DNA 5'ETS (B) Promotor do rDNA (C) Promotor do snR17A (D) Controle, DNA de região intergênica. DNA de esperma de salmão (SS-DNA) foi utilizado como competidor inespecífico. GST foi incubada com os fragmentos de DNA como controle negativo.

4.8 Cwc24p não é capaz de ligar-se a RNA

Para investigar se Cwc24p era capaz de ligar-se a RNA, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação de RNA utilizando a proteína de fusão ProtA-Cwc24p. Extrato total de células expressando ProtA-Cwc24p foi incubado com resina IgG-sepharose. RNAs co-imunoprecipitados foram marcados radioativamente nas extremidades 3' com ^{32}P -pCp e separados em gel de poliacrilamida 7% (Figura 23A). Observou-se que as mesmas bandas presentes no controle negativo estão presentes também quando foi empregada a fusão ProtA-Cwc24p, portanto, não foi possível detectar ligação a RNAs específicos nas condições deste ensaio.

O RNA co-imunoprecipitado foi também separado em gel de poliacrilamida desnaturante, transferido para membrana de nylon e analisado por *Northern blot*, utilizando sondas contra rRNAs e o snoRNA U3 (que está diretamente envolvido nas clivagens iniciais do pré-rRNA 35S). Não foi possível, entretanto, observar ligação de ProtA-Cwc24p ao snoRNA U3, sendo que o nível de RNA detectado foi igual àquele observado na reação controle (RNA co-imunoprecipitado pela ProtA; Figura 23B).

Ainda na tentativa de observar a ligação de Cwc24p a RNA *in vitro*, foram realizados ensaios de *band-shift* com RNA. Nestes ensaios, GST-Cwc24p foi incubada com 1 pmol do pré-snoRNA U3A marcado radioativamente (transcrito *in vitro* na presença de α - ^{32}P -UTP). Novamente, não foi observada ligação de Cwc24p a este RNA (Figura 23C). Tendo em vista as evidências apresentadas aqui, é muito provável que Cwc24p não se ligue a ácidos nucleicos. Conseqüentemente, os domínios *zinc-finger* e RING devem estar envolvidos em interação proteína-proteína.

Figura 23. Ensaios de ligação de Cwc24p a RNA. (A) Co-imunoprecipitação de RNA com ProtA ou ProtA-Cwc24p e marcação com ^{32}P -pCp. (B) Co-imunoprecipitação de RNA com ProtA ou ProtA-Cwc24p e análise por *Northern blot* com sonda contra snoRNA U3 e rRNA 5.8S. (C) Pré-snoRNA U3 transcrito *in vitro* e marcado radioativamente foi incubado com quantidades crescentes de GST-Cwc24p para análise de *band shift*. Resultados dos três tipos de experimentos indicam que Cwc24p não se ligue a RNA diretamente.

4.9 Cwc24p influencia o splicing do pré-snoRNA U3

Como demonstrado acima, a depleção de Cwc24p leva a um acúmulo do pré-rRNA 35S, sem alterar significativamente os níveis de rRNAs maduros, fenótipo semelhante ao de mutantes de subunidades do *core* de snoRNPs de box C/D. Nop17p, caracterizada em nosso laboratório, participa da montagem de snoRNPs de box C/D e interage com Cwc24p. Além disso, Cwc24p foi isolada em um complexo com o fator de splicing Cef1p (Ohi et al., 2002). Como Cwc24p está localizada no núcleo, e não concentrada no nucléolo (subcompartimento onde o pré-rRNA é transcrito e onde ocorrem as primeiras etapas de processamento), uma hipótese para sua função poderia ser a do seu envolvimento em splicing, afetando indiretamente o processamento de pré-rRNA. Para verificar se havia interação direta entre Cef1p e Cwc24p, foi realizado um ensaio de *pull-down* utilizando GST-Cwc24p e His-Cef1p expressas em *E. coli*. Através deste ensaio, foi possível observar que His-Cef1p é co-precipitada por GST-Cwc24p, enquanto está ausente da eluição referente à proteína GST (Figura 24). A interação direta entre Cef1p e Cwc24p confirma a hipótese de que esta última estaria envolvida no processo de splicing.

Com o objetivo de investigar a participação de Cwc24p nesta via, foram realizados ensaios de *microarray* específicos para splicing em levedura (Clark et al., 2002; Pleiss et al., 2007). Nestes experimentos, RNA total extraído da cepa $\Delta cwc24$, incubada por diferentes intervalos de tempo em meio contendo glicose, foi utilizado para produzir cDNAs marcados, que foram hibridizados em lâminas de *microarray* contendo sondas para as regiões do *introns*, *exons* e *exon-junctions* dos 250 genes de *S. cerevisiae* que contêm introns (Figura 25A).

Na ausência de Cwc24p, poucos pré-RNAs tiveram seu splicing afetado, o que descartou a possibilidade desta proteína ser um fator geral de splicing. Entretanto, foi observado acúmulo dos pré-snoRNAs U3A e U3B (codificados pelos genes snR17A e snR17B, respectivamente), sendo estes os RNAs cujo splicing foi mais afetado (Figura 25B). Como dito anteriormente, o snoRNA U3 é essencial para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S, que se mostraram deficientes na ausência de Cwc24p. Além de snR17A e B, o splicing dos pré-mRNAs TEF4 e IMD4 foi afetado pela ausência de Cwc24p (Figura 25B). É interessante notar que os introns desses pré-mRNAs codificam os snoRNAs de box C/D snR38 e snR54, respectivamente.

Figura 24. Análise de interação entre Cwc24p e Cef1p. *Pull-down* das proteínas recombinantes GST-Cwc24p e His-Cef1p. Extratos totais de células de *E. coli* expressando GST ou GST-Cwc24p foram incubados com resina glutationa-sepharose. Depois de lavagem, extrato total de células de *E. coli* expressando His-Cef1p foi adicionado à resina. Proteínas ligadas à resina foram eluídas com glutatona reduzida. TE: extrato total; FT: *flow-through*; B: eluição.

Figura 25. Análise de splicing em escala global na cepa $\Delta cwc24$. A partir do RNA extraído das cepas *CWC24* e $\Delta cwc24$, foi sintetizado cDNA marcado, utilizado para hibridizar lâminas de *microarray* com sondas específicas para os *exons*, *introns* e *exon-junctions* de genes de *S. cerevisiae*. **(A)** Esquema ilustrando a posições dos oligonucleotídeos utilizados como sondas no *microarray*. **(B)** Análise de genes de levedura que contêm introns. **(C)** Análise de genes que não apresentam introns. Amarelo indica maior concentração de RNA na cepa $\Delta cwc24$ em relação à cepa selvagem, enquanto azul representa menor concentração.

Esses resultados indicam que Cwc24p esteja envolvida em splicing de pré-snoRNAs de box C/D.

Os dados obtidos por microarray foram confirmados por primer extension, utilizando *primers* que hibridizam no segundo exon ou nos introns dos pré-snoRNAs U3. Embora possuam introns de tamanho e seqüência diferentes, após o splicing ambos precursores dão origem a cópias praticamente idênticas do snoRNA U3 maduro (Figura 26A). Os resultados obtidos confirmam que, na ausência de Cwc24p, há acúmulo das formas não maduras do snoRNA U3 (Figura 26B e C, os pré-snoRNAs estão indicados à direita, pelas letras A e B). O acúmulo do pré-snoRNA U3A na cepa $\Delta cwc24$ foi também comprovado através de *Northern blot* (Figura 26D).

Com os resultados descritos acima, foi possível concluir que Cwc24p é necessária para que o splicing dos pré-snoRNAs U3A e U3B ocorra com eficiência, gerando o snoRNA U3 maduro que é essencial para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S. Desta maneira, Cwc24p conecta os processos de splicing e processamento de rRNA.

Figura 26. Cwc24p influencia o splicing dos pré-snoRNAs U3. (A) O snoRNA U3 é codificado, em *S. cerevisiae*, por dois genes que contêm introns. As sondas indicadas foram utilizadas para analisar o splicing do pré-snoRNA U3 através de *primer extension* (**B** e **C**) e *Northern blot* (**D**) a partir de RNAs extraído de células incubadas em glicose por diferentes períodos de tempo.

4.10 Cwc24p é conservada evolutivamente, apresentando uma possível ortóloga em *H. sapiens*

O alinhamento da sequência de Cwc24p com os bancos de dados revelou, como descrito anteriormente, similaridade com proteínas de outros organismos, em especial na porção que compreende o *zinc finger* e o *RING finger* (Figura 18). Dentre as proteínas identificadas, Cwc24p apresentou 18% de similaridade e 26% de identidade com as proteínas de humanos *ring finger protein 183* (também denominada como ZNF113A) e sua paróloga *ring finger protein 183L* (*183 like*), o que nos levou a investigar se estas poderiam ser ortólogas de Cwc24p (Figura 27). O gene de humanos que codifica ZNF113A foi clonado e utilizado em ensaios de complementação da cepa $\Delta cwc24$. A expressão da proteína de humanos em levedura não complementou o fenótipo de depleção de Cwc24p, tampouco a expressão de uma quimera, contendo o N-terminal de Cwc24p e o C-terminal de ZNF113A (Figura 28). Entretanto, quando foi expresso apenas o C-terminal da proteína de humanos, que contém os domínios *zinc-finger* e RING, observou-se uma complementação parcial da cepa mutante (Figura 28, AD-znf113a [202-343]). É importante lembrar que a expressão da porção C-terminal de Cwc24p também complementou parcialmente o crescimento da cepa mutante. É possível, portanto, que estas proteínas exerçam a mesma função em levedura e em humanos, porém apesar da conservação de sequência e função no C-terminal, divergências de sequência no restante da proteína podem impedir que a proteína de humanos complemente o fenótipo da cepa $\Delta cwc24$.

Figura 27. Cwc24p apresenta homologia com proteínas de humanos. Alinhamento da seqüência de Cwc24p (Sc, *S. cerevisiae*) com duas proteínas potencialmente ortólogas em humanos (Hs, *H. sapiens*), denominadas 183 (NCBI accession number NP_008909) e 183L (NCBI accession number NP_849192). O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW. Retângulos correspondem aos motivos *zinc finger* e *RING finger*. Regiões em cinza correspondem a cisteínas e histidinas conservadas nestes motivos.

Figura 28. Análise de complementação da cepa $\Delta cwc24$ com a proteína codificada pelo gene humano ZNF113A, uma potencial ortóloga de Cwc24p. (A) Diluição seriada em meio contendo glicose. **(B)** Curva de crescimento em meio líquido.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, são apresentados dados de caracterização funcional de Cwc24p, uma proteína essencial em levedura, cuja função não tinha sido investigada anteriormente. Como demonstrado aqui, Cwc24p é um fator necessário para o eficiente splicing de pré-snoRNAs de box C/D, em particular do snoRNA U3, influenciando indiretamente o processamento de pré-rRNA.

Cwc24p foi identificada em nosso laboratório por sua interação com Nop17p, uma proteína nucleolar envolvida na montagem de snoRNPs de box C/D (Gonzales et al., 2005). O clone de *CWC24* inicialmente obtido no sistema do duplo-híbrido possuía uma deleção dos cinco primeiros resíduos de aminoácidos da proteína e foi o que apresentou interação mais forte com Nop17p, possivelmente devido a um favorecimento da conformação nativa da proteína fundida ao domínio de ativação da transcrição de Gal4p. Este tipo de comportamento é comumente observado em ensaios de duplo-híbrido (Van Crielinge e Beyaert, 1999). Entretanto, utilizando a proteína Cwc24p inteira, a interação com Nop17p também pôde ser observada. Além disso, a interação Cwc24p-Nop17p independe das fusões utilizadas nos ensaios de duplo-híbrido.

Cwc24p possui dois domínios conservados em sua porção C-terminal, um *zinc-finger* e um domínio RING. Utilizando versões truncadas de Cwc24p, foi possível verificar que sua porção central é suficiente para a interação com Nop17p, o que indica que a interação entre estas proteínas não depende dos domínios conservados de Cwc24p. Entretanto, não é possível afirmar, através do sistema do duplo-híbrido, que Cwc24p e Nop17p interajam diretamente, uma vez que outras proteínas presentes na célula de levedura poderiam mediar esta interação. A análise da interação através de ensaio de *pull-down*, entretanto, utilizando as proteínas expressas em sistema heterólogo, confirma que a interação entre Cwc24p e Nop17p é direta.

O nucléolo é o subcompartimento nuclear onde ocorre a transcrição e processamento dos rRNAs e a montagem das subunidades ribossomais. Nop17p, uma proteína que atua na montagem e estabilização de snoRNPs e box C/D, encontra-se concentrada neste subcompartimento, assim como as proteínas Nop1p, Nop56p, Nop58p e Snu13p, que formam o *core* destes snoRNPs. Apesar de interagir com Nop17p, Cwc24p não está concentrada no nucléolo, mas encontra-se

espalhada por todo o núcleo. Uma vez que não foi encontrado sinal de localização nuclear na sequência de Cwc24p, a localização subcelular das porções N-terminal e C-terminal foi monitorada, mostrando que a porção N-terminal localiza-se no núcleo. Como esta porção contém a região responsável pela interação com Nop17p, que por sua vez possui a sequência rica em lisinas PKMKKKG (um possível sinal de localização nuclear), é provável que Cwc24p seja direcionada para o núcleo através de sua interação com Nop17p.

Dado que Cwc24p interage com proteínas envolvidas em processamento de RNA, era importante estudar os efeitos da depleção de Cwc24p sobre esta via. Para isso, foi obtida uma cepa mutante condicional que expressa o gene *CWC24* somente na presença de galactose, aqui denominada $\Delta cwc24$. Analisando o crescimento da cepa $\Delta cwc24$ em meio contendo glicose (inibição da expressão de Cwc24p), foi possível observar que Cwc24p é uma proteína bastante estável, podendo ser detectada na célula até 12 horas após o início do cultivo na condição restritiva. Deve-se notar que a proteína detectada por *Western blot* corresponde à super-expressão de Cwc24p sob controle do promotor *GAL1*, uma vez que não foi possível detectar a proteína endógena na cepa selvagem. Também não foi possível detectar o mRNA endógeno de Cwc24p por *Northern blot* (dados não mostrados), o que é esperado dado que a alta estabilidade da proteína permite que a mesma seja expressa em baixo nível. Cwc24p foi também fusionada ao *degron tag* (Dohmen et al., 1994) na tentativa de se obter uma proteína menos estável, mas a fusão Degron-Cwc24p continuou estável (dados não mostrados).

A depleção de Cwc24p levou a uma diminuição na cinética de processamento dos rRNAs precursores 35S e 27S em relação à cepa selvagem, o que confirmou o envolvimento de Cwc24p no processamento de RNA ribossomal. Além disso, observou-se uma diminuição geral da quantidade de rRNAs na cepa $\Delta cwc24$ (a membrana correspondente a esta região foi super-exposta para permitir a visualização do resultado), indicando um possível efeito na transcrição pela RNA polimerase I, o que não é surpreendente, uma vez que a transcrição dos rRNAs por RNA pol I e o processamento de rRNA são processos interligados (Gallagher et al., 2004; Hall et al., 2006). Analisando o nível basal de rRNAs através de *Northern blot*, foi observado que a depleção de Cwc24p leva a um acúmulo dos pré-rRNAs 35S, 27S, 23S e 20S. Entretanto, é interessante notar que o acúmulo destes precursores

não é acompanhado por uma redução drástica dos rRNAs maduros 18S, 25S e 5.8S. O mesmo fenótipo foi observado em mutantes da proteína Nop1p, a metiltransferase dos snoRNPs de box C/D (Tollervey et al., 1993). Por outro lado, a depleção da proteína Nop58p, que também faz parte destes snoRNPs, acarreta drástica redução do rRNA 18S maduro (Lafontaine e Tollervey, 1999). Estes dados demonstram que mutações de diferentes fatores envolvidos nas mesmas etapas do processamento de rRNA podem levar a fenótipos bastante distintos.

Em certos casos, como nos mutantes de Nop58p, é possível identificar prontamente que seu efeito ocorre na biogênese da subunidade 40S, dado o significativo efeito no rRNA 18S. No caso de Cwc24p, apesar do claro acúmulo de rRNAs precursores, ocorre uma diminuição de cerca de 30% dos rRNAs 18S e 25S maduros, observada através da quantificação dos ensaios de *Northern blot*. Para determinar se o efeito de Cwc24p seria predominante na biogênese da subunidade 40S ou 60S, foram feitos ensaios de *primer-extension*, que mostraram inibição das clivagens iniciais no pré-rRNA 35S, principalmente da clivagem em A₀, e acúmulo de rRNAs precursores. As clivagens nos sítios C₁, C₂ e E, que dão origem aos rRNAs 5.8S e 25S da subunidade 60S, não foram afetadas, o que comprova que Cwc24p influencia principalmente as etapas iniciais de processamento de rRNA. É interessante notar que o efeito mais marcante observado foi a inibição no sítio A₀, enquanto as clivagens em A₁, A₂ e A₃ foram pouco afetadas. Este mesmo fenótipo foi observado em mutantes das proteínas de box C/D Nop58p e Snu13p (Lafontaine e Tollervey, 1999; Dobbyn e O'Keefe, 2004).

Depois de confirmado o efeito da depleção de Cwc24p nas clivagens iniciais do pré-rRNA 35S, foi analisado o perfil polissomal nessas células. Embora tenha sido observada apenas uma pequena diminuição dos rRNAs maduros 18S e 25S, esta diferença acarreta uma diminuição da quantidade de subunidades 40S e 60S, assim como do nível de polissomos. Estes resultados corroboram os de análise de processamento de pré-rRNA, uma vez que o processamento mais lento do pré-rRNA 35S vai acarretar uma diminuição do número de subunidades ribossomais maduras.

Os domínios *zinc-finger* e RING presentes na porção C-terminal de Cwc24p são essenciais para sua função. Em ensaios de complementação da cepa $\Delta cwc24$ a expressão de uma proteína truncada contendo estes dois domínios resgatou parcialmente o crescimento da cepa na condição restritiva, enquanto a mutação pontual de uma das cisteínas do domínio *zinc-finger* impediu a complementação. Os

zinc-fingers são geralmente associados a ligação de DNA, porém diversas evidências mostram que estes domínios também ligam RNA e proteínas (Gamsjaeger et al., 2006). A presença destes domínios na proteína Cwc24p, levantou a hipótese de que a mesma poderia atuar através de ligação a DNA, influenciando a formação do RNA ribossomal no nível da transcrição ou de maneira co-transcricional. Vários fatores influenciam o processamento co-transcricional de RNA, dentre eles Nop1p, que se associa aos genes que codificam snoRNAs de box C/D durante a transcrição (Morlando et al., 2004), as t-UTPs, que se associam co-transcricionalmente ao pré-rRNA 35S (Gallagher, et al., 2004) e o complexo CURI, que se associa aos genes de proteínas ribossomais (Rudra et al., 2007).

Com base nos resultados de *pulse-chase labeling*, uma primeira hipótese para a função de Cwc24p seria a sua ligação ao promotor do rDNA, onde poderia modular a transcrição do pré-rRNA 35S, ou à região do rDNA correspondente ao 5'ETS, onde poderia atuar no processamento do rRNA de maneira co-transcricional. Como Cwc24p afeta principalmente as etapas iniciais de clivagem do pré-35S, que é dirigida pelo snoRNP U3, ela poderia ligar-se também aos promotores dos genes snR17A e snR17B, que codificam o snoRNA U3. Ensaio de ChIP não mostraram ligação *in vivo* de Cwc24p a quaisquer destas regiões. Os ensaios de *band-shift* mostraram que Cwc24p é capaz de ligar fragmentos de DNA *in vitro*, porém de maneira inespecífica e com baixa afinidade. Também não foi observada ligação de Cwc24p a RNA. Estes resultados indicam que os domínios conservados de Cwc24p devem atuar na ligação a proteínas. De fato, diversas evidências mostraram que *zinc-fingers* podem atuar na ligação a proteínas ou podem ligar simultaneamente DNA e proteína através de superfícies diferentes de interação (Gamsjaeger et al., 2006). Além disso, diversos estudos de proteínas que contêm o RING, mostraram que este domínio não é responsável por ligação a DNA, mas está envolvido em ligação a proteínas, estando presente em diferentes enzimas com atividade de ubiquitina ligases (Freemont, 2000; Gamsjaeger et al., 2006). É interessante notar que Cef1p possui um *zinc-finger* e Prp19p contém um domínio similar ao RING, ambos envolvidos em ligação proteína-proteína (Tsai et al., 1999; Ohi et al., 2005). Uma possibilidade é a de que Cwc24p interaja através destes domínios conservados com Cef1p, porém esta hipótese ainda necessita confirmação experimental.

Os snoRNPs guiam metilações e pseudouridilações do pré-rRNA 35S, entretanto U3, U14, snR10 e snR30 participam nas clivagens iniciais deste

precursor e, interessante, são os únicos snoRNAs essenciais para a viabilidade celular de levedura (Venema e Tollervey, 1999; Nazar, 2004). Dentre estes, os snoRNPs U3 e U14 pertencem à classe de box C/D e, portanto, associam-se a Nop17p. A interação de Cwc24p com um complexo contendo Cef1p já tinha sido observada (Ohi et al., 2002) e neste trabalho essa interação foi confirmada. A interação com Cef1p, a localização nuclear e o pequeno efeito no processamento de rRNA, indicavam que Cwc24p pudesse estar envolvida no processo de splicing, indiretamente influenciando o processamento de RNA ribossomal. Os resultados de análise global de splicing por *microarray* confirmaram esta hipótese, indicando que Cwc24p afeta splicing do snoRNA de box C/D U3.

Alguns snoRNPs são transcritos a partir de unidades com promotor e terminador próprios, enquanto outros são codificados no interior de introns de mRNAs que codificam proteínas envolvidas na biogênese de ribossomos (Weinstein e Steitz, 1999; Filipowicz e Pogacic, 2002). O snoRNA U3, cujo pareamento com a extremidade 5' do pré-rRNA é essencial para as clivagens nos sítios A₀, A₁ e A₂, é codificado por dois genes, snR17A e snR17B, ambos contendo introns. A depleção de Cwc24p causa um acúmulo dos pré-snoRNAs U3A e U3B. É curioso notar que, embora haja um acúmulo dos precursores, o nível de U3 maduro não é drasticamente afetado. Efeitos similares no splicing do snoRNA U3 foram observados em mutantes das proteínas do core de box C/D Nop1p, Nop56p e Snu13p (Gautier et al., 1997; Stevens et al., 2001; Tollervey et al., 1991; Tollervey et al., 1993). O acúmulo do pré-snoRNA U3 sem diminuição drástica do snoRNA maduro levou à conclusão de que Cwc24p é um fator de eficiência do splicing do pré-snoRNA U3, influenciando indiretamente o processamento do RNA ribossomal. É importante ressaltar, entretanto, que embora os pré-snoRNAs U3 tenham sido os RNAs mais afetados pela depleção de Cwc24p, também foi observado no ensaio de *microarray* o acúmulo dos pré-mRNAs IMD4 e TEF4, cujos introns contêm as seqüências dos snoRNAs de box C/D snR54 e snR38, respectivamente. O snR54 participa da metilação do rRNA 18S, enquanto snR54 guia metilação no rRNA 25S. Portanto, apesar do efeito de Cwc24p ser mais drástico na biogênese do snoRNA U3, não se pode descartar a hipótese de que esta proteína tenha uma atuação mais geral, influenciando splicing de snoRNAs de box C/D.

O snoRNP U3, formado pela associação do snoRNA U3 a 34 proteínas, liga-se à extremidade 5' do pré-rRNA 35S formando o SSU processomo (Dragon et al.,

2002). Embora a biogênese deste snoRNP tenha sido bem caracterizada, ainda não se sabe se a ligação co-transcricional das proteínas ao snoRNA U3 pode influenciar seu splicing. O snoRNA U3 é transcrito pela RNA polimerase II, porém a maturação da extremidade 3' não ocorre através de clivagem e poliadenilação. Ao invés disto, foi proposta uma via de maturação que é iniciada através de clivagem pela endonuclease Rnt1p, que reconhece um *stem-loop* conservado na extremidade 3' do transcrito primário do pré-snoRNA U3 (Kufel et al., 2000). Em seguida ocorre clivagem exonucleolítica 3' → 5' pelo exossomo, possivelmente acompanhado do complexo Rex (Kufel et al., 2000). O exossomo tem atividade processiva e a ligação da proteína Lhp1p a uma região poli(U) impede que a clivagem prossiga. Um dos modelos de processamento do snoRNA U3 propõe que, após o splicing, as proteínas do box C/D Nop1p e Nop58p liguem-se ao pré-snoRNA, deslocando Lhp1p, o que permite que o exossomo gere a extremidade madura do snoRNA U3 (Kufel et al., 2000). Este modelo propõe, portanto, que o splicing do snoRNA U3 ocorra antes da associação das proteínas Nop1p e Nop58p, que levariam à formação da extremidade madura. Entretanto, dados posteriores mostraram que é possível detectar um precursor do snoRNA U3 que ainda contém o intron, mas tem a extremidade 3' madura (Kufel et al., 2003), portanto não se pode afirmar que o splicing ocorra antes da ligação das proteínas do *core* de box C/D. O nosso modelo considera a possibilidade de que o splicing do snoRNA U3 ocorra co-transcionalmente e de maneira simultânea à ligação das proteínas do *core* de box C/D ao snoRNA U3.

Diversas evidências fornecem suporte ao modelo aqui proposto, no qual a maturação dos snoRNAs ocorre simultaneamente à ligação das proteínas do *core*, durante a montagem dos snoRNPs maduros. Foi mostrado que a depleção da proteína Snu13p leva a um acúmulo do pré-snoRNA U3 (Stevens et al., 2001). A proteína Nop1p associa-se aos genes de snoRNAs de box C/D ainda durante a transcrição, indicando que já estaria ligada ao snoRNA U3 quando ocorre o splicing (Morlando et al., 2004; Mougin et al., 1996). O snoRNA U18 é codificado em um intron e sua maturação envolve a ligação de Nop1p ao mRNA, recrutando a endonuclease Rnt1p que forma a extremidade 5' deste snoRNA (Giorgi et al., 2001). Além disso, a associação das proteínas do *core* ocorre simultaneamente à maturação da extremidade 5' de snoRNAs codificados independentemente, ou seja, daqueles não codificados em introns (Pretti et al., 2006).

O modelo proposto aqui considera que Cwc24p interage com Cef1p e Nop17p durante a transcrição do pré-snoRNA U3, conectando as vias de processamento de rRNA e splicing. De acordo com este modelo, as proteínas do core de box C/D ligam-se co-transcritucionalmente ao pré-snoRNA U3, inclusive Nop58p, que interage com Nop17p. Nop17p, por sua vez, recruta Cwc24p. Através de sua interação com Cef1p, Cwc24p pode aumentar a eficiência de splicing dos pré-snoRNAs U3 (Figura 29). Cef1p é uma proteína que pertence ao complexo NTC, que estabiliza a ligação dos snRNPs U5 e U6 durante a ativação do spliceossomo e desestabiliza a ligação das proteínas Lsm2-8p com U6, permitindo que o mesmo faça contato com uma região no interior do intron (Chen et al., 2006). Através de sua ligação com Cef1p, e conseqüentemente com o complexo NTC, Cwc24p aumentaria a eficiência de splicing do pré-snoRNA U3. Na ausência de Cwc24p há um acúmulo do pré-snoRNA U3, o que conseqüentemente leva a uma diminuição da eficiência das clivagens iniciais do pré-rRNA 35S.

Curiosamente, embora a maioria dos introns de *S. cerevisiae* possuam as seqüências canônicas nos sítios de splicing 5' e 3' e no sítio de ramificação extremamente conservadas, o pré-snoRNA U3 é uma exceção. Análise da seqüência e da estrutura secundária deste pré-RNA mostraram que a região que contém o sítio de splicing 5' está envolvida em pareamento de bases e que a seqüência do sítio de ramificação apresenta desvio em relação ao consenso (Mougin et al., 1996). Estas observações podem explicar a necessidade de um fator de eficiência de splicing para este snoRNA.

Outras evidências vêm sendo acumuladas indicando que possam existir fatores que agem especificamente no splicing de certas classes de pré-RNAs. Inicialmente, imaginava-se que o splicing em levedura era pouco controlado, ou seja, o splicing de todos os mRNAs aconteceria com a mesma eficiência. Isto se deve à conservação das seqüências canônicas de splicing em *S. cerevisiae*, e ao fato de não terem sido encontradas proteínas com funções homólogas às proteínas SR de humanos, que se ligam a seqüências de RNA denominadas *splicing enhancers* e aumentam a eficiência do splicing de mRNAs com sítios de splicing pouco conservados (Graveley, 2000; Blencowe, 2000; Hastings e Kreiner, 2001; Lim e Burge, 2001; Shen e Green, 2006). Entretanto, foi observado recentemente que mutações de componentes do core do spliceossomo não afetam toda a população de mRNAs de maneira semelhante, indicando uma especificidade do spliceossomo

Figura 29. Modelo da função de Cwc24p. Cwc24p pode ser direcionada para o pré-snoRNA U3 através de sua interação com Nop17p, que é um fator de montagem dos snoRNPs de box C/D e deve se ligar co-transcricionalmente ao snoRNA, na medida em que as proteínas do core Snu13p, Nop1p, Nop58p e Nop56p são recrutadas. Através da interação com Cef1p, Cwc24p pode direcionar a maquinaria de splicing para o pré-snoRNA U3, estabilizando a ligação e aumentando a eficiência de splicing deste pré-snoRNA.

em relação aos seus substratos (Pleiss et al., 2007). Desta maneira, é possível que comecem a ser identificados fatores de eficiência de splicing em levedura, que não possuem homologia com as proteínas SR de mamíferos, mas que atuariam no splicing de pré-RNAs específicos, como está sendo proposto para a proteína Cwc24p.

Sabe-se que os genes que codificam as proteínas ribossomais correspondem a cerca de 50% dos genes de *S. cerevisiae* que contêm introns (Ares et al., 1999), e devido ao seu alto nível de expressão, são responsáveis por 90% da população de mRNAs transcritos que sofrem splicing (Warner et al., 1999). Cerca de 70% dos genes que codificam proteínas ribossomais possuem introns e uma das hipóteses mais prováveis é a de que esta seja uma estratégia de regulação, que permite coordenar a produção das proteínas ribossomais com a maturação dos rRNA ribossomais. Além disso, a presença de snoRNAs em introns de outros genes e a presença de introns no snoRNA U3 também indicam uma possível estratégia de regulação. Estes fatos, por si só, mostram uma íntima relação entre o processamento de rRNA e splicing. Entretanto, novas evidências surgiram acerca da conexão entre processamento de rRNA e splicing e também sobre a coordenação da transcrição dos genes que codificam proteínas ribossomais (RNA polimerase II) e do rDNA (RNA polimerase I). A proteína Prp43p é uma helicase de box DEXD/H, que atua após a reação de splicing, removendo U2, U5 e U6 do complexo contendo o intron em forma de laço, promovendo a reciclagem dos snRNPs e a degradação do intron removido (Arenas et al., 1997; Martin et al., 2002). Entretanto, Prp43p foi recentemente identificada também no nucléolo e a análise de mutantes *prp43* mostrou acúmulo do pré-rRNA 35S, acompanhado de degradação dos precursores 20S e 27S (Combs et al., 2006). Prp43p, portanto, atuaria tanto em splicing como no processamento de rRNA. Prp43p também foi isolada em um complexo contendo Cwc23p, que assim como Cwc24p, faz parte do complexo de splicing NTC (Gavin et al., 2002). Hmo1p, é uma proteína da família HMG (*high mobility group*) que se liga a regiões específicas dos promotores dos genes que codificam proteínas ribossomais e também está presente por toda a região do rDNA, desta maneira coordenando a transcrição dos genes das r-proteínas (RNA polimerase II) e do rRNA (RNA polimerase I; Gadad et al., 2002; Hall et al., 2006). O complexo CUR1, está envolvido na regulação da transcrição dos genes que codificam as proteínas ribossomais,

porém também afeta os primeiros passos do processamento de rRNA, guiados pelo snoRNP U3 (Rudra et al., 2007).

Através de alinhamento de sequência contra os bancos de dados, não foi possível encontrar proteínas de outros organismos que apresentassem alto grau de similaridade com Cwc24p. Entretanto, foram identificadas proteínas de *S. pombe*, *C. albicans*, *C. elegans*, *B. taurus* e *H. sapiens* que também possuem em sua porção C-terminal domínios *zinc-finger* e RING justapostos, o que poderia indicar uma conservação de função para este tipo de arranjo. O alinhamento de Cwc24p com a proteína de humanos ZNF113A mostrou 18% de similaridade e 26% de identidade. Ensaio com a cepa $\Delta cwc24$ mostraram que a proteína de humanos não é capaz de complementar a mutação, porém a expressão de uma porção truncada, contendo os domínios conservados, é capaz de resgatar parcialmente o crescimento da cepa mutante em condição restritiva. Estes dados indicam que, realmente, a função destes domínios deve ser conservada em outros organismos, porém divergências no restante da sequência de aminoácidos impedem que a proteína de humanos seja funcional em levedura.

A biogênese dos ribossomos é um processo complexo e altamente organizado, que responde por uma grande porcentagem dos recursos energéticos da célula e, portanto, necessita ser precisamente regulado. Esta regulação é conseguida através da coordenação entre diferentes processos celulares: transcrição das proteínas ribossomais pela RNA polimerase II e transcrição dos rRNAs pelas RNA polimerase I e III; splicing dos mRNAs das proteínas ribossomais e de alguns snoRNAs; processamento do RNA ribossomal e concomitante associação das proteínas ribossomais e exportação das subunidades ribossomais para o citoplasma. Os dados apresentados aqui demonstram a caracterização de uma das etapas de coordenação entre splicing e processamento de rRNA.

6. CONCLUSÃO

Cwc24p é uma proteína nuclear, essencial para a viabilidade celular em *S. cerevisiae* e que apresenta domínios conservados na porção C-terminal, provavelmente envolvidos na interação com proteínas, muito provavelmente com Cef1p. Cwc24p interage diretamente com Nop17p, envolvida em processamento de rRNA e com Cef1p, envolvida em splicing. Através destas interações, atua como um fator de eficiência do splicing dos snoRNAs de box C/D, em especial do snoRNA U3, que é essencial para que as clivagens iniciais do pré-rRNA ocorram, influenciando de maneira indireta a biogênese dos ribossomos.

7. REFERÊNCIAS

1. Allmang, C.; Kufel, J.; Chanfreau, G.; Mitchell, P.; Petfalski, E. e Tollervey, D. (1999b) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18: 5399-5410.
2. Allmang, C.; Mitchell, P.; Petfalski, E. e Tollervey, D. (2000) Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic. Acids Res.* 28: 1684-1691.
3. Allmang, C.; Petfalski, E.; Podtelejnikov, A.; Mann, M.; Tollervey, D. e Mitchell, P. (1999a) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'-5' exonucleases. *Genes Dev.* 13: 2148-2158.
4. Arenas, J.E. e Abelson, J.N. (1997) Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 11798-11802.
5. Ares, M.Jr.; Grate, L. e Pauling, M.H. (1999) A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA* 5: 1138-1139.
6. Atzorn, V.; Fragapane, P. e Kiss, T. (2004) U17/snoR30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production. *Mol. Cell. Biol.* 24: 1769-1778.
7. Bachellerie, J.P. e Cavaille, J. (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci.* 22: 257-261.
8. Bachellerie, J.P.; Cavaille, J. e Huttenhofer, A. (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie.* 84: 775-790.
9. Balakin, A.G.; Smith, L. e Fournier, M.J. (1996) The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86: 823-834.
10. Bartel, P.L. e Fields, S. (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* 254: 241-263.
11. Baserga, S.J.; Yang, X.D. e Steitz, J.A. (1991) An intact Box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *EMBO J.* 10: 2645-2651.
12. Baßler, J.; Grandi, P.; Gadai, O.; Leßmann, T.; Petfalski, E.; Tollervey, D. Lechenr, J. e Hurt, E. (2001) Identification of a 60S pre-ribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol. Cell* 8: 517-529.

13. Beltrame, M. e Tollervey, D. (1995) Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J.* 14: 4350-4356.
14. Bernstein, K.A.; Gallagher, J.E.; Mitchell, B.M.; Granneman, S. e Baserga, S.J. (2004) The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot. Cell* 3: 1619-1626.
15. Blencowe, B.J. (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* 25: 106-110.
16. Borden, K.L. e Freemont, P.S. (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 395-401.
17. Caffarelli, E.; Fática, A.; Prislei, S.; De Gregório, E.; Frapapane, P. e Bozzoni, I. (1996) Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved C and D boxes control both the processing reaction and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J.* 15: 1121-1131.
18. Cavaille, J.; Nicoloso, M. e Bachellerie, J.P. (1996) Targeted ribose methylation of RNA *in vivo* directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 383: 732-735.
19. Cech, T.R. (2000) The ribosome is a ribozyme. *Science*. 289: 878-879.
20. Chamberlain, J.R.; Lee, Y.; Lane, W.S. e Engelke, D.R. (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* 12: 1678-1690.
21. Chan, S.P. e Cheng, S.C. (2005) The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J. Biol. Chem.* 280: 31190-31199.
22. Chan, S.P.; Kao, D.I.; Tsai, W.Y. e Cheng, S.C. (2003) The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* 302: 279-282.
23. Chanfreau, G.; Legrain, P. e Jacquier, A. (1998) Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* 284: 975-988.
24. Chen, C.H.; Kao, D.I.; Chan, S.P.; Kao, T.C.; Lin, J.Y. e Cheng S.C. (2006) Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling. *RNA* 12: 765-774.
25. Choesmel, V.; Bacqueville, D.; Rouquette, J.; Noaillac-Depeyre, J.; Fribourg, S.; Crétien, A.; Leblanc, T.; Tchernia, G.; Da Costa, L. e Gleizes, P.E. (2007)

- Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 109: 1275-1283.
26. Chu, S.; Archer, R.H.; Zengel, J.M. e Lindahl, L. (1994) The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 659-663.
 27. Clark, T.A.; Sugnet, C.W. e Ares, M.Jr. (2002) Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. *Science* 296: 907-910.
 28. Cléry, A.; Senty-Ségault, V.; Leclerc, F.; Raué, H.A. e Branlant, C. (2007) Analysis of sequence and structural features that identify the B/C motif of U3 small nucleolar RNA as the recognition site for the Snu13p-Rrp9p protein pair. *Mol. Cell. Biol.* 27: 1191-1206.
 29. Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C. e Deléage G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25:147-150.
 30. Combs, D.J.; Nagel, R.J.; Ares, M.Jr. e Stevens, S.W. (2006) Prp43p is a DEAH-box spliceosome disassembly factor essential for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26: 523-534.
 31. Decatur, W.A. e Fournier, M.J. (2003) RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J. Biol. Chem.* 278: 695-698.
 32. Decker, C.J. (1998) The exosome: a versatile RNA processing machine. *Curr. Biol.* 8: 238-240.
 33. Dez, C.; Noaillac-Depeyre, J.; Caizergues-Ferrer, M. e Henry, Y. (2002) Naf1p, an essential nucleoplasmic factor specifically required for accumulation of box H/ACA small nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7053-7065.
 34. Dez, C.; Houseley, J. e Tollervey, D. (2006) Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 25: 1534-1546.
 35. Dobbyn, H.C. e O'Keefe, R.T. (2004) Analysis of Snu13p mutations reveals differential interactions with the U4 snRNA and U3 snoRNA. *RNA* 10: 308-320.
 36. Dohmen, R.J. e Varshavsky, A. (1994) Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* 263: 1273-1276.
 37. Dragon, F.; Gallagher, J.E.G.; Compagnone-Post, P.A.; Mitchell, B.M.; Porwancher, K.A.; Wehner, K.A. et al. (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417: 967-970.

38. Dziembowski, A.; Lorentzen, E.; Conti, E. e Seraphin, B. (2007) RNA channelling by the archaeal exosome *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 15-22.
39. Fatica, A. e Tollervey, D. (2002a) Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 313-318.
40. Fatica, A.; Cronshaw, A.D.; Dlakic, M. e Tollervey, D. (2002b) Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol. Cell.* 9: 341-351.
41. Fatica, A.; Morlando, M. e Bozzoni, I. (2000) Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3'-processing apparatus. *EMBO J* 19: 6218-6229.
42. Filipowicz, W. e Pogacic, V. (2002) Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 319-327.
43. Freemont, P.S. (2000) RING for destruction? *Curr. Biol.* 10:R84-87.
44. Fromont-Racine, M.; Senger, B.; Saveanu, C e Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313:17-42.
45. Gadai, O.; Labarre, S.; Boschiero, C. e Thuriaux, P. (2002) Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* 21: 5498-5507.
46. Gadai, O.; Strauss, D.; Kessl, J.; Trumpower, B.; Tollervey, D. e Hurt, E. (2001) Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3405-3415.
47. Gallagher, J.E.; Dunbar, D.A.; Grannemann, S.; Mitchell, B.M.; Osheim, Y.; Beyer, A.L. e Baserga, S.J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev.* 18: 2506-2517.
48. Gamsjaeger, R.; Liew, C.K.; Loughlin, F.E.; Crossley, M. e Mackay, J.P. (2006) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *TIBS* 32: 63-70.
49. Ganot, P.; Bortolin, M.L. e Kiss, T. (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89: 799-809.
50. Gautier, T.; Bergès, T.; Tollervey, D. e Hurt, E. (1997) Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17: 7088-7098.

51. Gavin, A.C.; Boeshe, M.; Krause, R.; Grandi, P.; Marzioch, M.; Bauer, A. e Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141-147.
52. Giaever, G.; Chu, A.M.; Ni, L.; Connelly, C.; Riles, L.; Véronneau, S. et al. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.
53. Gietz, R.D. e Sugino, A. (1998) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74: 527-534.
54. Giorgi, C.; Fatica, A.; Nagel, R. e Bozzoni, I. (2001) Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with the Rnt1p endonuclease. *EMBO J.* 20: 6856-6865.
55. Gleizes, P.E.; Noaillac-Depeyre, J.; Léger-Silvestre, I.; Teulières, F.; Dauxois, J.Y.; Pommet, D.; Azum-Gelade, M.C. e Gas, N. (2001) Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J. Cell. Biol.* 155: 923-936.
56. Gonzales, F.A.; Zanchin, N.I.T.; Luz, J.S. e Oliveira, C.C. (2005) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* 346: 437-455.
57. Granato, D.C.; Machado-Santelli, G.M. e Oliveira, C.C. (2008) Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS J.* 275: 4164–4178.
58. Grandi, P.; Rybin, V.; Baßler, J.; Petfalski, E.; Strauß, D.; Marzioch, M.; Schäfer, T.; Kuster, B.; Tschochner, H.; Tollervey, D.; Gavin, A.C. e Hurt, E. (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell* 10: 105-115.
59. Granneman, S. e Baserga, S.J. (2004) Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp. Cell. Res.* 296: 43-50.
60. Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. 6: 1197-1211.

61. Hall, D.B.; Wade, J.T. e Struhl, K. (2006) An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3672-3679.
62. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
63. Harnpicharnchai, P.; Jakovljevic, J.; Horsey, E.; Miles, T.; Roman, J.; Rout, M.; Meagher, D.; Imai, B.; Guo, Y.; Brame, C.J.; Shabanowitz, J; Hunt, D.F. e Woolford, J.L. Jr. (2001) Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol. Cell.* 8: 505-515.
64. Hastings, M.L. e Krainer, A.R. (2001) Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 302-309
65. Henras, A.; Henry, Y.; Bousquet-Antonelli, C.; Noaillac-Depeyre, J.; Gélugne, J.P. e Caizergues-Ferrer, M. (1998) Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* 17: 7078-7090.
66. Henry, Y.; Wood, H.; Morrissey, J.P.; Petfalski, E.; Kearsey, S. e Tollervey, D. (1994) The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* 13: 2452-2463.
67. Hesling, C.; Oliveira, C.C.; Castilho, B.A. e Zanchin, N.I. (2007) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome associated protein interacts with HsNip7 and its down-regulation affects gene expression at the transcriptional and translational levels. *Exp. Cell. Res.* 313: 4180-4195.
68. Ho, J.H.; Kallstrom, G. e Johnson, A.W. (2000) Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell. Biol.* 151: 1057-1066.
69. Holstege, F.C.; Jennings, E.G.; Wyrick, J.J.; Lee, T.I.; Hengartner, C.J.; Green, M.R.; Golub, T.R.; Lander, E.S. e Young, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95: 717-728.
70. Huang, G.M.; Jarmolowski, A.; Struck, J.C. e Fournier, M.J. (1992) Accumulation of U14 small nuclear RNA in *Saccharomyces cerevisiae* requires box C, box D, and a 5', 3' terminal stem. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4456-4463.
71. Hughes, J.M. e Ares, M.Jr. (1991) Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J.* 10: 4231-4239.

72. Hughes, J.M.; Konings, D.A. e Cesareni, G. (1987) The yeast homologue of U3 snRNA. *EMBO J.* 6: 2145-2155.
73. James, P.; Halladay, J. e Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436.
74. Johnson, A.W. (1997) Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6122-6130.
75. Jurica, M.S. e Moore, M.J. (2003) Pre-mRNA splicing: Awash in a sea of proteins. *Mol. Cell.* 12: 5-14.
76. King, T.H.; Liu, B.; McCully, R.R. e Fournier, M.J. (2003) Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol. Cell.* 11: 425-435.
77. Kirwan, M. e Dokal, I. (2008) Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. *Clin. Genet.* 73: 103-112.
78. Kiss T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109:145-148.
79. Kiss, T. (2001) Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* 20: 3617-3622.
80. Kiss-Laszlo, Z.; Henry, Y. e Kiss, T. (1998) Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J.* 17: 797-807.
81. Kiss-Laszlo, Z.; Henry, Y.; Bachellerie, J.P.; Caizergues-Ferrer, M.; e Kiss, T. (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85: 1077-1088.
82. Kressler, D.; Linder, P. e de La Cruz, J. (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7897-7912.
83. Kufel, J.; Allmang, C.; Chanfreau, G.; Petfalski, E.; Lafontaine, D.L.J. e Tollervey, D. (2000) Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5415-5424.

84. Kufel, J.; Allmang, C.; Verdone, L.; Beggs, J. e Tollervey, D. (2003) A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. *Nucleic Acids Res.*, 31, 6788-6797.
85. Kufel, J.; Dichtl, B. e Tollervey, D. (1999) Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA*. 5: 909-917.
86. LaCava, J.; Houseley, J.; Saveanu, C.; Petfalski, E.; Thompson, E.; Jacquier, A. e Tollervey, D. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*. 121: 713-724.
87. Lafontaine, D.L. e Tollervey, D. (1999) Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* 5: 455-567.
88. Lafontaine, D.L. e Tollervey, D. (2000) Synthesis and assembly of the box C/D small nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2650-2659.
89. Lafontaine, D.L.; Preiss, T. e Tollervey, D. (1998) Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol. Cell. Biol.* 18: 2360-2370.
90. Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
91. Li, H.V., Zagorski, J. e Fournier, M.J. (1990) Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18 S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1145-1152.
92. Lim, L.P. e Burge, C.B. (2001) A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 11193-11198.
93. Lohr, D.; Venkov, P. e Zlatanova, J. (1995) Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* 9: 777-787
94. Lovering, R.; Hanson, I.M.; Borden, K.L.; Martin, S.N.; O'Reilly, J.; Evan, G.I.; et al. (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2112-2116.
95. Luz, J.S.; Tavares, J.R., Gonzales, F.A.; Santos, M.C. e Oliveira, C.C. (2007) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie* 89: 686-691.

96. Lygerou, Z.; Allmang, C.; Tollervey, D. e Seraphin, B. (1996) Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP *in vitro*. *Science* 272: 268-270.
97. Madhani H.D. e Guthrie, C. (1994) Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annu Rev Genet* 28: 1-26.
98. Martin, A.; Schneider, S. e Schwer, B. (2002) Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.* 277: 17743-17750.
99. Maxwell, E.S. e Fournier, M.J. (1995) The small nucleolar RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 35: 897-934.
100. Miller, O.L.Jr. e Beatty, B.R. (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science* 23: 955-957.
101. Mitchell, P.; Petfalski, E.; Shevchenko, A.; Mann, M. e Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91: 457-466.
102. Morlando, M.; Ballarino, M.; Greco, P.; Caffarelli, E.; Dichtl, B. e Bozzoni, I. (2004) Coupling between snoRNP assembly and 3' processing controls box C/D snoRNA biosynthesis in yeast. *EMBO J.* 23: 2392-2401.
103. Morrissey, J.P. e Tollervey, D. (1997) U14 small nucleolar RNA makes multiple contacts with the pre-ribosomal RNA. *Chromosoma* 105: 515-522.
104. Mougey, E.B.; O'Reilly, M.; Osheim, Y.; Miller, O.L.Jr; Beyer, A. e Sollner-Webb, B. (1993) The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev.* 7: 1609-1619.
105. Mougin, A., Grégoire, A., Banroques, J., Ségault, V., Fournier, R., Brulé, F., Chevrier-Miller, M. e Branlant, C. (1996) Secondary structure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* pre-U3A snoRNA and its implication for splicing efficiency. *RNA* 2: 1079-1093.
106. Nazar, R.N. (2004) Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *Life* 56: 457-465.
107. Ni, J.; Tien, A.L.; e Fournier, M.J. (1997) Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* 89: 565-573.

108. Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. e Hegemann, J.H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12: 773-786.
109. Nissan, T. A.; Baßler, J.; Petfalski, E.; Tollervey, D. e Hurt, E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* 21: 5539-5547.
110. Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P.B. e Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930.
111. Ofengand, J. (2002) Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* 514: 17-25.
112. Ohi, M.D. e Gould, K.L. (2002) Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA* 8: 798-815.
113. Ohi, M.D., Link, A.J., Ren, L., Jennings, J.L., McDonald, W.H. e Gould, K.L. (2002) Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2011-2024.
114. Ohi, M.D.; Kooi, C.W.V.; Rosenberg, J.A.; Ren, L.; Hirsch, J.P.; Chazin, W.J.; Walz, T. e Gould, K. (2005) Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Mol. Cell. Biol.* 25: 451-460.
115. Oliveira, C.C.; Gonzales, F.A. e Zanchin, N.I.T. (2002) Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit Rrp43p show a deficiency in mRNA degradation and no longer interact with the exosome. *Nucleic Acids Res.* 30: 4186-4198.
116. Osheim, Y.N.; French, S.L.; Keck, K.M.; Champion, E.A.; Spasov, K.; Dragon, F.; Baserga, S.J. e Beyer, A.L. (2004) Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.* 16: 943-954.
117. Pérez-Fernández, J.; Román, A.; De Las Rivas, J.; Bustelo, X.R. e Dosil M. (2007) The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 27: 5414-5429.
118. Piper, P.W.; Bellatin, J.A. e Lockheart, A. (1983) Altered maturation of sequences at the 3' terminus of 5S gene transcripts in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant that lacks a RNA processing endonuclease. *EMBO J.* 2: 353-359.

119. Piper, P.W.; Patel, N. e Lockheart A. (1984) Processing of the 3' sequence extensions upon the 5S rRNA of a mutant yeast in *Xenopus laevis* germinal vesicle extract. *Eur. J. Biochem.* 141: 115-118.
120. Planta, R.J. (1997) Regulation of ribosome synthesis in yeast. *Yeast* 13: 1505-1518
121. Pleiss, J.A.; Whitworth, G.B.; Bergkessel, M. e Guthrie, C. (2007) Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS Biol.* 5: e90.
122. Preti, M., Guffanti, E., Valinuto, E. e Dieci, G. (2006) Assembly into snoRNP controls 5'-end maturation of a box C/D snoRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 351: 468-473.
123. Ramirez, M.; Wek, R.C. e Hinnebusch, A.G. (1991) Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3027-3036.
124. Reichow S.L.; Hamma, T.; Ferré-D'Amaré, A.R. e Varani, G. (2007) The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 35:1452-64.
125. Rudra, D.; Mallick, J.; Zhao, Y. e Warner, J.R. (2007) Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 27: 4815-4824.
126. Salinas, K.; Wierzbicki, S.; Zhou, L. e Schmitt, M.E. (2005) Characterization and purification of *Saccharomyces cerevisiae* RNase MRP reveals a new unique protein component. *J. Biol. Chem.* 280: 11352-11360.
127. Sambrook, J.; Maniatis, T. e Fritsch, E.F. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
128. Saveanu, C.; Bienvenu, D.; Namane, A.; Gleizes, P.E.; Gas, N.; Jacquier, A. e Fromont-Racine M. (2001) Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J.* 20: 6475-6484.
129. Schäfer, T.; Strauss, D.; Petfalski, E.; Tollervey, D. e Hurt, E. (2003) The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* 22: 1370-1380.

130. Schimmang, T.; Tollervey, D.; Kern, H.; Frank R. e Hurt, E.C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J.* 8: 4015-4024.
131. Schmitt, M. E. e Clayton, D. A. (1993) Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7935-7941.
132. Sharma, K. e Tollervey, D. (1999) Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6012-6019.
133. Shen, H. e Green, M.R. (2006) RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans. *Genes Dev.* 20: 1755-1765.
134. Sherman, F.; Fink, G.R. e Hicks, J.B. (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
135. Smith, C.M. e Steitz, J.A. (1997) Sno Storm in the nucleolus: New Roles for Myriad Small RNPs. *Cell* 89: 669-672.
136. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D. et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
137. Spingola, M.; Grate, L.; Haussler, D. e Ares, M. Jr. (1999) Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 5: 221-234.
138. Staley, J.P. e Guthrie, C. (1998) Mechanical devices of the spliceosome: Motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92: 315-326.
139. Stevens, A.; Hsu, C.L.; Isham, K.R. e Larimer, F.W. (1991) Fragments of the internal transcribed spacer 1 of pre-rRNA accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* lacking 5'----3' exoribonuclease 1. *J. Bacteriol.* 173: 7024-7028.
140. Stevens, S.W.; Barta, I.; Ge, H.Y.; Moore, R.E.; Young, M.K.; Lee, T.D. e Abelson, J. (2001) Biochemical and genetic analyses of the U5, U6, and U4/U6-U5 small nuclear ribonucleoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 7: 1543-1553.
141. Terns, M.P. e Terns, R.M. (2002) Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene Expr.* 10:17-39.

142. Thompson, J.D.; Higgins, D.G. e Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
143. Tollervey D. (1987) A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* 6: 4169-4175.
144. Tollervey, D. e Kiss, T. (1997) Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 337-342.
145. Tollervey, D.; Lehtonen, H.; Carmo-Fonseca, M. e Hurt, E.C. (1991) The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* 10: 573-583.
146. Tollervey, D.; Lehtonen, H.; Jansen, R.; Kern, H. e Hurt, E.C. (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72: 443-457.
147. Trapman, J.; Retèl, J. e Planta, R.J. (1975) Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp. Cell. Res.* 90: 95-104.
148. Tsai, W.Y.; Chow, Y.T.; Chen, H.R.; Huang, K.T.; Hong, R.I.; Jan, S.P.; Kuo, N.Y.; Tsao, T.Y.; Chen, C.H. e Cheng, S.C. (1999) Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 274: 9455-9462.
149. Udem, S.A. e Warner, J.R. (1973) The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J. Biol. Chem.* 248: 1412-1416.
150. Valadkhan, S. (2005) snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 603–608.
151. Van Crielinge, W. e Beyaert, R. (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol. Proced. Online* 2:1-38.
152. Van Hoof, A.; Lennertz, P. e Parker, R. (2000a) Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* 15: 135713-65.
153. Van Hoof, A.; Staples, R.R.; Baker, R.E. e Parker, R. (2000b) Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8230-8243.

154. Vanacova, S.; Wolf, J.; Martin, G.; Blank, D.; Dettwiller, S.; Friedlein, A.; Langen, H.; Keith, G. e Keller, W. (2005) A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol.* 3: e189.
155. Vanrobays, E.; Gelugne, J.P.; Gleizes, P.E. e Caizergues-Ferrer, M. (2003) Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23: 2083-2095.
156. Venema, J. e Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33: 261-311.
157. Verheggen, C.; Mouaikel, J.; Thiry, M.; Blanchard, J.M.; Tollervey, D.; Bordonne, R.; Lafontaine, D.L. e Bertrand, E. (2001) Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J.* 20: 5480-5490.
158. Vojtek, A.B. e Hollenberg, S.M. (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* 225: 331-342.
159. Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24: 437-440.
160. Warner, J.R. (2001) Nascent ribosomes. *Cell* 107: 133-136
161. Watkins, N.J., Dickmanns, A. e Lührmann, R. (2002) Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required along with the 15.5K protein for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol. Cell Biol.* 22: 8342-8352.
162. Watkins, N.J.; Dickmanns, A. e Lührmann, R. (2002) Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol Cell Biol.* 22: 8342-8352.
163. Weinstein, L.B. e Steitz, J.A. (1999) Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 378-384.
164. Wu, P.; Brockenbrough, S.; Metcalfe, A.C.; Chen, S. e Aris, J.P. (1998) Nop5p is a small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *J. Biol. Chem.* 273: 16453–16463.
165. Wyers, F.; Rougemaille, M.; Badis, G.; Rousselle, J.C.; Dufour, M.E.; Boulay, J.; Regnault, B.; Devaux, F.; Namane, A.; Seraphin, B.; Libri, D. e Jacquier, A. (2005) Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121: 725-737.

166. Zanchin, N.I.T. e Goldfarb, D.S. (1999) Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1518-1525.
167. Zanchin, N.I.T.; Roberts, P.; DeSilva, A.; Sherman, F. e Goldfarb, D.S. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5001-5015.
168. Zebarjadian, Y.; King, T.; Fournier, M.J.; Clarke, L. e Carbon, J. (1999) Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7461-7472.

ANEXO A - SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mauricio Barbugiani Goldfeder.

Nacionalidade: brasileiro.

Naturalidade: São Paulo, SP.

Data de nascimento: 09/07/1980

CPF: 221.677.788-99 **RG:** 28.991.730-X SSP SP

Endereço residencial: Avenida Pref. Fábio Prado, 655, apt. 07.

Telefone: (11) 5575-7339 **e-mail:** mbgold@iq.usp.br

2. FORMAÇÃO

2.1 Ensino médio

1994-1997: Colégio Carandá, São Paulo, SP.

2.2 Ensino superior

2000-2003: Bacharelado em Química – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

2002-2003: Bacharelado em Química – Atribuição Biotecnológica – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

2.3 Pós-graduação

2004: Doutorado Direto – Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Título: “Caracterização funcional da proteína Cwc24p de *Saccharomyces cerevisiae*.”

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira.
Bolsista da CAPES.

3. INICIAÇÃO CIENTÍFICA

2001-2002: Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Título: Interação de moléculas de interesse biológico com superfícies I. Espectroscopia Vibracional Intensificada por superfície de algumas porfirinas e ftalocianinas.

Orientadora: Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria
Bolsista da FAPESP.

2003: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Título: Efeito do pH nas propriedades fotodinâmicas de corantes fenotiazínicos.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista.
Bolsista do CNPQ.

4. MONITORIAS

1) Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Disciplina: QBQ102 – Bioquímica e Biologia Molecular, 1º Semestre 2005.

Supervisor: Prof. Dr. Pedro Soares de Araújo.

Bolsista do PAE

2) Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Disciplina: QBQ215 – Bioquímica: Estrutura e Metabolismo, 2º Semestre 2005.

Supervisor: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira.

Bolsista do PAE

5. CURSOS

- 1) **26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 2003.

Participação em Workshop: “Métodos Modernos em Fotoquímica e Fotofísica.”, coordenação: Professor Doutor Frank Herbert Kina.

- 2) **Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.**

Curso de Extensão Universitária Modalidade Atualização: “Proteção Radiológica 2007.”, coordenação: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira.

5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 1) **10º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, São Carlos, SP, 2002.**

Apresentação de Poster: Goldfeder, M.B. ; Carvalho, A.T. ; Faria, D.L.A.; Silva, M.L.P. “Avaliação do Uso de Silício Corroído como Substrato para Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície.”

- 2) **4º Simpósio de Iniciação Científica e Tecnológica FATEC, São Paulo, SP, 2002.**

Apresentação de Poster: Carvalho, A.T.; Goldfeder, M.B.; Faria, D.L.A. e Silva, M.L.P. “Silício Corroído para Espectroscopia Vibracional Intensificada por Superfície”.

- 3) **26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 2003.

Apresentação de Poster: Goldfeder, M.B. e Faria, D.L.A. “Espectroscopia Vibracional Intensificada por Superfícies Metálicas Produzidas através de Evaporação Térmica, Electron-beam e Sputtering.”

- 4) **XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology**, Búzios, RJ, 2006.
Apresentação de Poster: Sanchez, E.M.R.; Goto, H.; Oliveira, C.C.; Goldfeder, M.B. e Gidlund, M. “Cloning and Production of Hamster Recombinant INFG Antigen for Production of Anti-INFG Antibodies.”

- 5) **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, Salvador, BA, 2007.
Apresentação de Poster: Goldfeder, M.B e Oliveira, C.C. “Characterization of a novel ring-finger protein involved in ribossomal RNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*.”

- 6) **RNA 2007, 12th Annual Meeting of the RNA Society**, Madison, WI, USA, 2007.
Apresentação de Poster: Goldfeder, M.B., Pleiss, J.A., Guthrie, C. e Oliveira, C.C. “Cwc24p, a novel *S. cerevisiae* RING-finger protein, connects pre-rRNA processing with splicing.”

- 7) **2008 ASBMB Annual Meeting**, San Diego , CA, USA, 2008.
Apresentação de Poster: Goldfeder, M.B. e Oliveira, C.C. “Cwc24p, a novel *S. cerevisiae* RING-finger protein, affects U3 snoRNA splicing and rRNA processing.”

- 8) **Alunos na Ciência**, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2008.
Apresentação de Poster: Goldfeder, M.B. e Oliveira, C.C. “Cwc24p, a novel *S. cerevisiae* RING-finger protein, affects U3 snoRNA splicing and rRNA processing.”

6. PRÊMIO

- 1) **2008 ASBMB Graduate / Postdoctoral Travel Award, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)**, para participação no congresso: “2008 ASBMB Annual Meeting”, San Diego, CA, USA.

7. PUBLICAÇÃO:

- 1) Goldfeder M.B. e Oliveira, C.C. (2008) Cwc24p, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Nuclear Ring Finger Protein, Affects Pre-snoRNA U3 Splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 2644-2653.

ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO

Goldfeder M.B. e Oliveira, C.C. (2008) Cwc24p, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Nuclear Ring Finger Protein, Affects Pre-snoRNA U3 Splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 2644-2653.

Cwc24p, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Nuclear Ring Finger Protein, Affects Pre-snoRNA U3 Splicing^{*[S]}

Received for publication, September 20, 2007, and in revised form, October 31, 2007 Published, JBC Papers in Press, November 1, 2007, DOI 10.1074/jbc.M707885200

Mauricio B. Goldfeder¹ and Carla C. Oliveira²

From the Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, 748 Av. Prof. Lineu Prestes, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

U3 snoRNA is transcribed from two intron-containing genes in yeast, *snR17A* and *snR17B*. Although the assembly of the U3 snoRNP has not been precisely determined, at least some of the core box C/D proteins are known to bind pre-U3 co-transcriptionally, thereby affecting splicing and 3'-end processing of this snoRNA. We identified the interaction between the box C/D assembly factor Nop17p and Cwc24p, a novel yeast RING finger protein that had been previously isolated in a complex with the splicing factor Cef1p. Here we show that, consistent with the protein interaction data, Cwc24p localizes to the cell nucleus, and its depletion leads to the accumulation of both U3 pre-snoRNAs. U3 snoRNA is involved in the early cleavages of 35 S pre-rRNA, and the defective splicing of pre-U3 detected in cells depleted of Cwc24p causes the accumulation of the 35 S precursor rRNA. These results led us to the conclusion that Cwc24p is involved in pre-U3 snoRNA splicing, indirectly affecting pre-rRNA processing.

In eukaryotes, three of the rRNAs (18, 5.8, and 25 S in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*) are transcribed by RNA pol³ I as a single precursor, which undergoes various processing steps that include nucleotide modifications and endo- and exonucleolytic cleavages. In yeast, at least 150 factors are involved in 35 S pre-rRNA processing, including different proteins and snoRNPs. Processing and modification of the pre-rRNA seems to occur simultaneously with the assembly of ribosomal proteins, and large transient ribonucleoprotein (RNP) particles are formed in the nucleolus (1–3). Different sets of proteins were found in each complex. Among the proteins identified in the 90 S preribosomal complex are many of the small subunit ribosomal proteins, the core box C/D proteins (Nop1p, Nop56p, and Nop58p), U3 snoRNP-specific proteins, and other factors that might also be involved in the early steps of pre-rRNA processing (2). Proteins present in the pre-60 S complex are mainly involved in processing of 5.8 S and 25 S and in the formation of the large ribosome subunit (4, 5).

The snoRNPs involved in rRNA modification can be divided into two major groups based on conserved sequence elements in the snoRNAs and on their association with evolutionarily conserved core proteins (6–8). The core proteins forming the box H/ACA guide snoRNPs, responsible for the conversion of uridine into pseudouridine, are Cbf5p, Gar1p, Nhp2p, and Nop10p. The box C/D class of guide snoRNPs, responsible for 2'-O-methylation, contains the core proteins Nop1p (fibrillarin in higher eukaryotes), Nop58p, Nop56p, and Snu13p (15.5K in mammals) (9–15). Despite being a box C/D snoRNA, U3 is not involved in rRNA methylation but rather in processing at sites A₀, A₁, and A₂ (16–18). The U14 snoRNP is involved both in 2'-O-ribose methylation within the 18 S rRNA and in cleavage at sites A₁ and A₂ (19–22).

Interestingly, most of the snoRNAs are not essential in yeast, except those involved in cleavage reactions, which include, in addition to box C/D U3 and U14, box H/ACA snR10 and snR30. U3 is encoded by two genes in *S. cerevisiae*, *snR17A* and *snR17B*, and at least one copy is essential for cell viability. These U3 genes are transcribed by RNA pol II and contain introns but are not polyadenylated. Instead, the U3 snoRNA 3'-end is formed after Rnt1p endonucleolytic cleavage (23).

U3 snoRNA has been reported to associate with about 30 proteins (3, 24), and the final assembly of this snoRNP seems to occur during 35 S pre-rRNA processing (25). The C/D box snoRNP core proteins, however, associate with the precursor U3 snoRNA at a very early stage of the U3 biogenesis pathway (26, 27). Snu13p binds U3 snoRNA early in processing and is important for recruitment of the other C/D box snoRNP core proteins (28). Interestingly, depletion of Snu13p has been shown to result in the accumulation of unspliced U3 snoRNA precursor (29). Binding of the human Snu13p ortholog 15.5K to box C/D snoRNAs is essential for the subsequent association of Nop56p, Nop58p, and fibrillarin as well as the assembly factors Tip48 and Tip49 (30). Although it is thought to be recruited by Snu13p, Nop1p has been shown to associate specifically with actively transcribed box C/D snoRNA coding genes (31) and also to be associated with U18 precursor snoRNA (32).

In addition to being one of the box C/D core subunits, Snu13p also associates with U4 snRNA (33), participating in two different RNA processing pathways, rRNA processing and splicing. In addition to the five small nuclear RNPs (U1, U2, U4, U5, and U6), other protein factors participate in splicing, among them the NTC complex, which is involved in stabilization of U6 snRNA and pre-mRNA base pairing and release of Lsm proteins (34, 35). Cef1p binds Prp19p and is part of the NTC complex (36, 37). Cwc24p has been previously iso-

^{*} This work 788888/* was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 05/56493-9 (to C. C. O.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4.

¹ Recipient of a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior fellowship.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-11-3091-3810 (ext. 208); Fax: 55-11-3815-5579; E-mail: ccoliv@iq.usp.br.

³ The abbreviations used are: pol, polymerase; GST, glutathione S-transferase; GFP, green fluorescent protein; RNP, ribonucleoprotein.

lated in a complex with Cef1p, indicating that this novel yeast protein may be involved in splicing (38). Here we show that Cwc24p also interacts with Nop17p, which is involved in assembly of box C/D snoRNP (39), and that Cwc24p affects splicing of U3 pre-snoRNA, indirectly influencing pre-rRNA processing.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA Manipulation and Plasmid Construction—Plasmids used in this study, described in Table 1, were constructed according to the cloning techniques described by Sambrook *et al.* (43) and sequenced by the Big Dye method (PerkinElmer Life Sciences). Cloning strategies were as follows. *CWC24* gene, encoded by the YLR323C open reading frame, was PCR-amplified from *S. cerevisiae* genomic DNA using primers 5'-CAAAGCTCCAGGAATTCATG-3' and 5'-GTTGATATGGGATCCTCCAT-3'. For the two-hybrid assays, the PCR product was digested with EcoRI and BamHI and cloned into pBTM116 (40) and pGAD-C2 (41) digested with the same enzymes, generating pBTM-CWC24 and pGAD-CWC24 (which code for the fusions BD-Cwc24p and AD-Cwc24p, respectively, where BD refers to the LexA DNA binding domain and AD refers to the Gal4p transcription activation domain). Plasmid pACT-CWC24 was isolated from a cDNA library obtained from the American Type Culture Collection (ATCC 87002) and consists of a GAL4-Cwc24p-(6–260) fusion (the

numbers in parentheses refer to Cwc24p amino acid residues encoded by the plasmid). For heterologous expression in *Escherichia coli*, pGEX-CWC24 (which expresses GST-Cwc24p fusion protein) was generated through the insertion of an EcoRI-BamHI fragment into pGEX (GE Healthcare). Vector pET28a-CEF1 (which expresses His-Cef1p fusion protein) was generated by the insertion of a PCR-amplified BamHI-Sall DNA fragment containing the *CEF1* gene into pET28a (Novagen), digested with BamHI and XhoI. YCp111GAL-CWC24, which carries *CWC24* under the control of the GAL1 promoter, was obtained by inserting a fragment from pBTM-CWC24 digested with EcoRI (following filling in with T4 DNA polymerase) and PstI into YCp111-GAL digested with NdeI (following T4 DNA polymerase 3' overhang removal) and PstI. To determine the subcellular localization of Cwc24p by fluorescence microscopy, the plasmid pGFP-N-FUS-CWC24 was constructed by first cloning *CWC24* into pBS, after digestion of the plasmid with EcoRI and SmaI, and inserting a SmaI-Sall fragment from the latter vector into pGFP-N-FUS (42), digested with the same enzymes.

Yeast Maintenance, Transformation, and Sporulation—Yeast genetic techniques were conducted as described by Sherman *et al.* (44). Strains described in Table 2 were maintained in yeast extract-peptone medium (YP) or synthetic medium (YNB) with 2% (w/v) galactose or glucose as carbon source as indicated and supplemented with amino acids when required. Yeast cells were transformed using a lithium acetate method (44). A $\Delta cwc24$ diploid strain (2n, *CWC24/cwc24::kan^R*) obtained from Euroscarf was transformed with YCp111GAL-CWC24, induced to sporulation (growth in 1% potassium acetate, 0.005% zinc acetate medium), and spore separation was performed as described elsewhere (44). Strains *CWC24* and $\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24 were grown in galactose-containing medium to stationary phase, and cell suspension was 10-fold concentrated and plated in glucose containing medium in a 10-fold serial dilution (Fig. 3A).

For the growth curve in liquid medium (Fig. 3B), conditional strain $\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24 was transformed with plasmid pGAD-CWC24 (which constitutively expresses Cwc24 under the control of *ADH1* promoter) or pGAD as a control, resulting in strains $\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24 and $\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24,

TABLE 1
List of plasmid vectors used in this study

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pBTM116	<i>lexA</i> DNA binding domain, <i>TRP1</i> , 2 μ m	Ref. 40
pBTM-CWC24	<i>lexA</i> :: <i>CWC24</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	This study
pBTM-cwc24 [X] ^a	<i>lexA</i> :: <i>cwc24</i> [X], <i>TRP1</i> , 2 μ m	This study
pGAD-C2	<i>GAL4</i> activation domain, <i>LEU2</i> , 2 μ m	Ref. 41
pACT-cwc24 [6–260]	<i>GAL4</i> :: <i>cwc24</i> [6–260], <i>LEU2</i> , 2 μ m	This study
pGAD-CWC24	<i>GAL4</i> :: <i>CWC24</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	This study
YCp111GAL-CWC24	<i>GAL1</i> :: <i>CWC24</i> , <i>LEU2</i> , <i>CEN4</i>	This study
YCp33GAL-CWC24	<i>GAL1</i> :: <i>CWC24</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	This study
pGFP-N-FUS	<i>MET25</i> :: <i>GFP</i> , <i>CEN6</i> , <i>URA3</i>	Ref. 42
pGFP-N-CWC24	<i>MET25</i> :: <i>GFP-CWC24</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	This study
pGEX-CWC24	<i>GST</i> :: <i>CWC24</i> , Amp ^R	This study
pET-His-NOP17	<i>His</i> :: <i>NOP17</i> , Amp ^R	Ref. 39
pET-His-CEF1	<i>His</i> :: <i>CEF1</i> , Amp ^R	This study

^aX corresponds to Cwc24p amino acid residues encoded by the plasmids.

TABLE 2
List of yeast strains used in this work

Strain	Relevant features	Reference
L40	<i>MATa his3d200 trp1-901 leu2-3,311 ade2 lys2-801am URA3::lexAop8-lacZ</i>	Ref. 45
L40-41	<i>LYS2::lexAop4-HIS3</i>	
YFG-131	L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP8	46
YFG-221	L40, pBTM-NOP17, pGAD	39
	L40, pBTM-NOP17, pACT-cwc24 [6–260]	Gonzales and Oliveira, unpublished observations
YMG-222	L40, pGAD, pBTM-CWC24	This study
YMG-223	L40, pGAD-NOP17, pBTM-cwc24 [X] ^a	This study
CWC24	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; CWC24</i>	Research Genetics
CWC24/ <i>cwc24::kan^R</i>	<i>MATa/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; ura3Δ0/ura3Δ0; MET15/met15Δ0; CWC24/CWC24c::KAN^R</i>	Euroscarf
$\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; CWC24c::KAN^R; YCp111GAL-CWC24</i>	This study
$\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24, AD	$\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24, YCp33GAL-CWC24, pGAD	This study
$\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24, AD-CWC24	$\Delta cwc24$ /GAL1::CWC24, YCp33GAL-CWC24, pGAD-CWC24	This study
W303	<i>MATa/MATα; ura3-52/ura3-52; trp1Δ 2/trp1Δ 2; leu2-3_112/leu2-3_112; his3-11/his3-11Δ ade2-1/ade2-1; can1-100/can1-100</i>	
YMG-224	W303, pGFP-N-FUS	This study
YMG-225	W303, pGFP-N-FUS-CWC24	This study

^aX corresponds to Cwc24p amino acid residues encoded by the plasmids.

Cwc24p Affects Pre-snoRNA U3 Splicing by Interacting with Cef1p

TABLE 3

DNA oligonucleotides used for Northern blot hybridization and primer extension analyses

Oligonucleotide	Sequence	Source or reference
P1	5'-GGTCTCTCTGCTGCCGAAATG-3'	Ref. 47
P2	5'-CATGGCTTAATCTTTGAGAC-3'	Ref. 48
P3	5'-GCTCTCATGCTCTTGCCAAAC-3'	Ref. 47
P4	5'-CGTATCGCATTTGCTGCGTTC-3'	Ref. 47
P5	5'-CTCACTACCAACAGAATGTTTGAGAAGG-3'	Ref. 49
P6	5'-GTTTCGCCTAGACGCTCTCTTC-3'	Ref. 47
P7	5'-GCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGC-3'	Ref. 39
P8	5'-TGTATCCTCTGGGCCCCG-3'	Ref. 47
P9	5'-AATTTCCAGTTACGAAATCTTGTGTTTGTGAC-3'	Ref. 47
P10	Anti-U3	Ref. 50
P11	Intron snR17a	This study
P12	Intron snR17b	This study

AD-Cwc24, respectively. Wild type CWC24 strain was also used as a control. Cells were grown in galactose-containing medium overnight until stationary phase and then shifted to glucose medium.

Yeast Two-hybrid Assays—Fusion proteins with either LexA DNA binding domain (BD-protein) or Gal4p transcription activation domain (AD-protein) were expressed in the host strain L40 (45), which has two reporter genes for two-hybrid interactions integrated into the genome: yeast *HIS3* and *E. coli lacZ*. Transformants were plated in minimal medium lacking histidine as a first selection, and viable clones were further tested for β -galactosidase activity, as described below. Exponentially growing cultures in minimal medium (supplemented with histidine) were 10-fold concentrated and either transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight at 30 °C for β -galactosidase activity assay (45) or plated in His[−] medium in a 10-fold serial dilution. β -Galactosidase activity in cell extracts generated in buffer Z was quantitated using ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as substrate (40). Strain L40-41 was used as a positive control, and strain YMG-222 was used as negative control for two-hybrid interaction (Table 2).

Immunofluorescence Analysis—In order to determine its subcellular localization, Cwc24p was expressed in the strain YMG-224 with an NH₂-terminal green fluorescent protein (GFP) tag, encoded by the plasmid pGFP-N-FUS-CWC24. DNA in the cell nucleus was stained using Hoechst. Localization of GFP was analyzed in the strain YMG-225 as a control.

Protein Pull-down and Immunoblot Analysis—In the pull-down assay, cellular extracts generated in phosphate-buffered saline of *E. coli* cells expressing either GST or GST-Cwc24p (*TE₁*; see Fig. 1) were incubated for 1 h at 4 °C with 250 μ l of glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare), and the unbound (*FT₁*) material was washed. Beads were then incubated with cellular extract containing His-Nop17p or His-Cef1p (*TE₂*; not shown), flow-through was collected (*FT₂*), and beads were once again washed with phosphate-buffered saline. Bound proteins were eluted (*B*) with 50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM reduced glutathione, resolved on SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated with anti-polyhistidine antibody (GE Healthcare), anti-GST antiserum (Sigma), anti-Cwc24p antiserum, or anti-Nop17p antiserum, and the immunoblots were developed using the ECL system (GE Healthcare). To analyze the presence of Cwc24p in the strain Δ cwc24/*GAL1::CWC24* grown at the restrictive condition, yeast cells were collected at

various times after medium shift and broken with glass beads. Immunoblot of the cellular extracts was conducted as described above, and the membrane was additionally incubated with anti-Nip7 as an internal control.

RNA Analysis—Exponentially growing cultures of yeast strains were shifted from galactose to glucose medium. At various times, samples were collected and quickly frozen in a dry ice-ethanol bath. Total RNA was isolated from yeast cells by a modified hot phenol method (39). RNAs were separated by electrophoresis (20 μ g of total RNA was loaded in each lane) on 1.3% agarose gels, following denaturation with glyoxal (43), and transferred to Hybond nylon membranes (GE Healthcare). Membranes were probed with ³²P-labeled oligonucleotides (Table 3) complementary to specific regions of the 35 S pre-rRNA or with a ³²P-labeled DNA fragment corresponding to scR1 RNA, using the hybridization conditions described previously (47) and analyzed in a PhosphorImager (Amersham Biosciences).

Microarray Analysis of Splicing—Total RNA was extracted from yeast strains CWC24 and Δ cwc24/*GAL1::CWC24* grown in glucose medium for different periods of time and used as templates for cDNA synthesis. cDNA labeling and microarray hybridization and analysis were performed as described (51).

Primer Extension Analysis—Total RNA extracted as described above was used for primer extension analysis. Reactions were performed by annealing 1 pmol of ³²P-labeled oligonucleotide to 5 μ g of total RNA. Following annealing, extension was performed with 100 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) and dNTPs (0.5 mM) for 30 min at 37 °C. cDNA products were precipitated, resuspended in H₂O, treated with RNase A, denatured, and analyzed on 6% denaturing polyacrylamide gels. Gels were dried and analyzed in a PhosphorImager. Oligonucleotides used in primer extension analyses are listed in Table 3.

RESULTS

Cwc24p is an essential yeast protein that had previously been isolated in a complex with Cef1p (38), but its function had not been addressed. Cwc24p is a 30-kDa protein containing a zinc finger and a RING domain. In a two-hybrid screen with Nop17p, we identified the interaction between BD-Nop17p and AD-Cwc24p-(6–260) (39).⁴ We subsequently tested the interaction between these two proteins in the two-hybrid sys-

⁴ F. A. Gonzales and C. C. Oliveira, unpublished results.

FIGURE 1. Protein interactions of Cwc24p. A, schematic representation of the different clones of Cwc24p, full-length and truncated, that were tested for interaction with Nop17p, either fused to LexA DNA binding domain (BD) or to Gal4p transcription activation domain (AD). B, protein interactions were analyzed through the two-hybrid system, testing for expression of the reporter genes *HIS3* (left) and *lacZ* (right). BD-Cwc24 + AD was negative control. Strain L40-41, which harbors plasmids encoding BD-Nip7p and AD-Nop8p, was used as a positive control. C, Western blot for detection of proteins after pull-down assay. Total extract from cells expressing either GST or GST-Cwc24p (TE₁) was incubated with a glutathione-Sepharose resin, flow-through fraction was collected (FT₁), and after washing, total extract of cells expressing His-Nop17p TE₂ (not shown) was loaded. The flow-through fraction was collected again (FT₂), resin was washed (W), and bound fraction was obtained (B). His-Nop17p is only pulled down by GST-Cwc24p. His-Nop17p was detected either with anti-His monoclonal antibody or with anti-Nop17p antiserum. GST-Cwc24p was detected with either anti-GST or anti-Cwc24p antiserum. Bands corresponding to full-length and breakdown products of fusion proteins are detected with the antisera indicated on the right. D, Western blot for detection of GST, GST-Cwc24p, or His-Cef1p proteins after pull-down assay, as described in C.

1, A and B). In order to determine the Nop17p-interacting domain of Cwc24p, deletion mutants of the latter were created. The mutants were deleted of either the zinc finger, the RING domain, or the amino-terminal region of the protein (Fig. 1A). The results show that the central portion of Cwc24p, containing the zinc finger domain, BD-Cwc24-(86–164), is sufficient for interaction with Nop17p (Fig. 1B). A Cwc24p amino-terminal fragment, not containing the zinc finger domain, BD-Cwc24-(1–85), however, still interacts with Nop17p, although less strongly (Fig. 1B). The interaction between these two proteins was confirmed through GST pull-down assays of the recombinant proteins His-Nop17p and GST-Cwc24p (Fig. 1C). In these experiments, GST or GST-Cwc24p was immobilized on a glutathione-Sepharose resin, after which total extract of *E. coli* cells expressing His-Nop17p was incubated with the resin. After washing and elution of bound proteins, fractions were analyzed through immunoblot with various antisera, anti-His, and anti-Nop17 to detect His-Nop17p (Fig. 1C, top) or anti-GST and anti-Cwc24 to detect GST-Cwc24p (Fig. 1C, bottom). Both protein fusions, GST-Cwc24p and His-Nop17p, seem to be unstable under the electrophoresis and immunoblot conditions used, since breakdown products are detected. Anti-GST antiserum, however,

detects only one band corresponding to GST-Cwc24p fusion (Fig. 1C).

Although Cwc24p had been identified in a complex with Cef1p (38), it was not known whether the interaction between these two proteins was direct or whether it depended on another NTC subunit. In order to address that question, the recombinant proteins GST-Cwc24p and His-Cef1p were used in GST pull-down assays, as described above. The results show that GST-Cwc24p pulls down His-Cef1p, leading us to the conclusion that these proteins interact directly with each other (Fig. 1D).

The interaction of Cwc24p with the NTC complex subunit Cef1p and with Nop17p indicates a nuclear subcellular localization for the protein. In order to confirm that, a GFP-Cwc24p fusion protein was used to monitor its localization through fluorescence microscopy (Fig. 2). In accordance with the interaction data, GFP-Cwc24p localizes to the nucleus (Fig. 2). Despite

FIGURE 2. Subcellular localization of GFP-Cwc24p. Yeast strains expressing either GFP (top) or a GFP-Cwc24p NH₂-terminal fusion (bottom) were analyzed. Hoechst, nuclei stained with the DNA dye Hoechst; GFP, localization of the green fluorescent protein; Merge, merge of the green fluorescent and the DNA dye signals.

tem by switching the tags, and the results show that the interaction is independent of the tag, although it is stronger when Nop17p is fused to the DNA binding domain (BD-Nop17p; Fig.

Cwc24p Affects Pre-snoRNA U3 Splicing by Interacting with Cef1p

FIGURE 3. CWC24 is an essential *S. cerevisiae* gene. **A**, 10-fold serial dilution of CWC24 and Δcwc24/GAL1::CWC24 strains growing on glucose-containing plates. **B**, growth curve of CWC24, Δcwc24/GAL1::CWC24, and Δcwc24/GAL1::CWC24, AD-Cwc24 strains in glucose medium. **C**, Western blot analysis of GAL1-CWC24 expression in Δcwc24/GAL1::CWC24 cells in glucose medium. Cwc24p was detected with an anti-Cwc24p serum, and Nip7p, used as an internal control, was detected with an anti-Nip7p serum. Endogenous Cwc24p could not be detected due to low expression level in the wild type strain.

the interaction between Cwc24p and Nop17p, however, Cwc24p is not concentrated in the nucleolus but rather is distributed throughout the nucleus.

In order to characterize Cwc24p function, we first had to obtain a conditional mutant strain containing the CWC24 gene under the control of an inducible promoter. A heterozygous diploid deletion strain (CWC24/cwc24::kan^R) was obtained from Euroscarf and transformed with a plasmid containing the CWC24 gene under control of the GAL1 promoter. Sporulation of this strain generated the haploid conditional strain Δcwc24/GAL1::CWC24, which grows on galactose-containing medium, but not on glucose medium (Fig. 3). Growth analysis of the conditional strain shows that Δcwc24/GAL1::CWC24 starts to grow more slowly after 12 h in glucose medium (Fig. 3B). This conditional strain was then transformed with a plasmid encoding the fusion protein AD-Cwc24p (AD corresponds to Gal4p transcription activation domain) under control of the constitutive promoter ADHI (Δcwc24/GAL1::CWC24, AD-Cwc24) and tested for growth in glucose medium. The results show that AD-Cwc24p rescues the growth in glucose (Fig. 3B). Immunoblot assays to monitor Cwc24p expression in the conditional strain show that the Cwc24p band can only be detected up to 12 h in glucose, corresponding to the

time when the strain starts to grow more slowly (Fig. 3C). These results indicate that Cwc24p is a very stable protein, being detected up to 12 h after the shift to glucose medium (repression of GAL1::CWC24; Fig. 3C).

Since Cwc24p interacts with Nop17p, a factor that affects assembly of box C/D snoRNP and, consequently, pre-rRNA processing (39), we next investigated the possible involvement of Cwc24p in this process. Δcwc24/GAL1::CWC24 cells and isogenic haploid wild type cells were incubated in glucose-containing medium for 30 h and subsequently subjected to RNA pulse-chase labeling experiments with [³H]uracil. rRNA analysis from these cells shows that the 35 S pre-rRNA processing is much slower in the strain Δcwc24/GAL1::CWC24 than in the control CWC24 strain, since the precursor rRNA is still visible after 30 min of chase in the conditional strain, whereas it is no longer visible after 3 min of chase in the wild type strain (supplemental Fig. S1). It also appears that since processing is less efficient after depletion of Cwc24p, transcription by RNA pol I is being inhibited, since the portion of the film containing the conditional strain RNAs had to be exposed for a longer period than the CWC24 samples. Surprisingly, despite the slower pre-rRNA 35 S processing in the strain Δcwc24/GAL1::CWC24, only minor alterations could be detected in the kinetics of mature rRNA formation, which indicates that depletion of Cwc24p confers a mild phenotype to the cells, so that pre-35 S pre-rRNA processing is not blocked but rather slowed down. Interestingly, similar effects have been reported for NOP1 and NOP56 mutants, two box C/D core subunits (14, 52).

rRNA processing was also analyzed through Northern blot hybridizations. The results confirm the pulse-chase labeling experiments, also showing the accumulation of the precursor rRNA 35 S (2.2-fold accumulation) and the intermediates 23 S (1.3-fold), 20 S (1.3-fold), and 27 S (3.0-fold) in the conditional strain over time in glucose medium (Fig. 4). Quantitation of the bands also show a 30% decrease on the mature rRNAs 25 and 18 S levels. From these data, it can be inferred that Cwc24p affects the initial steps of pre-rRNA processing, which involve cleavage at A₀, A₁, and A₂ sites. In order to analyze the cleavage efficiency at these sites in the Δcwc24/GAL1::CWC24 strain, we performed primer extension experiments, using primers that anneal to the pre-rRNA downstream of these cleavage sites. Interestingly, the results show a higher concentration of longer products in the conditional strain, due to the higher levels of nonprocessed pre-rRNAs, although the main cleavage reactions are still detected (Fig. S2). A similar effect was observed for mutants of the box C/D core protein Nop58p, which have also been shown to have little decrease in the efficiency of cleavage at A₁ site (11, 22). The primer extension data presented here corroborate the Northern hybridizations and pulse-chase labeling results, which show higher levels of pre-rRNAs in the conditional strain but only a small change in mature rRNAs concentration. Similar effects on rRNA processing have been reported for temperature-sensitive mutants of Nop1p (53).

The interaction of Cwc24p with Cef1p and the nuclear localization of the protein indicated that Cwc24p could also be involved in splicing. Therefore, we decided to analyze the efficiency of splicing in Δcwc24/GAL1::CWC24 cells. In a global

FIGURE 4. Northern blot analysis of pre-rRNA processing. A, 20 μ g of total RNA extracted from cells incubated in glucose medium for different periods of time and hybridized against specific oligonucleotide probes. The relative positions of the probes on the 35 S pre-rRNA are indicated in B. Bands corresponding to the major intermediates and to the mature rRNAs are indicated on the right. The lower panels show hybridizations with probes against the 5 S rRNA and the scR1 RNA, used as internal controls. B, structure of the 35 S pre-rRNA and major intermediates of the rRNA processing pathway in *S. cerevisiae*. The positions of the probes used for Northern blot hybridizations are indicated below the 35 S pre-rRNA. Processing of 35 S pre-rRNA starts with endonucleolytic cleavages at sites A₀ and A₁ in the 5'-ETS, generating 32 S pre-rRNA. The subsequent cleavage at site A₂, in ITS1, generates the 20 S and 27 S_{A2} pre-rRNAs (dotted arrows indicate a possible pathway including the aberrant intermediate 23 S). The 20 S pre-rRNA is then processed at site D to the mature 18 S rRNA. The major processing pathway of the 27 S_{A2} pre-rRNA involves cleavage at site A₃, producing 27 S_{B1}, which is digested quickly by exonucleases to generate the 27 S_{B1} (27 S_{B1} short) pre-rRNA. The subsequent processing step occurs at site B₂, at the 3'-end of the mature 25 S rRNA. Processing at sites C₁ and C₂ separates the mature 25 S rRNA from the 7 S₅ pre-rRNA. This pre-rRNA is subsequently processed exonucleolytically to generate the mature 5.8 S₅ rRNAs. A fraction of the 27 S_{A2} pre-rRNA is processed at the 5'-end by a different mechanism and, following processing at the remaining sites, gives rise to the 5.8 S_L (5.8 S long) rRNA, which is 6–8 nucleotides longer than the 5.8 S₅ rRNA at the 5'-end.

approach (51), splicing of all yeast genes was analyzed by microarray by comparing the conditional and wild type strains growing in galactose or glucose media. The results showed that very few pre-mRNAs had their splicing affected in the mutant strain (Fig. 5). However, splicing of both U3 pre-snoRNAs, coded by *snR17A* and *snR17B*, were among the most affected in the cell after depletion of Cwc24p. Splicing of *TEF4* and *IMD4* pre-mRNAs is also affected in the conditional strain (Fig. 5), and interestingly, the box C/D snoRNAs *snR38* and *snR54* are coded in the introns of these pre-mRNAs, respectively. *RPL7A* and *ASC1* pre-mRNAs also host C/D box snoRNAs (*snR39* and *snR24*, respectively) and are slightly affected upon depletion of Cwc24p.

The microarray results were confirmed through Northern blot hybridization and primer extension experiments, which show an accumulation of pre-U3 snoRNA upon depletion of Cwc24p (Fig. 6). Interestingly, both pre-U3 snoRNAs, encoded by *snR17A* and *snR17B*, accumulate in the nonpermissive condition (Fig. 6B). The oligonucleotides used in the primer extension experiments are complementary to the U3 second exon (P10) or to pre-U3A or pre-U3B introns, P11 and P12, respec-

tively. Some cross-hybridizations are detected, since pre-U3A oligonucleotide (P11) also hybridizes with pre-U3B intron, although less efficiently (Fig. 6C, P11). Similarly, pre-U3B oligonucleotide (P12) hybridizes also with pre-U3A intron (Fig. 6C, P12). Northern blot hybridization with primer P10 confirms the accumulation of pre-U3 snoRNAs upon depletion of Cwc24p (Fig. 6D). The results obtained from various RNA preparations and three different methods show that the depletion of Cwc24p leads to the accumulation of unspliced U3 snoRNA precursor without altering much the levels of mature U3 (29). These results indicate that Cwc24p is a U3 splicing efficiency factor. Interestingly, depletion of the core C/D box protein and splicing factor Snu13p has also been shown to result in the accumulation of unspliced U3 snoRNA precursor without altering much the levels of mature U3 (29).

Cwc24p has two domains potentially involved in protein-protein or protein-nucleic acid interactions, a zinc finger and a RING finger. As shown above, a portion of Cwc24p containing the zinc finger is involved in the interaction with Nop17p (Fig. 1). In order to determine whether the role of Cwc24p in splicing of pre-snoRNA U3 is due to

direct protein-RNA interaction, RNA co-immunoprecipitation was performed, using a ProtA-Cwc24p fusion. The results showed that Cwc24p does not co-precipitate RNAs, indicating that Cwc24p is not involved in stable RNA interactions (Fig. S3, A and B). Interestingly, however, recombinant Cwc24p binds DNA *in vitro*, although nonspecifically and with very low affinity (Fig. S3C). These results indicated that Cwc24p could affect splicing of pre-U3 snoRNA co-transcriptionally. In order to address that question, chromatin immunoprecipitation experiments were performed in which *snR17A* and -B promoter and coding regions were probed. Surprisingly, Cwc24p does not co-precipitate chromatin (data not shown), leading us to the conclusion that Cwc24p participates in pre-U3 splicing through protein-protein interactions. Accordingly, a truncated Cwc24p mutant, containing only the zinc finger and RING domains, complements growth of the conditional mutant in glucose medium (Fig. S4). Moreover, a single amino acid substitution in the zinc finger domain results in no complementation of growth of $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ under conditions in which CWC24 expression is repressed.

FIGURE 5. Analysis of global splicing in strain $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ after depletion of CWC24 expression. Total RNA was extracted from cells growing in glucose medium for the indicated time periods, and splicing was analyzed through microarray, using primers for exons, introns, and exon junctions. *A*, analysis of *S. cerevisiae* genes containing introns. *B*, analysis of intronless yeast genes. Yellow indicates higher RNA concentration in the conditional strain $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$; blue indicates lower RNA concentration in the conditional strain.

DISCUSSION

Cwc24p is an essential yeast protein previously identified by affinity isolation in Cef1p complexes (38), although its function had not yet been addressed. In this study, we identified the direct interactions between Cwc24p and Cef1p and a box C/D

FIGURE 6. Analysis of splicing efficiency of pre-U3 snoRNAs. Splicing of U3 pre-snoRNAs was analyzed through primer extension reactions of total RNA extracted from cells growing in media containing either galactose (0 h) or glucose (36 h). *A*, positions of the primers used in the primer extension reactions that anneal either to the second U3 exon or to the introns of U3A and U3B pre-snoRNAs. *B*, primer extension with the primer P10 allows the detection of the U3 mature 5'-end (indicated as U3) as well as 5'-ends of both pre-U3s (A and B), which accumulate in the conditional mutant strain. *C*, primer extension reactions with primer P11 (pre-U3A) and P12 (pre-U3B) show that the nonspliced snoRNAs accumulate in the conditional strain. *D*, Northern blot hybridization with P10 also shows accumulation of pre-U3 snoRNA.

snoRNP assembly factor, Nop17p (39), and showed that Cwc24p is involved in pre-U3 splicing, indirectly affecting pre-35 S rRNA processing.

Analysis of Cwc24p sequence shows conserved domains, a zinc finger and a RING domain. These domains are conserved in other eukaryotic proteins, and sequence alignments indicate that there may be Cwc24p orthologs in other organisms, although it remains to be determined. Mapping of Cwc24p regions involved in Nop17p interaction showed that the central portion of the protein, including the zinc finger, is responsible for the interaction. Although zinc fingers are generally considered as DNA binding domains, they are also responsible for protein-RNA and protein-protein interactions (54). Interestingly, Cef1p also contains a zinc finger domain, and Prp19p contains a RING finger-like domain, both of which are considered to be involved in protein-protein interactions (36, 55). Fur-

ther indicating that Cwc24p zinc finger and RING domains are involved in protein interaction, a truncated Cwc24p mutant containing these domains complements growth of the conditional mutant strain $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ in glucose, whereas the insertion of a single amino acid mutation in the Cwc24p zinc finger no longer complements growth in glucose. These results indicate that protein interaction is responsible for Cwc24p molecular function.

Depletion of Cwc24p leads to the accumulation of 35 S pre-rRNA, although the levels of the mature rRNAs are only slightly affected. Interestingly, a similar phenotype has been reported for a temperature-sensitive mutant of Nop1p, a box C/D core subunit (53). Analysis of the 35 S pre-rRNA cleavage sites that are affected in the $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ strain by primer extension showed that although bands corresponding to precursor rRNAs are detected, the cleavages at A₁ and A₂ are little affected, the strongest inhibition being at site A₀. It is important to note that some mutants of box C/D core proteins Nop58p and Snu13p also show little inhibition of cleavage at A₁ (11, 33).

Since Cwc24p depletion leads to the accumulation of the 35 S precursor, mainly affecting the early cleavage reactions, directed by the snoRNPs U3, U14, snR10, and snR30 (56, 57). However, despite its interaction with Nop17p, a nucleolar protein involved in assembly of box C/D snoRNPs, Cwc24p localizes to the nucleus rather than being concentrated in the nucleolus. That observation indicated that the effects of the Cwc24p depletion on 35 S pre-rRNA might be indirect. Among the snoRNPs involved in the early 35 S pre-rRNA cleavages, U3 and U14 are of box C/D and therefore associate with Nop17p. Because Cwc24p also binds Cef1p, it was hypothesized that it could affect splicing, and coincidentally, U3 is encoded by two intron-containing genes in yeast, *snR17A* and *snR17B*. As shown here, Cwc24p actually affects splicing of U3 pre-snoRNAs. Cwc24p might influence specifically pre-U3 splicing by protein-protein interaction, since recombinant Cwc24p did not bind RNA directly *in vitro*; nor did ProtA-Cwc24p co-immunoprecipitate RNA from total yeast extracts. The data shown here lead to the conclusion that Cwc24p is a splicing efficiency factor, whose depletion causes accumulation of pre-snoRNA U3 but does not affect significantly assembly or stability of mature U3 snoRNAs. Similar effects on U3 snoRNA splicing and stability have been reported for the box C/D core subunits Nop1p, Nop56p, and Snu13p (14, 29, 52, 53).

A large number of proteins have been shown to be part of the mature U3 snoRNP (3), although it remains unclear whether some of those factors may bind pre-U3 snoRNA co-transcriptionally, thereby influencing its splicing. U3 snoRNA 3'-end processing involves Rnt1p cleavage and 3'-5' trimming by the exosome and probably also the Rex complex (23). Lhp1p binds a U3 processing intermediate at a 3'-end poly(U) tract, inhibiting further 3'-5' trimming. After splicing has taken place, binding of box C/D core proteins Nop1p and Nop58p displaces Lhp1p, allowing the exosome to form the mature 3'-end of U3 snoRNA (23). Interestingly, Nop17p interacts with Nop58p, the exosome subunit Rrp43p (39), and with Cwc24p. Lsm complexes have also been shown to be involved in processing of U3 snoRNA, binding internal poly(U) tracts at the 3'-end of pre-U3 (58). Although Lsm proteins and Lhp1p are important for the

FIGURE 7. Schematic representation of a model for Cwc24p function. Box C/D core proteins may bind U3 snoRNA co-transcriptionally. As a box C/D assembly factor, Nop17p may also bind Nop58p in this context. Through the interaction with Nop17p, Cwc24p can be directed to the pre-snoRNA and bring about/stabilize the association of the NTC complex, thereby increasing pre-U3 splicing efficiency and, consequently, leading to the efficient maturation of U3 snoRNP U3, which is essential for the early cleavages A₀, A₁, and A₂ in pre-rRNA 35 S processing. For simplicity, the other proteins that associate with U3 snoRNP are not represented, and only box C/D core proteins are shown.

3'-end processing of U3, the level of this snoRNA has been reported to be little affected in the absence of any of those proteins (59).

Depletion of Snu13p has been shown to result in an accumulation of unspliced U3 snoRNA precursor (29). Nop1p has been shown to associate with actively transcribed box C/D snoRNA genes, indicating its early binding to the snoRNAs (31), and confirming an earlier hypothesis that splicing of pre-U3 snoRNA occurs in a complex containing some of the U3 snoRNP proteins (26). Nop1p has also been shown to influence Rnt1p cleavage of pre-U18 snoRNA (32). The assembly of snoRNP has also been shown to be coupled to 5'-end maturation of independently transcribed box C/D snoRNAs (60).

Here we show that Cwc24p affects splicing of pre-U3 snoRNA. Since Cwc24p did not co-immunoprecipitate *snR17A* or *snR17B* chromatin, the effect of this protein may be post-transcriptional. Cwc24p may interact with Nop17p and Cef1p in the context of the pre-U3 snoRNA, thereby connecting splicing and pre-rRNA processing pathways (Fig. 7). Cwc24p may be directed to pre-U3 by its interaction with Nop17p. Cef1p is part of the NTC complex, which is required for the stabilization of the interactions between the U5 and U6 snRNAs and the pre-mRNA during splicing, and for the destabilization of the interactions between Lsm proteins and U6 snRNA (61). By binding Cef1p, and, therefore, the NTC complex, Cwc24p increases the splicing efficiency of the pre-U3 snoRNA. In the absence of the essential protein Cwc24p, pre-U3 accumulates, decreasing the efficiency of the early cleavage reactions of 35 S pre-rRNA. Sequence and secondary structure analysis of U3 pre-snoRNAs shows that it contains a noncanonical branching

site sequence and that the 5'-end of the intron base pairs with exon 1 (26). These observations may explain why Cwc24p is required for efficient splicing of these pre-snoRNAs.

There is increasing evidence of the coordinated regulation of rRNA processing and splicing. Prp43p, a DEXD/H-box helicase involved in the late steps of splicing (62, 63), has recently been shown to localize to the nucleolus and also to influence rRNA processing (64). Prp43p has also been identified in a complex with Cwc23p (65), which, as Cwc24p, is complexed with Cef1p (38). The presence of these proteins in different subcomplexes may allow the regulation of the processes they are involved in. Interestingly, the ribosome protein genes form the major group of genes containing introns in yeast (51, 66). It has been shown that proteins associated with promoters of ribosome protein genes may also be involved in RNA pol I transcription and rRNA processing (67) and that the CUR1 complex may regulate both the transcription of ribosome protein genes and the early steps of rRNA processing directed by U3 snoRNP (68). The coordinated regulation of ribosome formation seems, therefore, to occur at various levels, including RNA pol I and pol II transcription, rRNA processing, and splicing of both ribosome protein mRNAs and pre-U3 snoRNA.

Acknowledgments—We are indebted to Jeffrey A. Pleiss and Christine Guthrie for providing technical expertise and reagents for microarray experiments. We also thank Juliana S. Luz and Nilson I. T. Zanchin for anti-Cwc24p and anti-Nip7p antisera, respectively, and Tereza C. Lima Silva and Zildene G. Correa for DNA sequencing.

REFERENCES

- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 313–318
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzochio, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschöchner, H., Tollervey, D., Gavin, A. C., and Hurt, E. (2002) *Mol. Cell.* **10**, 105–115
- Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settler, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F., and Baserga, S. J. (2002) *Nature* **417**, 967–970
- Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechenr, J., and Hurt, E. (2001) *Mol. Cell.* **8**, 517–529
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002) *EMBO J.* **21**, 5539–5547
- Maxwell, E. S., and Fournier, M. J. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **35**, 897–934
- Tollervey, D., and Kiss, T. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 337–342
- Warner, J. R. (2001) *Cell* **107**, 133–136
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R., and Hurt, E. C. (1989) *EMBO J.* **8**, 4015–4024
- Bachelier, J. P., and Cavaillé, J. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 257–261
- Lafontaine, D. L., and Tollervey, D. (1999) *RNA* **5**, 455–567
- Cahill, N. M., Friend, K., Speckmann, W., Li, Z. H., Terns, R. M., Terns, M. P., and Steitz, J. A. (2002) *EMBO J.* **21**, 3816–3828
- Filipowicz, W., and Pogacic, V. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 319–327
- Gautier, T., Bergès, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7088–7098
- Lafontaine, D. L., and Tollervey, D. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2650–2659
- Hughes, J. M., and Ares, M., Jr. (1991) *EMBO J.* **10**, 4231–4239
- Beltrame, M., and Tollervey, D. (1995) *EMBO J.* **14**, 4350–4356
- Sharma, K., and Tollervey, D. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6012–6019
- Li, H. V., Zagorski, J., and Fournier, M. J. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1145–1152
- Nicoloso, M., Qu, L. H., Michot, B., and Bachelier, J. P. (1996) *J. Mol. Biol.* **260**, 178–195
- Morrissey, J. P., and Tollervey, D. (1997) *Chromosoma* **105**, 515–522
- Wu, P., Brockenbrough, S., Metcalfe, A. C., Chen, S., and Aris, J. P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16453–16463
- Kufel, J., Allmang, C., Chanfreau, G., Petfalski, E., Lafontaine, D. L. J., and Tollervey, D. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5415–5424
- Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y. N., Beyer, A. L., and Baserga, S. J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9464–9469
- Granneman, S., Gallagher, J. E. G., Vogelzangs, J., Horstman, W., Venrooij, W. J., Baserga, S. J., and Pruijn, G. J. M. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 1877–1887
- Mougin, A., Grégoire, A., Banroques, J., Ségault, V., Fournier, R., Brulé, F., Chevrier-Miller, M., and Branlant, C. (1996) *RNA* **2**, 1079–1093
- Watkins, N. J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2004) *Mol. Cell* **16**, 789–798
- Cléry, A., Senty-Ségault, V., Leclerc, F., Raué, H. A., and Branlant, C. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1191–1206
- Stevens, S. W., Barta, I., Ge, H. Y., Moore, R. E., Young, M. K., Lee, T. D., and Abelson, J. (2001) *RNA* **7**, 1543–1553
- Watkins, N. J., Dickmanns, A., and Lührmann, R. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8342–8352
- Morlando, M., Ballarino, M., Greco, P., Caffarelli, E., Dichtl, B., and Bozzoni, I. (2004) *EMBO J.* **23**, 2392–2401
- Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R., and Bozzoni, I. (2001) *EMBO J.* **20**, 6856–6865
- Dobbyn, H. C., and O'Keefe, R. T. (2004) *RNA* **10**, 308–320
- Chan, S. P., and Cheng, S. C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 31190–31199
- Chen, C. H., Kao, D. I., Chan, S. P., Kao, T. C., Lin, J. Y., and Cheng, S. C. (2006) *RNA* **12**, 765–774
- Tsai, W. Y., Chow, Y. T., Chen, H. R., Huang, K. T., Hong, R. I., Jan, S. P., Kuo, N. Y., Tsao, T. Y., Chen, C. H., and Cheng, S. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9455–9462
- Ohi, M. D., and Gould, K. L. (2002) *RNA* **8**, 798–815
- Ohi, M. D., Link, A. J., Ren, L., Jennings, J. L., McDonald, W. H., and Gould, K. L. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2011–2024
- Gonzales, F. A., Zanchin, N. I. T., Luz, J. S., and Oliveira, C. C. (2005) *J. Mol. Biol.* **346**, 437–455
- Bartel, P. L., and Fields, S. (1995) *Methods Enzymol.* **254**, 241–263
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996) *Genetics* **144**, 1425–1436
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., and Hegemann, J. H. (1996) *Yeast* **12**, 773–786
- Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Vojtek, A. B., and Hollenberg, S. M. (1995) *Methods Enzymol.* **225**, 331–342
- Zanchin, N. I. T., and Goldfarb, D. S. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1518–1525
- Zanchin, N. I. T., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D. S. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5001–5015
- Fatica, A., Cronshaw, A. D., Diakic, M., and Tollervey, D. (2002) *Mol. Cell.* **9**, 341–351
- Oliveira, C. C., Gonzales, F. A., and Zanchin, N. I. T. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 4186–4198
- Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7053–7065
- Pleiss, J. A., Whitworth, G. B., Bergkessel, M., and Guthrie, C. (2007) *PLoS Biol.* **5**, e90
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., and Hurt, E. C. (1991) *EMBO J.* **10**, 573–583
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E. C. (1993) *Cell* **72**, 443–457
- Gamsjaeger, R., Liew, C. K., Loughlin, F. E., Crossley, M., and Mackay, J. P. (2006) *Trends Biochem. Sci.* **32**, 63–70
- Ohi, M. D., Kooi, C. W. V., Rosenberg, J. A., Ren, L., Hirsch, J. P., Chazin, W. J., Walz, T., and Gould, K. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 451–460
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999) *Annu. Rev. Genet.* **33**, 261–311
- Nazar, R. N. (2004) *Life* **56**, 457–465

58. Kufel, J., Allmang, C., Petfalski, E., Beggs, J., and Tollervey, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2147–2156
59. Kufel, J., Allmang, C., Verdone, L., Beggs, J., and Tollervey, D. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 6788–6797
60. Preti, M., Guffanti, E., Valinuto, E., and Dieci, G. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 468–473
61. Chan, S. P., Kao, D. I., Tsai, W. Y., and Cheng, S. C. (2003) *Science* **302**, 279–282
62. Arenas, J. E., and Abelson, J. N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11798–11802
63. Martin, A., Schneider, S., and Schwer, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 17743–17750
64. Combs, D. J., Nagel, R. J., Ares, M., Jr., and Stevens, S. W. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 523–534
65. Gavin, A. C., Boeshe, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., and Superti-Furga, G. (2002) *Nature* **415**, 141–147
66. Clark, T. A., Sugnet, S. W., and Ares, M., Jr. (2002) *Science* **296**, 907–910
67. Hall, D. B., Wade, J. T., and Struhl, K. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3672–3679
68. Rudra, D., Mallick, J., Zhao, Y., and Warner, J. R. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4815–4824

SUPPLEMENTAL DATA

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Metabolic labeling of rRNA

Metabolic labeling was performed as described previously (Zanchin et al., 1997). Exponentially growing cultures of strains *CWC24* and $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ were incubated at 30°C for 30 hours in YNB-Glucose medium. Cells were then pulse-labeled for 3 minutes at 30°C with 50 μ Ci of [³H]uracil per ml and chased for up to 1 hour after addition of unlabeled uracil to a final concentration of 300 μ g/ml. At various times samples were taken and quickly frozen. Total RNA was isolated, separated by electrophoresis and blotted as described above. Nylon membranes were incubated in En³Hance (NEN) and submitted to autoradiography.

Co-immunoprecipitation of RNA

Total extract from a yeast strain expressing an N-terminal fusion of Cwc24p with the ZZ domain of *Staphylococcus aureus* protein A, was incubated with IgG-sepharose beads. Bound RNA was extracted as described above, labeled using T4 RNA ligase and ³²P-pCp and separated on 7% polyacrylamide denaturing gel. Total RNA from a yeast strain which expresses ProtA, was used as a control. Alternatively, bound RNA was separated by electrophoresis and analyzed by Northern blot hybridization as described above.

Band-shift assay

Recombinant protein GST and a GST-Cwc24p N-terminal fusion were purified from *E. coli* total cellular extracts and purified by incubation with glutathione-sepharose beads. Different quantities of protein were incubated with 2,5 ng of the ³²P-labelled DNA fragment corresponding to snR17A promoter, for 1 hour in ring binding buffer (50mM Tris-Cl pH 7.5; 50mM KCl; 10% (w/v) glycerol; 0.5mM ZnSO₄; 2mM DTT; 1mM PMSF). Samples were separated on a 6% native polyacrylamide gel, which was dried and analyzed in a Phosphorimager.

LEGENDS TO SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1. Metabolic labeling of rRNA. Pulse-chase labeling with [³H]uracil was performed after incubating $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ and control strain in glucose medium for 30 hours. 20 μ g of total RNA was loaded on agarose gel after [³H]uracil labeling. The figure shows autoradiographs of RNA transferred to nylon membrane. Bands corresponding to major intermediates and mature rRNAs are indicated.

Figure S2. Analysis of pre-rRNA processing by primer extension. Total RNA was extracted from *CWC24* and $\Delta cwc24/GAL1::CWC24$ cells growing in glucose medium for different time intervals and used for primer extension experiments. Primer extension reactions were performed using oligonucleotides P₂ (A), P₈ (B) and P₉ (C), which are complementary to sequences downstream of the cleavage sites A₁, A₂ and A₃, respectively. Bands corresponding to the cleavage sites are indicated on the right-hand side. 5' indicates the 35S pre-rRNA 5'-end.

* indicates reverse transcription pause, probably due to secondary structure in the 5'-ETS sequence. Arrows indicate main longer primer extension products. Relative positions of the primers are indicated in Fig. 4B.

Figure S3. Analysis of Cwc24p interaction with nucleic acids. (A) RNA co-precipitation. Total extracts were obtained from yeast cells expressing either ProtA or ProtA-Cwc24p. Co-immunoprecipitation was carried out using IgG-sepharose. Bound RNA was recovered, labeled with ³²P-pCp, denatured, separated through denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by Phosphorimaging. (B) Co-immunoprecipitation of RNA was also analyzed through Northern blot with probes against U3 snoRNA or 5.8S rRNA. (C) DNA binding *in vitro*. Purified GST or GST-Cwc24p

were incubated with 0.25 ng of uniformly labeled DNA corresponding to the promoter of snR17A, in the absence of presence of cold non-specific competitor (hering sperm DNA), and analyzed through native gel electrophoresis.

Figure S4. Analysis of growth complementation of conditional strain *Δcwc24/GAL1::CWC24* by Cwc24p truncation mutants. *Δcwc24/GAL1::CWC24* strain was transformed with plasmids containing different portions of *CWC24* under control of a constitutive promoter and subjected to growth on glucose plates. A partial clone of *CWC24*, containing the Zn finger and RING domain supports growth of the conditional strain.

Figure S1 Goldfeder and Oliveira

Figure S2 Goldfeder and Oliveira

Figure S4 Goldfeder and Oliveira