**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA DOS SANTOS

**Caracterização funcional da proteína Nop8p de
Saccharomyces cerevisiae.**

**Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5809
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
23/08/2011

MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA DOS SANTOS

**Caracterização funcional da proteína Nop8p de
Saccharomyces cerevisiae.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo
2011

Ao meu avô Leonel Dias dos Santos (*in memoriam*) pelo jeito especial de cativar o meu
amor e admiração e por todos os gestos de carinho que me fazem falta.
Aos meus pais Arlindo Teixeira e Edna Dias pelo excesso de amor e dedicação.
À minha sobrinha e amiga Ana Carolina (Carol).

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos vários milagres feitos na minha vida.

À Professora e Dra. Carla Columbano de Oliveira pela orientação, por toda a assistência intelectual e técnica durante o meu doutorado e iniciação científica, pelo modo empolgado e contagiante de comemorar os resultados e pela compreensão e paciência.

Ao professor Dr. Nilson I. Zanchin por ceder cepas e plasmídeos, e pelas discussões científicas e contribuições intelectuais no artigo.

Aos meus pais Arlindo e Edna pelo exemplo de honestidade e simplicidade, por todo amor e apoio dedicado em todos os momentos da minha vida, pela confiança e compreensão.

Aos meus irmãos, Arnaldo pelo apoio e por todas as palavras de conforto e esperança nos momentos difíceis, e Edson pelo exemplo de fé, calma e pelo excesso de bom-humor nas horas necessárias. À Roseli e à Vanessa pela amizade e respeito. À Carolzinha pelo amor sincero e verdadeiro e por todos os momentos de felicidade e descontração. À minha avó Maria Júlia, à minha prima-irmã Érica Barbosa, à Nathali Rodrigues, à tia Rita, ao tio Guerino e ao Felipe Rodrigues pelo apoio e compreensão.

Aos antigos membros do laboratório Fernando, Celso, Maurício, José Roberto e Daniela pelo convívio. À Raphaela Georg e Juliana Luz pelas discussões científicas, pela amizade construída e por todos os momentos de entretenimento.

À Sheila Garcia pelo convívio saudável, pela ajuda em alguns experimentos e pela amizade. À Bruna Roz e Marcela Bach pelos momentos especiais. Ao melhor amigo que já fiz na vida Carlos Henrique por ser tão especial e amável, uma pessoa rara para toda a vida. Ao Germano pelo convívio e pelo carinho.

Aos membros do laboratório Patrícia, José Galeote, Luciana e Rogério, especialmente à Patrícia pela forma divertida de lidar com os colegas e pelas discussões científicas. À Camila Schroeder pelo auxílio no laboratório, pela amizade e mensagens enviadas diariamente. À Inácia pela ajuda e pelo carinho.

Ao professor e amigo Marcelo Paes de Barros pelo exemplo durante a graduação e por todas as palavras de motivação, ao professor e amigo Fernando Dutra pelo pontapé inicial e pela amizade. Aos inesquecíveis amigos Fábio Di Dário e Vinícius Antônio Dietrich.

Ao professor Dr. Etelvino Bechara pelas conversas inspiradoras, ao professor Dr. Pio Colepicolo pelos aconselhamentos e ao professor Dr. Ronaldo Bento pela amizade e conversas filosóficas. Ao professor Dr. Nilson Assunção pela amizade.

A todos os colegas da pós-graduação e aos amigos do bloco zero, seria impossível citar todos os nomes aqui, especialmente aos amigos Santiago Andrés, Raphael Queiroz (B. C.), Matheus Dias, Guilherme Louzada, Valdir Blasios, Thiago Lopes, Eliezer Stefanello, Valquíria Santos e Maria Fernanda Forni (Fefê). Ao Max Durvale pela ajuda com a formatação da tese e pela amizade.

Ao Matheus Bonatto pela acessoria técnica e à Mariana Duarte pelo auxílio nos experimentos e por dividir bons amigos.

Aos amigos antigos Gary Victor Bascope, Juan Carlos Pierola e Laércio Shiraishi, muito obrigada pelo suporte com a minha saúde e por todo carinho e atenção.

Ao amigo Willard E. Bransky pela amizade e pela agradável visita em um momento tão delicado, ao Andrew, Thomas e Jennifer.

Ao Andrews Brandão pela compreensão, carinho e respeito.

Aos amigos Eduardo Moraes, Eduardo Diniz, Shirley Cristine, Marcel Alexandropous, David Braga, Rafael Nassar, Marcos Suller Garcia, Sabrina Souza, Ricardo Milanez, Odair Ribeiro, Rosimeire Amorim, Juliana Monreal, Daniele e Danila Brandão pelo apoio, carinho e descontração. À Elizabeth Pedrón, Rosângela e Nelci eternas companheiras.

Ao José Carlos Guigueira pelo apoio em algumas tentativas pessoais e pela compreensão, em especial pelo seu jeito acessível e amigo.

À Sayuri pela amizade duradoura e por toda a sua doçura e carinho, à Vanessa Ângela Freitas pela amizade, pelo companheirismo, por compartilhar momentos engraçados e pela amiga confidente e presente nos momentos de aflição e dificuldade.

Ao Douglas Ganini pela amizade e pelo convívio saudável. Ao Ismael pela amizade recente, pela confiança e por compreender minha fase autista enquanto eu escrevia a tese.

Aos amigos Mario Dewey Lee e Eudes pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Instituto de Química, em especial ao Wanderley do protocolo por ser prestativo e agradável.

A FAPESP e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

“O verdadeiro local de nascimento é aquele em que lançamos pela primeira vez um
olhar inteligente sobre nós mesmos.”
Marguerite Yourcenar

RESUMO

Santos, M.C.T. **Caracterização Funcional da proteína Nop8p de *Saccharomyces cerevisiae***. 2011. (95p). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A proteína nucleolar Nop8p de levedura foi identificada inicialmente através de sua interação com Nip7p e está envolvida na formação da subunidade ribossomal 60S. A depleção de Nop8p em células de levedura leva à degradação prematura dos rRNAs, porém o mecanismo bioquímico responsável por este fenótipo ainda não é conhecido. Neste trabalho, mostramos que a interação de Nop8p com o rRNA 5.8S se dá através de sua região amino-terminal, enquanto que a porção carboxi-terminal é responsável pela interação com Nip7p e complementa parcialmente o defeito no crescimento observado na cepa mutante condicional $\Delta nop8/GAL::NOP8$. Além disso, Nop8p media a associação de Nip7p com as partículas pré-ribossomais. Nop8p também interage com a subunidade Rrp6p do exossomo e inibe a atividade do complexo *in vitro*, sugerindo que a diminuição dos níveis da subunidade ribossomal 60S detectada após a depleção de Nop8p pode ser resultado da degradação dos pré-rRNAs pelo exossomo. Estes resultados indicam que Nop8p pode regular a atividade do exossomo durante o processamento do pré-rRNA.

Palavras-chave: Exossomo, processamento de rRNA, Controle de qualidade de RNA, Nip7p, Nop8p, complexo TRAMP.

ABSTRACT

Santos, M.C.T. **Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein Nop8p**. 2011. (95p.). PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The yeast nucleolar protein Nop8p has previously been shown to interact with Nip7p and to be required for 60S ribosomal subunit formation. Although depletion of Nop8p in yeast cells leads to premature degradation of rRNAs, the biochemical mechanism responsible for this phenotype is still not known. In this work, we show that the Nop8p amino-terminal region mediates interaction with the 5.8S rRNA, while its carboxyl-terminal portion interacts with Nip7p and can partially complement the growth defect of the conditional mutant strain $\Delta nop8/GAL::NOP8$. Interestingly, Nop8p mediates the association of Nip7p to pre-ribosomal particles. Nop8p also interacts with the exosome subunit Rrp6p and inhibits the complex activity *in vitro*, suggesting that the decrease in 60S ribosomal subunit levels detected upon depletion of Nop8p may result from degradation of pre-rRNAs by the exosome. These results strongly indicate that Nop8p may control exosome function during pre-rRNA processing.

Keywords: Exosome, rRNA processing, RNA-surveillance, Nip7p, Nop8p, TRAMP-complex.

LISTA DE ABREVIATURAS

β -Gal	β -galactosidase
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
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETS	external transcribed spacer, seqüência espaçadora externa
GAL1	promotor do gene GAL1/YBR020W (galactoquinase) de <i>S. cerevisiae</i>
GFP	proteína verde fluorescente
GST	glutathione-S-transferase
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
ITS	internal transcribed spacer, seqüência espaçadora interna
kb	quilobase
kDa	quilodáton
OD	densidade óptica
PAGE	polyacrilamide gel electrophoresis
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
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 small nucleolar RNAs (processamento de rRNA)

snoRNPs small nucleolar ribonucleoproteins (processamento de rRNA)

SSC solução salina com citrato de sódio

SSPE solução salina com fosfato de sódio e EDTA

SSU small subunit, 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

UTP U three proteins

X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

YNB yeast nitrogen base (meio mínimo para levedura)

YPD yeast extract peptone dextrose (meio rico para levedura)

YPGAL yeast extract peptone galactose (meio rico para levedura)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de plasmídeos utilizados neste estudo.....	32
Tabela 2. Cepas de E. coli utilizadas neste estudo.....	34
Tabela 3. Cepas de levedura utilizadas neste estudo.....	35
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da biogênese de ribossomos em <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 2. Processamento de rRNA em <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 3. Modelo das vias de maturação das subunidades 40S e 60.....	22
Figura 4. Modelo do exossomo em levedura e humanos.....	27
Figura 5. Alinhamento de sequência de Nop8p em levedura, camundongos e humanos.....	45
Figura 6. Análise de complementação da cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8$ pelas versões truncadas de Nop8p, N-Nop8p e C-Nop8p.....	47
Figura 7. Análise do processamento de rRNA na cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8$ e na expressão das porções N- e C-terminal de Nop8p.....	50
Figura 8. Análise do processamento de rRNA na cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8$ e na expressão das porções N- e C-terminal de Nop8p por <i>Primer Extension</i>	53
Figura 9. Análise da proteína Nop8p recombinante com RNA <i>in vitro</i>	55
Figura 10. Coimunoprecipitação de RNAs com A-Nop8p e as versões truncadas da proteína.....	56
Figura 11. Mapeamento das regiões de interação entre Nop8p e Nip7p.....	58
Figura 12. Análise de perfil polissomal na cepa $\Delta nop8$ e na expressão dos mutantes de deleção.....	60
Figura 13. Análise da associação de Nip7p ao pré-60S na cepa $\Delta nop8$ e na expressão dos mutantes de deleção.....	62
Figura 14. Análise da interação entre Nop8p e Rrp6p.....	64
Figura 15. Análise de interação de Nop8p com as proteínas do complexo TRAMP.....	66
Figura 16. Análise dos rRNAs poliadenilados na cepa $\Delta nop8$ e na expressão dos mutantes de deleção.....	68
Figura 17. Co-precipitação dos complexos BoxC/D e Exossomo.....	71
Figura 18. Ensaio de atividade de RNase do exossomo <i>in vitro</i> na presença de Nop8p e Nip7p.....	72
Figura 19. Ensaio de atividade de RNase de Rrp6p <i>in vitro</i> na presença de Nop8p.....	74

Figura 20. Análise da interação de Nop8p com Rrp3p.....	76
Figura 21. Análise da localização subcelular de Rrp3p na ausência de Nop8p..	77
Figura 22. Modelo do processamento de rRNA na presença de Nop8p.....	83
Figura 23. Modelo do processamento de rRNA na ausência de Nop8p.....	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Processamento do pré-rRNA.....	17
1.2 Maturação da subunidade ribossomal 40S	21
1.3 Maturação da subunidade ribossomal 60S	21
1.4 Modificações covalentes no pré-rRNA	23
1.5 Fatores envolvidos na biogênese dos ribossomos	24
Nip7p	24
Nop8p	25
Exossomo	25
Complexo TRAMP	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Construção de Plasmídeos.....	31
3.2 Sequenciamento	31
3.3 Transformação de bactérias	32
3.3.1 Transformação de células competentes pelo método de PEG	33
3.3.2 Eletroporação	33
3.3.3 Transformação de células competentes pelo choque térmico	33
3.4 Transformação de Levedura.....	34
3.4.1 Transformação rápida de Levedura com acetato de lítio	34
3.5 Ensaio de duplo híbrido	34
3.5.1 Teste de Atividade de β -Galactosidase	35
3.6 Ensaios de complementação da função de Nop8p	36
3.7 Co-imunoprecipitação de proteínas	37
3.7.1 Quantificação de proteínas utilizando ácido bicínico	37
3.7.2 SDS-PAGE	37
3.7.3 Western Blot	37
3.8 Análise do processamento de rRNA através de Northern Blot.....	38
3.9 Análise do processamento de rRNA por Primer Extension	39
3.10 Co-imunoprecipitação de RNA	39
3.11 Análise quantitativa de RNA por qPCR	40

3.12 Expressão e purificação de proteínas	40
3.13 Ligação ao RNA in vitro	41
3.14 Gradiente de Polissomos.....	41
3.15 Ensaio de interação entre proteínas in vitro – pull down	42
3.16 Purificação de Complexos pela metodologia do Tap-Tag	42
3.17 Ensaio de RNase	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Análise de possíveis domínios estruturais de Nop8p	44
4.2 A porção C-Terminal de Nop8p é essencial para a função da proteína	46
4.3 Efeito da expressão das porções N- e C-Terminal de Nop8p no processamento de rRNA	48
4.4 Na ausência de Nop8p os rRNAs são degradados no sentido 3'→5'	51
4.5 Nop8p interage com RNA in vitro e associa ao pré-rRNA in vivo.....	54
4.6 A região C-terminal de Nop8p é importante para a interação com Nip7p ..	57
4.7 Análise da expressão de Nop8p e dos mutantes de deleção N-Nop8 e C-Nop8p na produção de ribossomos	59
4.8 C-Nop8p media associação de Nip7p ao pré-60S	61
4.9 Nop8p interage com a subunidade Rrp6p do exossomo.....	63
4.10 Nop8p interage com proteínas do complexo TRAMP e associa diretamente a subunidade Trf4p.....	65
4.11 Nop8p está envolvida na estabilidade de rRNAs poliadenilados	67
4.12 Nop8p inibe a atividade do exossomo in vitro	69
4.13 Nop8p modula a atividade de RNase da subunidade Rrp6p do exossomo	73
4.14 Nop8p interage com a helicase Rrp3p e é importante para a localização de Rrp3p no nucléolo.....	75
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÃO.....	84
7. REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

A biogênese dos ribossomos é uma das mais importantes atividades celulares e envolve processos altamente complexos e dinâmicos. Esse processo evolutivamente conservado tem sido intensivamente estudado em *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo modelo para estudos em eucariotos (Eichler and Craig, 1994; Gerbi and Borovjagin, 2004).

Em eucariotos, a síntese das subunidades ribossomais é iniciada no nucléolo, um sub-compartimento nuclear, onde os RNAs ribossomais (rRNAs) são transcritos e a partir de onde são processados, modificados covalentemente e associados a um grande número de fatores de processamento e proteínas ribossomais. Os rRNAs de *S. cerevisiae* (18S, 5.8S, 25S e 5S) são codificados por um fragmento de rDNA de 9,1Kb que se repete de 100 a 200 vezes no braço longo do cromossomo XII (Kressler et al., 1999). Três rRNAs, 18S, 5.8S e 25S, são transcritos pela RNA polimerase I como um precursor primário denominado pré-rRNA 35S/47S (levedura/mamíferos), enquanto o pré-rRNA 5S é transcrito independentemente pela RNA polimerase III (Figura1)(Kressler et al., 1999; Nomura et al. 2004; Venema & Tollervey, 1999). A transcrição das cópias dos genes que codificam os rRNAs e dos genes que codificam as r-proteínas deve ocorrer de maneira coordenada (Warner, 1999), de modo que, ao fim do processo as subunidades ribossomais maduras 40S e 60S estejam aptas para a tradução dos mRNAs (Kressler et al., 2010).

1.1 Processamento do pré-rRNA 35S

No pré-rRNA 35S, os rRNAs maduros são separados por dois espaçadores internos, ITS1 e ITS2, e flanqueados por dois espaçadores externos, 5'ETS e 3'ETS (Figura 2). A associação do pré-rRNA 35S com proteínas ribossomais e diversos fatores de processamento formam a partícula pré-ribossômica 90S (Figura 2). O processamento do pré-rRNA 35S e a maturação das subunidades ribossomais é feita através de uma série de modificações covalentes e de clivagens endo e exo-nucleolíticas, gerando as subunidades ribossomais maduras 40S e 60S (Grandi et al., 2002; Granneman and Baserga, 2004; Planta, 1997; Leary and Huang, 2001).

O processo de maturação do pré-rRNA inicia-se com as clivagens nos sítios A₀, A₁ e A₂, que envolvem a participação dos snoRNPs U3, U14, snR10 e snR30, além de

Figura 1. Modelo da biogênese de ribossomos em *S. cerevisiae*. O pré-rRNA 35S é transcrito pela RNA polimerase I enquanto o rRNA 5S é transcrito pela RNA polimerase III. Após clivagem no sítio A2 as partículas pré-40S e pré-60S são formadas, e a maturação final da subunidade 40S ocorre no citoplasma, através da clivagem no sítio D. O maturação da subunidade ribossomal 60S sofre vários passos de processamento no núcleo, retirado de *Kressler et al., 2010*.

várias proteínas (Kressler et al., 1999; Dutca et al., 2011), através dessas clivagens iniciais são gerados os rRNAs intermediários, 20S e 27S. O pré-rRNA 20S compõe a partícula pré-ribossomal 43S, que é exportada para o citoplasma onde o pré-rRNA 20S é clivado no sítio D para formar o rRNA maduro 18S (Grandi et al., 2002; Granneman and Baserga, 2004; Planta, 1997; Leary and Huang, 2001; Stevens et al., 1991; Moy and Silver 1999; Lamanna and Karbstein, 2009). A depleção de várias proteínas parece interferir na maturação do rRNA 18S, acumulando um intermediário de 23S, e conseqüentemente afetando a formação da subunidade ribossomal 40S (Girard et al., 1992; Dunbar et al., 1997; Jansen et al., 1993; O'day et al., 1996; Lamanna and Karbstein, 2009; Goldfeder and Oliveira, 2010).

O processamento do rRNA intermediário 27SA₂ pode ocorrer por duas vias alternativas (Figura 2), na maioria dos casos inicia com a clivagem no sítio A₃ pela RNase MRP (Chu et al., 1994; Schmitt & Clayton, 1993; Lygerou et al., 1996), acompanhada por digestão exonucleolítica 5'→3' a partir do sítio B1_S, gerando o intermediário 27SB_S. O pré-rRNA 27SB_L pode ser gerado por processamento no sítio B1_L. Ambos pré-rRNAs são subseqüentemente processados de maneira idêntica, através de clivagem endonucleolítica no sítio C₂ do espaçador interno ITS2, produzindo os pré-rRNAs 25.5S e 7S (Kressler et al., 1999; Amberg et al., 1992; Henry et al., 1994; Dichtl et al., 1997; Petfalski et al., 1998; Villa et al., 1998; Qu et al., 1999).

A maturação da extremidade 5' do pré-rRNA 25.5S é predominantemente dependente da atividade da exonuclease Rat1p, porém esses nucleotídeos também podem ser removidos menos eficientemente pela atividade da exonuclease Xrn1p (Geerlings et al., 2000). Do mesmo modo, a maturação 5' do rRNA 5.8S_s requer a atividade das exonucleases Xrn1p e Rat1p (Henry et al., 1994), enquanto que a extremidade 3' do rRNA 5.8S sofre digestão exonucleotídica 3'→5' pelo exossomo (Mitchell et al., 1997).

Além das reações de clivagem endo- e exonucleolíticas para a remoção dos espaçadores, a maturação dos rRNAs também envolve modificações covalentes que incluem a isomerização das uridinas em pseudouridinas e adição de grupos metila na posição 2'O da ribose de nucleotídeos específicos (Venema & Tollervey, 1999; Kressler et al., 1999).

Figura 2. Processamento do rRNA em *S. cerevisiae*. O pré-rRNA 35S sofre processamento em diversos sítios de clivagem, gerando como intermediários os pré-rRNA 20S, pré-rRNA 27S e pré-rRNA 7S. A clivagem em A2 leva à separação entre o rRNA 20S, que origina o rRNA 18S e o pré-rRNA 27S. Este último origina os rRNAs 5.8S e 25S. A associação do pré-rRNA 35S com as proteínas necessárias para o processamento gera a partícula pré-ribossomal 90S, após a clivagem em A2, as partículas pré-40S e pré-60S são formadas. Retirado de *Henras et al., 2008*.

1.2 Maturação da subunidade ribossomal 40S

A montagem da subunidade ribossomal 40S é iniciada durante a transcrição com a associação dos componentes do SSU processomo ao pré-rRNA. O SSU processomo é composto por aproximadamente 20 proteínas não ribossomais (UTPs), o snoRNA U3, o pré-rRNA 35S e algumas proteínas da subunidade ribossomal 40S (Perez-Fernandez et al., 2007).

A associação das UTPs ao pré-rRNA ocorre de maneira coordenada, permitindo a formação de sub-complexos denominados UTP-A, UTP-B e UTP-C (Figura 3) (Dutca et al., 2011). O subcomplexo UTP-A se liga ao pré-rRNA no início da transcrição, em seguida, o snoRNA U3 é trazido pelas proteínas do subcomplexo UTP-B e pareia com o pré-rRNA, permitindo a associação do sub-complexo Mpp10 e UTP-C (Dutca et al., 2011; Kressler et al., 2010).

O snoRNA U3 apresenta sequências que pareiam com o 5'ETS e com a extremidade 5' do rRNA 18S, esta associação é importante para direcionar as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S nos sítios A₀, A₁ e A₂. Após as clivagens iniciais, a composição das partículas pré-ribossomais 40S é alterada, com a dissociação dos fatores de processamento e o recrutamento das proteínas ribossomais. Essa nova partícula pré-ribossomal é transportada para o citoplasma onde ocorre a clivagem no sítio D do pré-rRNA 20S e maturação da subunidade ribossomal 40S (Dutca et al., 2011) (Figura 3). Muitos fatores estão envolvidos no processamento do sítio D, como Nob1p, Rio1p, Rio2p, Tsr1p e Fap7p, mutantes dos quais causam acúmulo do pré-rRNA 20S (Fatica et al., 2003; Granneman et al., 2005; Vanrobays et al., 2003; Gelperin et al., 2001). Estudos recentes revelam que Nob1p é a endonuclease responsável pela clivagem no sítio D, gerando a extremidade 3' madura do rRNA 18S, uma reação catalisada através de seu domínio PIN de endonuclease (Lamanna and Karbstein, 2009).

1.3 Maturação da subunidade ribossomal 60S

A maturação da subunidade ribossomal 60S envolve mais passos de processamento, uma vez que o pré-rRNA 27S é processado para dar origem aos rRNAs maduros 25S e 5.8S (Formont-Racine et al., 2003). O processamento do pré-rRNA 27S inclui clivagens endo e exonucleolíticas, além de contar com mais de 70 proteínas que participam de etapas diferentes do processamento e, portanto, se

Figura 3. Modelo 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 a clivagem no sítio D, no citoplasma. A maturação da subunidade 60S é mais complexa, envolvendo partículas pré-60S com diferentes composições (inicial, intermediária e tardia), que são processadas e transportadas do nucléolo para o núcleo. Retirado de *Framont-Racine et al., 2003*.

associam a complexos pré-60S em diferentes estágios de maturação: inicial, intermediário e tardio (Nissan et al., 2002; Formont-Racine et al., 2003; Henras et al., 2008), conforme ocorre a maturação, há a migração das partículas do nucléolo para o nucleoplasma (Figura 3) (Nissan et al., 2002; Formont-Racine et al., 2003).

Através dos estudos de co-precipitação de complexos pré-ribossomais é possível isolar sucessivas partículas do pré-60S. As partículas do pré-60S na etapa inicial do processamento, foram purificadas utilizando a proteína Ssf1p como isca, e contêm uma mistura dos pré-rRNAs 27SA e 27SB, proteínas ribossomais e aproximadamente 30 fatores de processamento que se associam ao pré-rRNA logo após a clivagem em A₂ (Fatica et al., 2002). A partícula intermediária foi purificada através da proteína Nsa1p, esta partícula ainda nucleolar, possui a proteína Rpf2p, que junto com Rrs1p recruta o complexo RNP 5S (5S e Rpl5p) e Rpl11p ao pré-60S (Zhang et al., 2007). A transição do nucléolo para o nucleoplasma desencadeia a maior mudança observada na composição dos complexos, essas partículas foram identificadas através da co-purificação com a proteína Rix1p, nesta partícula o pré-rRNA 27S já foi completamente processado a 25S e 7S/5.8S (Nissan et al., 2002) e algumas proteínas de transporte da subunidade ribossomal já se associam, como o complexo Arx1p-Alb1p (Kressler et al., 2010). As partículas tardias são consideradas partículas competentes para a exportação, e são recrutadas por Nmd3p e pelo heterodímero Mex67p-Mtr2p, essas partículas estão presentes tanto no núcleo quanto no citoplasma. No citoplasma, a partícula pré-60S sofre a liberação de Arx1p pelas proteínas Sdo1p e Efl1p, e torna-se capaz de associar a subunidade 40S (Kressler et al., 2010).

1.4 Modificações covalentes no pré-rRNA

As modificações nucleolíticas que ocorrem durante o processamento do pré-rRNA são direcionadas por snoRNPs (small nucleolar ribonucleoproteins), que selecionam os nucleotídeos através de pareamento de bases entre os snoRNAs (small nucleolar RNAs) e o substrato de rRNA. Os snoRNPs envolvidos nas modificações de rRNA podem ser divididos em duas grandes classes: snoRNPs de box C/D e snoRNPs de box H/ACA.

Box C/D snoRNPs: responsáveis por clivagem e metilação do pré-rRNA. Em *S. cerevisiae*, os rRNAs são metilados em 65 posições, das quais 55 são na posição 2'-

O-ribose por snoRNAs e os outros 10 são metilados nas bases. Os snoRNPs desta família

são compostos por snoRNAs contendo seqüências conservadas denominadas de “boxes” C e D, e seqüências complementares aos rRNAs, e por pelo menos quatro proteínas: Nop1p, Nop56p, Nop58p e Snu13p (Kressler et al., 1999). O snoRNA U3 é exclusivamente requerido para processamento nos sítios A_0 e A_1 , enquanto o snoRNA U14 está envolvido nas reações de processamento nos sítios A_1 e A_2 do pré-rRNA e na metilação do rRNA 18S (Lafontaine & Tollervey, 1999).

Box H/ACA snoRNPs: responsáveis pela isomerização de uridina em pseudouridina, modificando aproximadamente 45 nucleotídios nos rRNAs de *S. cerevisiae*. Os snoRNAs de box H/ACA estão associados às proteínas Cbf5p, Gar1p, Nhp2p e Nop10p (Maxwell et al., 1995; Kressler et al., 1999). Dessas, Cbf5p é a pseudouridina sintase e as outras 3 são responsáveis por mediar interações proteína-RNA para montagem e estabilização do complexo; (Kressler et al., 1999; Maxwell et al., 1995). O snoRNP de box H/ACA snR30 também está envolvido nas clivagens nos sítios A_1 e A_2 no pré-rRNA 35S (Kressler et al., 1999; Bonhsack et al., 2008).

1.5 Fatores envolvidos na biogênese da subunidade ribossomal 60S

A maturação da subunidade ribossomal 60S conta com a participação de aproximadamente 70 proteínas não-ribossomais. À medida que a maturação da subunidade 60S ocorre, diferentes partículas do pré-60S são formadas através da associação coordenada dessas proteínas (Nissan et al., 2002; Formont-Racine et al., 2003). Os papéis dessas proteínas na biogênese da subunidade 60S ainda não foram completamente esclarecidos, mas acredita-se que essas proteínas possam estabilizar estruturas do complexo ou o pré-rRNA, além de direcionar a associação de fatores tardios de processamento (Chen, 2001). Diversos fatores de *S. cerevisiae* já foram caracterizados, e se associam ao pré-60S durante a maturação da subunidade ribossomal maior (Zanchin et al., 1997; Rosado et al., 2006; Granato et al., 2005; de la Cruz et al., 2004; Rosado and de la Cruz, 2004).

Nip7p

Dentre os fatores que se associam ao pré-60S está Nip7p, uma proteína essencial evolutivamente conservada que participa do processamento do intermediário

27S (Zanchin et al., 1997). Nip7p está concentrada no nucléolo, porém também é encontrada no nucleoplasma associada à subunidade ribossomal pré-60S. Esses dados sugerem que Nip7p participe de várias etapas de maturação da subunidade 60S (Zanchin et al., 1997). Através de ensaios de duplo-híbrido e *protein pull down* foram encontradas as interações de Nip7p com a subunidade do exossomo Rrp43p e com a proteína nucleolar Nop8p (Zanchin and Goldfarb, 1999).

Nop8p

A proteína nucleolar Nop8p faz parte do complexo pré-60S e está envolvida na maturação da subunidade 60S (Zanchin and Goldfarb, 1999). A interação observada entre as proteínas Nop8p e Nip7p (Zanchin and Goldfarb, 1999) é conservada evolutivamente, tendo sido também detectada entre as ortólogas humanas NOP132 e hNIP7 (Sekiguchi et al., 2006; Sekiguchi et al., 2004). Recentemente, foram descritos dados de interação de Nop8p com diversos outros fatores envolvidos no processamento da subunidade ribossomal 60S (Rosado et al., 2007; de la Cruz et al., 2004; Rosado and de la Cruz, 2004).

A depleção de Nop8p leva à diminuição dos níveis da subunidade ribossomal 60S na célula, devido ao processamento mais lento do pré-rRNAs 35S e 23S e redução da síntese do rRNA maduro 25S (Zanchin and Goldfarb, 1999; Zanchin et al., 1997; Berges et al., 1994; Daugeron et al., 1998; Gautier et al., 1997; Hong et al., 1997; Sun et al., 1994; Weaver et al., 1997). Porém, a depleção de Nop8p não causa acúmulo do rRNA intermediário 27S, o que sugere que os defeitos na biogênese da subunidade ribossomal 60S estejam relacionados com a degradação do pré-27S ou do 25S (Zanchin and Goldfarb, 1999).

Em humanos, NOP132 interage com proteínas da família da Proteína G RRAG A e RRAG D e com as helicases DDX47 e DDX18. NOP132 é importante para a correta localização nucleolar da helicase DDX47 (Sekiguchi et al., 2006), que é ortóloga da proteína de levedura Rrp3p, envolvida no processamento de rRNA (O'day et al., 1996).

Exossomo

O exossomo também está envolvido em processamento de rRNA e é um complexo com atividade exoribonucleolítica 3'→5', conservado desde archaea até

humanos, composto por 11 subunidades em *S. cerevisiae*: Rrp4p, Rrp6p, Rrp40p, Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p e Csl4p (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999a, 1999b, 2000; Lykke-Andersen et al., 2011). Em levedura, 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. (Figura 4) (Rrp4p, Rrp40p e Csl4p; Mitchell et al., 1997; Luz et al., 2007). Embora este complexo possua seis 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). Recentemente, foi caracterizado um domínio PIN na região amino-terminal de Rrp44p, responsável pela atividade adicional de endonuclease desta enzima (Lebreton et al., 2008).

Recentes estudos com o exossomo de humanos revelam a presença de mais uma subunidade naquele complexo, hDIS3-Like, uma proteína homóloga a Rrp44p (hDIS3) que possui todos elementos estruturais de Rrp44p (hDIS3), inclusive o domínio PIN (Figura 4), estudos de co-purificação do complexo em humanos, mostrou que ambas as proteínas se associam com o exossomo, porém a associação de hDIS3L ao complexo é mais estável. Estudos de localização mostraram que hDIS3 está localizada no núcleo e citoplasma, enquanto hDIS3L está restrita apenas ao exossomo citoplasmático (Figura 4) (Tomecki et al., 2010; Lykke-Andersen et al., 2011).

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). 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., 1999), 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).

Existem dois tipos de substratos para o exossomo, aqueles que serão

Figura 4. Modelo do exossomo em levedura e humanos. Em levedura apenas duas subunidades do exossomo possuem atividade catalítica, Rrp6p e Rrp44p, porém a proteína Rrp6p está presente apenas no núcleo. Em humanos, o exossomo possui diferentes isoformas. No núcleo, o complexo é formado pelas proteínas do *core* e pela subunidade catalítica hRRP6. No nucleoplasma, o exossomo está associado as subunidades hRRP6 e hDIS3, enquanto no citoplasma temos as isoformas associadas as subunidades hRRP6 e hDIS3 ou hRRP6 e hDIS3L.. Retirado de *Likke-Andersen et al., 2011*.

processados na extremidade 3', como o pré-rRNA 7S, ou as moléculas de RNA defeituosas geradas por erros na transcrição ou defeitos nas etapas de processamento, como pré-tRNAs que não foram processados corretamente, o rRNA 5S truncado, mRNAs defeituosos e intermediários aberrantes da via de processamento de rRNA (Anderson et al., 2009; Houseley and Tollervey, 2009). Uma questão importante no controle de qualidade de RNAs na célula é como esses RNAs são reconhecidos como moléculas aberrantes e são direcionadas para a maquinaria de degradação. Acredita-se que a diferença entre substratos que serão processados e substratos que serão degradados são os sinais presentes na molécula de RNA e a sua associação com proteínas específicas (La Cava and Tollervey, 2006). Várias proteínas já foram descritas como co-fatores do exossomo nas etapas de controle de RNAs na célula. O complexo Ndr1p-Nab3p está envolvido no controle de qualidade de transcritos das RNA polimerases II e III (Thiebaut et al., 2006; Wlotzka et al., 2011), Mpp6p é um co-fator importante nos processos de degradação de RNAs não codificadores (ncRNAs) (Milligan et al., 2008) e Rrp47p está relacionada com o controle de qualidade de mRNAs, snoRNAs e rRNA (Butler and Mitchel, 2011; Costello et al., 2011).

Trabalhos recentes sugerem que algumas proteínas que participam do processamento de rRNA atuam como co-fatores do exossomo e controlam a atividade do complexo. Ensaio *in vitro* realizados com proteínas de *Pyrococcus abyssi*, demonstram que as ortólogas de Nip7p e Sdo1p (PaNip7 e PaSBDS, respectivamente) afetam a atividade do exossomo (Pa-exossomo). PaSBDS e PaNip7 inibem o exossomo, embora a inibição por PaNip7 seja muito mais forte (Luz et al., 2010). Em levedura, a proteína nucleolar Nop53p participa do processamento do pré-rRNA 7S ativando o exossomo (Granato et al., 2008).

Complexo TRAMP

O exossomo também se associa com o complexo nuclear TRAMP, responsável pela poliadenilação de RNAs que serão destinados à degradação (Kadaba et al., 2004; LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wyers et al., 2005). O TRAMP é composto por uma poli(A) polimerase (Trf4p ou Trf5p), uma RNA helicase dependente de ATP (Mtr4p), e uma proteína que liga RNA (Air1p ou Air2p) (LaCava et al., 2005). O modelo de interação entre o exossomo e o TRAMP sugere que o TRAMP reconheça RNAs aberrantes por interação com proteínas e adicione uma cauda de poli-A aos RNAs que

necessitam ser degradados. Estruturas secundárias em RNAs inibem sua degradação pelo exossomo. No entanto, ao sintetizar uma cauda de poli-A, o TRAMP forma uma extensão de fita simples na extremidade 3' desses RNAs, o que possibilita a degradação do RNA pelo exossomo (Hamill et al., 2010). Além disso, a degradação desses RNAs pelo exossomo é estimulada pela presença da helicase Mtr4p que auxilia o exossomo nas etapas de degradação (Schneider et al., 2007; Hamill et al., 2010; Jia et al., 2011; Bernstein et al., 2008).

Apesar de vários fatores de processamento de pré-rRNA já terem sido identificados, muito ainda falta para a caracterização funcional desses fatores e para a determinação das etapas em que eles estão envolvidos. O defeito no processamento direciona os pré-rRNAs para a via de controle de qualidade, na qual o exossomo e o complexo TRAMP desempenham papéis diretos. Embora tenha sido identificada dentre as proteínas envolvidas na maturação da subunidade ribossomal 60S, tem-se pouca informação a respeito da função molecular de Nop8p. Os dados mostrando que a depleção de Nop8p leva a uma desestabilização do pré-rRNA 27S, entretanto, indicavam uma possível interação funcional entre Nop8p e o exossomo. Este trabalho teve como objetivo principal a determinação da função de Nop8p no processamento de pré-rRNAs e de sua possível interação com o exossomo.

2. OBJETIVOS

Com base nos dados de participação de Nop8p no processamento do pré-rRNA 27S e de sua importância para a estabilidade deste rRNA, o objetivo geral deste trabalho foi a caracterização funcional da proteína Nop8p de *Saccharomyces cerevisiae*, investigando seu papel na estabilidade e controle de qualidade dos rRNAs.

Objetivos específicos:

- Obtenção de mutantes de deleção de Nop8p para análise da contribuição das porções desta proteína para sua função;
- Análise da importância de Nop8p na associação de Nip7p ao complexo pré-60S;
- Análise da interação de Nop8p com as proteínas do exossomo;
- Análise do efeito de Nop8p na atividade do exossomo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção de plasmídeos

Os plasmídeos usados neste estudo foram construídos de acordo com as técnicas de clonagem descrita por Sambrook et al., 1989 e estão descritos na Tabela 1. Para a construção de pET-NOP8 e pGEXT-NOP8, o fragmento de DNA que codifica o gene de NOP8 foi retirado do vetor pGFP-NOP8 (Zanchin and Goldfarb, 1999) digerido com BamHI e XhoI e inserido nos vetores pET-28a (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and pGEXT-4T1 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) digeridos com a mesma enzima. Para construção dos mutantes de deleção N-Nop8p e C-Nop8p, o plasmídeo pGFP-NOP8 (Zanchin and Goldfarb, 1999) foi clivado com BamHI, HincII e XhoI, resultando em dois fragmentos codificando a região amino-terminal de Nop8p (aminoácidos 1-219), e a região carboxi-terminal de Nop8p (aminoácidos 221-484). Os fragmentos foram clonados nos vetores pGADC₁ (James et al., 1996), pBTM116 (Bartel and Fields, 1995). Os fragmentos de DNA que codificam as porções amino- e carboxi-terminal de Nop8p foram amplificados por PCR, digeridos com BamHI e XhoI e inseridos nos vetores pUG34 (Gueldener and Hegemann, não publicado), pGEXT-4T1 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e Ycplac33GAL-A, fusionado ao *tag* de proteína A, sob controle do promotor de *GAL1*.

Para a construção pGEXT-RRP3 e pGADC-RRP3, o fragmento de DNA RRP3 foi amplificado por PCR e inserido no vetor pGEMT-Easy (Promega), o gene RRP3 foi retirado com as enzimas EcoRI e Sall e subclonado nos vetores pUG34 (Gueldener and Hegemann, não publicado), pGEXT-4T1 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e pGADC₁ (James et al., 1996) tratados com as mesmas enzimas.

3.2 Sequenciamento

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

Tabela 1. Lista de plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características relevantes	Referência
pBTM116	<i>lexA</i> DNA binding domain, <i>TRP1</i> , 2 μ m	Bartel and Fields, 1995
pBTM–NOP8	<i>lexA::NOP8</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Zanchin et al., 1999
pBTM–N–NOP8	<i>lexA::N–NOP8</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este Estudo
pBTM–C–NOP8	<i>lexA::C–NOP8</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Este Estudo
pGAD	<i>GAL4</i> activation domain, <i>LEU2</i> , 2 μ m	Halladay and Craig, 1996
pACT–NOP8	<i>GAL4::NOP8</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Zanchin et al., 1999.
pACT–N–NOP8	<i>GAL4::N–NOP8</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este Estudo
pACT–C–NOP8	<i>GAL4::C–NOP8</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este Estudo
pET28a–NOP8	<i>His6::NOP8</i> , <i>KanR</i>	Este Estudo
pGEX4T1–NOP8	<i>GST::NOP8</i> , <i>AmpR</i>	Este Estudo
pGEX4T1–N–NOP8	<i>GST::N–NOP8</i> , <i>AmpR</i>	Este Estudo
pGEX4T1–C–NOP8	<i>GST::C–NOP8</i> , <i>AmpR</i>	Este Estudo
pUG34	<i>MET25::yEGFP3</i> , <i>CEN6</i> , <i>HIS3</i>	U. Guedener & J. H. Hegemann, unpublished
pUG34–NOP8	<i>MET25::yEGFP3–NOP8</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Este Estudo
pUG34–N–NOP8	<i>MET25::yEGFP3–N–NOP8</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Este Estudo
pUG34–C–NOP8	<i>MET25::yEGFP3–C–NOP8</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Este Estudo
YCp33GAL–A	<i>GAL1::PROTA</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	Granato et al., 2005
YCp33GAL–A–NOP8	<i>GAL1::PROTA–NOP8</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	Este Estudo
YCp33GAL–A–N–NOP8	<i>GAL1::PROTA–N–NOP8</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	Este Estudo
YCp33GAL–A–C–NOP8	<i>GAL1::PROTA–C–NOP8</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	Este Estudo
pET28a–NIP7	<i>His6::NIP7</i> , <i>KanR</i>	Coltri et al., 2007
pET28a–NOP53	<i>His6::NOP53</i> , <i>KanR</i>	Granato et al., 2008
pET28a–NOP17	<i>His6::NOP17</i> , <i>KanR</i>	Gonzales et al., 2005
pGEX4T1–RRP6	<i>GST::RRP6</i> , <i>AmpR</i>	Granato et al., 2008
pGEX4T1–RRP3	<i>GST::RRP3</i> , <i>AmpR</i>	Este Estudo
pGADC–RRP3	<i>GAL4::RRP3</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este Estudo
pGADC–MTR4	<i>GAL4::MTR4</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Granato et al., 2008
pGADC–TRF4	<i>GAL4::TRF4</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Granato et al., 2008
pGADC–AIR1	<i>GAL4::AIR1</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este Estudo
pGADC–AIR2	<i>GAL4::AIR2</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	Este Estudo
pUG34–RRP3	<i>MET25::yEGFP3–RRP3</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i>	Este Estudo
pBTM–RRP6	<i>lexA::RRP6</i> , <i>TRP1</i> , 2 μ m	Luz et al., 2007.

3.3 Transformação de bactéria

As reações de ligação foram realizadas a 16°C overnight, o DNA ligado foi inserido em cepas competentes de *E. coli* DH5 α pelo método de PEG ou eletroporação, e posteriormente as células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo LB. Os clones obtidos para expressão de proteínas recombinantes, foram transformados na cepa de *E. coli* BL21 DE3 RIL através da metodologia do choque térmico em tampão de cloreto de cálcio. As cepas de bactéria utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 2, os meios de cultura e soluções para bactérias foram preparados segundo protocolos de Sambrook et al. 1989.

3.3.1 Transformação de células bacterianas competentes pelo método de PEG

O DNA proveniente de reação de ligação ou 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 12.000 rpm por 1 minuto, ressuspensas em 100 μ L de meio LB e plaqueadas em meio LB seletivo.

3.3.2 Eletroporação

Segundo Dower et al. (1988). Cultura de bactérias crescendo a 37°C até uma OD₆₀₀ de 0,6 foi concentrada e conservada em glicerol 10% a -80 °C. Para a transformação, células foram eletroporadas com DNA plasmidial com o *Gene Pulser* e o *Pulse Controller* (BIO-RAD), ajustando o Gene Pulser com uma capacitância de 25 μ FD e uma voltagem de 2,50 kV em cubetas de 0,2 cm, e o Pulse Controller a uma resistência de 200 Ω .

3.3.3 Transformação de células bacterianas competentes pelo método de Cloreto de cálcio

Método utilizado como descrito por Cohen et al. (1972). Bactérias foram incubadas a 37°C por 2 horas até uma OD₆₀₀ 0,6 (cultura em fase logarítmica), centrifugadas e ressuspensas em 0,1 M de CaCl₂ gelado. 50 ng de DNA plasmidial exógeno foi adicionado à suspensão de células, que foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos. Posteriormente, as células transformantes foram plaqueadas em meio seletivo.

Tabela 2. Cepas de *E. coli* utilizadas

Cepa	Características relevantes	Referência
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F– <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB– mB–) <i>dcm</i> + Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Camr]	Stratagene
DH5 α	<i>supE</i> 44 Δ <i>lacU</i> 169 (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> 1 <i>relA</i> 1	Hanahan, 1983

3.4 Transformação de levedura

Cepas de levedura utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 3. As cepas foram mantidas em meio rico de extrato de levedura e peptona (YP) ou em meio mínimo (YNB) segundo Sherman et al., (1986). Glicose ou galactose foram adicionados como fonte de carbono para uma concentração final de 2%. Cepas de levedura foram transformadas pelo método de transformação rápida de leveduras com acetato de lítio (Sherman et al., 1986).

3.4.1 Transformação rápida de *S. cerevisiae* com acetato de lítio e DTT

Como descrito por Chen et al, 1992, células crescendo a 30°C com constante agitação por 18 horas até atingir fase estacionária (OD₆₀₀ $\geq$ 1,0) foram lavadas com TE e em seguida ressuspensas em solução de LiAc-PEG-DTT (0,2 M acetato de lítio, 50% PEG, 1M DTT). A esta suspensão de células foram adicionados 2-5 μ g de DNA plasmidial, seguido por incubação a 42°C por 30 minutos. Imediatamente depois, as células foram plaqueadas em meio seletivo.

3.5 Ensaio de duplo híbrido

A cepa L40 (Tabela 3), usada nos ensaios de duplo-híbrido (Vojtek & Hollenberg, 1995), contém os genes *HIS3* de levedura e *lacZ* de *E.coli* como repórteres para a

interação do duplo-híbrido integrados no seu genoma. A cepa L40 foi transformada com os plasmídeos do sistema de duplo híbrido (pBTM -codifica uma proteína híbrida composta por um domínio lexA de ligação à DNA e pGAD – codifica o domínio de ativação da transcrição de *GAL4*) contendo os genes de interesse. Os transformantes foram plaqueados diretamente em meio YNB sem histidina, a interação entre as proteínas de interesse é detectada pelo crescimento da levedura na ausência do aminoácido histidina (Bartel & Fields,1995).

3.5.1 Teste de Atividade de β -Galactosidase

A interação entre as proteínas é confirmada pelo teste de X-Gal que avalia a expressão do gene repórter da β -galactosidase (Bartel & Fields,1995). Este ensaio é um método bastante sensível para testar se as colônias nas placas estão expressando β -Galactosidase. As colônias de levedura crescidas por 2 a 3 dias em meio sólido sobre uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas com nitrogênio líquido por 30 segundos. Depois, as membranas foram colocadas em Buffer Z contendo X-gal (50 μ g/mL) e incubadas a 37° C até o aparecimento de cor, por um período máximo de duas horas.

Tabela 3. Cepas de levedura utilizadas.

Cepa	Características relevantes	Referência
DG 456	MATa ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100 Nop8::KAN p(URA3 GAL::PrtA::NOP8)	Zanchin et al., 1999.
YMS 52	W303, YCp33GAL-A	Este estudo
YMS 53	W303, YCp33GAL-A-NOP8	Este estudo
YMS 54	W303, YCp33GAL-A-N-NOP8	Este estudo
YMS 55	W303, YCp33GAL-A-C-NOP8	Este estudo
YMS 20	Δ nop8, YCp33GAL-A-NOP8,pACT-NOP8	Este estudo
YMS 21	Δ nop8,YCp33GAL-A-NOP8,pGAD-N-NOP8	Este estudo
YMS 22	Δ nop8,YCp33GAL-A-NOP8,pGAD-C-NOP8	Este estudo
YMS 13	Δ nop8, YCp33GAL-A-NOP8,pGADC ₁	Este estudo
YMS 43	Δ nop8, YCp33GAL-A-NOP8,GFP-NOP8	Este estudo
YMS 44	Δ nop8,YCp33GAL-A-NOP8,GFP-N-NOP8	Este estudo
YMS 45	Δ nop8, YCp33GAL-A-NOP8,GFP-C-NOP8	Este estudo

YMS 46	<i>Δnop8, YCp33GAL-A-NOP8,GFP</i>	Este estudo
L40-41	L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP8	Zanchin et al., 1999.
L40-61	L40, pBTM-NIP7, pACT-RRP43	Zanchin et al., 1999.
YMS 1	L40, pBTM-NOP8, pGADC	Este estudo
SG 10	L40, pBTM-NOP8, pGADC-RRP6	Este estudo
YMS 62	L40, pBTM-NOP8, pGADC-AIR1	Este estudo
YMS 63	L40, pBTM-NOP8, pGADC-AIR2	Este estudo
YMS 64	L40, pBTM-NOP8, pGADC-MTR4	Este estudo
YMS 65	L40, pBTM-NOP8, pGADC-TRF4	Este estudo
YMS 66	L40, pBTM-NOP8, pGADC-RRP3	Este estudo
YMS 11	L40, pBTM-NIP7, pGADC-N-NOP8	Este estudo
YMS 10	L40, pBTM-NIP7, pGADC-C-NOP8	Este estudo
YMS 71	<i>W303, GFP</i>	Este estudo
YMS 72	<i>W303, GFP-RRP3</i>	Este estudo
YMS 73	<i>Δnop8, YCp33GAL-A-NOP8,GFP</i>	Este estudo
YMS 74	<i>Δnop8, YCp33GAL-A-NOP8,GFP-RRP3</i>	Este estudo

3.6 Ensaios de complementação da função de Nop8p na cepa *Δnop8/GAL::NOP8* expressando os mutantes de deleção de Nop8p

A proteína Nop8p possui um domínio altamente conservado na região N- terminal, e regiões desestruturadas na porção C-terminal. Para investigar se estas regiões eram essenciais para a função da proteína, foram construídos plasmídeos que expressam porções truncadas e mutadas de Nop8p em levedura. Estes plasmídeos possuem a expressão do gene clonado sobre controle do promotor *ADH1*, que é um promotor constitutivo de *S. cerevisiae* e foram transformados na cepa *Δnop8/GAL::NOP8*, que possui o gene *NOP8* sobre controle do promotor *GAL1*, gerando as cepas *Δnop8/GAL::NOP8/ADH1::NOP8*, *Δnop8/GAL::NOP8/ADH1::N-NOP8* e *Δnop8/GAL::NOP8/ADH1::C-NOP8*. 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 *ΔNOP8/GAL::NOP8/ADH1::NOP8*, foi feita por curva de crescimento em meio líquido e diluição seriada.

3.7 Co-imunoprecipitação de proteínas

Os extratos celulares totais foram preparados a partir da cepa W303 expressando tanto ProtA (YCpGAL1-A) quanto ProtA-Nop8p (YCp33GAL1-A-NOP8). Os extratos celulares totais foram incubados com a resina de IgG-Sefarose (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) em tampão A (Tris-Cl 10 mM pH 7.4, Acetato de magnésio 5 mM, Nonidet P-40 0.1%, Cloreto de sódio 150 mM, DTT 1mM e inibidores de proteases. A imunoprecipitação foi realizada a 4°C por 2 h. A resina de IgG-Sefarose foi lavada com o tampão inicial.

Para análise de proteínas, as amostras foram concentradas quando necessário por precipitação com 10% TCA e desnaturadas para serem aplicadas no gel de poliacrilamida. O gel foi transferido para a membrana de PVDF por 2 horas em solução de buffer de transferência (25mM Tris, 192mM Glicina, 15%Metanol) e bloqueado overnight em 5%Leite em pó desnatado em TBS-T. A membrana foi lavada em TBS-T antes da incubação com o anticorpo. O anticorpo foi incubado com a membrana durante no mínimo 2 horas. A membrana foi então lavada em TBS-T e incubada com anticorpo secundário por 2 horas. Western blot foi revelado pelo sistema ECL (Millipore).

3.7.1 Quantificação de proteína total utilizando ácido bicinconínico (BCA) e CuSO₄

A quantificação de proteína total em extratos celulares foi feita de acordo com método colorimétrico descrito por Smith et al. (1985). Ao extrato total (5µL-30µL, dependendo da concentração do extrato) foi adicionado 1mL de solução 5mM CuSO₄ 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*).

3.7.2 SDS-PAGE

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

3.7.3. Western Blotting

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

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com TBS-T (Tris-HCl pH8,0 20 mM; NaCl 150 mM; 0,05% Tween-20) contendo 5% leite desnatado, sob leve agitação por uma hora a 25°C. Transcorrido este tempo, a membrana foi lavada repetidamente com TBS-T e posteriormente incubada por 18 horas em TBS-T contendo os anticorpos.

Para a revelação do Western blot, foi usado o kit ECL (*Millipore*) que se baseia na conjugação do anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho com a “*horseradish peroxidase*” (HRP). A peroxidase reage com o substrato ao serem adicionados os reagentes de detecção ECL, resultando em um sinal de quimiluminescência, que foi captado por um filme de Raios X.

3.8 Análise de processamento de RNA através de Northern blot

Culturas da cepa selvagem e da cepa mutante condicional $\Delta nop8/GAL::A-NOP8$ em crescimento exponencial foram transferidas do meio de galactose para o meio que reprime a expressão da proteína (glicose). Amostras de células dos vários tempos foram coletadas e congeladas. O RNA total foi extraído das cepas de levedura através do método modificado de fenol quente (Oliveira & McCarthy, 1995). RNA total (20µg) foi desnaturado com glyoxal e separado por eletroforese em gel de agarose 1,3%, corrido em tampão de fosfato de sódio (Sambrook et al. 1989). O gel de RNA é submetido à *Northern blotting*, sendo transferido para membrana *Hybond nylon* (Amersham Biosciences). Membranas foram posteriormente hibridizadas com diferentes sondas marcadas radioativamente (^{32}P) complementares a regiões específicas do pré-rRNA 35S. As condições de hibridização foram descritas previamente (Zanchin et al., 1997) e análise foi feita em Phosphorimager (MolecularDynamics). Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos usados para *Northern blot* ou qPCR.

Oligonucleotídeo	Sequência	Referência
18S	5'-CATGGCTTAATCTTTGAGAC-3'	Fatica et al., 2002
5.8S	5'-CGTATCGCATTTCGCTGCGTTC-3'	Zanchin et al., 1997
DE2	5'-CTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGG-3'	Oliveira et al., 2002
UC1	5'-GTTTCGCCTAGACGCTCTCTTC-3'	Zanchin et al., 1997
25S	5'-GCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGC-3'	Gonzales et al., 2005
5S	5'-GGTCACCCACTACACTACTCGG-3'	Granato et al., 2005
5.8S_qPCR_FOR	5' – GCGAAATGCGATACGTAATGTG – 3'	Este estudo
5.8S_qPCR_REV	5' - GGCGCAATGTGCGTTCA – 3'	Este estudo
18S_qPCR_FOR	5' – GTGCATGGCCGTTCTTAGTTG – 3'	Este estudo
18S_qPCR_REV	5' – AGGTTAAGGTCTCGTTCGTTATCG – 3'	Este estudo
25S_qPCR_FOR	5' – CCGGGATTGCCTTAGTAACG – 3'	Este estudo
25S_qPCR_REV	5' – GGCACCGAAGGTACCAGATTT – 3'	Este estudo
ITS2_qPCR_FOR	5' – TTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAA – 3'	Este estudo
ITS2_qPCR_REV	5' – AAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAA – 3'	Este estudo
5S_qPCR_FOR	5' – TTTCCCGTCCGATCAACTG – 3'	Este estudo
5S_qPCR_REV	5' – GCGTATGGTCACCCACTACACTAC – 3'	Este estudo
Scr1_qPCR_FOR	5' – TCCTTCCTCGCGGCTAGA – 3'	Este estudo
Scr1_qPCR_REV	5' – GCACGGTGCGGAATAGAGA – 3'	Este estudo

3.9 Análise do processamento do pré-rRNA por *primer extension*

Nas análises por *primer extension*, 10µg de RNA total extraído de células da cepa selvagem e da cepa $\Delta nop8/GAL::A-NOP8$ 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 10U de transcriptase reversa MMLV (*Invitrogen*) e 0,5mM dNTPs por 30 minutos a 37°C. O cDNA transcrito foi precipitado por adição de 100µL de etanol absoluto, incubação a -20°C por 1 hora e centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O cDNA foi então ressuspendido em 5µL 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*.

3.10 Co-imunoprecipitação de RNA

Células de cultura de 500 mL da levedura W303 expressando Proteína A ou a fusão ProtA-Nop8p ou os mutantes de deleção, foram incubadas em meio YNB GAL até atingir $OD_{600} \approx 1$, foram coletadas e ressuspensas em 3mL de tampão A (10mM Tris-Cl pH 7,4,0; 5mM acetato de magnésio; 0,1% Nonidet P-40; 150mM cloreto de sódio; 1mM DTT e 1mM PMSF). As células foram rompidas por agitação mecânica. Após centrifugação a 15.000 rpm por 30 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 4°C com 250µL 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%, transferido para membrana de nitrocelulose e analisado por *Northern blot* ou utilizado como molde para reação com a transcriptase reversa.

3.11 Análise quantitativa de RNA por qPCR

RNA total foi extraído de culturas incubadas em triplicata. 1 µg de RNA foi utilizado como molde em reações com a transcriptase reversa *ThermoScriptTM RT-PCR System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com 50 µM de oligo(dT)₂₀ ou 50 ng de oligonucleotídeos de seqüências aleatórias. Após quantificação, aproximadamente 800 ng de cDNA foi utilizado como molde em reações de qPCR com *Máxima SYBR Green/ROX qPCR master mix* (Molecular probes Inc., Eugene, OR, USA). A reação foi realizada no equipamento Real Time *Applied Biosystems 7500*. Os dados apresentados são calculados de acordo com Livak & Schmittgen, 2001. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 4.

3.12 Expressão e purificação de proteínas

A proteína His.Nop8p foi expressa em meio de cultura LB até atingir OD= 0.6 – 0.8, em seguida foi induzida por 1 hora a 37°C com 5mM de IPTG. As células coletadas foram lisadas em *French Press* em tampão de lise contendo 50mM de Tris pH8; 50mM NaCl; 30mM Imidazol e 1mM PMSF. O extrato obtido foi centrifugado por 1 hora a 15.000 rpm e o sobrenadante foi incubado por 1 hora com coluna de níquel-*sepharose*. His-Nop8p foi eluída em tampão inicial contendo concentrações crescentes de imidazol e as frações eluídas foram incubadas com resina de heparina-*sepharose*, Q-*sepharose* e posteriormente gel filtração. A purificação foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e corado com *coomassie blue*.

A proteína GST.Rrp6p foi purificada de acordo com protocolo descrito em Burkard and Butler 2000.

3.13 Ligação a RNA *in vitro*

Para os ensaios de ligação a RNA *in vitro*, a proteína recombinante His-Nop8p foi purificada em coluna de níquel-*sepharose*, seguida por cromatografia de filtração em gel. Quantidades crescentes de proteína foram incubadas por 1 hora a 37°C com 1pmol do RNA marcado. As amostras foram separadas em gel nativo de poliacrilamida 6%, que foi seco e analisado por *Phosphorimager*.

3.14 Gradiente de sacarose

Para análise do perfil de polissomos, células de levedura selvagem e $\Delta nop8$ foram transferidas para meio contendo glicose por 6 ou 15 horas, em seguida, é adicionada ciclohexamida (100 μ g/ml), as células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em tampão A (20mM Tris-Cl pH 7,4, 50mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 200 μ g/ml de heparina, 100 μ g/ml de ciclohexamida, 1 mM PMSF) e lisadas por agitação com *glass beads*. Polissomos são separados por centrifugação a 190.000 g por 3 horas a 4°C em solução de sacarose de 5% a 47%. Posteriormente, o gradiente foi analisado por ultravioleta 254nm. As proteínas de cada fração são precipitadas com TCA 10% e analisadas por *Western Blot* com anticorpos específicos.

Para análise das subunidades ribossomais livres, as células da cepa mutante condicional e das cepas expressando os mutantes de deleção incubadas por 15 horas em glicose foram lisadas em tampão A (20mM Tris-Cl pH 7,4; 50mM NaCl; 10mM

MgCl₂; 1mM DTT; 1mM PMSF e 400mM EDTA). As subunidades ribossomais foram separadas em gradiente de sacarose 5% a 47% e o perfil polissomal foi obtido através da leitura de absorbância em 254nm. A área correspondente a cada subunidade ribossomal livre foi estimada com auxílio do programa ImageJ.

3.15 Ensaio de interação entre proteínas *in vitro* – pull down

A interação entre His-Nip7p e His-Rrp3p e GST-Nop8p e as versões truncadas da proteína foi realizada da seguinte forma: extrato celular foi gerado a partir da cepa BL21/GST e BL21/GST-Nop8p, GST-N-Nop8p ou GST-C-Nop8p em buffer A (20 mM Tris-Cl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40) com 1mM de PMSF e DTT, misturado com 500 µl de resina Glutathione-sepharose (GE Healthcare) e His-Nip7p ou His-Rrp3p, que tinham sido expressas em *E. coli*, e incubado a 4°C por 2hrs. A resina Glutathione-sepharose foi precipitada e lavada com buffer A e as proteínas ligadas foram eluídas e submetidas à eletroforese pela metodologia de SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare). A membrana foi incubada com anticorpo anti-His (Sigma) para detectar His-Rrp3p, com anti-GST (Sigma) para detectar GST ou GST-Nop8p/ N-Nop8p ou C-Nop8p, ou anti-Nip7p para detectar His-Nip7p.

Para interação entre His-Nop8p e GST-Rrp6p, extrato celular foi gerado a partir da cepa BL21/GST e BL21/GST-RRP6 em buffer A (20 mM Tris-Cl pH7,0, 150 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40) com PMSF e DTT, misturado com 500 µl de resina glutathione-sepharose (GE Healthcare) e His-Nop8p, que tinha sido expressa em *E. coli*, e incubado a 4°C por 2hrs. A resina glutathione-sepharose foi precipitada e lavada com buffer A e as proteínas ligadas foram eluídas e submetidas à eletroforese pela metodologia de SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare). A membrana foi incubada com anticorpo anti-His (Sigma) para detectar His-Nop8p, ou com anti-GST (Sigma) para detectar GST ou GST-Rr6p.

3.16 Purificação de complexos pela metodologia *tap-tag*

A purificação de TAP-RRP43 e TAP-NOP58 foi realizada seguindo protocolo já descrito (Granato et al., 2008). A cepa contendo o gene *RRP43* ou *NOP58* integrado no genoma e fusionado ao *TAP* (*Tandem affinity purification*, Open Biosystems), foi crescida em meio YPD a 30°C sob agitação até OD₆₀₀ 2,0. Quatro litros de células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão TMN (10mM Tris pH

7.6, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,1% Nonidet P40, 1mM DTT, 1mM PMSF). As células foram lisadas através de agitação mecânica. Após centrifugação, o extrato total foi incubado com 100µl de IgG-sepharose (GE *Healthcare*) por 2 horas a 4°C sob agitação. A resina foi lavada com 40 mL do mesmo tampão de lise e incubada com 100µl do tampão de clivagem contendo 1mM de DTT e 0,5mM EDTA e 20U de TEV protease por uma noite a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e submetido a ensaios de degradação de RNA.

3.17 Ensaio de RNase

Os ensaios para análise de degradação do RNA na presença de Nop8p foram feitos de acordo com o descrito anteriormente (Granato et al., 2008). Oligos de RNA marcado radioativamente poli-A₁₄ ou poli-AU₂₁ foram incubados por 30 min a 37°C na presença de 25 pmol de Rrp6p purificada e com concentrações crescentes His-Nop8p, e como controle, His-Nop53p e BSA. Para finalizar a reação foram adicionados 5µl de tampão de amostra contendo formamida e aplicado em um gel desnaturante de 8% de acrilamida/uréia. Do mesmo modo, os oligos de RNA marcados radioativamente foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença 1µg do exossomo ou snoRNP box C/D purificado, com concentrações crescentes His-Nop8p ou His-Nip7p, e como controle, His-Nop53p e BSA. Para finalizar a reação foram adicionados 5µl de tampão de amostra contendo formamida e aplicado em um gel desnaturante de 8% de acrilamida/uréia.

4. RESULTADOS

4.1 Análise de possíveis domínios estruturais de Nop8p

Em *S. cerevisiae*, Nop8p é uma proteína essencial para a viabilidade celular que possui 57 kDa e está localizada no nucléolo, um subcompartimento nuclear onde ocorre a transcrição e o processamento do RNA ribossomal (rRNA). Nop8p foi inicialmente descrita como uma proteína requerida para a biogênese da subunidade ribossomal 60S, interagindo com Nip7p, também envolvida em processamento de rRNA (Zanchin et al., 1999).

A análise da seqüência de aminoácidos de Nop8p e a comparação com banco de dados revelou a presença de um domínio altamente conservado na região amino-terminal da proteína e duas regiões *colied-coil* na sua porção carboxi-terminal. Os resíduos de aminoácidos 9 até 77 de Nop8p formam um domínio de reconhecimento e ligação a RNA (RRM). As proteínas que possuem RRM, têm uma variedade de funções na célula, podendo fazer parte de complexos protéicos que regulam o processamento alternativo de mRNAs – *splicing alternativo* (SR, U2AF) , proteínas que compõem os snRNAs (snRNPs U1 e U2), assim como proteínas cuja função está relacionada com regulação de tradução (PABP) ou com estabilidade de RNAs na célula (Chambers et al., 1988; Cléry et al., 2008).

A Análise de similaridade de seqüências revelou que Nop8p possui alta similaridade com os ortólogos presentes em camundongos e humanos (Figura 5A e 5B) (Higgins et al., 1994). Os resíduos de aminoácido 1 a 90 da região amino-terminal de Nop8p demonstram 29.8% de identidade com a ortóloga humana NOP132 (Figura 5A), enquanto a região carboxi-terminal revelou 16% de identidade entre essas proteínas. A região carboxi-terminal de ambas as proteínas apresenta estruturas de *coiled-coil*, conhecidas por mediar interação proteína-proteína (Figura 5B) (Sekiguchi et al., 2004; Higgins et al., 1994).

Figura 5. Análise da sequência de Nop8p em *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) alinhada com proteínas de camundongos (Mm) e Humanos (Hs). O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW. Em vermelho estão as regiões que possuem identidade e em amarelo as regiões que possuem similaridade. (A) Alinhamento da região amino-terminal de Nop8p. (B) Alinhamento da região carboxi-terminal de Nop8p.

4.2 A porção C-Terminal de Nop8p é essencial para a função da proteína

A depleção de Nop8p tem forte efeito no processamento de rRNA levando a uma diminuição de rRNAs maduros (Zanchin and Goldfarb, 1999). Como descrito anteriormente, Nop8p e a ortóloga humana NOP132 apresentam domínios de ligação a RNA (RRM) nas suas porções amino-terminal, sugerindo que essa região pode ter papel importante na função de Nop8p.

Com o objetivo de analisar a importância desse domínio na função da proteína, mutantes de deleção foram clonados sobre controle de um promotor constitutivo e expressos na cepa mutante condicional $\Delta nop8/GAL::NOP8$ (Zanchin and Goldfarb, 1999), nesta cepa, a única cópia do gene *NOP8* está sob controle do promotor *GAL1*, e sua expressão é dependente da presença de galactose no meio. A análise de complementação da função de Nop8p foi feita nas cepas $\Delta nop8/GAL::NOP8/ADH1::N-NOP8$ e $\Delta nop8/GAL::NOP8/ADH1::C-NOP8$ através de cultivo em meio contendo glicose, condição na qual os mutantes de deleção são expressos sob controle do promotor constitutivo, enquanto o gene selvagem tem sua expressão reprimida.

A expressão de Nop8p sob controle do promotor constitutivo resgatou o crescimento da cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8$, enquanto a cepa contendo apenas o plasmídeo vazio, como um controle negativo, e a região amino-terminal de Nop8p (aminoácidos 1-219) não apresentaram crescimento. Semelhante ao crescimento observado na expressão da proteína inteira, a expressão da região C-terminal de Nop8p (aminoácidos 221-484) foi suficiente para resgatar o crescimento da cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8/$ na presença de glicose (Figura 6B e C). Os resultados foram confirmados através de análise de curva de crescimento em meio líquido na presença de glicose (Figura 6C).

Esses resultados indicam que a porção N-Terminal de Nop8p, embora contenha o RRM, não é responsável pela função molecular de Nop8p. De modo contrário, o crescimento observado na expressão da porção C-Terminal de Nop8p, sugere que as estruturas de *coiled-coil* presentes nessa região sejam essenciais para a função da proteína.

Figura 6. Análise de complementação da cepa $\Delta nop8$ /GAL::NOP8 pelas versões truncadas de Nop8p, N-Nop8p e C-Nop8p. C-Nop8p complementa o crescimento da cepa $\Delta nop8$ /GAL::NOP8 em glicose, condição em que Nop8p inteira não é expressa. (A) Representação esquemática de Nop8p e as versões truncadas N-Nop8p e C-Nop8p, destacando o domínio de ligação ao RNA (RRM) na porção N-Terminal de Nop8p e as regiões desestruturadas na porção C-Terminal de Nop8p. (B) Crescimento em placas contendo galactose ou glicose. (C) Curva de crescimento em meio líquido.

4.3 Efeito da expressão das porções N- e C-Terminal de Nop8p no processamento de rRNA

A ausência de Nop8p causa diminuição nos níveis dos rRNAs maduros 18S, 25S e 5.8S e a degradação do intermediário da via de processamento pré-27S (Zanchin and Goldfarb, 1999). Para avaliar o efeito das porções N- e C-Terminal de Nop8p no processamento de rRNA, os níveis dos rRNAs foram analisados através de *Northern Blot* e RT-qPCR. Para isso, o RNA total foi extraído da cepa mutante condicional $\Delta nop8/GAL::NOP8$ expressando os mutantes de deleção N-Nop8 ou C-Nop8p após crescimento em glicose por 10 e 18 horas. Para o ensaio de RT-qPCR, o RNA total foi utilizado como molde em reações de síntese de cDNA com a transcriptase reversa e primers de sequências aleatórias de hexanucleotídeos. O cDNA recém-sintetizado foi utilizado como molde em experimentos de qPCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para as diferentes regiões do pré-rRNA.

A análise dos níveis de rRNA através de *Northern Blot* mostrou que todos os rRNAs maduros apresentam diminuição dos níveis na cepa mutante condicional $\Delta nop8/GAL::NOP8$ em glicose, porém, o fenótipo mais severo pode ser observado nos níveis dos rRNAs maduros 25S, 5.8S e 5S, componentes da subunidade ribossomal 60S. De modo semelhante, a expressão do mutante de deleção N-Nop8p apresenta diminuição dos níveis dos rRNAs maduros, enquanto a expressão do mutante de deleção C-Nop8p restaura os níveis dos rRNAs 5.8S e 5S, apesar dos níveis dos rRNAs 18S e 25S serem semelhantes ao observado na ausência de Nop8p (Figura 7A). De acordo com os resultados observados nos ensaios de *Northern Blot*, os resultados obtidos através de RT-qPCR mostram que a depleção de Nop8p causa a diminuição dos níveis dos rRNAs maduros que constituem a subunidade ribossomal maior 60S (Figura 7B). Os níveis dos rRNAs maduros 5.8S e 25S apresentaram uma redução de 50% e 70%, respectivamente, em relação à cepa expressando Nop8p, enquanto houve uma redução nos níveis do rRNA 5S de apenas 25% em comparação à selvagem. Foi possível observar o aumento dos níveis de pré-rRNAs contendo a região ITS2 (Figura 7B), no entanto, os oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR para amplificar a região referente ao ITS2, não são capazes de distinguir entre os diferentes pré-rRNAs 35S, 27S e 7S, todos afetados pela depleção de Nop8p. Nos resultados de *Northern Blot*, a depleção de Nop8p causou uma diminuição dos níveis dos pré-rRNAs 27S e 7S

em relação à cepa selvagem (Figura 7A), portanto, o aumento dos níveis de pré-rRNAs contendo a região do ITS2 observado no RT-qPCR, pode ser proveniente do acúmulo do pré-rRNA 35S que já foi observado anteriormente (Zanchin and Goldfarb, 1999).

A expressão de N-Nop8p não restaura os níveis dos rRNAs 25S e 5S, porém melhora os níveis do rRNA 5.8S e de pré-rRNAs contendo a região ITS2. A expressão de C-Nop8p restaura os níveis dos rRNAs maduros 25S, 5.8S e 5S, enquanto diminui os níveis dos pré-rRNAs contendo a região do ITS2 (Figura 7B).

Esses resultados confirmam o ensaio de complementação de Nop8p, uma vez que foi possível observar que com a expressão de C-Nop8p, os níveis dos rRNAs maduros que compõem a subunidade ribossomal maior são semelhantes àqueles observados na cepa selvagem.

A **B**

Figura 7. Análise dos níveis de rRNA na ausência de Nop8p e na presença dos mutantes de deleção por Northern blot e RT-qPCR. **(A)** O RNA total foi extraído de células crescendo em galactose (T0) ou em glicose por 18 horas. As hibridizações foram feitas com sondas complementares a diferentes regiões do pré-rRNA 35S. **(B)** RT-qPCR foi feito utilizando o rRNA como molde para reações de transcrição reversa com oligonucleotídeos de sequências aleatórias, as reações de PCR foram realizadas utilizando oligonucleotídeos para diferentes regiões do pré-35S.

4.4 Depleção de Nop8p leva à degradação de rRNAs

A depleção de Nop8p diminui a eficiência do processamento do pré-rRNA e direciona o pré-rRNA 27S para degradação. Em *S. cerevisiae*, a degradação dos rRNAs pode ser realizada pelas exonucleases 5'→3' Xrn1p e Rat1p (Henry et al., 1994; Geerlings et al., 2000) ou na direção 3'→5' pelo exossomo (Mitchell et al., 1997). Para estudar mais detalhadamente os efeitos da depleção de Nop8p no processamento do pré-rRNA e analisar a direção da degradação dos rRNAs, foram realizados experimentos de *primer extension*, utilizando oligonucleotídeos complementares a diferentes regiões dos rRNAs. Para isso, o RNA total extraído das cepas *NOP8* e *Δnop8/GAL::NOP8*, incubadas em meio contendo glicose por diferentes períodos de tempo, foi utilizado como molde em reações com transcriptase reversa e os oligonucleotídeos marcados radioativamente.

Ensaio utilizando oligonucleotídeo complementar à extremidade 5' do rRNA 18S mostrou que embora a clivagem no sítio A₁ seja pouco afetada, a depleção de Nop8p causa o aparecimento de precursores contendo a região 5'-ETS. Este resultado confirma dados de acúmulo do pré-rRNA 23S observados na cepa *Δnop8/GAL::NOP8* (Zanchin and Goldfarb, 1999). Também é possível observar bandas menores correspondentes a produtos de degradação (Figura 8A).

Reações com oligonucleotídeo complementar a região do ITS2 demonstraram que após 9 horas de crescimento das células em meio contendo glicose, as bandas correspondentes à extremidade 5' de ambas as formas do 5.8S (B_{1L} e B_{1S}) tornaram-se mais fracas, enquanto bandas de tamanho maior podem ser observadas, confirmando o defeito observado da depleção de Nop8p no processamento do pré-27S (Figura 8B).

Ensaio para analisar o rRNA 25S também resultou na detecção de RNAs alongados na região 5', correspondendo ao pré-rRNA 27S, como esperado, porém, foram detectadas bandas menores correspondentes a produtos de degradação (Figura 8C). Os resultados obtidos com 5S rRNA mostram que na ausência de Nop8p o rRNA 5S é dirigido para degradação, como pode ser observado pela formação de produtos de degradação após 12 horas de depleção de Nop8p (Figura 8D). É possível que a degradação do rRNA 5S seja um evento secundário. Os baixos níveis dos rRNAs 25S e 5.8S na depleção de Nop8p podem não permitir a associação do rRNA 5S na

subunidade ribossomal 60S, fazendo com seja dirigido para degradação.

Os resultados obtidos pelos ensaios de *primer extension*, *Northern blot* e RT-qPCR confirmam o envolvimento de Nop8p no processamento de rRNA. Na ausência de Nop8p, o pré-rRNA 27S é processado de maneira menos eficiente e os rRNAs que compõem a subunidade ribossomal maior 60S são encaminhados para a degradação.

Figura 8. Análise do efeito da depleção de Nop8p no processamento de pré-rRNA. Reações de primer extension foram realizadas com os primers A, B, C e D complementares aos RNAs 18S, 5.8S, 25S e 5S, respectivamente, como indicado no esquema. Pré-rRNAs formados na ausência de Nop8p, detectados na forma de produtos mais estendidos na primer extension, são submetidos a degradação na direção 5'-3'. *, produto estendido detectado com exposição por longos períodos.

4.5 Nop8p interage com RNA *in vitro* e se associa ao pré-rRNA *in vivo*

De acordo com os dados de predição estrutural, Nop8p possui um domínio de ligação a RNA altamente conservado na porção amino-terminal (Figura 5A e 6A), indicando que Nop8p interage com RNAs na célula.

Para confirmar se Nop8p interage com RNA *in vitro*, a proteína recombinante His-Nop8p purificada de *E. coli*, foi utilizada em ensaios de ligação a RNA *in vitro* (RNA binding). Diferentes concentrações da proteína purificada (10 e 50 pmol) foram incubadas por 30 minutos a 37°C com oligos de RNA marcados radioativamente e, em seguida, as amostras foram separadas em gel nativo de poliacrilamida 6%.

A banda referente ao RNA marcado de poli-AU₂₁ foi deslocada para uma região de maior peso molecular em ambas as concentrações de His-Nop8p, indicando que Nop8p é capaz de ligar a esse RNA com bastante afinidade, de modo contrário, ao adicionar His-Nop8p aos RNAs marcados poli-A₁₄ e poli-U₁₄, o deslocamento dos RNAs para a região de maior peso molecular só é observado nas maiores concentrações de Nop8p, sugerindo que Nop8p interage com esses RNAs com menor afinidade (Figura 9).

Com base nessas informações, foi importante investigar os rRNAs com os quais Nop8p tem maior afinidade *in vivo*, e se essas interações são dependentes do domínio de interação a RNA presente na porção amino-terminal da proteína. Para isso, foi realizado o experimento de co-imunoprecipitação de RNA utilizando a proteína Nop8p inteira e os seus mutantes de deleção, fusionados a um *tag* de proteína A. O RNA extraído das frações precipitadas foi analisado por RT-qPCR. Os resultados mostram que Nop8p interage com complexos contendo os rRNAs maduros 5.8S e 25S e principalmente, com os intermediários de processamento de rRNA que possuem a região do ITS2, como os pré-rRNAs 35S, 7S e 27S (Figura 10). A porção amino-terminal de Nop8p, co-purifica o rRNA 5.8S e não foi observado interação com outros rRNAs (Figura 10), sugerindo que o domínio presente nessa região da proteína tenha especificidade de ligação. A porção carboxi-terminal de Nop8p não co-purifica de maneira significativa rRNAs (Figura 10), indicando que essa região seja importante para

a interação entre Nop8p e outras proteínas do pré-60S.

Figura 9. Ensaio de ligação de His-Nop8p a RNA. Quantidades crescentes de His-Nop8p (10 ou 50 pmol) foram incubadas com oligos de diferentes seqüências de RNA marcados radioativamente. Nop17p (50 pmol) foi utilizada como controle negativo. Nop8p interage com oligo de poli-AU₂₁.

Figura 10. Coimunoprecipitação de RNAs com A-Nop8p e as versões truncadas da proteína. Extrato total de células expressando ProtA, A-Nop8p, A-N-Nop8p e A-C-Nop8p foram incubados com a resina de IgG-sepharose. Após a imunoprecipitação, o RNA foi extraído e analisado por RT-qPCR com oligonucleotídeos específicos para diferentes regiões do pré-rRNA. A-Nop8p interage com pré-rRNAs e A-N-Nop8p interage com rRNA 5.8S. Quantificação foi determinada seguindo o método descrito na literatura (Livak and Schittgen, 2001).

Sekiguchi et al., 2004). Para mapear a região de Nop8p envolvida na interação com Nip7p, foram realizados ensaios de duplo-híbrido. Para isso, foram construídos plasmídeos que expressam as porções truncadas de Nop8p em fusão com o domínio ativação da transcrição de Gal4, enquanto Nip7p estava fusionada ao domínio de ligação a DNA de *lexA*. Os plasmídeos foram transformados em levedura para realização dos ensaios de duplo-híbrido. A análise da expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*, sugerem que a forte interação observada entre as proteínas Nip7p e Nop8p se dá através da porção C-terminal de Nop8p (Figura 11A).

Para confirmar se a interação observada é direta, foram realizados ensaios de *pull-down* utilizando proteínas recombinantes expressas em *E. coli*. Os extratos totais de células de bactéria expressando GST, GST-Nop8p, GST-N-Nop8p ou GST-C-Nop8p foram incubados com a resina glutationa-*sepharose*, as proteínas foram imobilizadas na coluna e em seguida incubada com extrato de células de bactérias expressando His-Nip7p. As proteínas ligadas à coluna, eluídas por incubação com tampão contendo glutationa reduzida, foram separadas por *SDS-PAGE*, transferidas para membrana de *PVDF* e analisadas por *Western blot* utilizando antisoros anti-Nip7 e anti-GST. A incubação da membrana com antisoro contra GST mostra a presença de GST, GST-Nop8p, GST-N-Nop8p e GST-C-Nop8p nas frações eluídas, indicando que as proteínas foram imobilizadas eficientemente na coluna. Observou-se que His-Nip7p foi co-precipitada com todas as fusões de Nop8p, GST-Nop8p, GST-C-Nop8p e GST-N-Nop8p, mas não com GST (Figura 11B). Estes resultados indicam que a porção C-terminal de Nop8p interage mais fortemente com Nip7p, mas sua porção N-terminal também está envolvida nesta interação.

Figura 11. Nop8p interage com Nip7p através da região carboxi-terminal. **(A)** Análise da interação entre as versões truncadas de Nop8p e Nip7p pelo sistema de duplo-híbrido **(B)** Análise de Western blot para detecção das proteínas após o experimento de pull-down. Extrato total (TE) de células expressando GST, GST-Nop8p e as versões truncadas da proteína foram incubadas com resina de glutationa-sepharose. As proteínas que não ligaram a resina foram coletadas (FT₁ e FT₂—Flow through material que não interage com a proteína imobilizada na coluna), material ligado foi detectado após incubação com anticorpo anti-GST e anti-Nip7p (El—Eluição).

4.7 Análise da expressão de Nop8p e dos mutantes de deleção na produção de ribossomos

Após observar a interação de Nop8p com o pré-rRNA 27S, tornou-se importante investigar as alterações associadas à depleção de Nop8p e dos mutantes de deleção N-Nop8p e C-Nop8p na produção das subunidades ribossomais 40S e 60S e no perfil dos polissomos. Para isso, células da cepa mutante condicional e das cepas expressando os mutantes de deleção incubadas por 15 horas em glicose foram tratadas com EDTA. A quantificação das áreas correspondendo aos picos das subunidades 40S e 60S pelo programa ImageJ mostrou que na ausência de Nop8p e na expressão de N-Nop8p, os níveis da subunidade ribossomal 60S foram reduzidos para 45% e 51%, respectivamente, em comparação com a cepa selvagem, enquanto na expressão de C-Nop8p os níveis da subunidade ribossomal 60S se mantiveram próximos aos da cepa selvagem representando 85% (Figura 12).

A análise do perfil polissomal de extratos obtidos na presença de ciclohexamida permite observar a formação dos ribossomos completos (fração 80S) e polissomos. Os resultados mostraram que na depleção de Nop8p e na expressão de N-Nop8p há diminuição da subunidade ribossomal 60S, o que acarreta a diminuição da fração de 80S, correspondente ao ribossomo maduro, além da formação de *halfmers* polissomos, que são poli-ribossomos ou monômeros de ribossomos contendo uma subunidade ribossomal 40S adicional ligada ao sítio de início da tradução, provavelmente na forma de um complexo de iniciação da tradução aguardando a associação da subunidade 60S (Helser et al., 1981) (Figura 13 A). A expressão do mutante de deleção C-Nop8p apresenta fenótipo semelhante ao observado na cepa selvagem, com os níveis normais do 60S, 80S e formação dos polissomos (Figura 13 A).

Esses resultados são condizentes com a degradação dos rRNAs observados nessas cepas, confirmando a importância da região C-terminal de Nop8p na função molecular da proteína e o papel de Nop8p na biogênese da subunidade maior do ribossomo.

Figura 12. Análise de perfil polissomal com EDTA, com a dissociação do 80S e polissomos é possível quantificar a diferença dos níveis da subunidade 60S nas diferentes cepas, $\Delta nop8$ e a expressão da região N-terminal de Nop8p apresentam quantidades de 60S semelhantes.

4.8 C-Nop8p media associação de Nip7p ao pré-60S

Após observar o efeito de Nop8p no processamento do rRNA e na formação das subunidades ribossomais, tornou-se importante checar como estava a associação de Nip7p ao complexo pré-60S, uma vez que Nip7p e Nop8p interagem via região carboxi-terminal. Para isso, as proteínas presentes em cada uma das frações do gradiente de polissomos foram precipitadas, separadas por SDS-PAGE e analisadas por *Western blot* para observar a distribuição da proteína Nip7p no gradiente de polissomos.

Na presença de Nop8p, Nip7p está concentrada nas frações correspondentes ao pré-60S, enquanto na depleção de Nop8p, Nip7p não está associada ao pré-60S e se concentra na fração solúvel do gradiente. A interação observada entre a porção C-terminal de Nop8p e Nip7p é consistente com o perfil de sedimentação de Nip7p no gradiente de sacarose, na expressão do mutante de deleção C-Nop8p, Nip7p está associada ao pré-60S e permanece ligada ao 60S e polissomos, já a expressão do mutante de deleção N-Nop8p não é suficiente para a associação de Nip7p ao pré-60S. A proteína ribossomal da subunidade maior Rpl5p foi utilizada como controle para o experimento e foi detectada nas frações correspondentes aos picos do 60S, 80S e polissomos, como esperado (Figura 13 B).

Estes resultados sugerem que Nop8p é importante para a associação de Nip7p ao complexo pré-60S e que essa associação se dá através da porção C-terminal de Nop8p, ou que a associação de Nip7p ao pré-60S requer que o complexo esteja intacto.

Figura 13. Análise do perfil polissomal na ausência de Nop8p e na expressão dos mutantes de deleção. (A) A análise de perfil polissomal através de gradiente de sacarose na cepa $\Delta nop8$ e $\Delta nop8/N-Nop8p$ os níveis da subunidade ribossomal 60S estão diminuídos. (B) Proteínas recuperadas das frações obtidas dos gradientes de sacarose foram submetidas a Western blot para verificar a associação de Nip7p ao pré-60S. A Proteína ribossomal da subunidade maior, Rpl5p, foi utilizada como controle.

4.9 Nop8p interage com a subunidade Rrp6p do exossomo

Como mostrado anteriormente, na depleção de Nop8p os rRNAs são direcionados para a degradação, provavelmente pela extremidade 3'. Como o exossomo é um complexo de exoribonucleases que degrada RNAs na direção 3'→5' envolvido no controle de qualidade dos RNAs na célula, ensaios foram realizados a fim de identificar alguma interação entre Nop8p e o complexo.

Para analisar a possibilidade de interação de Nop8p com as subunidades do exossomo, foram utilizados clones de duplo híbrido expressando as proteínas do exossomo fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de *lexA* (BD-Exossomo) e Nop8p fusionada ao domínio de ativação da transcrição de *Gal4* (AD-Nop8). Através dos ensaios foi possível observar a interação de Nop8p apenas com a subunidade do exossomo Rrp6p (Figura 14A - Experimento realizado pela aluna de iniciação científica do laboratório Sheila Garcia).

Para confirmar a interação entre essas proteínas, foi realizado o ensaio de *pull-down*. GST e GST-Rrp6p foram expressas em *E. coli* e o extrato total foi incubado com resina glutationa-sepharose. Após as lavagens, a resina foi incubada com extrato de células de bactérias expressando His-Nop8p. As proteínas foram eluídas com tampão contendo glutationa reduzida, sendo subsequentemente separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e analisadas por *Western blot* utilizando anticorpos anti-His e anti-GST.

É possível observar que His-Nop8p foi co-precipitada com GST-Rrp6p, mas não com GST (Figura 14B), confirmando que a interação entre Nop8p e Rrp6p é direta. Os resultados obtidos nos ensaios de *primer extension*, sugeriam que na ausência de Nop8p os rRNAs são degradados. A interação de Nop8p com a subunidade do exossomo, Rrp6p, fortalece a hipótese de que os rRNAs são degradados pelo exossomo, e que possivelmente, a função molecular de Nop8p esteja relacionada com a regulação da atividade do exossomo, já que Rrp6p é uma das subunidades catalíticas do complexo. Além disso, Nop8p pode interagir com o exossomo de forma indireta, através da interação com Nip7p, que por sua vez, interage com a subunidade do exossomo Rrp43p (Figura 14C).

A

B

C

Figura 14. Interação de Nop8p com a subunidade Rrp6p do exossomo. (A) Análise da interação entre Nop8p e a subunidade do exossomo Rrp6p por duplo-híbrido – Realizado pela aluna de iniciação científica do laboratório Sheila Garcia (B) e *pull-down* de proteínas. TE-Extrato total, FT – Flow through material não ligado à coluna, El - eluição.(C) Nop8p interage diretamente com a subunidade catalítica do complexo Rrp6p, e interage indiretamente com a subunidade Rrp43p, através da interação com Nip7p.

4.10 Nop8p interage com proteínas do complexo TRAMP e associa diretamente a subunidade Trf4p

A poliadenilação de rRNAs foi descrita como um mecanismo de controle de qualidade desses RNAs na célula, sinalizando para a maquinaria de degradação que estes RNAs devem ser degradados (Kuai et al., 2004). O complexo TRAMP é responsável pelo reconhecimento e poliadenilação de RNAs aberrantes, facilitando a interação destes transcritos com o exossomo e conseqüentemente, estimulando a atividade exonucleolítica do exossomo *in vitro* e *in vivo* (Kabada et al., 2004; Vanacova et al., 2005). Dados da literatura demonstram que na ausência da subunidade do exossomo Rrp6p há um acúmulo de rRNAs poliadenilados (Van Hoof et al., 2000; Kuai et al., 2004).

Através de teste de interação entre Nop8p e as subunidades do TRAMP pelo sistema do duplo-híbrido, foi possível observar que Nop8p interage fracamente com as proteínas Air1p e Air2p, ambas caracterizadas como proteínas responsáveis por reconhecer e ligar os RNAs aberrantes. Nop8p também interage com as proteínas Mtr4p, com função de helicase, e Trf4p, uma poliA polimerase (Figura 15A). Embora a interação entre Nop8p e as subunidades do TRAMP seja fraca, sua interação com Trf4p foi confirmada por ensaio de *pull-down* de proteínas (Figura 15B).

Já foram descritas na literatura proteínas que interagem com o exossomo e atuam juntamente com o complexo no processamento de RNAs estáveis (Granato et al., 2008; Granato et al., 2005; Mitchell & Tollervey, 2003; Kufel et al., 2003; van Hoof & Parker, 2000), e proteínas que atuam como co-fatores do exossomo no controle de qualidade dos RNAs da célula (Araki et al., 2001; Wang et al., 2005). Os dados apresentados até o momento reforçam a hipótese do envolvimento de Nop8p no controle de qualidade dos rRNAs na célula através da interação com o TRAMP e com o exossomo.

A

B

Figura 15. Nop8p interage com a subunidade Trf4p do complexo TRAMP. (A) A interação entre Nop8p e as subunidades do complexo TRAMP foi analisada através de duplo-híbrido pela expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. (B) A interação de Nop8p com a proteína Trf4p foi confirmada por *pull down*. TE-Extrato total, FT – Flow through material não ligada à coluna, EL-eluição.

4.11 Nop8p está envolvida na estabilidade de rRNAs poliadenilados

A poliadenilação é uma etapa de modificação pós-transcricional importante no processamento e formação da extremidade 3' de mRNAs, tendo como principais funções manter a estabilidade desses mRNAs, exportação nuclear e regulação de tradução (Colgan & Manley, 1997). Em contraste, os rRNAs poliadenilados são direcionados para degradação pelo exossomo (Granato et al., 2008; Callahan & Butler, 2008; Kuai et al., 2004). O complexo TRAMP, responsável pela poliadenilação de RNAs para seu direcionamento para degradação, estimula a atividade exonucleolítica do exossomo (Kabada et al., 2004; Vanacova et al., 2005).

Uma vez detectada a interação de Nop8p com proteínas do TRAMP, tornou-se importante analisar o efeito de Nop8p e dos mutantes de deleção N-Nop8p e C-Nop8p na poliadenilação de rRNAs. A análise foi feita através de RT-qPCR, para isso, o RNA total foi utilizado como molde em reações de síntese de cDNA com a transcriptase reversa e oligonucleotídeos de oligo-desoxitimidina (oligo dT). O cDNA recém-sintetizado foi utilizado como molde em experimentos de qPCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para diferentes regiões do pré-rRNA.

O níveis dos rRNAs 5.8S e 25S poliadenilados mostraram-se reduzidos na ausência de Nop8p, sugerindo que estes rRNAs estão sendo degradados mais rapidamente, provavelmente, devido ao aumento da processividade do exossomo. Os níveis do rRNA 18S não foram significativamente alterados e como Nop8p é uma proteína do complexo pré-60S, era esperado que sua depleção não influenciasse um rRNA do complexo pré-40S (Figura 16). Os níveis do pré-rRNA 27S poliadenilado, por outro lado, foram aumentados na ausência de Nop8p (Figura 16), sugerindo que na ausência de Nop8p esses rRNAs são reconhecidos pela maquinaria de controle de qualidade de RNAs e são mais poliadenilados pelo TRAMP para servirem de substrato para a degradação via exossomo. Não foram observadas alterações significativas na expressão dos mutantes de deleção de Nop8p. Esses resultados estão de acordo com os efeitos de Nop8p no processamento de rRNA, uma vez que os ensaios de *Northern Blot* mostraram que na ausência de Nop8p os pré-rRNAs e os rRNAs da subunidade ribossomal 60S são mais degradados.

Figura 16. Análise de rRNAs poliadenilados por RT-qPCR. PCR quantitativo foi realizado utilizando RNA extraído da cepa mutante condicional $\Delta nop8/GAL::NOP8$ expressando Nop8, ou as porções truncadas da proteína, o cDNA foi produzido com oligodT. As reações de PCR foram realizadas com oligonucleotídeos que anelam em diferentes regiões do pré-rRNA 35S. Os resultados obtidos foram analisados pelo método de quantificação relativa de expressão gênica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.12 Nop8p inibe a atividade do exossomo *in vitro*

Os resultados obtidos indicam que Nop8p é uma proteína relacionada com a estabilidade dos rRNAs na célula, e após caracterizar a interação de Nop8p com a subunidade do exossomo, Rrp6p, construiu-se a hipótese de que Nop8p afeta a atividade do exossomo, provavelmente, por interação direta com o complexo, mas possivelmente por interação com os rRNAs. Nop8p poderia interagir com o exossomo e diminuir a processividade do complexo, ou ligar ao RNA e dificultar a degradação pelo exossomo. Para determinar se Nop8p afeta a atividade de RNase do exossomo *in vitro*, o exossomo de levedura foi isolado por purificação com TAP-Rrp43p, conforme descrito anteriormente (Granato et al., 2008). Como controle, as proteínas do complexo foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por *Western blot* utilizando o anti-soro contra Mtr3p, uma das subunidades do exossomo (Figura 17A). Como controle, também foi purificado de levedura o complexo de snoRNP de box C/D envolvido em processamento de rRNA pela mesma metodologia, através da proteína de fusão TAP-Nop58p, que co-precipitou Nop1p – controle do *Western blot*, uma outra subunidade de snoRNP de box C/D (Figura 17B). As proteínas recombinantes Nop8p, Nip7p e Nop53p utilizadas para o ensaio de degradação de RNA *in vitro* foram purificadas de extratos de bactéria expressando as proteínas recombinantes (Figura 17C).

Como mostrado acima, Nop8p é capaz de ligar RNA *in vitro* e tem baixa afinidade pelos oligos de poli-rA e poli-rU, tendo maior afinidade por poli-rAU. Sendo assim, foi analisada a degradação *in vitro* de poli-rA₁₄ pelo exossomo na presença das proteínas recombinantes purificadas Nop8p e Nip7p, e como controle Nop53p e BSA. Os resultados confirmam que Nop53p é capaz de estimular a atividade de RNase do exossomo, como já era esperado (Granato et al., 2008). Ao contrário de Nop53p, Nop8p inibe a atividade de RNase do exossomo, enquanto Nip7p parece não ter efeito sobre a atividade do complexo (Figura 18A).

Nip7p é uma proteína evolutivamente conservada que interage com a subunidade do exossomo Rrp43p, mas não há ainda trabalhos propondo uma relação funcional de Nip7p com a atividade do exossomo em eucariotos. Porém a proteína ortóloga em archaea, PaNip7, liga RNA e inibe fortemente a atividade do exossomo *in vitro* (Luz et al., 2010), sugerindo que em eucariotos, Nip7p poderia regular a atividade do exossomo, e provavelmente, a estável interação observada entre Nip7p e Nop8p

pudesse ter alguma função nesse processo de regulação. Os dados apresentados aqui, indicam que apenas Nop8p influencia negativamente a atividade do exossomo, sendo coerente com a degradação dos precursores dos rRNAs observados na depleção de Nop8p.

Em um experimento semelhante, porém realizado com poli-rAU₂₁, com o qual Nop8p apresenta maior afinidade, Nop8p continuou inibindo a atividade de RNase do exossomo (Figura 18B), sugerindo que o efeito regulatório de Nop8p sobre o exossomo independe da interação entre Nop8p e o substrato, sendo dependente apenas da interação entre o exossomo e Nop8p.

Figura 17. Purificação dos complexos do exossomo (TAP-Rrp43) e de snoRNP de box C/D (TAP-Nop58) a partir de extratos de levedura. Obtenção dos complexos foi confirmada através de Western blot com anticorpos contra outras subunidades dos complexos, Mtr3p (**A**) e Nop1p (**B**), respectivamente. (**C**) Purificação de proteínas recombinantes para analisar seus efeitos na atividade do exossomo *in vitro*. Nop53p e Rrp6p recombinantes são instáveis quando estocadas a 4°C. Bandas correspondendo a quebras das proteínas são visualizadas em gel corado com prata.

Figura 18. Efeito de Nip7p e Nop8p na degradação de RNA pelo exossomo. Proteínas recombinantes Nip7p, Nop8p e Nop53p foram purificadas e incubadas com RNA na ausência ou presença de complexos de snoRNP de box C/D (controle negativo) ou do exossomo purificados a partir de extrato de levedura. **(A)** Ensaio utilizando oligo de RNA poli-A₁₄. **(B)** Ensaio com oligo de RNA poli-AU₂₁.

4.13 Nop8p inibe a atividade de RNase da subunidade Rrp6p do exossomo

A proteína Rrp6p é uma subunidade do exossomo exclusivamente nuclear que apresenta atividade catalítica e interage diretamente com Nop8p. Esses dados sugerem que Nop8p pode influenciar a atividade do exossomo através de sua interação com Rrp6p. Para confirmar esse modelo a proteína recombinante GST-Rrp6p foi purificada, conforme descrito anteriormente (Burkard and Butler, 2000) e utilizada em ensaios de degradação de RNA *in vitro*.

Os resultados mostram que GST-Rrp6p apresenta atividade de RNase *in vitro*, e após a adição de BSA essa atividade não foi alterada (Figura 19), de modo contrário, Nop8p inibe a atividade de Rrp6p *in vitro* (Figura 19).

Como demonstrado aqui, Nop8p afeta o processamento de pré-rRNA e interage com Rrp6p, uma subunidade do exossomo que apresenta atividade catalítica, inibindo sua atividade *in vitro*. Esses dados indicam que Nop8p é um fator de processamento de rRNA que se liga ao pré-rRNA 27S, participa da montagem do complexo pré-60S, interage com o exossomo e modula a atividade catalítica do complexo.

Figura 19. Efeito de Nip7p e Nop8p na degradação de RNA pela subunidade do exossomo Rrp6p. Proteínas recombinantes Nip7p e Nop53p foram purificadas e incubadas com oligonucleotídeo de RNA poly-rA₁₄ na ausência ou presença de GST (controle negativo) ou da subunidade do exossomo GST.Rrp6p.

4.14 Nop8p interage com a helicase Rrp3p e é importante para a localização de Rrp3p no nucléolo

Já que a proteína ortóloga humana de Nop8p, NOP132, interage com as helicases DDX18 e DDX47 (Sekiguchi et al., 2006), a interação entre a ortóloga de DDX47 em levedura, Rrp3p, e Nop8p também foi testada. A interação de Rrp3p com Nop8p foi observada por duplo-híbrido, e embora esta interação não pareça ser forte ou estável, ela foi confirmada por *pull-down* (Figura 20 A e B).

Outro aspecto a ser investigado em relação à localização de Rrp3p era a maneira pela qual a proteína é direcionada para o nucléolo, já que Rrp3p não possui sinal de localização nuclear em sua seqüência de aminoácidos. De acordo com Sekiguchi et al. 2006, em humanos a proteína NOP132 (ortóloga de Nop8p) é necessária para a correta localização de DDX47 no nucléolo, sendo assim, dada a interação entre Nop8p e Rrp3p, foi testado o papel de Nop8p na localização de Rrp3p no nucléolo.

A proteína de fusão GFP-Rrp3p foi expressa na cepa $\Delta nop8/GAL1::NOP8$ e a localização de Rrp3p foi monitorada na presença e ausência de Nop8p. Observou-se que na presença de Nop8p (galactose), a localização de Rrp3p é nucleolar (Figura 21A), enquanto em glicose, condição na qual Nop8p não está sendo expressa, a localização de Rrp3p está mais espalhada pelo núcleo (Figura 21B). Esses dados sugerem que Nop8p é importante para direcionar Rrp3p para a região do nucléolo, sendo esta função conservada evolutivamente.

A

B

Figura 20. Análise da interação entre Nop8p e Rrp3p. (A) A interação foi observada através de duplo-híbrido pela expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. (B) A interação de Nop8p com a proteína Rrp3p foi confirmada por *pull down*. TE -Extrato total, FT – Flow through material não ligada à coluna, EL-eluição.

Figura 21. Análise da localização sub-celular de Rrp3p na ausência de Nop8p. (A) Localização de Rrp3p na cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8$ na presença de galactose. (B) Localização de Rrp3p após crescimento das células em glicose, condição na qual o gene que codifica Nop8p tem a expressão reprimida, Rrp3p está espalhada por todo núcleo.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a função de Nop8p foi caracterizada como uma proteína importante para a integridade do complexo pré-60S, influenciando a interação de outras proteínas a este complexo e a estabilidade dos pré-rRNAs. A análise da sequência de Nop8p e comparação com banco de dados revelou a possibilidade da presença de um domínio de ligação a RNA na região amino-terminal da proteína. Na região carboxi-terminal de Nop8p, há regiões desordenadas preditas por terem alta flexibilidade e disponibilizar interfaces de interação com outras proteínas, chamadas regiões *coiled-coil*.

Para comprovar a existência de domínios de interação com RNA em Nop8p, foram gerados mutantes de deleção da proteína e realizados experimentos de ligação a RNA. Como demonstrado aqui, Nop8p interage com RNA *in vitro* e *in vivo*, comprovando a existência de um domínio de interação com RNA. A análise da associação de Nop8p com RNA *in vivo* mostrou que essa proteína co-imunoprecipita os rRNAs maduros 25S e 5.8S, além dos pré-rRNAs 27S e 7S. Os dados apresentados aqui estão de acordo com a predição estrutural, confirmando que o domínio RRM de Nop8p está localizado na região N-terminal da proteína. Por outro lado, C-Nop8p interage com Nip7p, sendo importante para a associação de Nip7p ao complexo pré-60S, além de complementar parcialmente a função de Nop8p, confirmando que a região *coiled-coil* forma uma plataforma de interação proteína-proteína conforme sugerido para a ortóloga humana NOP132 (Sekiguchi et al., 2004).

Nop8p interfere na estabilidade dos rRNAs e na maturação da subunidade ribossomal 60S, dado que na ausência de Nop8p há diminuição dos níveis de todos os rRNAs maduros que compõem a subunidade ribossomal 60S. Consistente com os ensaios de complementação de crescimento em glicose da cepa $\Delta nop8/GAL::NOP8$, o mutante de deleção C-Nop8p é capaz de restabelecer os níveis de rRNAs maduros 5.8S, 25S e 5S. O processamento do pré-rRNA e a formação da subunidade ribossomal maior requer a associação de diversas proteínas não ribossomais nas diferentes partículas pré-60S formadas durante a maturação dessa subunidade (Nissan et al., 2002). É possível que Nop8p tenha papel importante na montagem dos complexos, uma vez que ela interage com diversas proteínas componentes do complexo pré-60S (Rosado et al., 2007), interação que pode ser mediada pela região C-terminal de

Nop8p. O mutante de deleção N-Nop8p, embora seja capaz de ligar a RNAs, não restabeleceu os níveis dos rRNAs maduros 25S e 5S, mas somente os níveis de 5.8S. Curiosamente, a porção N-Nop8p co-imunoprecipita esse rRNA, sugerindo que Nop8p possa interagir com o rRNA 5.8S *in vivo* e protegê-lo da maquinaria de degradação.

Na busca por parceiros de interação que pudessem sugerir a função de Nop8p, foi detectada a interação entre Nop8p e as subunidades do complexo TRAMP, responsável por reconhecer e poliadenilar RNAs aberrantes que são substratos de degradação para o exossomo (LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005). O modelo de associação entre o exossomo e o TRAMP sugere que o TRAMP adiciona uma cauda de poli-A aos RNAs que necessitam ser degradados, formando uma extensão de fita simples na extremidade 3', o que possibilita a degradação desses RNAs pelo exossomo (Schneider et al., 2007). As subunidades do TRAMP Trf4p e/ou Trf5p são poli(A) polimerases, Mtr4p é uma RNA helicase dependente de ATP, e Air1p e Air2p são proteínas que ligam RNA (LaCava et al., 2005), Nop8p interagiu com todas essas subunidades nos ensaios de duplo híbrido, porém nesse sistema não é possível determinar a interação direta entre proteínas, uma vez que outras proteínas ou moléculas de RNA presentes na célula de levedura poderiam intermediar essa interação. A análise da interação através de ensaio de *pull-down*, utilizando as proteínas expressas em sistema heterólogo, confirmou a interação direta entre Nop8p e Trf4p.

Consistentemente com a interação entre Nop8p e Trf4p, os níveis de rRNAs poliadenilados foram alterados na ausência de Nop8p, os experimentos de RT-qPCR mostraram que os níveis dos rRNAs 25S e 5.8S estavam diminuídos, ao mesmo tempo em que os níveis do pré-rRNA 27S estavam significativamente elevados. Provavelmente, na depleção de Nop8p os rRNAs 25S e 5.8S são mais degradados pelo exossomo depois de terem sido poliadenilados pelo TRAMP.

Dados da literatura mostram que em mutantes da subunidade Rrp6p do exossomo, há acúmulo de rRNAs poliadenilados, sugerindo que Rrp6p seja responsável pelo controle de qualidade dos rRNAs na célula (Van Hoof et al., 2000; Kuai et al., 2004). Nop8p também interage diretamente com a subunidade do exossomo Rrp6p e os ensaios de atividade *in vitro*, mostraram que a adição da proteína recombinante Nop8p inibe a atividade catalítica de Rrp6p. O mesmo foi observado quando Nop8p foi adicionada ao complexo do exossomo purificado de levedura. É

importante dizer que a habilidade de Nop8p em inibir a atividade catalítica foi maior com o exossomo purificado de levedura, onde nas menores concentrações de Nop8p adicionada já é possível observar o seu efeito inibitório. É possível que Rrp6p tenha atividade maior isoladamente do que em complexo, uma vez que a conformação estrutural pode deixar o sítio ativo de Rrp6p menos exposto quando associada ao exossomo. Por outro lado, nos testes do efeito de Nop8p na atividade do exossomo *in vitro*, não foi possível determinar se Rrp6p estava associada ao complexo do exossomo purificado de levedura. Assim, a atividade de exonuclease observada nesses complexos pode ter sido proveniente de Rrp44p, a outra subunidade do exossomo que possui atividade catalítica.

O exossomo está envolvido em processamento e degradação de diferentes tipos de RNAs na célula, sendo considerado componente fundamental no controle de qualidade dos RNAs no citoplasma e no núcleo. A forma nuclear do complexo está envolvida tanto na maturação de RNAs precursores, através do processamento da extremidade 3' de pré-mRNAs, pré-snoRNAs e pré-snRNAs (Allmang et al., 1999b), quanto na degradação de pré-mRNAs, pré-rRNAs e pré-tRNAs aberrantes (Allmang et al., 1999a; Van Hoof et al., 2000a; Dez et al., 2006). A participação do exossomo em diferentes processos no núcleo e citoplasma sugere que o complexo interage com co-fatores específicos para diferenciar as vias de degradação das vias de processamento.

Trabalhos recentes sugerem que algumas proteínas que participam do processamento de rRNA atuam como co-fatores do exossomo e controlam a atividade do complexo. Nop53p, Rrp47p, Mpp6p e o complexo TRAMP atuam como co-fatores do exossomo nuclear, enquanto o complexo Ski atua como co-fator do exossomo no citoplasma (Granato et al., 2008; Mitchell et al., 2003; Milligan et al., 2008; Laçava et al., 2005; Araki et al., 2001). É importante ressaltar que todos co-fatores do exossomo nuclear estão envolvidos com Rrp6p, a subunidade do exossomo exclusivamente nuclear.

Ensaio *in vitro* realizados com proteínas de *Pyrococcus abyssi*, demonstram que as ortólogas de Nip7p e Sdo1p afetam a atividade do exossomo (Pa-exossomo). PaSBDS e PaNip7 inibem o exossomo, embora a inibição por PaNip7 seja muito mais forte (Luz et al., 2010). Neste trabalho, foi demonstrado que Nip7p não afeta a atividade catalítica do exossomo, como Nip7p interage de forma estável com Nop8p (Zanchin et al., 1999), a associação das duas proteínas poderia potencializar o efeito inibitório de

Nop8p sobre o complexo, uma vez que Nip7p interage com Rrp43p e Nop8p poderia ter mais afinidade pelo complexo, porém o ensaio mostrou que a adição de Nip7p e Nop8p ao complexo não alterou a atividade do exossomo *in vitro*. Na célula, a interação dessas proteínas pode ter efeito regulatório sobre o exossomo, já que ambas as proteínas possuem afinidade por RNA e estão presentes no mesmo complexo do pré-60S.

Além da interação com Nip7p, Nop8p também interage com outras proteínas, como a RNA helicase Dbp6p que participa dos passos iniciais de montagem do complexo pré-60S (de La Cruz et al., 2004). Nop8p também faz parte de um complexo formado por Npa1p, Dbp6p, Has1p e Rsa3p, que sedimenta junto com o complexo pré-60S nos ensaios de gradiente de polissomos (Rosado et al., 2007).

Nop8p possui 30% de identidade com a região amino-terminal da ortóloga humana NOP132, justamente na região onde está o RRM. Em contraste, a região carboxi-terminal possui apenas 16% de similaridade onde estão as regiões de *coiled-coil*, provavelmente envolvida em interações com outras proteínas (Sakeguchi et al., 2004). O silenciamento do gene que codifica NOP132 alterou a localização nucleolar da helicase DDX47, sugerindo que NOP132 recruta DDX47 para o nucléolo, região onde ocorre a transcrição e processamento dos pré-rRNAs (Sakeguchi et al., 2006). De modo semelhante, a depleção de Nop8p em levedura alterou a localização celular de Rrp3p, a ortóloga de DDX47, sugerindo que Nop8p é importante para localização de Rrp3p no nucléolo. A depleção de Nop8p também alterou a associação de Nip7p ao complexo pré-60S, que foi restabelecida com a expressão do mutante de deleção C-Nop8p, mostrando que Nop8p é importante para manter a integridade do complexo pré-60S.

Baseado nos dados obtidos neste trabalho é proposto o modelo em que Nop8p se liga ao pré-rRNA 27S através do domínio RRM presente na região N-terminal, a associação de Nop8p nas partículas pré-ribossomais estabiliza o pré-rRNA 27S, prevenindo a degradação inespecífica pelo exossomo. Nip7p se associa ao complexo pré-60S depois de Nop8p, por interação com a sua região C-terminal. A clivagem em ITS2 ocorre após a ligação de Nip7p, Nop8p e Nip7p permanecem associadas ao pré-rRNA 7S, regulando a atividade catalítica do exossomo no processamento 3' desse rRNA (Figura 22). Na ausência de Nop8p, o pré-60S não é corretamente formado e Nip7p não se associa ao complexo, o pré-rRNA 27S fica disponível para degradação, o complexo TRAMP liga ao pré-27S, e poliadenila a extremidade 3' do pré-rRNA que é

subsequentemente degradado pelo exossomo (Figura 23). Em resumo, este trabalho mostra a identificação de uma proteína essencial responsável por controlar a atividade do exossomo no processamento de rRNA *in vivo* e *in vitro*.

Figura 22. Modelo da função de Nop8p no processamento de rRNA. Nop8p liga a região do ITS2 e direciona Nip7p para o complexo pré-60S. Nop8p e Nip7p regula a atividade do exossomo no processamento do pré-rRNA 7S, após a maturação do 5.8S a subunidade ribossomal 60S é formada.

6. CONCLUSÃO

Nop8p é uma proteína essencial conservada evolutivamente, localizada no nucléolo, compartimento nuclear onde os rRNAs são transcritos e processados. Nop8p apresenta domínios conservados de ligação a RNA na porção N-terminal, responsável pela sua interação com o pré-rRNA 27S. Nop8p interage diretamente com Trf4p, uma poli(A)-polimerase do complexo TRAMP, envolvido em controle de qualidade de RNAs na célula, e com Rrp6p, uma subunidade catalítica do exossomo, que exclusivamente nuclear. De acordo com as evidências experimentais mostradas aqui, Nop8p atua como uma proteína regulatória que controla a atividade do exossomo e previne a degradação dos pré-rRNAs durante seu processamento, influenciando de maneira direta a biogênese dos ribossomos e a estabilidade do complexo pré-60S.

Figura 23. Modelo da função do processamento de rRNA na ausência de Nop8p. Sem Nop8p, Nip7p não consegue associar ao complexo pré-60S e o pré-27S não é processado de maneira correta, sendo reconhecido pelo TRAMP e degradado pelo exossomo. Os demais rRNAs também servem de substrato para o exossomo.

7. REFERÊNCIAS:

1. Allmang, C.; Petfalski, E.; Podtelejnikov, A.; Mann, M.; Tollervey, D.; Mitchell, P. 1999a. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'5' exonucleases. *Genes Dev.*, v 13, p 2148-2158.
2. Allmang, C.; Kufel, J.; Chanfreau, G.; Mitchell, P.; Petfalski, E.; Tollervey, D. 1999b. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18: 5399-5410.
3. Allmang, C.; Mitchell, P.; Petfalski, E. e Tollervey, D. 2000. Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic. Acids Res.* 28: 1684- 1691.
4. Amberg D.C.; Goldstein A.L.; Cole C.N. 1992. Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev.* 6(7):1173-89.
5. Araki, Y.; Takahashi, S.; Kobayashi, T.; Kajiho, H.; Hoshino, S. and Katada, T. 2001. Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* 20, 4684-4693.
6. Bartel PL & Fields S. 1995. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* 254, 241-263.
7. Berges, T.; Petfalski, E.; Tollervey, D. & Hurt, E.C. 1994. synthetic lethality with fibrillarin identifies nop77p, a nucleolar protein required for pre-rRNA processing and modification. *EMBO J.* 13:3136-3149.
8. Bernstein J, Patterson DN, Wilson GM, Toth EA. 2008. Characterization of the essential activities of *Saccharomyces cerevisiae* Mtr4p, a 3'->5' helicase partner of the nuclear exosome. *J Biol Chem.* 283(8):4930-42.
9. Burkard, K.T and Butler, J.S. 2000. A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 20, 604-16.
10. Butler JS, Mitchell P. 2011. Rrp6, rrp47 and cofactors of the nuclear exosome. *EMBO J.* May 4;30(9):1790-803.
11. Callahan, K.P. and Butler, J.S. 2008. Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nuc. Acids Res.* 36:6645-6655.

12. Chambers, J.C.; Kenan, D.; Martin, B.J.; Keene, J.D. 1988. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol. Chem.* 263 (34): 18043-51.
13. Chen DC, Yang BC & Kuo TT. 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* 21, 83–84.
14. Chu, S.; Archer, R.H. ; Zengel, J.M. & Lindahl, L. 1994. The RNA of Rnase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:659-663.
15. Cléry, a.; Blatter, m.; Allain, F.H.T. 2008. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Structural Biology*, 18: 290-298.
16. Colgan, D.F.; Manley, J.L. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes e Dev.* 11, 2755-2766.
17. Coltri PP, Guimarães BG, Granato DC, Luz JS, Teixeira E, Oliveira CC, Zanchin NIT. 2007. Structural insights into the interaction of the Nip7 PUA domain with polyuridine RNA. *Biochemistry* 46:14177-14187.
18. Costello J.L.; Stead J.A.; Feigenbutz M.; Jones R.M.; Mitchell P. 2011. The C-terminal region of the exosome-associated protein Rrp47 is specifically required for box C/D small nucleolar RNA 3'-maturation. *J Biol Chem.* 286(6):4535-43.
19. Dageron , M. C. & Linder, P. 1998. Dbp7p, a putative ATP-dependent RNA helicase from *saccharomyces cerevisiae*, is required for 60S ribosomal subunit assembly. *RNA Soc.* 4:566-581.
20. De La Cruz, J. L.; Combe, T.; Deloche, O.; Linder, P.; Kressler, D. 2004. the putative RNA helicase Dbp6p functionally interacts with Rpl3p, Nop8p and the novel trans-acting factor Rsa3p during biogenesis of 60S ribosomal subunits in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 166:1687-1699.
21. Dez C, Houseley J, Tollervey D. 2006. Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 25:1534–1546.
22. Dichtl B.; Tollervey D. 1997. Pop3p is essential for the activity of the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins in vivo. *EMBO J.* 15;16(2):417-29.
23. Dziembowski, A.; Lorentzen, E.; Conti, E. e Seraphin, B. 2007. RNA channelling by the archaeal exosome *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 15-22.

24. Dunbar, D.A.; Wormley, S.; Agentis, T.M. & Baserga, S. J. 1997. Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 13:3424-3433.
25. Dutca, L.M.; Gallagher, J.E.; Baserga, S.J.; 2011. The initial U3 snoRNA: pre-rRNA pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing. *Nucleic acids res.* 39 (12) 5164-5180.
26. Eichler, D.C and Craig, N. 1994. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 49, 197-239.
27. Fatica, A.; Cronshaw, A.D.; Dlakic, M. e Tollervy, D. 2002. Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol. Cell.* 9: 341-351.
28. Gautier, T. ; Berges, T.; Tollervy, D. & Hurt, E. 1997. Nucleolar KKE/D repect proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17:7088-7098.
29. Geerlings TH, Vos JC, Raué HA. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'-->3' exonucleases. RNA. 6(12):1698-703
30. Granato, D; Gonzales, F; Luz, J.S.; Oliveira, C.C. 2005. Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.*, v 272(17), p 4450-4463.
31. Granato DC, Machado-Santelli GM, Oliveira CC. 2008. Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS J* 275, 4164-4178.
32. Grandi, P. 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.*, v 10(1), p 105-15.
33. Granneman S.; Baserga, S.J. 2004. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Experimental Cell Research* v 296, p 43-50.
34. Gelperin, D.; Hurton, L.; Beckman, J.; Lemmon, S.K. 2001. Bms1p , a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA*, 7, 1268-1283.

35. Gerbi, S. A. and Borovjagin, A. V. 2004. Pre-ribosomal processing in multicellular organisms. In: Nucleolus (ed. M.O.J. Olson). Landes Biosciences/Eurekah.com, Georgetown, TX.
36. Girard, J.; Lehtonen, P. H.; Caizergues-Ferrer, M.; Amalric, F.; Tollervey, D. & Lapeyere, B. 1992. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. EMBO J. 11:673-682.
37. Goldfeder, M & Oliveira, CC. 2010. Utp25p, a nucleolar *Saccharomyces cerevisiae* protein, interacts with U3 snoRNP subunits and affects processing of the 35S pre-rRNA. FEBS J. 13, 2838-2852.
38. Gonzales FA, Zanchin NI, Luz JS & Oliveira CC. 2005. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. J Mol Biol 346, 437–455.
39. Hamill S, Wolin SL, Reinisch KM. 2010. Structure and function of the polymerase core of TRAMP, a RNA surveillance complex. Proc Natl Acad Sci U S A.; 107(34):15045-50.
40. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166, 557–580.
41. Henras AK, Soudet J, Gerus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mougin A, Henry Y. 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 65:2334-2359.
42. Henry, Y.; Wood, H.; Morrissey, J.P.; Petfalski, E.; Kearsey, S. & 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.
43. Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.
44. Hong, B.; Brockenbrough, S.; Wu, P. & Aris, J.P. 1997. Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. Mol. Cell. Biol. 17:378-388.
45. Houseley J, Tollervey D. 2008. The nuclear RNA surveillance machinery: the link between ncRNAs and genome structure in budding yeast? Biochim Biophys

Acta.1779(4):239-46.

46. Houseley J, LaCava J, Tollervey D. 2006. RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:529-539.
47. Jansen, R.; Tollervey, D. & Hurt, E. C. 1993. A U3 snoRNP protein with homology to splicing factor PRP4 and G domains is required for ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 12:2549-2558.
48. James P, Halladay J & Craig E.A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.
49. Jia H, Wang X, Liu F, Guenther UP, Srinivasan S, Anderson JT, Jankowsky E. 2011. The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell.*;145(6):890-901.
50. Kabada, S.; Krueger, A.; Trice, T. Krecic, A.M.; Hinnebusch A.G.; Andreson, J. 2004. Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA Met in *S. cerevisiae*. *GENES DEV.* 18, 1227-1240.
51. Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19(12): 7897-912.
52. Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. (2010) Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803; 673-683.
53. Kuai L, Fang F, Butler JS, Sherman F (2004) Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 101: 8581–8586.
54. Kufel, J.; Allmang, C.; Verdone, L.; Beggs, J.; Tollervey, D. 2003. A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 6788-6797.
55. La cava, J.; Houseley, J.; Saveanu, C.; Petfalsky, E.; Thompson, E.; Jacquier, A.; Tollervey, D. 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, 121, 713-724.
56. Lamanna, AC. & Karbstein, K. 2009. Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (34); 14259-64.

57. Lafontaine, D.L.J & Tollervey, D. 1999. Nop58p is a common component of the box C+D snoRNP that is required for snoRNA stability. *RNA*, v 5, p 455 – 567.
58. Leary, D.J. & Huang, S. 2001. regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus . *FEBS. Lett.* 209:145-150.
59. Livak JK and Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Method* 25, 402-408.
60. Lygerou Z.; Allmang C.; Tollervey D.; Séraphin B.1996. Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science*. 272(5259):268-70.
61. Lykke-Andersen S, Tomecki R, Jensen TH, Dziembowski A. 2011. The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biol.* 2011 Jan-Feb;8(1):61-6.
62. Luz, J.S.; Tavares, J.R.; Gonzales, F.A.; Santos, M.C.T. & Oliveira, C.C. 2007. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie*.
63. Nissan, T; . 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* 21, 5539-5547.
64. Nomura, M.; Nogi, Y. and Oakes, M. 2004. Transcription of rDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nucleolus* (ed. M.O.J. Olson). Landes Biosciences/Eurekah.com, Georgetown, TX.
65. Maxwell, E.S. & Fournier, M.J. 1995. The small nucleolar RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* , v 35, p 897-934.
66. Milligan L, Decourty L, Saveanu C, Rappsilber J, Ceulemans H, Jacquier A, Tollervey D. 2006. A yeast exosome cofactor, Mpp6, functions in RNA surveillance and in the degradation of noncoding RNA transcripts. *Mol Cell.* 23(6):853-64.
67. Mitchell, P.; Petfalski, E.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Tollervey, D. 1997. The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3' à 5' Exoribonucleases. *Cell* , v 91, p 457-466.
68. Mitchell P, Petfalski E, Houalla R, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D. 2003. Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Mol Cell Biol.* 23:6982-6992.

69. Moy, T.I.; Silver, P.A. 1999. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the Ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes & Dev.* 13: 2118-2133
70. O'day, C.L.; Chavanikamannil, F.; and Abelson, J. 1996. 18S rRNA processing requires the RNA helicase-like protein Rrp3. *Nucl. Acids. Res.*, v 24, p 3201-3207.
71. Petfalski E.; Dandekar T.; Henry Y.; Tollervey D. 1998. Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Mol Cell Biol.* 18(3):1181-9.
72. 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.
73. Planta, R.J. 1997. Regulation of ribosome synthesis in yeast. *Yeast* 13:1505-1518.
74. Qu, L.H.; Henras, A.; Lu, Y.J. 1999. Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19 1144-1158.
75. Rosado, V.I.; Dez, C.; Lebaron, S.; Caizergues-Ferrer, M.; Henry, Y.; De La Cruz, J. 2006. Characterization of *saccharomyces cerevisiae* npa2p (Urb2p) reveals a low-molecular-mass complex containing Dbp6p, Npa1p (Urb1p), Nop8p and Rsa3p involved in early steps of 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1207-1221.
76. Rosado, I.V. and De La Cruz, J. 2004. Npa1p is essential trans-acting factor required for an early step in the assembly of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 10:1073-1083.
77. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
78. 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.
79. 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.
80. Sekiguchi, T.; Todaka, Y.; Wang, Y.; Hirose, E.; Nakashima, N. & Nishimoto, T. 2004. A novel human nucleolar protein, Nop132, binds to the G proteins, RRAG A/C/D. *The journal of biol. Chemistry*, 8343-8350.
 81. Sekiguchi, T.; Hayano, T.; Yanagida, M.; Takahashi, N. & Nishimoto, T. 2006. NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res.* 34:4593-4608
 82. Schneider, C.; Anderson, J.T.; Tollervey, D.; 2007. The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. *Mol Cell.* 27(2), 324-331.
 83. 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.
 84. Sun, C. and Woolford JR, J. L. 1994. the yeast NOP4 gene product is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunit. *EMBO J.* 13: 3127-3135.
 85. Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowski A, Larsen KM, Szczesny RJ, Drazkowska K, Pastula A, Andersen JS, Stepień PP, Dziembowski A, Jensen TH. 2010. The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* 2010 Jul 21;29(14):2342-57.
 86. Vanacova, S.; Wolf, J.; Martin, G.; Blank, D.; Dettwiler, S.; Friedlein, A.; Langen, H.; Keith, G.; Keller, W. 2005. A new yeast poly (A) polymerase complex involved in RNA quality control. *Plos Biol.* 3(6), e189.
 87. Van Hoof, A.; Lennertz, P.; Parker, R. 2000. Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylation forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol. Cell. Biol.*, v 20, p 441-452.
 88. Vanrobays, E.; Gelugne, J.P.; Gleizes, P.E. Cuizergues-Ferrer, M. 2003. Late cytoplasmatic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2083-2095.
 89. Venema, J.; Tollervey, D. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, v 33, p 261-311.

90. Vojtek AB & Hollenberg SM (1995) Ras–Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol* 255, 331–342.
91. Zanchin, N.I.T.; Roberts, P.; Desilva, A.; Sherman, F. & Goldfarb, D.S. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, v 17, p 5001-5015.
92. Zanchin, N.I.T. & Goldfarb, D.S. 1998. Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. And Cell Biol.* 1518-1525.
93. Zhang J, Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, Tang L, Guo Y, Oeffinger M, Rout MP, Hiley SL, Hughes T, Woolford JL Jr. 2007. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev.* 2007 Oct 15;21(20):2580-92.
94. Wang, L.; Lewis, M.S.; Johnson, A.W. 2005. Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA*, 11, 1291-1302.
95. Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24: 437-440.
96. Weaver, P.; Sun, C. & Chang, T. H. 1997. Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Mol. Cell Biol.* 17:1354-1365.
97. Wlotzka W, Kudla G, Granneman S, Tollervey D. 2008. The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *Mol Cell Biol.* (17):5446-57.
98. 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.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Márcia Cristina Teixeira dos Santos

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP.

Data de nascimento: 31/10/1983

Endereço Residencial: Avenida Jaguaré, 325 Bl.4 Ap.35

Telefone: (11) 9946-2065

2. FORMAÇÃO

2.1 Ensino Superior

2004-2006 Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade Cruzeiro do Sul
São Paulo, SP.

2.2 Pós-graduação

2007-2011 Doutorado Direto
Universidade de São Paulo
Instituto de Química - Departamento de Bioquímica
São Paulo, SP.
Título: Caracterização Funcional da proteína Nop8p de
Saccharomyces cerevisiae.
Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo (FAPESP).

3. INICIAÇÃO CIENTÍFICA

2005-2006 Universidade de São Paulo
Instituto de Química - Departamento de Bioquímica
São Paulo, SP.
Título: Expressão e purificação das proteínas do complexo
exossomo de *Saccharomyces cerevisiae*.
Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo (FAPESP).

4. MONITORIAS E PARTICIPAÇÕES EM CURSOS

- 2005-2005** Extensão Universitária em Monitoria Genética I
Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP.
- 2006-2006** Extensão Universitária em Monitoria Genética II
Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP.
- 2008-2008** III Curso de Verão em Bioquímica – Monitora
Universidade de São Paulo, USP.
- 2008-2008** III Curso de Inverno em Bioquímica – Monitora
Universidade de São Paulo, USP.
- 2009-2009** PAE Monitora em Bioquímica Metabólica
Universidade de São Paulo, USP.
- 2010-2010** PAE Monitora em Biologia Molecular
Universidade de São Paulo, USP.

5. CURSOS

- 2010-2010** Proteomics Methods and Approaches for Protein Identification
Universidade de São Paulo, USP.

6. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 2006** 14° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP
Título: Expressão e Purificação das subunidades do exossomo de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2008** XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)
Título: Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Nucleolar Protein Nop8.
- 2008** Alunos na Ciência
Título: Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Nucleolar Protein Nop8.
- 2008** II Alunos na Ciência
Título: Identification of archaeal proteins that affect the exosome function *in vitro*.
- 2009** 14° Annual Meeting of the RNA Society
Título: Identification of archaeal proteins that affect the exosome
- 2010** 15° Annual Meeting of the RNA Society
Título: Study of the exosome activity regulation in yeast.

2010

II Encontro de Pós-Graduação do Instituto de Química – USP
Título: Study of the exosome activity regulation in yeast.

7. PUBLICAÇÕES

1 -Luz, Juliana S.; Tavares, José R.; Gonzales, Fernando A.; **Santos**, Márcia C.T.; Oliveira, Carla C. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie*, v89, p. 686-691, 2007.

2 -Luz, Juliana S.; Ramos, Celso RR.; **Santos**, Márcia C.T.; Coltri, Patrícia P; Palhano, Fernando L; Foguel, Debora; Zanchin, Nilson IT; Oliveira, Carla C. Identification of archaeal proteins that affect the exosome function in vitro. *BMC Biochemistry*, v11, p.22, 2010.

3 -**Santos**, Márcia C.T.; Goldfeder, Mauricio B.; Zanchin, Nilson I.T.; Oliveira, Carla C. The essential Nucleolar yeast protein Nop8p controls the Exosome function during 60S ribosomal subunit maturation. *PlosOne*, 6 (6), e21686, 2011.