

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FELIPE FRANCO DE MELO BAGATELLI

**Caracterização do papel de Nop53
na montagem da subunidade ribossomal maior
em *Saccharomyces cerevisiae***

Versão corrigida da Tese defendida

**São Paulo
29/09/2021**

FELIPE FRANCO DE MELO BAGATELLI

**Caracterização do papel de Nop53
na montagem da subunidade ribossomal maior
em *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
2021**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B144c Bagatelli, Felipe Franco de Melo
Caracterização do papel de Nop53 na montagem da subunidade ribossomal maior em *Saccharomyces cerevisiae* / Felipe Franco de Melo Bagatelli. - São Paulo, 2021.
194 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Oliveira, Carla Columbano

1. Ribossomo. 2. Biogênese ribossomal. 3. Pré-60S. 4. Exossomo. I. T. II. Oliveira, Carla Columbano, orientador.

***Aos meus pais e
aos meus avós***

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, pela oportunidade de desenvolver este projeto em seu laboratório sob sua orientação, por ter me introduzido a este universo que é a biogênese ribossomal, compartilhando comigo seu amplo conhecimento e experiência. Agradeço, sobretudo, pelo apoio, pelos conselhos e pelo exemplo de vida. Sua dedicação à pesquisa, motivação e coragem de enfrentar todos os desafios são valores que espero trazer comigo sempre.

À minha família, pelo apoio e suporte incondicional e imponderável. O mérito deste trabalho é fruto dos esforços de meus pais. Agradeço pelo incentivo, pelo amor, pelo exemplo de dedicação e por tudo que são. À minha irmã, agradeço pela amizade e inspiração. Aos meus tios e tias, especialmente minha madrinha, pelos muitos livros, filmes, passeios e conversas. Aos meus avós, por todo carinho, pelas histórias e pelas memórias. Agradeço ao meu avô por sua curiosidade constante sobre o mundo, que tanto me influenciou.

Aos amigos companheiros (*lat. cum panis*) de todos os dias, pela vida e pelo indizível.

Aos amigos e colegas do laboratório, pela amizade, pelas descontrações, pelas discussões, pelas ideias, pelas sugestões e por compartilharem comigo suas experiências e conhecimento. Agradeço aos antigos, atuais e novos membros do laboratório. A contribuição de todos, especialmente do agora Prof. Dr. Fernando Gonzales Zubiato, da M. Griselda Perona, Fiorella O. Peralta, Thierry P.F. Girotto, Luiz H.S. Maniero, Felipe A. Carvalho, L. Paola P. Cepeda, Ellen K. Okuda e Alessandra A.A. de Sousa foram essenciais neste trabalho. A Alessandra, agradeço pela eficiência, pelo apoio e ajuda tanto na parte burocrática, quanto experimental, pela sua organização, sem a qual nada estaria no lugar. Agradeço às alunas de Iniciação Científica Helena S. Pinto, Débora Goldner, e Flávia M. Adachi, que me acompanharam e me ajudaram em diferentes etapas do projeto. Às técnicas Camila Schroeder e Ivanilde Marcelino, pelo suporte e ajuda tão fundamentais.

Ao Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida (IQ-USP) e à Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi (IB-USP) pela oportunidade de realizar estágios de Iniciação Científica em seus laboratórios sob sua orientação. Agradeço ao Prof. Dr. Samir Merabet (IGFL-Lyon) pela orientação durante meu estágio de Master 1 em seu laboratório.

À Profa. Dra. Ohara Augusto, Profa. Dra. Maria Teresa Machini, Profa. Dra. Graziella Eliza Ronsein, Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales e à minha orientadora por aceitarem minha participação como monitor de suas disciplinas de graduação (IQ-USP). Agradeço pela confiança e pelo aprendizado que tive.

À Dra. Julia Pinheiro Chagas da Cunha e a Francisca N de Luna Vitorino do LECC e CeTICS/Instituto Butantã pela análise das amostras por espectrometria de massas e por terem me ensinado e auxiliado a analisar os dados de proteômica.

À doutoranda Renata Maria dos Santos da UFRJ, seu orientador Prof. Dr. Paulo Costa Carvalho do Instituto Carlos Chagas -Fiocruz (PR) e colaborador Prof. Dr. Fábio C.S. Nogueira da UFRJ pela análise das amostras por espectrometria de massas, e por aceitarem minha contribuição em seu projeto em uma colaboração com ótimos resultados. Agradeço ao doutorando Marlon D.S. dos Santos - Instituto Carlos Chagas -Fiocruz (PR) e seu orientador Prof. Dr. Paulo Costa Carvalho pelo auxílio com o uso do software *Patternlab for Proteomics*.

Ao Dr. Raphael Enoque F. de Paiva, ao Dr. Eduardo G. Vieira, a Aline M. L. Zaballa, Bruna S. R. da Silva, Daniel R. da Silva, Veridiana F. Tofik, Cléia J. Nunes e sua orientadora, Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, por aceitarem minha contribuição em projetos de colaboração. Agradeço especialmente ao pós-doc Raphael pela confiança e pelo estímulo à discussão e proposição de novas ideias.

Agradeço aos professores do Departamento de Bioquímica pelo uso de equipamentos e pela doação de regentes. Ao Prof. Dr. Fabio Luis Forti, pela doação de alíquota de rapamicina. Ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho, pelo uso do microscópio de fluorescência. Ao Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista, pelo uso do Spectramax e do Savant SpeedVac. Ao Prof. Dr. Nicolas Carlos Hoch, pelo uso do ChemiDoc. Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, pelo rotor P40ST. Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, à Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia e ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho pelo uso da ultracentrífuga. Agradeço também pelo uso do equipamento multiusuário Odyssey do IQ-USP.

Ao Dr. Pedro Ismael da Silva Jr. do Instituto Butantã pelo uso da ultracentrífuga e pela disponibilização de espaço em seu laboratório para análise de gradientes.

Ao Prof. Dr. John L. Woolford, Jr. (Carnegie Mellon University), pelo anticorpo anti-Nog1.

Ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli (UNESP Araraquara) pelo anticorpo anti-uL18 e por cepas da biblioteca *Yeast-GFP Clone Collection*

Agradeço ao Serviço de Sequenciamento de DNA da Central Analítica (IQ-USP) e do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco (IB-USP).

Agradeço ao Departamento de Bioquímica, à Secretaria de Pós-Graduação, à Biblioteca do Conjunto das Químicas, a todos os funcionários do IQ-USP e ao serviço terceirizado de limpeza, pelo suporte, apoio e manutenção das condições básicas para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a CAPES e à FAPESP (2015/05776-2) pelo fundamental apoio financeiro.

*We shall not cease from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.*

T.S. Elliot

RESUMO

BAGATELLI, F.F.M. **Caracterização do papel de Nop53 na montagem da subunidade ribossomal maior em *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. (194p). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os ribossomos são complexos ribonucleoproteicos conservados formados por duas subunidades assimétricas (40S e 60S em eucariotos) responsáveis pela tradução da informação genética e catálise da síntese proteica. A montagem destes complexos em eucariotos é mais bem descrita em *S. cerevisiae*, constituindo um processo celular energeticamente dispendioso e com múltiplas etapas. Ela tem origem no nucléolo com a transcrição do pré-rRNA 35S e requer o recrutamento hierárquico e transiente de cerca de 200 fatores de montagem para garantir a formação correta dos centros funcionais aptos à tradução. Neste processo, que se estende no núcleo e citoplasma, 79 proteínas ribossomais associam-se gradativamente à medida que o pré-rRNA é dobrado, modificado e processado. O processamento do pré-rRNA 35S consiste na remoção progressiva de espaçadores internos (ITS1 e ITS2) e externos (5'ETS e 3'ETS), que separam e flanqueiam os rRNAs maduros componentes de ambas subunidades ribossomais. A clivagem do ITS1 separa as vias de maturação do pré-60S e do pré-40S. O ITS2, que, em associação a fatores de montagem, forma uma estrutura denominada *ITS2-foot*, é o último espaçador do pré-60S a ser removido. A composição do *ITS2-foot* permanece inalterada no nucléolo até a transição entre o estado E nucleolar e a formação da partícula Nog2 nuclear. Nesta etapa, a liberação do fator Erb1 permite o recrutamento do fator de montagem conservado e essencial Nop53. Na base do *ITS2-foot*, Nop53 recruta o exossomo via RNA helicase Mtr4 para a clivagem 3'-5' exonucleolítica de parte do ITS2 levando à desmontagem do *ITS2-foot*. O fato de Nop53 atuar como ponte entre dois grandes complexos e apresentar uma estrutura flexível e estendida nos levou a aprofundar a caracterização de seu papel durante a maturação do pré-60S. Neste trabalho, usando análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas, caracterizou-se o interactoma de Nop53, e avaliou-se o impacto da depleção de Nop53 no interactoma da subunidade catalítica do exossomo Rrp6 e na composição de pré-ribossomos representativos de quase todas as etapas de maturação do pré-60S. Em paralelo, foram caracterizados mutantes truncados de Nop53 e avaliada por *pull-down* a interação de Nop53 com componentes do exossomo. Os resultados obtidos mostraram que Nop53 é capaz de interagir com o cofator do exossomo Mpp6, sugerindo pontos adicionais de interação durante o recrutamento do exossomo ao pré-60S. A análise do interactoma de Rrp6 mostrou uma associação precoce do exossomo aos intermediários pré-ribossomais nucleolares mais iniciais, anteriores aos previamente descritos. Mudanças na composição dos intermediários pré-60S revelaram que a depleção de Nop53 afeta a transição entre o estado E e a partícula Nog2, afetando eventos tardios de maturação como o recrutamento de Yvh1. Comparando-se o efeito da depleção de Nop53 com o de mutantes *nop53* desprovidos da região de recrutamento do exossomo, obtivemos evidências bioquímicas do papel estrutural de Nop53 na base do *ITS2-foot*. Em conjunto, estas observações, à luz de estruturas de intermediários pré-ribossomais recentemente descritas, nos permitiram concluir que o recrutamento de Nop53 ao pré-60S contribui para a estabilização de eventos de remodelamento do rRNA que antecedem a formação da partícula Nog2.

Palavras-chave: biogênese ribossomal, pré-60S, exossomo, Nop53

ABSTRACT

BAGATELLI, F.F.M. **Characterization of the role of Nop53 in the assembly of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. (194p.). Ph.D. Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ribosomes are conserved ribonucleoprotein complexes formed by two asymmetric subunits (the 40S and the 60S in eukaryotes) responsible for translating the genetic information and catalyzing protein synthesis. The assembly of these complexes in eukaryotes is best described in *S. cerevisiae*. It is an energetically demanding, multi-step cellular process, that starts in the nucleolus with the transcription of the 35S pre-rRNA. It requires the hierarchical and transient recruitment of about 200 assembly factors to ensure the correct formation of the functional centers suitable for translation. In this process, which extends into the nucleus and cytoplasm, 79 ribosomal proteins gradually associate as the pre-rRNA is folded, modified, and processed. The 35S pre-rRNA processing happens with the progressive removal of internal (ITS1 and ITS2) and external (5'ETS and 3'ETS) transcribed spacers, which separate and flank the mature rRNA components of both ribosomal subunits. The cleavage at the ITS1 separates the pre-60S and pre-40S maturation pathways. The ITS2, which in association with assembly factors constitutes a structure called ITS2-foot, is the last pre-60S spacer to be removed. The composition of the ITS2-foot remains unchanged in the nucleolus until the transition between the nucleolar state E and the nuclear Nog2 particle. At this stage, the release of Erb1 allows the recruitment of the conserved and essential assembly factor Nop53. At the base of the ITS2-foot, Nop53 recruits the exosome via the RNA helicase Mtr4 for the ITS2 3'-5' exonucleolytic cleavage leading to the ITS2-foot disassembly. The fact that Nop53 acts as a bridge between these two large complexes and exhibits a flexible and extended structure led us to further characterize its role in the pre-60S maturation. In this work, using mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics, we characterized the interactome of Nop53, as well as the impact of the depletion of Nop53 on the interactome of the exosome catalytic subunit Rrp6 and on the composition of pre-ribosomes representative of almost all pre-60S maturation stages. In parallel, we characterized *nop53* truncated mutants and evaluated the interaction of Nop53 with exosome components by pull-down assays. The results showed that Nop53 can interact with the exosome cofactor Mpp6, suggesting the contribution of additional points of interaction during the exosome recruitment to the pre-60S. The analysis of the Rrp6 interactome revealed an early association of the exosome with pre-ribosomal intermediates at very early nucleolar stages, before those previously described. Changes in the composition of pre-60S intermediates revealed that Nop53 depletion affects the transition between the state E and the Nog2 particle, affecting late pre-60S maturation events, such as the Yvh1 recruitment. Comparing the effect of Nop53 depletion with that of *nop53* mutants lacking the exosome interacting region, we obtained biochemical evidence of the structural role of Nop53 at the base of the ITS2-foot. Altogether, and in light of recently described structures of pre-ribosomal intermediates, these observations allowed us to conclude that the recruitment of Nop53 to the pre-60S contributes to the stabilization of rRNA remodeling events that precede the formation of the Nog2 particle.

Keywords: ribosome biogenesis, pre-60S, RNA exosome, Nop53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
aa	aminoácido
AAA-ATPase	ATPase associada a diversas atividades celulares
ACN	acetonitrila
AD	domínio de ativação da transcrição
AIM	motivo de interação com domínio <i>arch</i> (<i>arch interacting motif</i>)
BCA	ácido bicinconínico
BD	domínio de ligação ao DNA
BSA	albumina de soro bovino
CID	dissociação induzida por colisão (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
Co-IP	coimunoprecipitação
CP	protuberância central (subunidade ribossomal 60S)
CRAC	UV- <i>cross-linking</i> e análise de cDNA
crio-EM	criomicroscopia eletrônica
C-terminal	extremidade carboxi-terminal
CUT	transcrito críptico instável
Da	Dalton
DDA	aquisição dependente de dados (<i>Data-Dependent Acquisition</i>)
ddNTP	didesoxirribonucleotídeo (ddATP, ddCTP, ddTTP e ddGTP)
DEPC	dietilpírocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)
DOX	doxiciclina
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eEF	fator eucariótico de alongação da tradução
eIF	fator eucariótico de iniciação da tradução
ETS	sequência transcrita espaçadora externa (<i>external transcribed spacer</i>)
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Gal	galactose
GAL1	promotor do gene GAL1/YBR020W (galactoquinase) de <i>S. cerevisiae</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu	glicose
GST	glutathiona-S-transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
ITS	sequência transcrita espaçadora interna (<i>internal transcribed spacer</i>)
kb	quilobase
kDa	quilodalton
LB	meio Luria Bertani

LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
LFQ	<i>label-free quantification</i>
LSU	subunidade ribossomal maior (large subunit)
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
M	molar (mol/L)
mA	miliampère
MDa	megadalton
mL	mililitros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MUT	transcrito meiótico instável
<i>m/z</i>	massa/carga
NAC	<i>Nascent polypeptide Associated Complex</i>
NAI	ácido 2-metilnicotínico imidazolidina
ncRNA	RNA não-codificador
NES	sequência de exportação nuclear
ng	nanograma
nLC	nano-cromatografia líquida
NLS	sequência de localização nuclear
NPC	complexo do poro nuclear
nt	nucleotídeo
N-terminal	extremidade amino-terminal
NTPs	ribonucleotídeos (ATP, CTP, TTP, GTP)
OD	densidade óptica
ODU	unidade de densidade óptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	polietilenoglicol
PET	túnel de saída de polipeptídeo (subunidade ribossomal 60S)
pl	ponto isoelétrico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PNK	polinucleotídeo quinase
PNPase	polinucleotídeo fosforilase
Pol	polimerase
Pré-rRNA	precursor de RNA ribossomal
PRIDE	<i>Proteomics IDentifications Database</i> (EMBL-EBI)
ProtA	domínio ZZ da proteína A de <i>S. aureus</i>
Proteína-r	proteína ribossomal
PTC	centro peptidiltransferase
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RAC	<i>Ribosome Associated Complex</i>

rDNA	DNA que codifica o RNA ribossomal
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RQC	complexo de Controle de Qualidade do Ribossomo
RNP	ribonucleoproteína
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
S	Sverberg (unidade de coeficiente de sedimentação. 1S = 10 ⁻¹³ s)
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SSC	solução salina com citrato de sódio
SSPE	solução salina fosfato de sódio-EDTA
SSU	subunidade ribossomal menor (<i>small subunit</i>)
TAE	tampão Tris-acetato EDTA
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TBE	tampão Tris-borato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampão Tris-HCl EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tet-OFF	sistema de expressão regulado por tetraciclina
TFA	ácido trifluoroacético
T _m	<i>melting temperature</i>
Tris	tris-hidroximetilaminometano
tRNA	RNA transportador
tTA	transativador transcricional do sistema tet-OFF
U	unidade de atividade enzimática
Utp	<i>U-three protein</i>
UTR	região não-traduzida do mRNA
V	volt
WT	<i>wild type</i> (selvagem)
X-α-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-α-D-galactopiranosídeo
XIC	<i>extracted ion chromatogram</i>
XL-MS	<i>cross-linking</i> de proteína acoplado à espectrometria de massas
yEGFP	<i>yeast enhanced green fluorescent protein</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (componente de meio mínimo para levedura)
YPD	<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose</i> (meio rico com glicose para levedura)
2YT	meio duas vezes extrato de levedura / triptona

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conservação e divergência evolutiva dos ribossomos.....	20
Figura 2. Estrutura da subunidade ribossomal 40S de <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 3. Estrutura da subunidade ribossomal 60S de <i>S. cerevisiae</i>	24
Figura 4. Esquema da biogênese ribossomal em <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura 5. Modificações do rRNA em <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 6. Processamento do pré-rRNA em <i>S. cerevisiae</i>	32
Figura 7. Montagem da subunidade ribossomal 40S em <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 8. Montagem modular da subunidade ribossomal 60S em <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 9. Estágios de maturação nucleolar e nuclear inicial do pré-60S.	46
Figura 10. Estágios de maturação nuclear tardio e citoplasmático do pré-60S	50
Figura 11. Estrutura, conservação e atividade do exossomo de <i>S. cerevisiae</i>	56
Figura 12. Cofatores do exossomo de <i>S. cerevisiae</i>	57
Figura 13. Funções do exossomo em <i>S. cerevisiae</i>	61
Figura 14. Etapas do processamento do ITS2.	64
Figura 15. Estrutura e interações de Nop53.	68
Figura 16. Interação de Nop53 com o cofator do exossomo Mpp6.	105
Figura 17. Expressão da subunidade catalítica Rrp6 não é afetada pela depleção de Nop53.	106
Figura 18. A depleção de Nop53 afeta o interactoma de Rrp6.	109
Figura 19. Com a depleção de Nop53, Rrp6 permanece associada ao core do exossomo e aumenta significativamente a associação a componentes de partículas pré-ribossomais.	110
Figura 20. Classificação dos fatores de montagem ribossomal coimunoprecipitados com subunidades do exossomo em níveis aumentados após depleção de Nop53.	112
Figura 21. Efeito da depleção de Nop53 na localização subcelular e no perfil de sedimentação de Rrp6.	113
Figura 22. Rrp6 coimunoprecipita pré-rRNAs de estágios nucleolares iniciais de maturação das subunidades ribossomais.	115
Figura 23. Predição estrutural de Nop53.	117
Figura 24. Efeito dos mutantes <i>nop53</i> S31A e <i>nop53</i> S403A no crescimento celular e processamento do pré-rRNA.	120
Figura 25. Nop53 encontra-se estavelmente associada a partículas pré-ribossomais e parece não compor complexos menores.	121
Figura 26. Ensaio de co-IP com TAP-Nop53.	123
Figura 27. Análise das proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 em relação ao controle negativo	126
Figura 28. Análise quantitativa do interactoma de Nop53 (RNase+ e RNase-).	128
Figura 29. Ensaio de co-IP com Nop7-TAP e Nmd3-TAP.	131
Figura 30. Ensaio de co-IP com Rsa4-TAP e Arx1-TAP.	132

Figura 32. A depleção de Nop53 afeta diferencialmente a associação dos fatores nucleocitoplasmáticos Arx1 e Nmd3 a intermediários pré-60S.....	135
Figura 33. Partículas pré-60S nucleares intermediárias e tardias ainda são formadas após depleção de Nop53.....	136
Figura 34. Depleção de Nop53 afeta a localização subcelular de Nmd3 e Nop7.....	138
Figura 35. Ensaios de co-IP com Erb1-TAP.....	139
Figura 36. Erb1 encontra-se associada predominantemente ao estado E e a partículas pré-60S tardias após depleção de Nop53.....	140
Figura 37. Ensaios de co-IP com Yvh1-TAP e Lsg1-TAP.....	142
Figura 38. A depleção de Nop53 tem diferentes impactos no interactoma de Yvh1 e Lsg1.....	143
Figura 39. O recrutamento de Yvh1 ao pré-60S é afetado pela depleção de Nop53.....	145
Figura 40. O fator de montagem Mrt4 não se encontra retido em intermediários pré-60S citoplasmáticos após a depleção de Nop53.....	146
Figura 41. Efeito dos mutantes de deleção N- e C-terminal de Nop53 no crescimento celular.....	148
Figura 42. Efeito dos mutantes de deleção N- e C-terminal de Nop53 no processamento do pré-rRNA.....	149
Figura 43. Mutantes de deleção N-terminal de Nop53 afetam a associação de Yvh1 ao pré-60S.....	151
Figura 44. Os sítios de ligação de Nop53 e Yvh1 no rRNA 25S são diferencialmente afetados pela depleção de Nop53 e pelos mutantes de deleção N-terminal <i>nop53</i>	152
Figura 45. Comparação do efeito da depleção de Nop53 com o de mutantes de deleção N-terminal de Nop53 no interactoma de Nop7.....	154
Figura 46. Mutantes <i>nop53</i> Δ 48-98 e <i>nop53</i> Δ 1-71 afetam diferencialmente a montagem da subunidade 60S em comparação com a depleção de Nop53.....	155
Figura 47. Estrutura do 90S acoplado ao exossomo.....	161
Figura 48. Detalhes das interações intermoleculares de Nop53 no pré-60S.....	168
Figura 49. Nop53 desempenha um papel estrutural essencial durante a transição do estado E para a partícula Nog2.....	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de plasmídeos usados neste estudo	72
Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos usados para clonagens e sequenciamento de DNA plasmidial.	75
Tabela 3. Lista de cepas de <i>E. coli</i> usadas para clonagem molecular	78
Tabela 4. Lista de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas neste estudo	79
Tabela 5. Composição dos meios de cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
Tabela 6. Conjuntos de fatores de montagem ribossomal representativos de intermediários pré-60S específicos	96
Tabela 7. Lista de oligonucleotídeos utilizados como sondas em ensaios de <i>Northern blot</i>	101
Tabela 8. Lista de oligonucleotídeos utilizados nas reações de <i>primer extension</i> dos ensaios de SHAPE <i>in vivo</i>	102
Tabela 9. Sítios de fosforilação de Nop53 indexados nos bancos de dados SGD e BioGRID	117

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Evolução, estrutura e função do ribossomo eucariótico	19
1.2 Biogênese ribossomal eucariótica.....	25
1.2.1 Modificação do pré-rRNA	29
1.2.2 Processamento do pré-rRNA.....	31
1.2.3 Recrutamento de proteínas ribossomais.....	34
1.2.4 Fatores de Montagem.....	36
1.3 Início da biogênese ribossomal (90S)	38
1.4 Montagem da subunidade ribossomal menor (40S).....	42
1.5 Montagem da subunidade ribossomal maior (60S).....	43
1.5.1 Maturação nucleolar e nuclear	43
1.5.2 Transporte nucleocitoplasmático	49
1.5.3 Maturação citoplasmática.....	49
1.6 Exossomo eucariótico.....	51
1.6.1 Estrutura e Composição	52
1.6.2 Cofatores do exossomo	56
1.6.3 Função do exossomo no citoplasma e núcleo.....	60
1.7 Processamento do ITS2.....	63
1.8 Fator de montagem Nop53: conectando o exossomo ao pré-60S	67
2. OBJETIVOS.....	71
2.1 Objetivos Específicos.....	71
3. MATERIAIS E MÉTODOS	72
3.1 Técnicas de Clonagem Molecular.....	72
3.1.1 Construção de plasmídeos	73
3.1.2 PCR, análise e purificação de fragmentos de DNA	75
3.1.3 Mutação sítio-dirigida	77
3.1.4 Manipulação, cultura e transformação de cepas de <i>E. coli</i>	77
3.1.5 Reação de sequenciamento de plasmídeos	78
3.1.6 Extração e purificação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	78
3.2. Manipulação e cultura de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
3.2.1 Cepas de levedura <i>S. cerevisiae</i>	79
3.2.2 Meios de cultura	80
3.2.3 Cepas de <i>S. cerevisiae</i> com expressão regulável de Nop53.....	81
3.2.4 Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	82

3.2.5 Integração genômica em <i>S. cerevisiae</i>	83
3.2.6 Extração de DNA total de <i>S. cerevisiae</i>	83
3.3 Análise do crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i>	84
3.3.1 Curva de Crescimento.....	84
3.3.2 Diluição seriada	84
3.4 Ensaio de interação proteína-proteína.....	84
3.4.1 Ensaio de duplo híbrido	84
3.4.2 Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	85
3.4.3. Purificação de His-Nop53 e GST-Mpp6	86
3.4.4. Ensaio de interação proteína-proteína <i>in vitro</i> (GST pull-down)	87
3.5 Análise de proteínas	88
3.5.1 Quantificação de proteínas.....	88
3.5.2 SDS-PAGE	88
3.5.3 Coloração por Coomassie blue e por impregnação com prata.....	88
3.5.4 Western blot	89
3.6 Ensaio de coimunoprecipitação	89
3.6.1 Coimunoprecipitação para análise proteômica	89
3.6.2 Coimunoprecipitação de RNA.....	90
3.7 Análise Proteômica Quantitativa <i>label-free</i>	91
3.7.1 Preparo das amostras para LC-MS/MS	91
3.7.2 LC-MS/MS (Rrp6-TAP e TAP-Nop53).....	91
3.7.3 LC-MS/MS (análise dos estágios de maturação do pré-60S)	92
3.7.4 Análise dos dados de MS/MS (Rrp6-TAP).....	92
3.7.5 Análise dos dados de MS/MS (TAP-Nop53 e fatores de montagem ribossomal).....	93
3.7.6 Análise proteômica quantitativa label-free (Rrp6-TAP)	94
3.7.7 Análise proteômica quantitativa label-free (TAP-Nop53 e fatores de montagem ribossomal) .	94
3.7.8 Análise Funcional do interactoma de TAP-Nop53	97
3.8 Visualização molecular com ChimeraX, PyMOL e RiboVision.....	97
3.9 Análise de perfil de sedimentação.....	98
3.9.1 Gradiente de sacarose (perfil de polissomos)	98
3.9.2 Gradiente de glicerol	98
3.10 Microscopia de Fluorescência	99
3.11 Análise de RNA	99
3.11.1 Extração de RNA total de levedura	99
3.11.2 Separação do RNA por eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida	100
3.11.3 Northern blot	100
3.11.5 SHAPE <i>in vivo</i>	101

4. RESULTADOS.....	103
4.1 Interação de Nop53 com o complexo exossomo	103
4.1.1 Nop53 interage com o cofator do exossomo Mpp6.....	103
4.2. Efeito da depleção de Nop53 no exossomo	105
4.2.1 Nível de expressão de Rrp6 não é afetado pela depleção de Nop53.....	106
4.2.2 A depleção de Nop53 afeta o interactoma de Rrp6	107
4.3 Interações e modificações pós-traducionais de Nop53	116
4.3.1 Mutantes pontuais de resíduos fosforilados de Nop53	116
4.3.2 Nop53 não foi encontrada associada estavelmente a complexos menores que o pré-60S...	120
4.3.3 Interactoma de Nop53.....	122
4.4. Efeito da depleção de Nop53 na montagem da subunidade 60S	128
4.4.1 A depleção de Nop53 afeta a transição do estado E para a partícula Nog2, com impacto em intermediários pré-60S tardios.....	129
4.4.2 A depleção de Nop53 leva ao acúmulo de partículas pré-ribossomais nucleolares (estado E) e à associação de Erb1 a intermediários pré-60S tardios	138
4.4.3 A depleção de Nop53 afeta eventos tardios de maturação da subunidade ribossomal maior, tendo impacto na associação de Yvh1 ao pré-60S	142
4.5. Mutantes truncados de Nop53	147
4.5.1 Efeito de mutantes truncados de Nop53 no crescimento celular e eventos tardios de maturação do pré-60S.....	147
4.5.2 A depleção de Nop53 tem impactos diferentes na maturação do pré-60S em comparação com mutantes <i>nop53</i> sem o motivo de recrutamento do exossomo	153
5. DISCUSSÃO	157
5.1 Nop53 no recrutamento e posicionamento do exossomo durante o processamento do ITS2.....	157
5.2 O exossomo é recrutado a intermediários pré-ribossomais nucleolares mais iniciais, incluindo o 90S	159
5.3 Mecanismos regulatórios que podem modular a localização subcelular e recrutamento de Nop53 ao pré-60S	161
5.4 A depleção de Nop53 afeta estágios de maturação nucleolar e tardio do pré-60S	164
5.5 Evidências de funções adicionais de Nop53 durante a montagem da subunidade ribossomal 60S	167
5.6 Base estrutural da função expandida de Nop53 na montagem da subunidade 60S	169
6. CONCLUSÃO	173
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174
LISTA DE ANEXOS	
ANEXO A – Súmula Curricular	
ANEXO B – Artigo Cepeda, Bagatelli et al., <i>JBC</i> (2019)	
ANEXO C – Artigo Bagatelli et al., <i>NAR</i> (2021)	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Evolução, estrutura e função do ribossomo eucariótico

Os ribossomos são intrincados complexos ribonucleoproteicos que foram selecionados ao longo da evolução para traduzir o código genético, catalisando a síntese de cadeias polipeptídicas nos três Domínios da vida (Bowman et al., 2020; Harris et al., 2003). Sua presença ubíqua nos seres vivos permitiu que o alinhamento de sequências do RNA ribossomal (rRNA) e, mais recentemente, de proteínas ribossomais (proteínas-r) fossem utilizados como ferramenta para elucidar a divergência evolutiva e relação filogenética entre organismos dos Domínios Bacteria, Archaea e Eukarya (Woese e Fox, 1977; Hug et al., 2016). De acordo com um dos modelos evolutivos mais aceitos recentemente, denominado modelo de acreção, os ribossomos evoluíram a partir da sequencial inserção de segmentos de expansão (ES) ao rRNA, aumentando em tamanho com a adição de novas camadas e elementos estruturais (Bowman et al., 2020; Petrov et al., 2015). Em paralelo, proteínas ribossomais (proteínas-r) coevoluíram com o rRNA, havendo a associação de proteínas-r adicionais ou o acréscimo de domínios, extensões, ou inserções às preexistentes (Timsit et al., 2021).

Deste modo, tanto em composição quanto em estrutura, ribossomos procarióticos e eucarióticos apresentam diferenças entre si (Fig. 1A), variando entre 2.3 MDa a 4.3 MDa em massa molecular (Melnikov et al., 2012; Klinge et al., 2012; Wilson e Doudna Cate, 2012). Em ambos os casos, todos os ribossomos são compostos por duas subunidades assimétricas (LSU e SSU) que desempenham funções distintas no processo da tradução. Bactérias e eucariotos apresentam proteínas-r específicas, mas partilham 34 proteínas-r homólogas que compõem, em conjunto com 4400 nt de rRNA, o *core* ribossomal - estruturalmente conservado e provido dos principais centros funcionais (Figs. 1B,C) (Melnikov et al., 2012). Na bactéria *Escherichia coli*, a subunidade ribossomal menor (SSU) 30S é formada por 21 proteínas-r e pelo rRNA 16S, enquanto a subunidade ribossomal maior 50S, por 33 proteínas-r e pelos rRNAs 5S e 23S. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por sua vez, apresenta o ribossomo 80S, 1 MDa maior que o de *E. coli*, formado por uma SSU (40S) com 33 proteínas-r e o rRNA 18S, e por uma LSU (60S) contendo 46 proteínas-r e os rRNAs 5S, 5.8S e 25S (Woolford e Baserga, 2013).

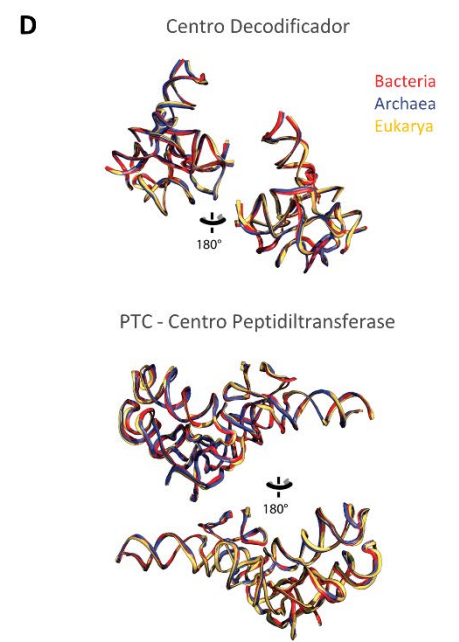
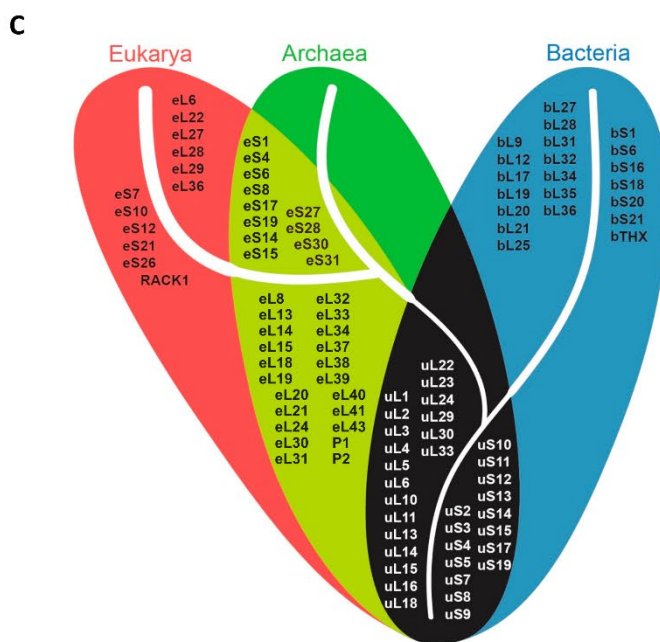
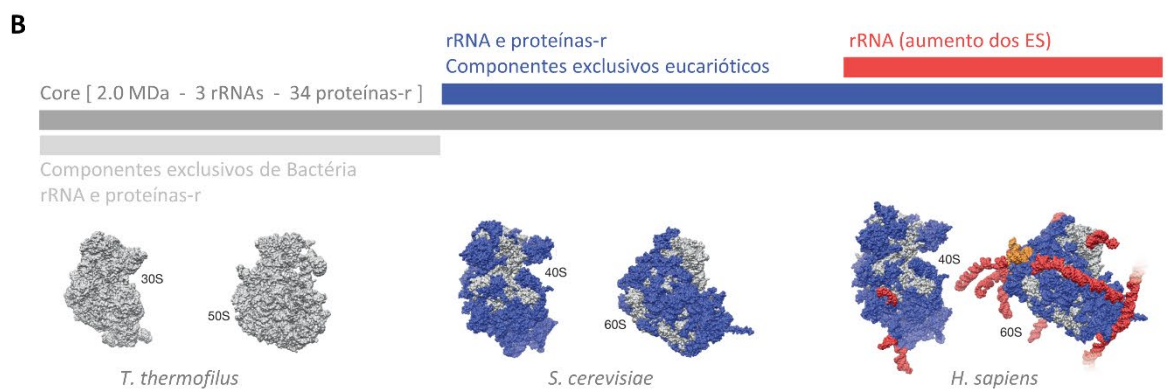
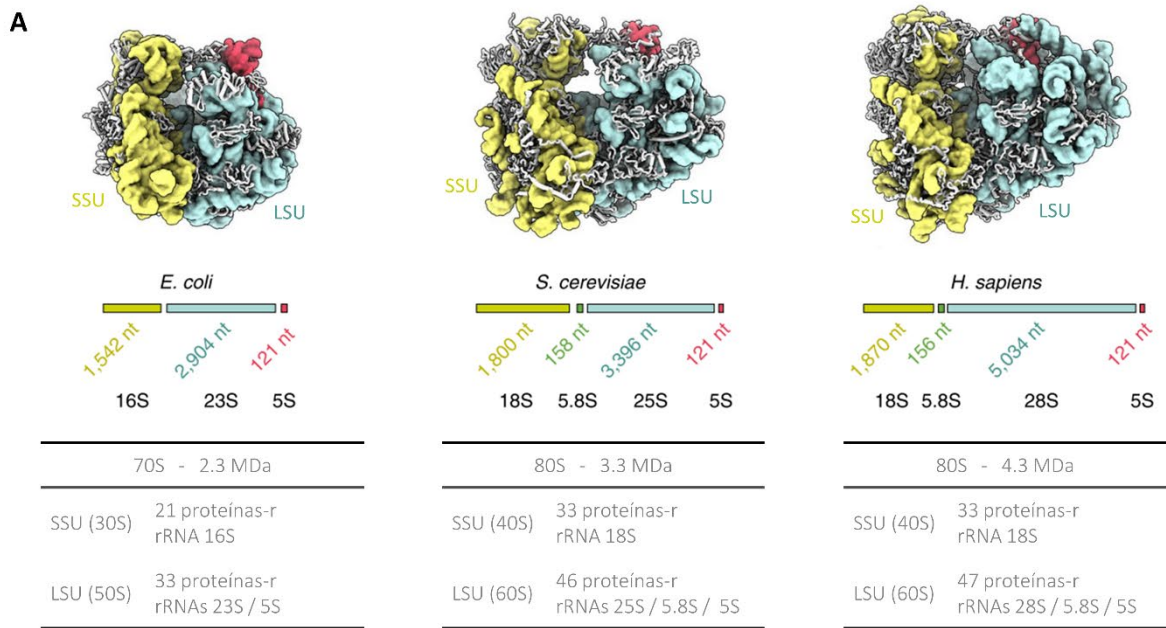


Figura 1. Conservação e divergência evolutiva dos ribossomos. (A) Estrutura e composição dos ribossomos de *E. coli* (PDB 4YBB), *S. cerevisiae* (PDB 4V88) e *H. sapiens* (PDB 6EK0). As duas subunidades assimétricas (maior – LSU, e menor - SSU) que compõem os ribossomos são compostas por proteínas-r (branco) e rRNAs específicos (destacado em cores). (Adaptado de Barandun et al., 2019 e Melnikov et al., 2012) (B) Comparação dos ribossomos de *T. thermophilus* (PDB 3I9D,3I9E), *S. cerevisiae* (PDB 4V88) e *H. sapiens* (PDB 6EK0) destacando sua evolução em camadas. Apesar da divergência evolutiva, com componentes exclusivos de bactérias e eucariotos, o ribossomo apresenta um *core* altamente conservado que inclui os centros funcionais. A adição de novos elementos estruturais (azul e vermelho) ocorre sobretudo externamente ao *core* conservado, como é o caso do progressivo aumento de tamanho dos segmentos de expansão (ES) do rRNA (Adaptado de Anger et al., 2013). (C) Proteínas-r e sua distribuição nos três Domínios da vida. Em azul, proteínas-r específicas de bactérias; em vermelho, específicas de eucariotos; em verde, presentes em eucariotos e archaeas; e em preto as que compõem o *core* ribossomal, sendo encontrada nos três Domínios (u: universal). (Adaptado de Bowman et al., 2020, com base em Ban et al., 2014). (D) Conservação dos centros funcionais do SSU (centro decodificador) e LSU (centro peptidiltransferase) evidenciada pela superposição do rRNA de representantes dos três Domínios (Bactéria: *E. coli* – vermelho; Archea: *P. furiosus* - azul; Eukarya: *S. cerevisiae* - amarelo) (Adaptado de Bowman et al., 2020).

A variação de tamanho das partículas ribossomais também é verificada dentro do grupo dos eucariotos. Enquanto o microsporídeo *V. necatrix*, um eucarioto parasita obrigatório, apresenta um ribossomo similar ao de bactérias, representando o limite da compactação (Barandun et al., 2019), o ribossomo humano 80S conta com uma proteína-r (eL28) a mais que *S. cerevisiae*, além de ES muito maiores no rRNA 28S (homólogo do rRNA 25S). Tais ES, entretanto, encontram-se na superfície externa das subunidades ribossomais formando hélices flexíveis (Fig. 1B) que não afetam a estrutura altamente conservada do *core* ribossomal (Anger et al., 2013; Melnikov et al., 2012; Ben-Shem et al., 2011; Agmon et al., 2009, 2005), a qual se figura como um verdadeiro registro molecular de cerca de 4 bilhões de anos (Fig. D) (Petrov et al., 2015).

Apesar da natureza da ligação peptídica ser conhecida desde 1901 (Goodman et al., 2003), foi apenas na década de 1950 que o componente celular responsável pela catálise de sua formação foi elucidado (Rheinberger, 2004). As primeiras imagens de ribossomos datam de 1955, tendo sido visualizados por microscopia eletrônica como partículas eletrodensas citoplasmáticas (Palade, 1955). Foram então necessários quase 50 anos, com avanços nas áreas de cristalografia de raio-X e de criomicroscopia eletrônica (crio-EM), para que estruturas de ribossomos em alta resolução pudessem ser obtidas. A estrutura das subunidades maior e menor do ribossomo de bactéria e archea foram as primeiras a serem resolvidas (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000; Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001; Schuwirth et al., 2005). Este feito foi reconhecido com o prêmio Nobel de Química em 2009 e revelou que o sítio catalítico peptidiltransferase é desprovido de proteínas, caracterizando o ribossomo como uma verdadeira ribozima (enzima de RNA), como previamente postulado (Noller et al., 1992).

Posteriormente, a estrutura do primeiro ribossomo eucariótico 80S foi obtida de *S. cerevisiae* por cristalografia de raio-X a uma resolução de 3.0Å (Ben-Shem et al., 2010, 2011). Esta estrutura revelou a alta conservação estrutural do centro peptidiltransferase (PTC) e do centro decodificador, o posicionamento externo dos ES, e o fato das proteínas ribossomais estarem sobretudo localizadas na superfície exposta ao solvente, com longas extensões adentrando a intrincada

estrutura terciária dos rRNAs (Bernier et al., 2018; Melnikov et al., 2012). Estas observações indicaram como principais papéis das proteínas-r: a ligação ao rRNA e a manutenção da estrutura terciária complexa dos rRNAs, sugerindo contribuição destas duas propriedades na montagem destes complexos (Ban et al., 2000; Lafontaine e Tollervey, 2001).

Na subunidade ribossomal menor 40S (Fig. 2), verificou-se que a estrutura terciária do rRNA 18S (1800 nt) se dispõe em 4 domínios (5', central, 3' maior e 3' menor) que juntamente com as proteínas-r formam elementos estruturais denominados “cabeça”, “corpo”, “pescoço”, “plataforma”, “bico” e “ombro” (catacreses adotadas na interpretação desta complexa estrutura).

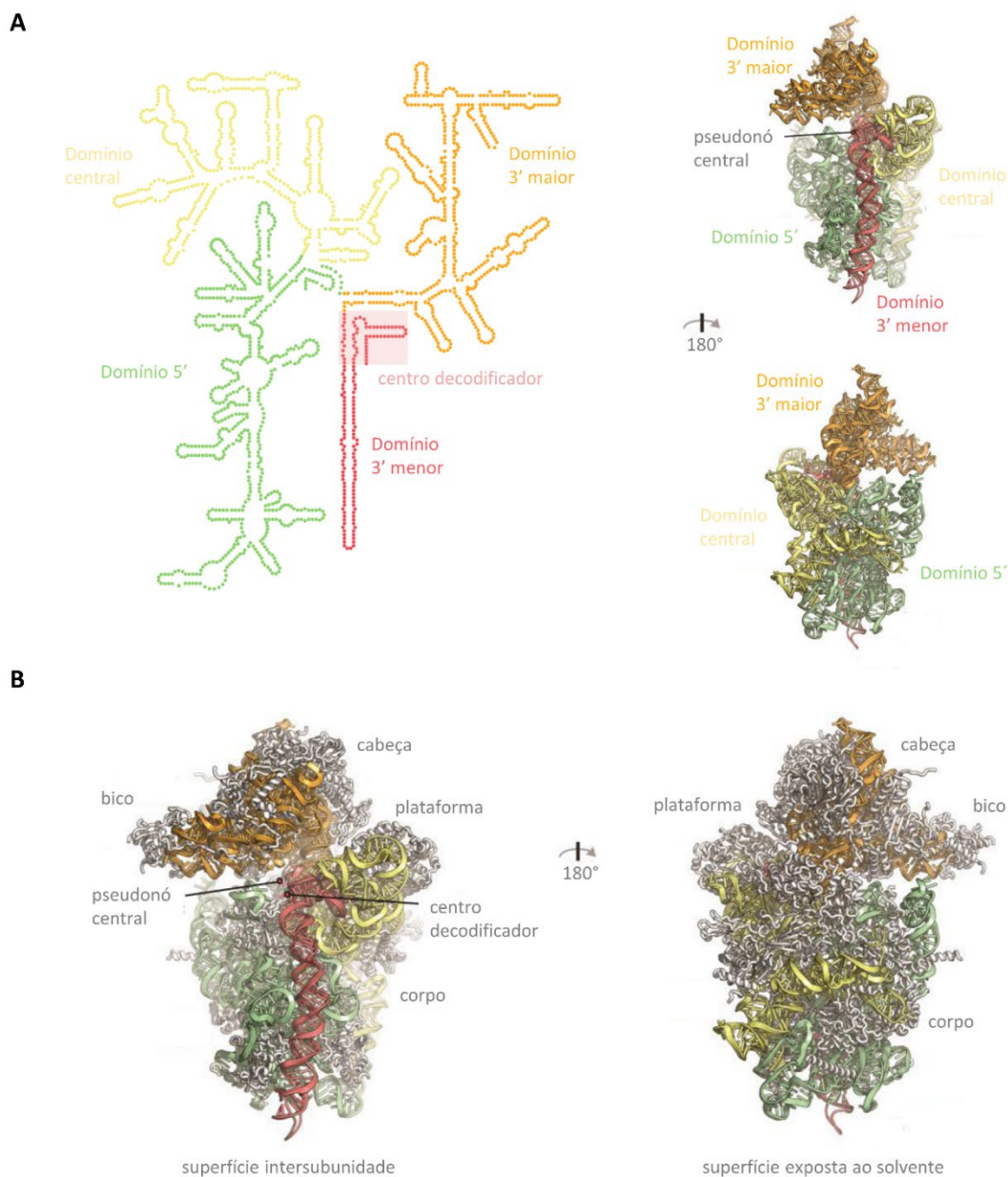


Figura 2. Estrutura da subunidade ribossomal 40S de *S. cerevisiae*. (A) Estrutura secundária do rRNA 18S, destacando em cores seus 4 domínios (obtida e editada com RiboVision v.1.15) (B) Estrutura terciária do rRNA 18S mostrando a disposição espacial dos seus domínios na subunidade 40S. (Adaptado de Klinge e Woolford, 2019) (C) Estrutura da subunidade 40S (PDB 4V88) evidenciando os elementos estruturais e a posição do centro decodificador (proteínas-r em branco e domínios do rRNA destacados em cores). São apresentadas a superfície intersubunidade (voltada ao 60S no ribossomo 80S) e a superfície exposta ao solvente (Adaptado de Klinge e Woolford, 2019).

Os 4 domínios são unidos por uma estrutura terciária denominada pseudonó central. Durante a tradução, a subunidade 40S possui a importante função de se associar ao mRNA e assegurar a adequada decodificação dos códons – trincas de nucleotídeos que definem um aminoácido ou o fim da tradução. Para tanto, o mRNA se posiciona em torno da fenda entre o corpo e a cabeça do 40S, denominada pescoço. É nesta região da superfície intersubunidade que se encontra o centro decodificador, no qual ocorre o pareamento entre códon do mRNA e anticódon do tRNA. Este centro funcional é fundamental para a fidelidade da tradução, influenciando na seleção do aminoacil-tRNA adequado e na manutenção da fase de leitura da sequência codificadora.

A subunidade ribossomal maior 60S (Fig. 3), por sua vez, apresenta o rRNA 25S (3396 nt) com uma complexa estrutura terciária e secundária subdividida em 6 domínios (nomeados de I a VI na ordem 5'-3'). Os ES distribuem-se na periferia envolvendo o *core* ribossomal. O rRNA 5.8S (158 nt) pareia e se entrelaça com o 25S, enquanto o rRNA 5S (121 nt) tem uma estrutura terciária independente. Juntamente com as 46 proteínas-r, os 3 rRNAs formam uma estrutura globular com elementos estruturais proeminentes como: a protuberância central (CP), composta pelo rRNA 5S; o L1-stalk, em cuja extremidade há a proteína-r uL1; e o P-stalk, em cuja extremidade se liga um pentâmero formado pelas proteínas-r uL10, (P1 e P2)₂. Na interface com a subunidade menor, uma concavidade delimita os três sítios de associação dos tRNAs: A, P e E (aminoacil, peptidil, e de saída). No sítio P encontra-se o centro peptidiltransferase (PTC), formado apenas por rRNA e responsável por catalisar a formação da ligação peptídica. Próximo deste sítio há um canal estreito de cerca de 80Å de extensão por onde o peptídeo nascente sai do ribossomo, denominado túnel de saída do polipeptídeo (PET). Na saída deste túnel, enzimas ou complexos auxiliam cotraducionalmente no enovelamento, endereçamento e modificação pós-traducional da proteína. Durante a tradução, a subunidade 60S não apenas forma e orienta a saída do polipeptídeo, como também auxilia na movimentação do ribossomo ao longo mRNA. Para tanto, próximo ao sítio A, entre o P-stalk e o *sarcin-ricin loop* (SRL), possui o centro de ativação de GTPases (GAC), que incluem fatores de iniciação e alongação, cuja atividade enzimática regula a seleção do tRNA e impulsiona a translocação de ambas as subunidades (Ben-Shem et al., 2011; Klinge et al., 2012; Melnikov et al., 2012).

Estas observações também foram verificadas mais recentemente na estrutura do ribossomo humano, de *Drosophila melanogaster*, *Tetrahymena thermophila*, e de *Trypanosoma brucei* (Rabl et al., 2011; Klinge et al., 2011; Anger et al., 2013; Hashem et al., 2013), revelando a alta conservação dos mecanismos básicos da tradução em eucariotos (Jobe et al., 2019). As diferenças mais significativas referem-se ao tamanho dos ES, que podem conferir novas funcionalidades e mecanismos de regulação durante a tradução ou auxiliar no processo de montagem das subunidades (Ramesh e Woolford, 2016).

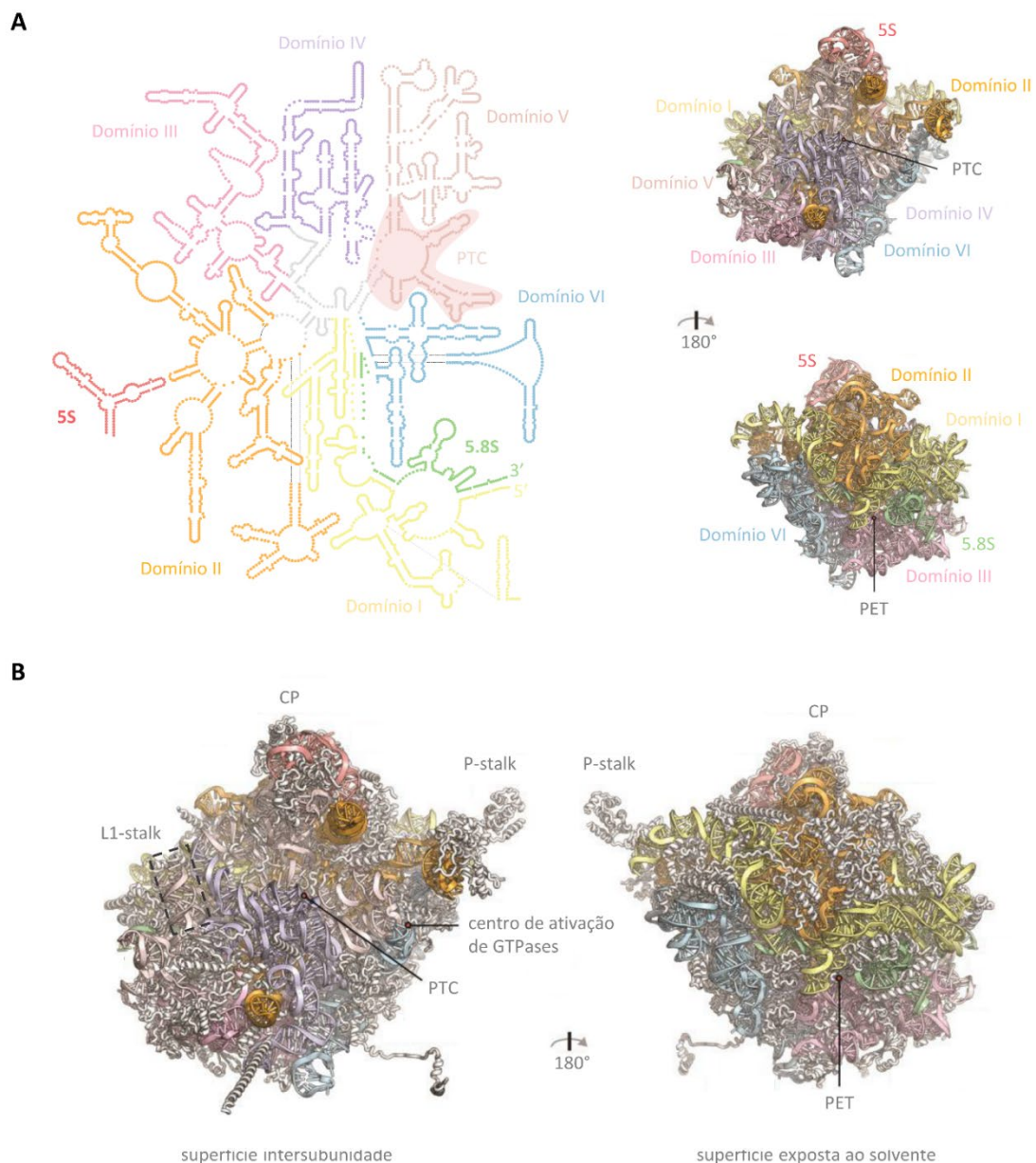


Figura 3. Estrutura da subunidade ribossomal 60S de *S. cerevisiae*. (A) Estrutura secundária dos rRNAs 5S, 5,8S e 25S, destacando em cores os 6 domínios do 25S (obtida e editada com RiboVision v.1.15) (B) Estrutura terciária dos rRNAs 5S, 5.8S e 25S mostrando a disposição espacial dos seus domínios na subunidade 60S. (PTC: centro peptidiltransferase; PET: túnel de saída do polipeptídeo) (Adaptado de Klinge e Woolford, 2019) (C) Estrutura da subunidade 60S (PDB 4V88) evidenciando os elementos estruturais (L1-stalk, P-stalk e protuberância central - CP) e a posição do centros funcionais PTC e PET (proteínas-r em branco e domínios do rRNA destacados em cores). São apresentadas a superfície intersubunidade (voltada ao 40S no ribossomo 80S) e a superfície exposta ao solvente (Adaptado de Klinge e Woolford, 2019).

A tradução do mRNA requer a participação de múltiplos fatores que se associam transientemente às subunidades ribossomais maduras nos estágios de iniciação, alongação, terminação e reciclagem (Jackson et al., 2010a). Durante este ciclo, 40S e 60S se unem em torno do transcrito formando a partícula ribossomal 80S. Os 17 pontos de contato encontrados entre as subunidades ribossomais maior e menor são denominados pontes intersubunidade. Estas pontes não apenas estabilizam o 80S, mas permitem movimentação e rotação entre as

subunidades (Ben-Shem et al., 2011). À medida que os códons são traduzidos sequencialmente, o 80S sofre mudanças conformacionais, num ciclo GTPase-dependente, que impulsionam sua translocação em um movimento “*ratchet-like*” (Dever et al., 2016).

O processo da tradução, apesar de elemento essencial no fluxo da informação gênica, é energeticamente dispendioso, estando integrado a diversos mecanismos de controle de qualidade que podem levar à degradação do peptídeo em formação e do mRNA traduzido. Cada vez mais, o ribossomo tem se mostrado fundamental na regulação da meia-vida dos mRNAs, afetando tanto o transcriptoma quanto o proteoma (Simms et al., 2017). De um modo geral, a fidelidade da tradução e a proteostase são altamente dependentes da montagem precisa de ambas subunidades ribossomais, garantindo a formação correta de seus intrincados centros funcionais (Tye et al., 2019; Huang et al., 2020; Collins et al., 2018).

1.2 Biogênese ribossomal eucariótica

A biogênese ribossomal eucariótica constitui um processo de múltiplas etapas, hierarquicamente organizado, energeticamente dispendioso, e altamente regulado que ocorre em diferentes compartimentos subcelulares (Fig. 4) (Baßler e Hurt, 2019; Klinge e Woolford, 2019; Woolford e Baserga, 2013). Este processo tem início no nucléolo, um subcompartimento nuclear não delimitado por membrana, que, em *S. cerevisiae*, é organizado em torno de uma região do cromossomo XII, onde se encontram cerca de 100 a 200 cópias em tandem do rDNA (DNA ribossomal) - *locus* que codifica os rRNAs (Thiry e Lafontaine, 2005; Venema e Tollervey, 1999). A estrutura do nucléolo é dinâmica e mantida por separação de fase, sendo dependente da transcrição ativa do rDNA (Falahati et al., 2016; Feric et al., 2016; Lafontaine et al., 2021). Em *S. cerevisiae*, estima-se que 60% de toda transcrição, e 50% da mediada pela RNA Polimerase II são destinadas à biogênese ribossomal, garantindo a formação de cerca de 2000 ribossomos por minuto em fase exponencial de crescimento (Warner, 1999).

A atividade coordenada das três RNA polimerases é necessária para a formação das subunidades 40S e 60S. Enquanto a RNA polimerase III produz o rRNA 5S, a RNA polimerase II transcreve os genes que codificam proteínas ribossomais e fatores de montagem, além dos snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) envolvidos em modificações dos rRNAs. A RNA polimerase I, por sua vez, produz o transcrito policistrônico 35S (pré-rRNA), precursor dos rRNAs maduros 18S, 25S e 5.8S (Woolford e Baserga, 2013).

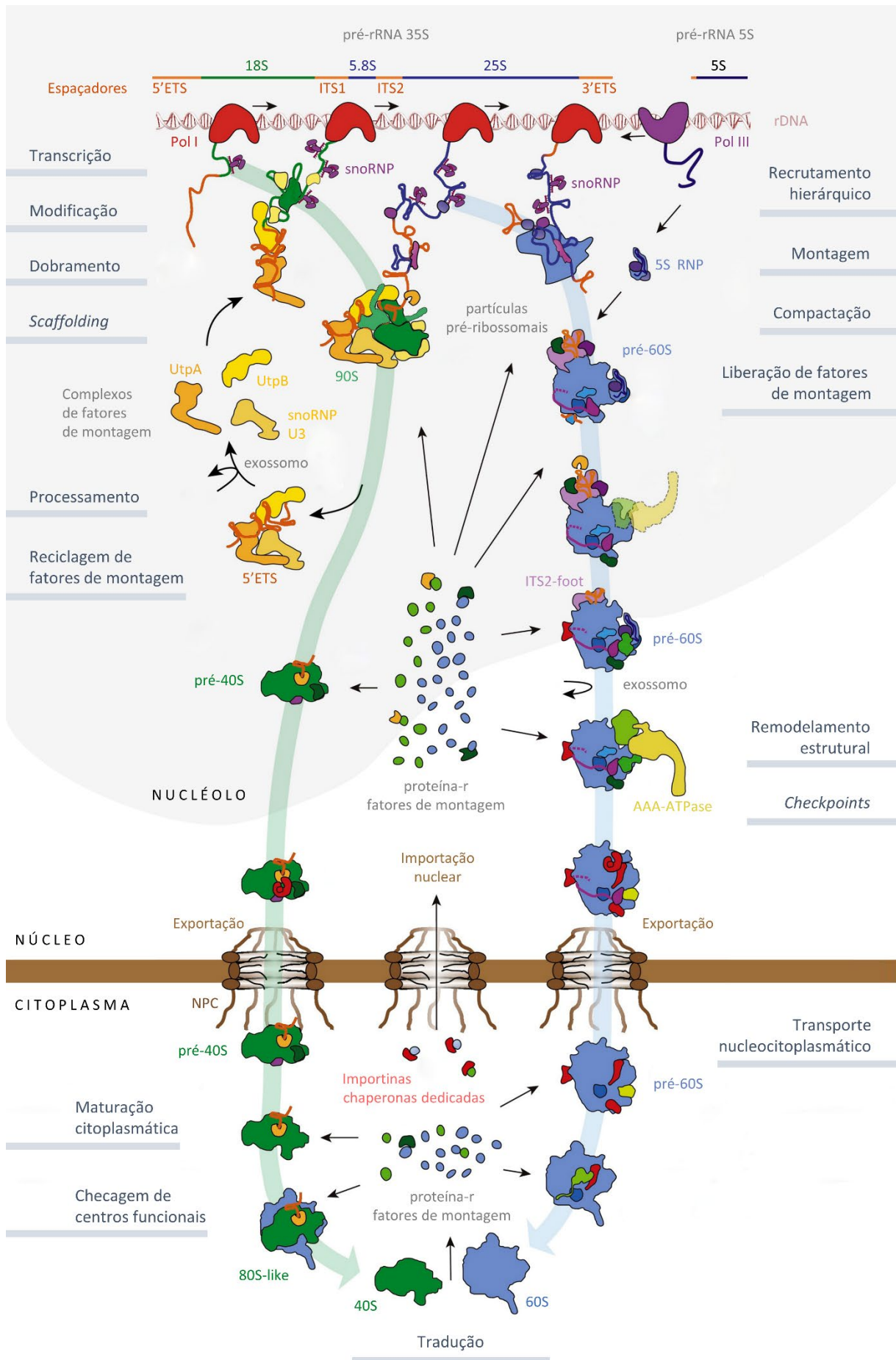


Figura 4. Esquema da biogênese ribossomal em *S. cerevisiae*. O processo tem início no nucléolo com a transcrição dos pré-rRNAs 35S e 5S, esquematizados no topo. O pré-rRNA 35S apresenta espaçadores internos e externos (laranja), cuja remoção resultará nos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S. Co-transcricionalmente, fatores de montagem, proteínas-r e complexos interagem com o pré-rRNA nascente formando o 90S. Estes componentes são traduzidos no citoplasma e precisam ser importados para o núcleo e nucléolo. snoRNPs catalisam modificações do rRNA. Uma clivagem no ITS1 separa as vias de formação das subunidades 40S (verde) e 60S (azul), que ocorrem de modo independente. Eventos de clivagem endonucleolítica e exonucleolítica remodelam as partículas pré-ribossomais, como é o caso da remoção do *ITS2-foot* do pré-60S. Fatores de montagem e proteínas-r são recrutados hierarquicamente à medida que seus sítios de ligação se formam ou tornam-se disponíveis. Os domínios de rRNA são dobrados e remodelados por ação de helicases e AAA-ATPases. No núcleo, as partículas pré-ribossomais se associam a fatores de exportação tornando-se competentes a serem exportadas através do NPC (complexo do poro nuclear). No citoplasma, novos fatores de montagem são recrutados auxiliando na maturação e checagem dos centros funcionais. As últimas proteínas-r se associam enquanto os fatores de montagem se dissociam liberando subunidades ribossomais maduras aptas à tradução. Os processos fundamentais da biogênese ribossomal são apontados nas laterais, alguns dos quais ocorrem em mais de uma etapa e mais de um compartimento celular. (Adaptado de Kressler et al., 2017)

No pré-rRNA 35S, as sequências dos rRNAs maduros são separadas por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e flanqueadas por espaçadores transcritos externos (5'ETS e 3'ETS) (Woolford e Baserga, 2013). Através de uma sequência ordenada de clivagens sítio-específicas endo- e exonucleolíticas, estes espaçadores são removidos. Os pré-rRNAs são co- e pós-transcricionalmente processados, dobrados e covalentemente modificados havendo uma compactação estrutural progressiva (Klinge e Woolford, 2019; Woolford e Baserga, 2013; Koš e Tollervey, 2010; Tomecki et al., 2017; Fernández-Pevida et al., 2015).

Neste processo, as proteínas-r são recrutadas hierarquicamente, associando-se de forma gradativamente mais estável ao pré-rRNA (de la Cruz et al., 2015; Gamalinda et al., 2014). Mais de 200 fatores de montagem participam transitoriamente, coordenando espaço-temporalmente mudanças conformacionais e de composição dos intermediários pré-ribossomais. Estes fatores de montagem são recrutados e liberados em etapas específicas, não fazendo parte da composição das subunidades ribossomais maduras.

Por meio de abordagens complementares, incluindo espectrometria de massas e criomicroscopia eletrônica, várias partículas pré-ribossomais já foram caracterizadas. Elas são normalmente denominadas de acordo com o fator de montagem utilizado como isca na coimunoprecipitação (ex. partícula Nog2), e por vezes de acordo com uma classificação secundária, no caso de mais de um estado de maturação ter sido identificado com uma mesma isca (ex. partículas Nsa1 estado A – estado E). A composição específica de pré-rRNAs e fatores de montagem destas partículas forneceram a base para nosso entendimento da sequência dos eventos de maturação (Baßler e Hurt, 2019; Klinge e Woolford, 2019; Woolford e Baserga, 2013).

Importantes contribuições à descrição deste processo têm sido feitas utilizando o organismo modelo *S. cerevisiae*, eucarioto no qual a biogênese ribossomal é mais bem caracterizada (Klinge e Woolford, 2019; Woolford e Baserga, 2013). A fácil manipulação genética, o pequeno tempo de geração, a existência de ferramentas e protocolos padronizados para purificação de

complexos proteicos (Rigaut et al., 1999; Puig et al., 2001) e principalmente a facilidade do aumento de escala na produção de biomassa em fermentadores são algumas das vantagens que permitiram que diversos intermediários pré-ribossomais, menos abundantes que as subunidades maduras, tenham sido caracterizados neste organismo.

Os mecanismos essenciais descritos em *S. cerevisiae* são altamente conservados evolutivamente, apesar da biogênese de ribossomos humanos apresentar algumas diferenças em etapas do processamento do rRNA e envolver um maior número de fatores de montagem, muitos dos quais ainda elusivos (Aubert et al., 2018; Bohnsack e Bohnsack, 2019; Tomecki et al., 2017). Dentre os fatores de biogênese ribossomal humanos já caracterizados, diversos são homólogos aos de levedura, desempenhando o mesmo papel e apresentando o mesmo sítio de ligação nos intermediários pré-ribossomais humanos já descritos (Larburu et al., 2016; Ameismeier et al., 2018; Liang et al., 2020).

Um crescente interesse na compreensão da biogênese ribossomal provém do seu envolvimento em diversas patologias, e da sua integração com outros processos biológicos como crescimento e proliferação celular. Disfunções na montagem de ribossomos já foram associadas à iniciação e progressão do câncer (Bohnsack e Bohnsack, 2019; Pelletier et al., 2018). Além disso, mutações congênitas ou somáticas em proteínas ribossomais, fatores de montagem e de processamento do rRNA são a base de um grupo heterogêneo de doenças coletivamente denominadas ribossomopatias, incluindo, entre outras, a anemia Diamond–Blackfan (DBA), a síndrome Shwachman–Bodian–Diamond, a disqueratose congênita, a síndrome mielodisplásica 5q-, e a síndrome de Treacher Collins. Elas possuem fenótipos tecido-específicos, apresentando, em geral, manifestações hematológicas ou ósseas (Kampen et al., 2020; Bohnsack e Bohnsack, 2019; Narla e Ebert, 2010). A caracterização estrutural de partículas pré-ribossomais em *S. cerevisiae* tem auxiliado na compreensão de alguns mecanismos fisiopatológicos de certos mutantes (Kargas et al., 2019).

Com o avanço da criomicroscopia eletrônica, a estrutura de um grande número de intermediários de maturação ribossomal vem sendo obtida com alta resolução (Klinge e Woolford, 2019; Konikkat e Woolford, 2017; Greber, 2016). Destas estruturas podem-se depreender alguns princípios gerais da biogênese ribossomal eucariótica (Fig. 4), incluindo: a compactação progressiva do pré-rRNA, reduzindo sua liberdade conformacional; o recrutamento hierárquico dos fatores de montagem, com base em mimetismo molecular (ex. *placeholders*) e efeito estérico, prevenindo dobramentos incorretos ou processamento prematuro dos pré-rRNAs; a irreversibilidade de *checkpoints*, devido à ação de ATPases/GTPases ou endo/exonucleases, garantindo direcionalidade ao processo; e a checagem, em diferentes etapas, dos centros funcionais em formação (Klinge e Woolford, 2019).

1.2.1 Modificação do pré-rRNA

Durante a montagem de ambas as subunidades ribossomais, o pré-rRNA é alvo de diversas modificações que alteram propriedades químicas e topológicas dos nucleotídeos (Fig. 5). Em *S. cerevisiae*, 112 resíduos são modificados (cerca de 2%). Diferentemente dos tRNAs que possuem 25 tipos diferentes de modificação, os rRNAs apresentam apenas 12 (Figs. 5A,B), sendo as predominantes a metilação do grupo 2'-OH de ribose (55 sítios) e a isomerização de uridina a (ψ) pseudouridina (pseudouridilação em 45 sítios). A maior parte delas ocorre co-transcricionalmente e nos estágios nucleolares mais iniciais quando os resíduos a serem modificados ainda estão acessíveis (Koř e Tollervey, 2010; Sharma e Lafontaine, 2015; Sloan et al., 2016).

Neste processo, 76 snoRNAs, em complexos denominados snoRNPs, direcionam enzimas aos sítios exatos de modificação através do pareamento de bases com o pré-rRNA (Fig. 5A). Enquanto a metilação de riboses é realizada pela metiltransferase Nop1 associada a Snu13, Nop56, Nop58 e snoRNAs de box C/D, a pseudouridilação é realizada pela pseudouridina sintetase Cbf5 associada a Nhp2, Gar1, Nop10 e snoRNAs de box H/ACA (Watkins e Bohnsack, 2012; Sharma e Lafontaine, 2015; Sloan et al., 2016). Raras exceções incluem uma pseudouridilação (Ψ 50) no rRNA 5S e uma metilação de ribose (G2922) no rRNA 25S realizadas respectivamente por Pus7 e Spb1, ambas enzimas independentes de snoRNAs (Decatur e Schnare, 2008; Lapeyre e Purushothaman, 2004). Curiosamente, nem todos os snoRNAs guiam modificações no rRNA, como é o caso do U3 e snR30, que desempenham um papel estrutural, mantendo regiões do pré-rRNA em fita simples, de modo a impedir a formação de estrutura secundárias ou dobramentos incorretos (Sloan et al., 2016).

Adicionalmente, as bases nitrogenadas de 12 resíduos de nucleotídeo, 6 em cada subunidade ribossomal, são alvo de metilação, acetilação ou aminocarboxipropilação. Estas modificações covalentes são catalisadas por enzimas específicas (Emg1, Bud23, Dim1, Rrp8, Bmt2, Rcm1, Nop2, Bmt5, Bmt6, Kre33 e Tsr3) em diferentes estágios da maturação das subunidades ribossomais (Sloan et al., 2016). É interessante notar que os sítios de modificação, tanto de ribose como das bases nitrogenadas, não se encontram na superfície exposta ao solvente, mas sim agrupados na superfície intersubunidade em regiões conservadas do *core* ribossomal, próximos ou diretamente incluídos nos centros funcionais como o PTC e o centro decodificador (Fig. 5C). Apesar da função de tais modificações ainda não estar totalmente esclarecida, diversos indícios apontam para seu papel sinérgico otimizando a tradução, estabilizando dobramentos do rRNA e contatos entre as subunidades (Sharma e Lafontaine, 2015; Sloan et al., 2016).

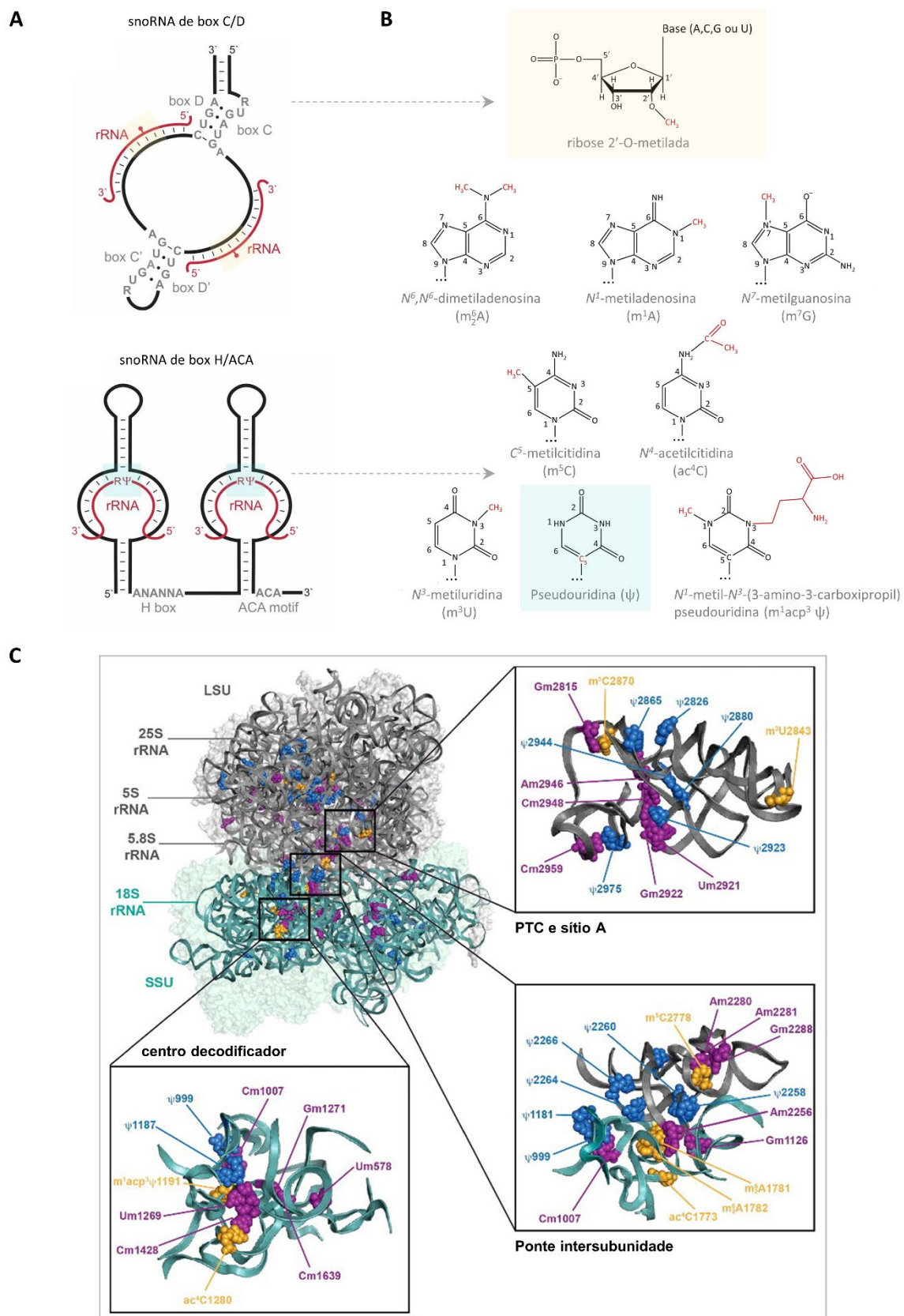


Figura 5. Modificações do rRNA em *S. cerevisiae*. (A) Esquema dos snoRNAs de box C/D e snoRNAs de box H/ACA que, na forma de snoRNPs e através do pareamento com o rRNA, selecionam respectivamente os sítios de 2'O-metilação de ribose e de pseudouridilação. (Adaptado de Watkins e Bohnsack, 2012) (B) Modificações do rRNA presentes em *S. cerevisiae*. Além da metilação da ribose, as bases nitrogenadas dos nucleosídeos também são alvo de modificações que alteram propriedades químicas e topológicas do rRNA. À exceção da pseudouridilação, as demais

modificações de bases não são guiadas por snoRNAs (Adaptado de Sharma e Lafontaine, 2015). **(C)** Estrutura do ribossomo 80S (SSU + LSU) de *S. cerevisiae* (PDB 4V88) destacando a posição das modificações do rRNA [ribose 2'-O-metilada (roxo), pseudouridina (azul) e demais modificações de bases (amarelo)]. Em destaque, o PTC (centro peptidiltransferase), o centro decodificador, e uma ponte intersubunidade, evidenciando as múltiplas modificações dos centros funcionais. (Extraído de Sloan et al., 2016)

1.2.2 Processamento do pré-rRNA

O processamento do pré-rRNA 35S envolve o recrutamento espaço-temporalmente coordenado de diversas ribonucleases que removem espaçadores internos (ITS1 E ITS2) e externos (5'ETS e 3'ETS) progressivamente à medida que as subunidades vão tomando forma e adquirindo conformações maduras (Fig. 6) (Fernández-Pevida et al., 2015; Henras et al., 2015; Tomecki et al., 2017). O caráter gradual deste processo, o qual só é finalizado no citoplasma, se deve, em parte, pelo fato destes espaçadores desempenharem importantes papéis estruturais como chaperonas ou *scaffolds*, em conjunto com fatores de montagem que a eles se associam, auxiliando no dobramento e compactação dos elementos de estrutura secundária dos rRNAs (Baßler e Hurt, 2019).

Em condições de crescimento exponencial, cerca de 70% do pré-rRNA 35S é processado co-transcricionalmente com clivagens na extremidade 5' terminal nascente nos sítios A₀, A₁ (no 5'ETS) e A₂ (no ITS1) que flanqueiam o rRNA 18S (Koš e Tollervey, 2010). Estas clivagens, no entanto, só ocorrem após a RNA Pol I ter iniciado a transcrição do 25S, 1.5kb *downstream* do sítio A₂ (Lebaron et al., 2013; Axt et al., 2014; Osheim et al., 2004). Em outros termos, a primeira partícula pré-ribossomal, denominada 90S, deve estar minimamente formada com fatores de montagem e proteínas ribossomais integrados para que as ribonucleases sejam recrutadas, posicionadas e estes sítios de clivagem expostos.

A remoção do 5'ETS tem início com as clivagens endonucleolíticas em A₀ seguida por A₁, delimitando a extremidade 5' madura do rRNA 18S. Sabe-se que a endonuclease Utp24 cliva o sítio A₁ (Bleichert et al., 2006; Wells et al., 2016), enquanto o mecanismo de clivagem em A₀ permanece desconhecido. O snoRNP U3, ao parear tanto com o 5'ETS quanto com a extremidade 5' do 18S, desempenha um papel essencial nestas clivagens (Phipps et al., 2011). Os fragmentos do 5'ETS são então degradados pela atividade exonucleolítica 3'-5' do complexo exossomo associado à helicase Mtr4 (Allmang et al., 2000). A clivagem no sítio A₂ do ITS1 está acoplada à clivagem em A₁ (Fernández-Pevida et al., 2015), ocorrendo por ação de Utp24 ou Rcl1 (Bleichert et al., 2006; Wells et al., 2016; Horn et al., 2011). Através da clivagem em A₂, libera-se o pré-rRNA 20S, composto pelo rRNA 18S e uma extensão de 212nt na extremidade 3'.

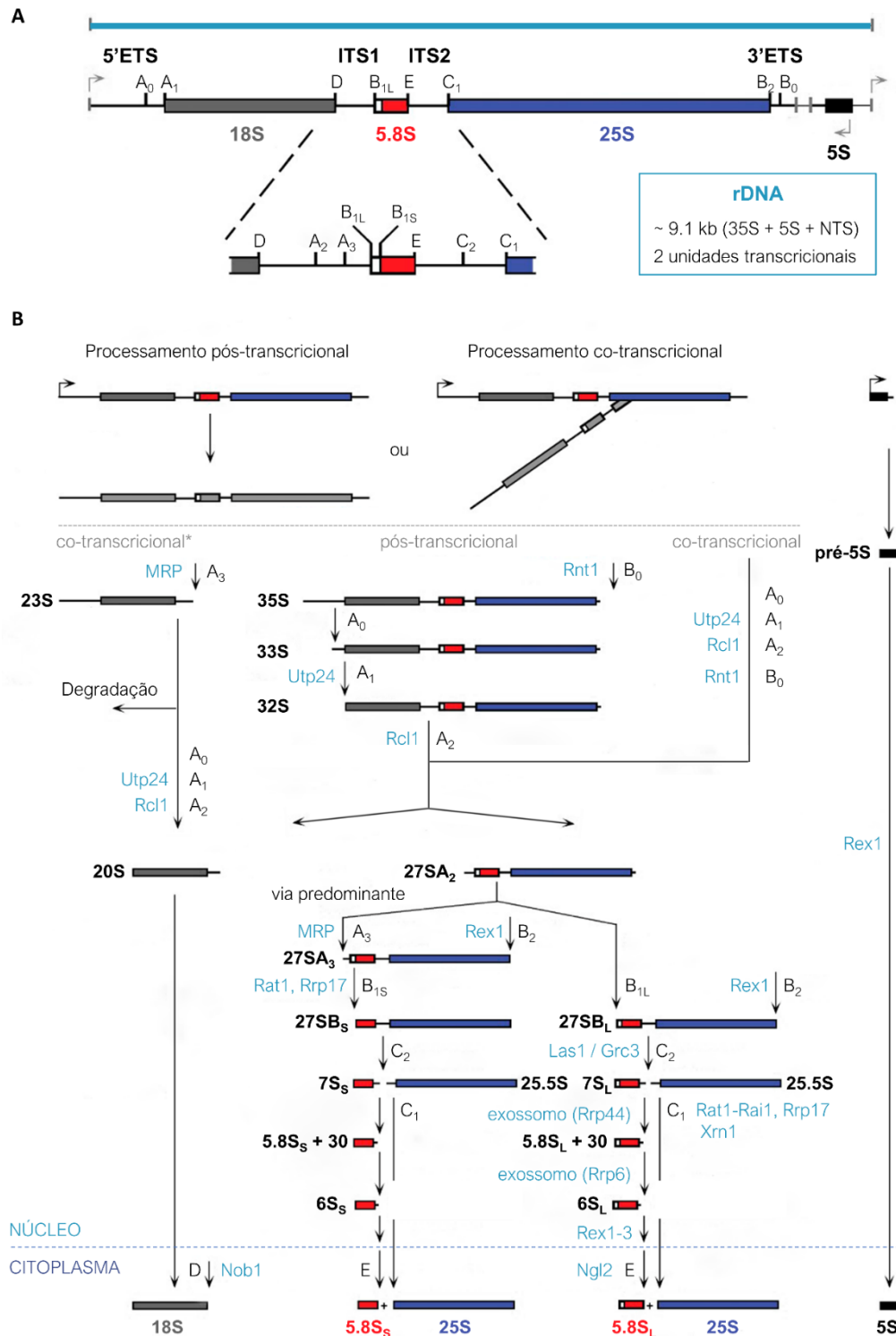


Figura 6. Processamento do pré-rRNA em *S. cerevisiae*. (A) Organização do rDNA, cujas 150-200 repetições em tandem se encontram no cromossomo XII, na região em torno da qual o nucléolo se forma. O 35S e o 5S fazem parte de unidades transcrpcionais independentes. O pré-rRNA 35S é policistrônico, contendo as sequências dos rRNAs 18S, 5.8S e 25S separadas por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e flanqueadas por espaçadores transcritos externos (5'ETS e 3'ETS). Os sítios de clivagem dos espaçadores estão destacados (NTS: sequência não transcrita – incluindo promotor e terminador da transcrição). (Adaptado de Fernández-Pevida et al., 2015) (B) Esquema da sequência de clivagens endonucleolíticas e exonucleolíticas durante o processamento do pré-rRNA 35S. O 5S é processado de forma independente. O processamento do pré-rRNA 35S se inicia no nucléolo co- ou pós-transcrpcionalmente, continua no núcleo e é finalizado apenas no citoplasma. (*via co-transcrpcional que ocorre em condições específicas - crescimento lento ou mutantes que afetam clivagens anteriores). As enzimas e complexos envolvidos nas clivagens são destacados em azul ao lado dos sítios de clivagem que têm por alvo. As enzimas que clivam os sítios A₀ e B_{1L} ainda permanecem desconhecidas (Adaptado de Fernández-Pevida et al., 2015)

A transcrição pela RNA Pol I progride até o 3'ETS, onde a endonuclease Rnt1 cliva o sítio B₀, liberando o pré-rRNA 27SA₂. Este precursor é composto por uma parte do ITS1 seguida pelos rRNAs 5.8S e 25S separados pelo ITS2. Alternativamente, na via de processamento pós-transcricional, as clivagens em A₀, A₁ e A₂ ocorrem apenas após a finalização da transcrição do 3'ETS e da clivagem em B₀, liberando o pré-rRNA 35S. Em ambos os casos, os 14 nt restantes na extremidade terminal 3' do rRNA 25S são removidos pela exonuclease 3'-5' Rex1 (Tomecki et al., 2017). Tanto na via co-transcricional quanto pós-transcricional, a separação dos pré-rRNAs 20S e 27SA₂ é fundamental, pois permite a maturação independente das subunidades 40S e 60S.

No pré-60S, a formação da extremidade 5' madura do rRNA 5.8S ocorre de duas formas distintas. A via preponderante se inicia com a clivagem endonucleolítica no sítio A₃ pelo RNA catalítico do complexo MRP, gerando o pré-rRNA 27SA₃. Esta clivagem ocorre pós-transcionalmente, estando acoplada à clivagem em B₀ (Allmang e Tollervey, 1998). Deve-se notar que uma pequena fração do pré-rRNA 35S apresenta clivagem prematura em A₃, antes das clivagens no 5'ETS ou em A₂, gerando intermediários 23S/22S/21S, que podem tanto ser degradados como gerar o rRNA 18S maduro. A formação destes intermediários é favorecida em condições de crescimento lento e em mutantes que afetam etapas iniciais de processamento (Allmang et al., 2000; Ferreira-Cerca et al., 2007; Talkish et al., 2016; Kos-Braun et al., 2017). Em condições normais, o pré-rRNA 27SA₃ formado é processado por Rat1, Rrp17 ou Xrn1, que são exonucleases 5'-3' com atividade redundante no processamento do ITS1. Esta clivagem termina no sítio B_{1S} delimitando a extremidade 5' do 5.8S_S (*short*) no pré-rRNA 27SB_S. Na via secundária, o sítio A₃ não é clivado, mas sim o sítio B_{1L} por uma endonuclease ainda desconhecida, que gera o pré-rRNA 27SB_L contendo o 5.8S_L (*long*), com uma extremidade 5' 6nt mais longa do que a do 5.8S_S. A cepa selvagem de *S. cerevisiae* produz 5.8S_S e 5.8S_L a uma razão de 5:1. O impacto ou papel destas variantes na tradução permanece ainda desconhecido.

A última etapa de processamento no pré-60S envolve a remoção em múltiplas etapas do ITS2, gerando as extremidades 3' do 5.8S e 5' do 25S. A clivagem endonucleolítica no sítio C₂ pelo complexo Las1-Grc3 converte o pré-rRNA 27SB em 7S e 26S (Gasse et al., 2015). Em função do extensivo pareamento de bases entre 5.8S e 25S, estes pré-rRNAs continuam entrelaçados na estrutura do pré-60S. Esta clivagem ocorre na transição da partícula pré-60S entre nucléolo e nucleoplasma. A extremidade 5' madura do 25S é então gerada pela atividade exonucleolítica 5'-3' de Rat1-Rai1 (ou Xrn1, Rrp17 – que apresentam papel redundante nesta etapa). Ao mesmo tempo, a extremidade 3' do pré-rRNA 7S é clivada exonucleoliticamente pelas duas subunidades catalíticas do exossomo. Inicialmente por Rrp44, que remove cerca de 110nt, gerando o 5.8S+30, seguida pela ação de Rrp6, que deixa 5-8nt remanescentes do ITS2 no pré-rRNA 6S (Briggs et al., 1998; Allmang et al., 2000). Exonucleases Rex1, Rex2 e Rex3 parecem

contribuir no processamento do 6S, deixando 5nt excedentes, os quais são removidos apenas no citoplasma por ação da nuclease Ng12 (Faber et al., 2002; Thomson e Tollervey, 2010).

O processamento do pré-rRNA 20S na subunidade pré-40S, por sua vez, é significativamente menos complexo. No citoplasma, a endonuclease Nob1 cliva o sítio D delimitando a extremidade 3' madura do rRNA 18S (Fatica et al., 2003; Pertschy et al., 2009). Esta clivagem ocorre em uma importante etapa de controle de qualidade, na qual o pré-40S se associa, na ausência de mRNA ou tRNA, a uma subunidade 60S madura com o fator de iniciação da tradução eIF5B, simulando a formação de uma partícula ribossomal 80S (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012).

Paralelamente, o rRNA 5S, que, apesar de fazer parte do rDNA, provém de uma unidade transcricional independente, é processado separadamente no núcleo. O pré-rRNA 5S, transcrito primário da RNA Pol III, apresenta uma extremidade terminal 5' madura e 12 nt excedentes na extremidade 3', os quais são removidos pela exonuclease Rex1 (van Hoof et al., 2000a; Lee e Nazar, 1997).

1.2.3 Recrutamento de proteínas ribossomais

Apesar do ribossomo ser uma ribozima, as proteínas-r constituem elementos estruturais fundamentais para sua formação e função. Algumas encontram-se, por exemplo, nas pontes intersubunidade (uL2, uL3, uL5, uL14, eL19, eL24e, eL30, eL41, eL43, eS1, eS6, uS7, eS8, uS13, uS15 e uS19) provendo sítios de interação transientes durante a tradução (Ben-Shem et al., 2011). Durante a biogênese ribossomal, à medida que o pré-rRNA é transcrito e processado, elas são recrutadas de forma hierárquica em etapas específicas da maturação (inicial, intermediária ou tardia) no nucléolo, núcleo e algumas apenas no citoplasma (de la Cruz et al., 2015; Gamalinda et al., 2014). Frequentemente, interações inicialmente fracas no recrutamento das proteínas-r se tornam mais fortes com a progressão da montagem, devido à orientação correta dos sítios de interação ou presença de sítios adicionais que surgem com o progressivo dobramento do rRNA (Woolford e Baserga, 2013; de la Cruz et al., 2015). Os fatores de montagem têm um grande impacto no recrutamento de proteínas-r, alguns dos quais (ex. Mtr4, Rlp24) atuando como *placeholders*, que impedem sua associação prematura (ex. uL10, eL24) (Espinar-Marchena et al.; Klinge e Woolford, 2019). Todas as proteínas-r interagem com RNA, e nas diferentes regiões a que se associam auxiliam na estabilização da estrutura terciária complexa do rRNA, garantindo mudanças conformacionais limitadas e reversíveis durante o ciclo da tradução (Woolford e Baserga, 2013; de la Cruz et al., 2015). Algumas apresentam inclusive funções extra-ribossomais caracterizadas (Warner e McIntosh, 2009; Zhou et al., 2015). O papel das proteínas-r na biogênese ribossomal se estende a auxiliar na compactação do rRNA (com

efeitos locais e de longa distância, guiando dobramentos corretos), prover sítios de ligação adicionais a fatores de montagem, estabilizando a associação e o posicionamento correto, bem como servindo de impedimento estérico a nucleases durante o processamento do pré-rRNA, delimitando a extremidade madura dos rRNAs (Woolford e Baserga, 2013; de la Cruz et al., 2015; Klinge e Woolford, 2019). A título de exemplo, Rpl17/uL22 auxilia na delimitação do sítio B_{1S}, protegendo a extremidade 5' madura do rRNA 5.8S (Fernández-Pevida et al., 2015; Sahasranaman et al., 2011).

A necessidade das 79 proteínas-r em proporções estequiométricas, faz com que sua co-expressão seja regulada em nível transcricional e pós-transcricional, sendo sensível à disponibilidade de nutrientes (via TOR/mTOR) e ao status da biogênese ribossomal (Petibon et al., 2021; Zencir et al., 2020). A complexidade é ainda maior considerando que a maioria das proteínas-r provém de genes duplicados. Em levedura, 59 possuem parálogos, 37 dos quais com 1 a 5 aminoácidos distintos, perfazendo 137 unidades transcricionais independentes. Esta diversidade contribui para a heterogeneidade do *pool* de ribossomos, cuja composição em parálogos varia de acordo com condições de crescimento e estresse, com alguns impactos parálogo-específicos já caracterizados (Ghulam et al., 2020; Parenteau et al., 2015; Xue e Barna, 2012; Komili et al., 2007).

Quanto à nomenclatura, as proteínas-r que se associam à subunidade 40S são nomeadas rpS ou S (ex. S1, rpS1), enquanto as da subunidade 60S são identificadas por rpL ou L (ex. L1, rpL1). As únicas exceções são proteínas do *P-stalk* da subunidade 60S (denominadas P0, P1 e P2), e Asc1 (RACK1) da subunidade 40S. Os parálogos são identificados por sufixos A e B (ex. rpS1A, rpS1B). Recentemente, uma nova nomenclatura foi proposta visando uniformizar sua identificação levando em consideração a homologia entre os três Domínios (Fig. 1C) (Ban et al., 2014). O sistema L e S foi mantido, mas o número associado a algumas proteínas mudaram (ex. rpL17 se torna uL22), além da adição de um prefixo “b”, “e” ou “u” designando respectivamente: presença exclusiva em bactérias; presença exclusiva em eucariotos e *archeas* ou apenas eucariotos; ou presença “universal” nos três Domínios (ex. bL12, eL8, uL1). Neste trabalho adotamos as duas nomenclaturas, indicando, sempre que possível, as duas formas.

As proteínas-r, de modo geral, possuem regiões ricas em aminoácidos positivamente carregados (apresentando elevado pI), podendo conter longas extensões não estruturadas (de la Cruz et al., 2015; Pillet et al., 2017). Estas características, similares às de histonas, tornam-nas propensas a interações inespecíficas com poliânions (como ácidos nucléicos) e à agregação, fazendo necessária a proteção de seus sítios de ligação até o momento de sua associação à partícula pré-ribossomal (Peña et al., 2017; Pillet et al., 2017). Cotraducionalmente, os complexos NAC e RAC auxiliam no seu enovelamento e estabilidade. Pelo menos 9 proteínas-r apresentam

chaperonas dedicadas (ex. Yar1, Sgt1, Rrb1), que interagem diretamente com a cadeia polipeptídica nascente, de modo a impedir sua interação com outros RNAs ou agregação e podendo inclusive auxiliar na sua importação nuclear (ex. Syo1) (Peña et al., 2017; Pillet et al., 2017; Rössler et al., 2019). Apesar da maioria das proteínas-r ser pequena [*S. cerevisiae*: 25-387aa, tamanho médio = 160aa (Ben-Shem et al., 2011)] o suficiente para passar passivamente pelo poro nuclear (NPC), elas têm o transporte assistido por importinas Ran-GTPase dependentes que reconhecem NLSs, concentrados justamente nas regiões de interação com a subunidade ribossomal, e, portanto, não expostos nos ribossomos maduros (Melnikov et al., 2020; Peña et al., 2017; Pillet et al., 2017). Essas carioferinas, assim como no caso das histonas, atuam como chaperonas das proteínas-r (Jäkel et al., 2002; Pillet et al., 2017). No núcleo, escortinas substituem as importinas, guiando as proteínas-r ao seu sítio de ligação (Peña et al., 2017; Pillet et al., 2017). Falhas na biogênese ribossomal ou depleção de chaperonas dedicadas levam a um acúmulo de proteínas-r órfãs, que contribuem para o estresse proteotóxico (Tye et al., 2019) e são alvo de degradação pelo sistema de controle de qualidade ERISQ (*excess ribosomal protein quality control*) (Sung et al., 2016a, 2016b).

1.2.4 Fatores de Montagem

Para que a conformação madura e funcional dos rRNAs seja alcançada, paralelamente ao correto posicionamento e estável ancoragem de todas as proteínas-r, durante a biogênese ribossomal eucariótica, faz-se necessária a participação transiente de mais de 200 fatores de montagem auxiliares, que não entrarão na composição das subunidades ribossomais maduras (Woolford e Baserga, 2013; Klinge e Woolford, 2019; Baßler e Hurt, 2019). Em função disso, partículas pré-ribossomais apresentam uma razão proteína/RNA maior que as subunidades maduras (Baßler e Hurt, 2019). A maioria dos fatores de montagem é essencial para a viabilidade celular, conservada evolutivamente, tendo sido originalmente descoberta em triagens de interação genética e análise proteômica de pré-ribossomos coimunoprecipitados. Embora muitos possuam estrutura e sítio de ligação ao pré-ribossomo descritos, vários permanecem ainda pouco caracterizados (Woolford e Baserga, 2013; Klinge e Woolford, 2019; Baßler e Hurt, 2019). Notavelmente, novos fatores, como é o caso de Rbp95 (B. Pertschy Lab, *comunicação pessoal*) e Pol5, ainda vêm sendo descobertos (Ramos-Sáenz et al., 2019; Braun et al., 2020).

Alguns dos fatores de montagem estão diretamente envolvidos na modificação (ex. metiltransferases, acetiltransferases, pseudoridina sintetases) e processamento (endonucleases e exonucleases) do rRNA, como anteriormente descrito. Outros têm papel fundamental no remodelamento estrutural do rRNA, incluindo uma ampla gama de RNA helicases DEAD-box e

DEAH-box (ex. Dbp3, Mak5, Has1), das quais sete participam da montagem da subunidade menor, nove da subunidade maior, e três em ambas subunidades, embora a exata função da maioria ainda permaneça elusiva (Klinge e Woolford, 2019). Em ambas subunidades, ATPases (ex. Rio1, Fap7) e GTPases (ex. Bms1, Nog1, Nog2) contribuem para a direcionalidade do processo, com alterações conformacionais ATP- e GTP-dependentes desencadeadas em momentos específicos da maturação (Woolford e Baserga, 2013; Klinge e Woolford, 2019). Três enormes AAA-ATPases (Rix7, Rea1 e Drg1), incluindo a maior proteína de levedura, Rea1 (4910aa, 559kDa), participam da montagem da subunidade ribossomal 60S contribuindo para a dissociação conjunta de diversos fatores com rearranjos conformacionais importantes (Prattes et al., 2019; Klinge e Woolford, 2019). Nem todos os fatores de montagem, entretanto, possuem atividade catalítica (ex. Nop53, Nip7, Utp18). A maioria (incluindo alguns com atividade enzimática) possui um papel estrutural, sendo providos de domínios de interação com RNA. Estes fatores atuam como *scaffold*, auxiliam no recrutamento de fatores e complexos de processamento do rRNA, protegem o rRNA da ação de nucleases, estabilizam conformações não-maduras do rRNA permitindo a maturação e modificação independente dos seus domínios antes que possam ser compactados, checam e orientam a formação de centros funcionais, transmitem efeitos de mudanças conformacionais a longa distância acoplando a maturação de diferentes regiões da partícula pré-ribossomal, além de auxiliarem no transporte nucleocitoplasmático. Alguns possuem homologia a proteínas-r (ex. Rlp24 e Mrt4), impedindo seu recrutamento prematuro, e vários atuam como fator de anti-associação (ex. eIF6), impedindo que subunidades 40S e 60S imaturas possam participar de um ciclo de tradução (Woolford e Baserga, 2013; Klinge e Woolford, 2019).

Todos os fatores de montagem, assim como as proteínas-r, são recrutados de forma hierárquica em etapas muito específicas da maturação ribossomal no nucléolo, nucleoplasma ou citoplasma. Alguns se associam co-transcricionalmente, auxiliando no dobramento e compactação inicial do pré-rRNA, enquanto a maioria apenas pós-transcricionalmente. Alguns formam inclusive subcomplexos (ex. UtpA, UtpB, UtpC) que facilitam o seu recrutamento conjunto. A dissociação dos fatores de montagem também ocorre de modo orquestrado, fazendo com que diferentes intermediários da biogênese ribossomal possuam uma composição específica. Entretanto, o mecanismo exato de associação e dissociação de muitos fatores ainda permanece elusivo. Enquanto alguns fatores se ligam de forma muito transiente (ex. Rix7, Drg1), vários acompanham as transições nucléolo-nucleoplasma (ex. Rsa4, Nog2) e núcleo-citoplasma (ex. Arx1, Nmd3), havendo alguns presentes em praticamente todas as etapas de maturação (ex. eIF6) como detalhado nas seções subsequentes. A depleção de diferentes fatores de montagem tem, portanto, efeitos distintos na biogênese ribossomal, bloqueando etapas específicas, que nos permitem inferir seu papel no processamento do pré-rRNA e montagem das subunidades

ribossomais (Woolford e Baserga, 2013; Klinge e Woolford, 2019). Mutantes truncados revelam ainda que diferentes domínios de um mesmo fator de montagem podem ser necessários em diferentes estágios da maturação ribossomal (Dembowski et al., 2013; Konikkat et al., 2017; Micic et al., 2020; Wilson et al., 2020), tendo estas abordagens sido amplamente adotadas no presente estudo.

1.3 Início da biogênese ribossomal (90S)

Durante a transcrição do pré-rRNA 35S, tem-se a montagem co-transcricional e gradual da primeira partícula pré-ribossomal estruturalmente estável, denominada 90S ou SSU processomo, precursora da subunidade ribossomal menor (Grandi et al., 2002; Dragon et al., 2002). Este intermediário de cerca de 5MDa foi inicialmente visualizado por microscopia eletrônica em segmentos de cromatina nucleolar ativamente transcritos, denominados *Miller spreads* (Miller e Beatty, 1969; Mougey et al., 1993). Nestas micrografias, os intermediários 90S encontram-se na extremidade dos pré-rRNAs nascentes como partículas eletrodensas, cuja formação mostrou-se dependente do recrutamento do snoRNP U3 e de fatores de montagem específicos (Fig. 7A) (Osheim et al., 2004; Grandi et al., 2002; Dragon et al., 2002).

Este enorme complexo macromolecular é montado em etapas, de forma hierárquica, ao mesmo tempo em que o pré-rRNA é modificado por snoRNPs e dobrado (Fig. 7B) (Barandun et al., 2018; Chaker-Margot, 2018). Inicialmente, a transcrição do 5'ETS é acompanhada pelo recrutamento do complexo UTP-A, seguida por UTP-B e pelo snoRNP U3. Associam-se então o módulo Mpp10, além dos fatores de montagem Bud21, Fcf2, Utp11, Sas10, Utp7, Sof1 e a endonuclease Utp24, formando a estrutura da partícula 5'ETS, sobre a qual o rRNA 18S nascente será dobrado (Barandun et al., 2018; Chaker-Margot, 2018; Zhang et al., 2016; Chaker-Margot et al., 2015).

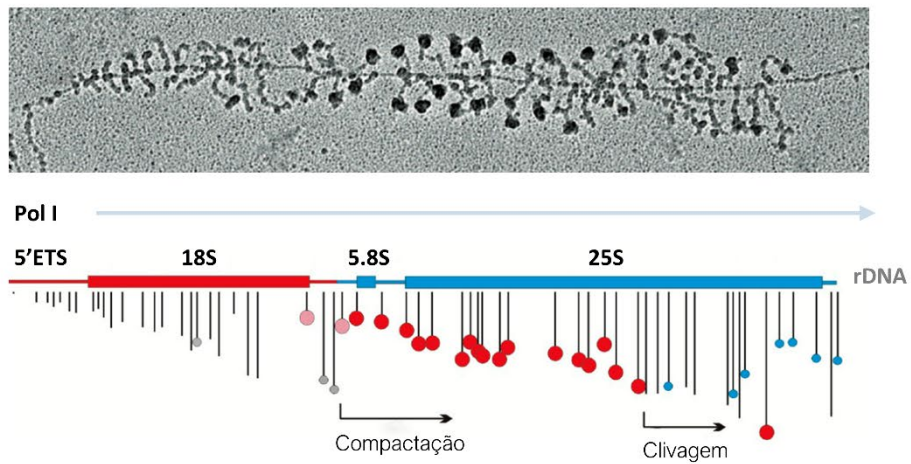
Fatores de montagem específicos a cada um dos domínios em formação (ex. UTP-C, Lcp5, Rrp5, Enp1, Nop14, Nop4, Rrp12) são recrutados ao longo da transcrição do rRNA 18S e do ITS1, alguns dos quais interagindo diretamente com componentes do 5'ETS e snoRNP U3. Muitos associam-se de forma transiente, incluindo snoRNPs (U14, snoR10 e snoR30) e helicases DEAD-box (ex. Dbp8, Rrp3, Rok1 e Dbp4) que auxiliam em remodelamentos conformacionais pontuais ou na liberação dos snoRNAs (Soltanieh et al., 2015; Martin et al., 2014). Cerca de 15 proteínas-r são recrutadas nesta fase à medida que seus sítios de ligação são formados, e não estando eles obstruídos por fatores de montagem (Barandun et al., 2018; Chaker-Margot, 2018; Klinge e Woolford, 2019; Baßler e Hurt, 2019).

Recentemente, diferentes grupos obtiveram a estrutura do 90S em alta resolução por criomicroscopia eletrônica (Kornprobst et al., 2016; Barandun et al., 2017; Chaker-Margot et al., 2017; Cheng et al., 2017; Sun et al., 2017). Nestas estruturas, em que apenas o sítio A_0 está clivado, pode-se observar que os 4 domínios do rRNA 18S encontram-se separados, e apenas o 5' possui uma conformação similar à madura. O dobramento do 18S parece ocorrer de forma sequencial no sentido 5' - 3' (Baßler e Hurt, 2019), com elementos estruturais do corpo e plataforma sendo formados antes que a cabeça e o bico, que são finalizados apenas no citoplasma. O 5'ETS juntamente com o snoRNP U3 formam um arcabouço que encapsula e protege os subdomínios do rRNA 18S como uma chaperona, permitindo que se dobrem de forma independente antes da compactação verificada na subunidade 40S madura.

Neste processo, o snoRNA de box C/D U3 desempenha um papel estrutural fundamental, auxiliando na estabilização da topologia da partícula 90S em formação e influenciando as clivagens em A_0 e A_1 (Barandun et al., 2018; Chaker-Margot, 2018). Sua extremidade 5' penetra no interior da partícula 90S, onde parece por motivos curtos de nucleotídeos com o 5'ETS, tornando sua estrutura mais rígida, e com o rRNA 18S, ocluindo a formação prematura do pseudonó central e parte do centro decodificador (Baßler e Hurt, 2019; Klinge e Woolford, 2019; Barandun et al., 2018; Chaker-Margot, 2018). Isso permite que os domínios do 18S mantenham-se separados e possam ser modificados e dobrados de forma independente, uma vez que o pseudonó central é a estrutura terciária que orienta espacialmente os domínios do rRNA 18S na subunidade 40S madura (Barandun et al., 2018). Alguns fatores de montagem com longas extensões e múltiplos sítios de ligação, como Mpp10, Utp11 e Sas10, também auxiliam na estabilização desta configuração prematura (Klinge e Woolford, 2019).

Cerca de 60 fatores de montagem compõem o 90S, dos quais aproximadamente 1/3 possui pelo menos um domínio β -propeller, envolvido em interação proteína-proteína, enquanto outros apresentam domínios α -solenoides, podendo interagir com regiões a longa distância como Utp10 e Utp20 (Barandun et al., 2018; Baßler e Hurt, 2019). Esta composição é remanescente de outros arcabouços proteicos celulares que atuam como molde, delimitando por exemplo a membrana no poro nuclear ou na maquinaria de transportes de vesículas (Kornprobst et al., 2016; Baßler e Hurt, 2019). Alguns destes componentes do 90S possuem atividade enzimática incluindo, além das RNA helicases recrutadas pontualmente, a GTPase Bms1 e seu cofator Rcl1, a endonuclease Utp24, a acetiltransferase Kre33 e as metiltransferases Nop1 e Emg1.

A



B

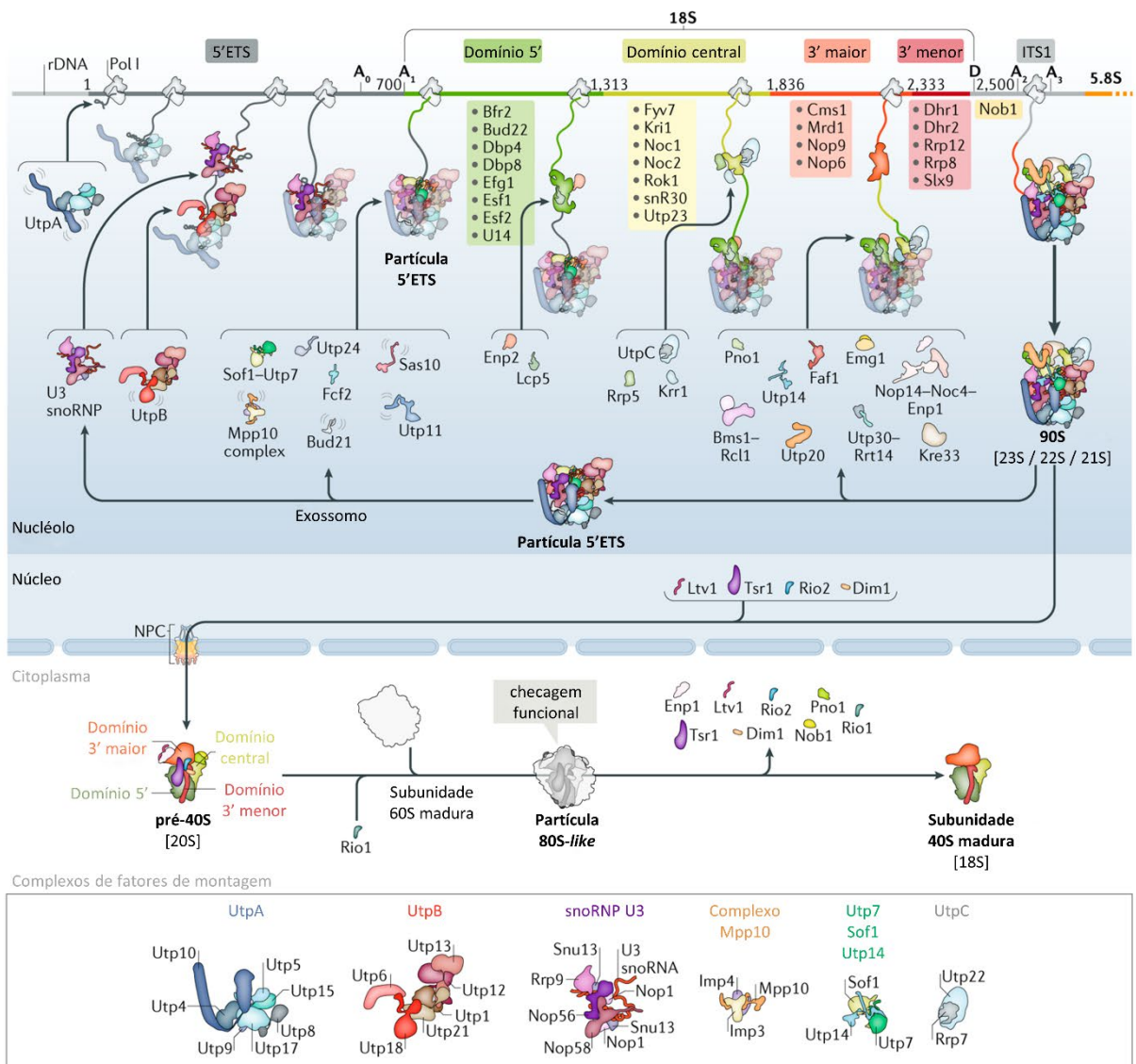


Figura 7. Montagem da subunidade ribossomal 40S em *S. cerevisiae*. (A) *Miller spreads* (segmento de cromatina nucleolar ativamente transcrito visualizado por microscopia eletrônica) mostram a formação co-transcricional de partículas pré-ribossomais identificadas como partículas eletrodensas formadas na extremidade 5' dos pré-rRNAs nascentes. O recrutamento de fatores de montagem, complexos e proteínas-r levam à compactação progressiva e formação do 90S ou SSU processomo (círculo vermelho). A clivagem no ITS1 ocorre apenas após transcrição de parte do rRNA 25S, levando à separação das vias de maturação do pré-40S e pré-60S (círculo azul) (Adaptado de Osheim et al., 2004) (B) Esquema da via de formação da subunidade ribossomal menor, destacando as etapas de recrutamento e liberação dos fatores de montagem e dos complexos, cuja composição é mostrada na parte inferior. O rRNA 18S com seus 4 domínios, entre o 5'ETS e o ITS1 é esquematizado no topo. Co-transcionalmente complexos como UtpA, snoRNP U3, UtpB e outros fatores se associam ao 5'ETS nascente formando a partícula 5'ETS. O rRNA18S, à medida que é transcrito, é abarcado pela estrutura da partícula 5'ETS que garante seu dobramento correto, evitando a formação prematura do pseudonó central. snoRNPs, que modificam o rRNA, e alguns fatores como helicases se associam de forma transiente. Outros fatores de montagem e proteínas-r permanecem estavelmente associados formando o 90S ou SSU processomo. Normalmente as clivagens nos sítios A₀ e A₁ que liberam o 5'ETS são seguidas pela clivagem em A₂ que libera o pré-40S. No esquema, a clivagem no sítio A₃ precede as demais, como verificado em certas condições como crescimento lento e mutantes. As clivagens em A₀ e A₁ liberam a partícula 5'ETS separando-a do pré-40S. A partícula 5'ETS é então desmontada pelo exossomo que degrada os fragmentos de clivagem endonucleolítica, permitindo reciclagem dos fatores de montagem e complexos iniciais. Fatores de montagem adicionais se associam ao pré-40S no núcleo antes que seja exportado pelo complexo do poro nuclear (NPC). No citoplasma, com a participação de novos fatores de montagem há o recrutamento das últimas proteínas ribossomais e maturação de elementos estruturais. O pré-40S se associa a uma subunidade 60S madura em uma etapa de checagem funcional, após a qual a extremidade 3' madura do rRNA 18S é formada. A liberação gradual dos fatores de montagem no citoplasma culmina com a formação da subunidade 40S madura. (Adaptado de Klinge e Woolford, 2019)

Os mecanismos exatos da transição entre a partícula 90S para o pré-40S ainda permanecem pouco conhecidos (Baßler e Hurt, 2019). Sabe-se as clivagens coordenadas em A₁ e A₂ são realizadas por Utp24 (Bleichert et al., 2006; Wells et al., 2016), com possível participação de Rcl1 (Horn et al., 2011). Este processo requer um remodelamento extensivo, envolvendo a remoção/reposicionamento de Sof1, Utp7 e Utp14 que protegem o sítio A1 (Chaker-Margot, 2018). A GTPase Bms1, ao interagir com diferentes subdomínios e fatores de montagem, parece ter um papel fundamental neste processo (Baßler e Hurt, 2019). A RNA helicase Dhr1 é recrutada e separa as regiões de dupla fita entre o snoRNA U3 e o pré-rRNA (Baßler e Hurt, 2019; Zhu et al., 2016; Sardana et al., 2015), permitindo que as clivagens ocorram, que o pseudonó central se forme e que o pré-rRNA 20S associado a proteínas-r e alguns fatores de montagem se dissocie do arcabouço na forma de uma partícula pré-40S independente.

O complexo exossomo degrada exonucleoliticamente o 5'ETS (Allmang et al., 2000), tendo um papel importante na desmontagem do arcabouço (partícula 5'ETS) separado da partícula pré-40S. Sabe-se que Utp18, componente do UTP-B, interage diretamente com um cofator do exossomo, a helicase Mtr4, contribuindo para seu recrutamento (Thoms et al., 2015). Outros fatores, como Sas10 e Lcp5 são potencialmente capazes de interagir com o exossomo (Mitchell, 2010; Chaker-Margot, 2018; Klinge e Woolford, 2019). Entretanto, o exato mecanismo de associação do exossomo e desmontagem da partícula 5'ETS permanecem pouco compreendidos (Chaker-Margot, 2018). De qualquer modo, a atividade do exossomo é fundamental para a reciclagem dos fatores de montagem e complexos que iniciam a biogênese ribossomal.

1.4 Montagem da subunidade ribossomal menor (40S)

Ao se desligar do arcabouço 5'ETS, a partícula pré-40S mantém Enp1, Pno1 e Rrp12 associados ao domínio 3', e Nob1 flexivelmente ligada ao ITS1 (Fig. 7B). Antes da exportação nuclear, fatores de montagem (Ltv1, Tsr1, Rio2 e Dim1) e proteínas-r adicionais (uS3, uS19, uS13, eS19) são recrutados ao pré-40S no nucleoplasma contribuindo para remodelamento do domínio 3' e maturação da cabeça da partícula (Schäfer et al., 2003; Fatica et al., 2003; Ferreira-Cerca et al., 2007; Chaker-Margot, 2018). Mais especificamente, Ltv1 interage com Enp1 na região do bico, impedindo a associação de eS10; Tsr1 é um análogo estrutural que substitui a GTPase Bms1; A metiltransferase Dim1 e a quinase Rio2 se ligam à superfície intersubunidade perto do centro decodificador, enquanto a endonuclease Nob1 encontra-se na plataforma com acesso ao sítio D obstruído por Pno1. Apesar dos fatores de montagem ocluírem os centros funcionais e a superfície intersubunidade, o *core* do 40S já possui no núcleo uma conformação similar à madura (Chaker-Margot, 2018; Scaiola et al., 2018; Heuer et al., 2017).

A translocação ao citoplasma envolve mecanismos redundantes e complementares (Baßler e Hurt, 2019; Chaker-Margot, 2018), incluindo Rrp12 (Oeffinger et al., 2004), Mex67-Mtr2 (Faza et al., 2012), além da exportina Crm1, Ran-GTPase dependente, que interage com sequências de exportação nuclear (NES) preditas em Rio2, Ltv1 e Pno1 (Nerurkar et al., 2015; Fischer et al., 2015; Merwin et al., 2014; Zemp et al., 2009). A estrutura da região de associação ao mRNA e do bico são finalizadas apenas nas últimas etapas no citoplasma com o recrutamento das últimas proteínas-r. Deste modo, evita-se a ligação prematura de intermediários pré-40S a mRNAs ou a fatores de iniciação da tradução.

No citoplasma, Enp1 e Ltv1 são fosforilados por Hrr25, dissociando-se da partícula (Schäfer et al., 2006) assim como Rio2 (Ferreira-Cerca et al., 2012), enquanto Dim1 e Tsr1 são reposicionados (Rai et al., 2021). O pré-40S pode então se ligar a uma subunidade 60S madura com o fator de iniciação da tradução eIF5B, simulando a formação de um ribossomo 80S em um ciclo de tradução (Lebaron et al., 2012; Strunk et al., 2012). Neste processo fundamental de controle de qualidade e teste funcional da partícula 40S em formação, participam outros fatores como ATPase/quinase Rio1 e a ATPase Fap7, que induz uma pseudotranslocação (Ghalei et al., 2017; Rai et al., 2021). A separação das subunidades é mediada pelos mesmos fatores que dissociam o 80S na terminação da tradução, Rli1 e Dom34 (Strunk et al., 2012). Tem-se a dissociação de Tsr1 e Dim1, enquanto a endonuclease Nob1 finaliza a maturação da extremidade 3' do rRNA 18S, removendo o ITS1 remanescente. Esta clivagem no sítio D parece estar acoplada à saída de Pno1, a qual também desobstrui o sítio de ligação da última proteína-r, eS26 (Chaker-

Margot, 2018; Baßler e Hurt, 2019). A saída destes últimos fatores de montagem torna a partícula 40S, então madura, apta à tradução do mRNA.

1.5 Montagem da subunidade ribossomal maior (60S)

Como observado no caso do 90S e pré-40S, o nucléolo, além de local da transcrição do rRNA, abarca a montagem inicial das partículas ribossomais. Isto também é válido para o pré-60S, cuja formação inicia co-transcricionalmente após clivagem no sítio A₂ gerando o pré-rRNA 27SA₂ (Fernández-Pevida et al., 2015; Tomecki et al., 2017). Diferentemente do dobramento sequencial do rRNA 18S que é auxiliado e encapsulado pela partícula 5'ETS, os domínios I-VI do rRNA 25S no pré-60S não são dobrados na ordem 5'-3', mas sim de maneira modular (Fig. 8) (Kater et al., 2017; Klinge e Woolford, 2019).

A complexidade estrutural da subunidade 60S faz com que sua via de formação também seja mais complexa, com várias etapas de remodelamento estrutural e de composição (Klinge e Woolford, 2019; Baßler e Hurt, 2019). De modo geral, pode-se dividir a montagem da subunidade ribossomal maior em três fases. No nucléolo, a superfície exposta ao solvente e o PET são inicialmente formados. A CP e a superfície intersubunidade que abriga os centros funcionais ganham forma no nucleoplasma, enquanto o PET continua a se estruturar. A superfície intersubunidade é finalizada apenas no citoplasma, sendo o centro catalítico PTC uma das últimas regiões a assumir a conformação madura (Gamalinda et al., 2014; Kater et al., 2017, 2020).

1.5.1 Maturação nucleolar e nuclear

A flexibilidade do pré-60S nas etapas nucleolares mais iniciais continua um desafio para que sua estrutura possa ser obtida por crio-EM, fazendo com que eventos de maturação que coincidem ou antecedem a remoção coordenada do ITS1 e 3'ETS sejam ainda pouco compreendidos (Klinge e Woolford, 2019; Allmang e Tollervy, 1998). A análise proteômica do interactoma de fatores de montagem iniciais, ou de partículas pré-ribossomais purificadas com pré-rRNAs truncados e marcados com aptâmeros, sugerem a ordem hierárquica de recrutamento co-transcricional dos fatores de montagem (Klinge e Woolford, 2019; Chaker-Margot e Klinge, 2019; Chen et al., 2017).

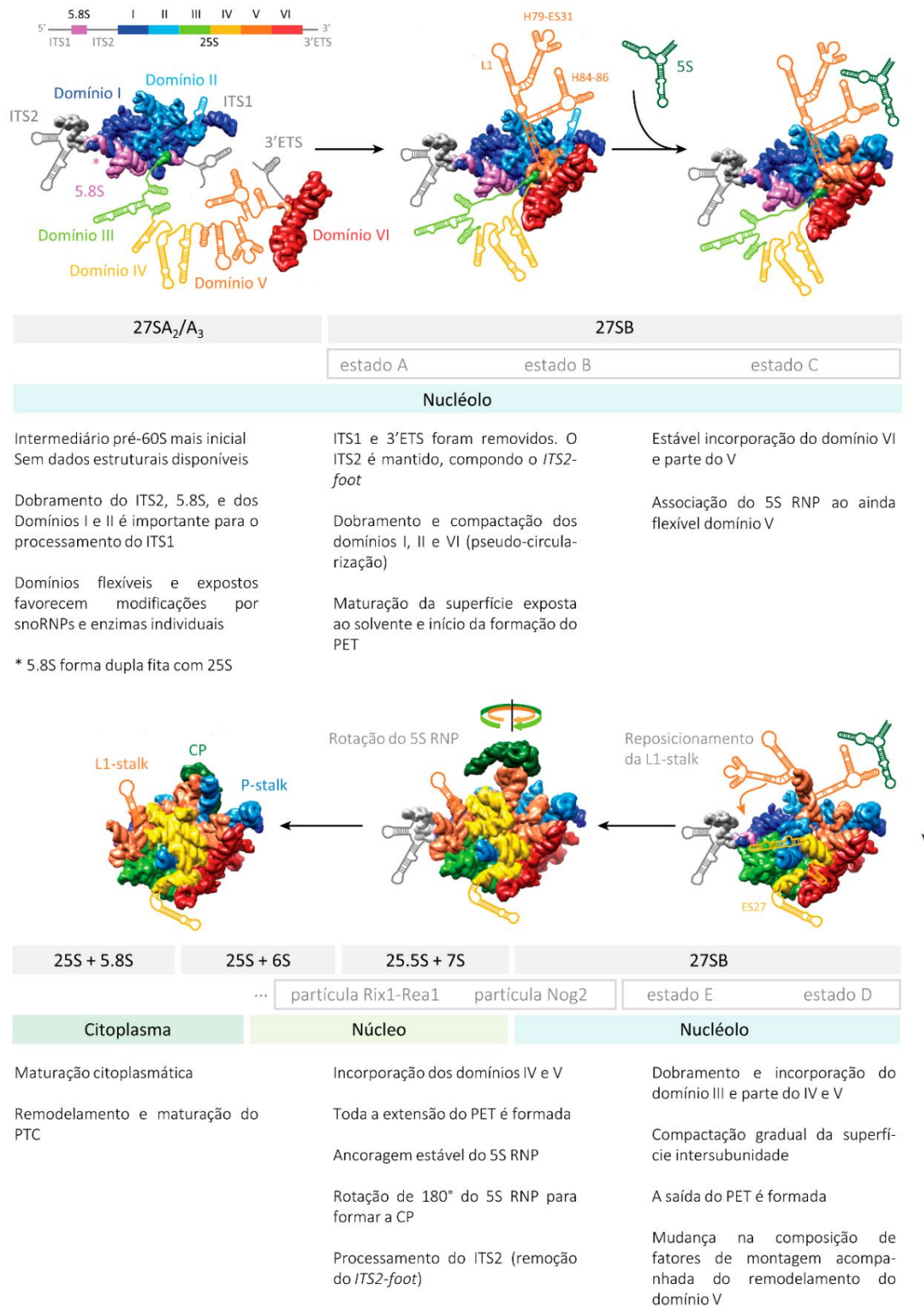


Figura 8. Montagem modular da subunidade ribossomal 60S em *S. cerevisiae*. Esquema da via de biogênese da subunidade ribossomal maior com base na sequência de maturação, dobramento e remodelamento dos rRNAs. O pré-rRNA 27S está esquematizado no topo, destacando, nas mesmas cores que as estruturas, os 6 domínios do 25S, o 5.8S e os espaçadores (ITS1, ITS2 e 3'ETS). Abaixo de cada estrutura, indica-se o estágio de processamento do 27S e o compartimento subcelular. Com exceção da primeira estrutura, que é apenas ilustrativa, as demais são baseadas em partículas pré-60S já caracterizadas por crio-EM (PDB 6EM4, 6EM1, 6EM5, 3JCT, 4V88) e indicadas. A maturação dos domínios do rRNA 25S se dá de modo modular, com as extremidades 3' e 5' sendo compactadas anteriormente aos domínios internos. O ITS2 é o último espaçador a ser removido. Eventos de remodelamento estrutural encontram-se destacados. Regiões flexíveis estão indicadas por esquematizações da estrutura secundária (H: hélice, ES: segmento de expansão). (Adaptado de Baßler e Hurt, 2019)

Sabe-se que o menor grau de compactação nestes estágios favorece a atuação de snoRNPs, modificando resíduos de nucleotídeos específicos. Cerca de 7 RNA helicases ATP-dependentes (Dbp2, Dbp3, Dbp6, Dbp7, Dbp9, Mak5 e Prp43) são recrutadas potencialmente remodelando a estrutura dos pré-rRNAs ou liberando snoRNAs, como já demonstrado para Dbp3 (Aquino et al., 2021; Rodríguez-Galán et al., 2013). Apesar da falta de detalhes estruturais, especula-se que os fatores de montagem Rrp5, Mak21, Noc2, Nop4, Npa1, Npa2, Rsa3, Nop8 e Dbp6 contribuam para a compactação e dobramento inicial do pré-rRNA 27SA₂ (Hierlmeier et al., 2013; Joret et al., 2018). Ademais, Rrp5 tem um papel fundamental nas clivagens do ITS1 em A₂ e A₃, funcionando como ponte entre o 90S e o pré-60S nascente, e como *checkpoint* coordenando a formação de subunidades 40S e 60S (Khoshnevis et al., 2019; Lebaron et al., 2013; Venema e Tollervey, 1996)

Após a clivagem em A₃, a remoção exonucleolítica do ITS1, necessária para formar a extremidade 5' madura do 5.8S, é dependente da associação de 12 fatores de montagem (Ebp2, Brx1, Pwp1, Nop12, Drs1, Has1, Nop7, Ytm1, Erb1, Rlp7, Nop15 e Cic1), coletivamente denominados fatores A₃ (Sahasranaman et al., 2011; Woolford e Baserga, 2013). Este processo presumivelmente afeta o dobramento e a hibridização das extremidades 5' e 3' do rRNA 5.8S com o rRNA 25S (Baßler e Hurt, 2019; Konikkat e Woolford, 2017), e coincide com o início da formação da superfície exposta ao solvente. Nesta etapa, os domínios I e II do 25S juntamente com o 5.8S e ITS2 são os primeiros a se dobrar, seguidos do domínio VI, formando um *core* compacto inicial ao qual os demais domínios (III, IV e V), ainda flexíveis, se associarão nas etapas seguintes.

Nas estruturas mais iniciais já obtidas por crio-EM de intermediários pré-60S nucleolares, contendo o pré-rRNA 27SB (após remoção de ITS1 e 3'ETS), quase todos os fatores A₃, à exceção de Pwp1, Nop12 e Drs1, são visíveis (Kater et al., 2017; Sanghai et al., 2018; Zhou et al., 2019a). Estas partículas revelam a evolução progressiva do pré-60S no nucléolo e são classificadas em estados 1/A, 2/B, C, D e E (Fig. 9). Enquanto nos estados A-C, o *core* do pré-60S tem a forma de um arco, os estados D-E já assumem uma estrutura globular (Kater et al., 2017). Nestas partículas nucleolares, apesar de não discernível por crio-EM, o rRNA 5S em conjunto com as proteínas-r uL18 e uL5 (5S RNP), já está associado ao pré-60S, embora ligado de forma flexível (Baßler e Hurt, 2019; Kressler et al., 2008).

Os fatores de montagem, incluindo fatores A₃, têm a importante função de estabilizar a compactação sequencial dos domínios do rRNA 25S. No estado 2/B, o módulo Ssf1-Rrp15-Rrp14, em conjunto com módulos presentes desde o estado A (Nsa1-Mak16-Rpf1-Rrp1 e Ebp2-Brix1) formam um anel no meio da partícula estabilizando contatos entre os domínios I, II e VI. Ebp2-Brix1 impedem pareamentos prematuros entre os domínios I e V, que ocorrerão apenas

após o estado E (Klinge e Woolford, 2019; Sanghai et al., 2018). A maturação do domínio VI no estado 2/B, faz com que as extremidades 3' e 5' do 25S já estejam estruturadas no *core* do pré-60S antes que os domínios centrais (Baßler e Hurt, 2019; Kater et al., 2017), e ocorre com o recrutamento de Mak11, além dos fatores de montagem Nog1, eIF6 e Rlp24, que acompanharão o pré-60S do nucléolo ao citoplasma (Kater et al., 2017; Sanghai et al., 2018; Klinge e Woolford, 2019).

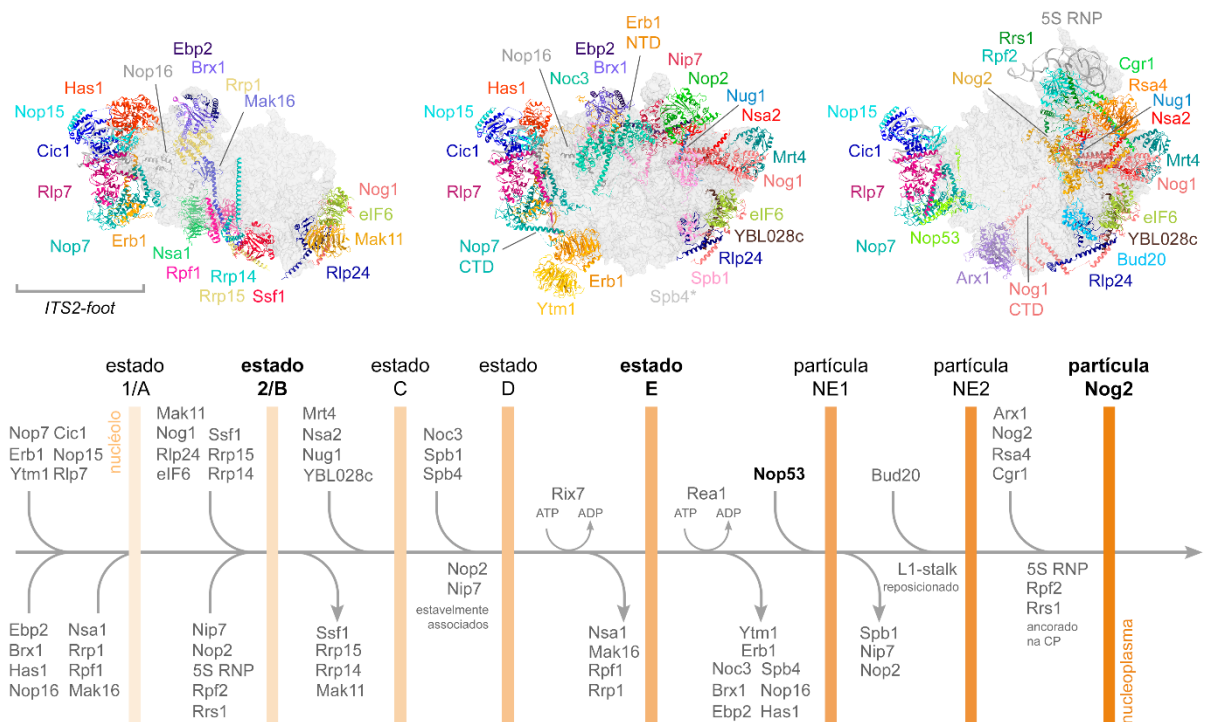


Figura 9. Estágios de maturação nucleolar e nuclear inicial do pré-60S. Representação esquemática das etapas de formação da subunidade 60S no nucléolo e nucleoplasma, destacando as mudanças de composição resultantes do orquestrado recrutamento e liberação dos fatores de montagem. As partículas pré-ribossomais já caracterizadas por crio-EM são representadas por barras verticais. Na parte superior são apresentadas as estruturas dos intermediários nucleolares estado B (PDB 6C0F) e estado E (PDB 6ELZ), e da partícula nucleolar/nucleoplasmática Nog2 (PDB 3JCT). (*Spb4 está presente no estado E, mas não é mostrada; NE: partícula Nop53 inicial; CTD: domínio C-terminal). Observa-se que o *ITS2-foot* está presente desde os estágios nucleolares mais iniciais. Duas AAA-ATPases participam de mudanças de composição nestes estágios: Rix7 na transição D-E leva à liberação do módulo Nsa1, enquanto Rea1, na transição entre estado E para a partícula Nog2, é recrutado por Ytm1 e leva à liberação de vários fatores de montagem incluindo Erb1. A liberação de Erb1 da base do *ITS2-foot* permite a associação de Nop53. Após remodelamento estrutural, com ancoragem do 5S RNP e incorporação de novos fatores de montagem forma-se a partícula Nog2.

Ainda nos estágios nucleolares, a composição do pré-60S é modificada e alguns centros funcionais começam a ganhar forma (Klinge e Woolford, 2019). Na transição entre o estado 2/B para C, o módulo Ssf1-Rrp15-Rrp14 é liberado permitindo que proteínas-r uL23, eL19 e eL31 se associem em torno da extremidade N-terminal de Rpf1 que marca o local de início da formação do PET (Sanghai et al., 2018). Nesta etapa, Mrt4, Nsa2, Nug1 e YBL028C são recrutados à região diametralmente oposta ao *ITS2-foot*. Na transição entre os estados C e D, o domínio III e parte do IV são incorporados ao *core*, fechando lateralmente o PET, enquanto os fatores Nip7, Noc3, Spb4 e as metiltransferases Nop2 e Spb1 são recrutados auxiliando na formação inicial do PTC

(Kater et al., 2017). A cavidade do PET torna-se desocupada na transição entre os estado D e E, quando, potencialmente em função da AAA-ATPase Rix7 recrutada por Nsa1 (Kressler et al., 2008), há a liberação do módulo Nsa1-Mak16-Rpf1-Rrp1.

Algumas estruturas do pré-60S, entretanto, mantém-se praticamente inalteradas no nucléolo do estado 1/A ao estado E. Este é o caso de uma das primeiras regiões a se estruturar de forma estável no *core* do pré-60S, montada em torno do ITS2 e denominada “*ITS2-foot*”. Constituída por 5 fatores A₃ (Cic1, Nop15, Rlp7, Nop7 e Erb1), ela é fundamental para o processamento do ITS1, atuando como *scaffold* para a montagem inicial do pré-60S (Baßler e Hurt, 2019; Kater et al., 2017; Sanghai et al., 2018; Zhou et al., 2019a). Cic1, Nop15 e Rlp7 interagem diretamente com o ITS2 (Wu et al. 2017; Wu et al. 2016) e se associam de maneira mutuamente interdependente com Nop7 e o N-terminal de Erb1, estabilizando a estrutura do *ITS2-foot* (Kater et al., 2017; Sahasranaman et al., 2011; Granneman et al., 2011). O recrutamento destes fatores se dá nas etapas nucleolares mais iniciais (Chaker-Margot e Klinge, 2019; Chen et al., 2017).

Erb1 tem um papel estrutural central nas partículas pré-60S nucleolares (Kater et al., 2017; Konikkat et al., 2017; Tang et al., 2008; Pestov et al., 2001). Sua extremidade N-terminal adentra a partícula pré-ribossomal, passando pelo *ITS2-foot* onde interage com Nop7 e Rlp7, alcançando longas distâncias e interagindo com os domínios I, III e IV, 3 proteínas-r (eL36, eL27 e eL38) e mais 7 fatores de montagem (Nop16, Has1, Noc3, Ebp2, Brx1 e Spb1). Na extremidade C-terminal, o domínio *β-propeller* de Erb1 interage com Ytm1, que é capaz de recrutar a AAA-ATPase Rea1, responsável pela liberação combinada de Erb1 e Ytm1 (Baßler et al., 2010; Wegrecki et al., 2015; Thoms et al., 2016). Este processo, por mecanismos ainda pouco compreendidos, causa um remodelamento do pré-60S possivelmente transmitido pelas múltiplas interações de Erb1, com uma mudança composicional considerável.

A saída de Erb1 ocorre no nucléolo, na transição entre o estado E para a partícula Nog2 com a liberação quase simultânea de 10 fatores de montagem (Ytm1, Ebp2, Brx1, Has1, Nop16, Spb4, Noc3, Nip7, Nop2, Spb1) (Kater et al., 2017; Wu et al., 2016). A composição do *ITS2-foot* permanece inalterada, exceto pelo espaço vacante deixado por Erb1 que permite o recrutamento do fator de montagem Nop53, cujo sítio de ligação ao pré-60S encontrava-se ocluído por Erb1. Na base do *ITS2-foot*, Nop53 interage diretamente com Nop7 e Rlp7 (Kater et al., 2017, 2020; Wu et al., 2016, 2017).

Eventos importantes de remodelamento do pré-60S ocorrem quando o *ITS2-foot* ainda está presente, incluindo o reposicionamento do L1 *stalk* (permitido pela saída de Nop2, Nip7, Noc3, Ebp2 e Spb1), o recrutamento de 5 fatores de montagem (Bud20, Arx1, Nog2, Rsa4, Cgr1), 3 proteínas-r (uL2, eL43, eL39), a maturação do PET (examinado pela inserção da extremidade C-terminal de Nog1), o dobramento dos domínios IV e V com maturação parcial do PTC, e a

formação inicial da CP com o ancoramento estável do 5S RNP no *core* do pré-60S assistido por Rrs1 e Rpf2. Todas estas alterações ocorrem na transição entre nucléolo e nucleoplasma, resultando na formação da partícula Nog2 (Wu et al., 2016; Kater et al., 2017, 2020; Micic et al., 2020; Wilson et al., 2020). Neste processo, sugere-se que alterações nas propriedades de superfície da partícula pré-ribossomal influenciem sua partição nucléolo/nucleoplasma (Tartakoff et al., 2021).

Na partícula Nog2, o 5S RNP que compõe a CP, apesar de estavelmente ancorado, encontra-se rotacionado 180° em relação à sua posição na subunidade 60S madura. Esta orientação prematura é estabilizada por Rrs1 e Rpf2 na base da CP, em torno da qual Rsa4 e a GTPase Nog2 encontram-se associadas ao domínio V, que contém o PTC (Wu et al., 2016; Leidig et al., 2014). A rotação do 5S RNP se inicia com a liberação de Rpf2 e Rrs1. Esta liberação, por sua vez, parece estar associada ao recrutamento de Sda1, cujo sítio de ligação parcialmente se sobrepõe ao de Rpf2. Próximo ao L1 *stalk*, Sda1 recruta o complexo Rix1 (Ipi1, Ipi3) associado à AAA-ATPase Rea1, que interage diretamente com Rsa4, formando a partícula Rix1-Rea1 (Fig. 10) (Kater et al., 2020; Barrio-Garcia et al., 2016). O recrutamento e atividade de Rea1 levam à liberação de Rsa4, rotação do 5S RNP e considerável remodelamento do domínio V (Micic et al., 2020; Baßler et al., 2010; Ulbrich et al., 2009). Cgr1 estabiliza a orientação rotacionada de 5S RNP neste processo (Thoms et al., 2018), sendo liberado com a dissociação de Rea1, do complexo Rix1 e de Sda1.

Na transição entre a partícula Nog2 e a partícula Rix1-Rea1, o *ITS2-foot* é removido à medida que o ITS2 é clivado e processado em um complexo processo de várias etapas detalhado na seção 1.9 (Pillon et al., 2019a). Este processo parece estar acoplado à maturação parcial do PET e PTC, uma vez que seu início depende da formação da partícula Nog2 (Klinge e Woolford, 2019; Konikkat e Woolford, 2017). A clivagem endonucleolítica inicial em C₂ pelo complexo Las1-Grc3 (Gasse et al., 2015), cujo mecanismo de recrutamento ainda não é conhecido, depende da associação prévia de 11 proteínas-r e 14 fatores de montagem denominados fatores B (Biedka et al., 2018; Talkish et al., 2012). Metade dos fatores de montagem B compõem a partícula Nog2 (Rlp24, eIF6, Nog1, Nsa2, Rpf2, Rrs1 e Nog2), enquanto os demais são liberados em etapas anteriores (Mak11, Drs1, Has1, Nip7, Nop2, Spb4 e Dbp10) contribuindo indiretamente à formação deste intermediário pré-60S. Esta clivagem no ITS2 gera os pré-rRNAs 7S e 26S que serão processados exonucleoliticamente. Nop53 tem um papel fundamental recrutando o exossomo ao pré-60S para o processamento do 7S, o que permite a liberação dos demais fatores de montagem que compõem o *ITS2-foot* (Rlp7, Cic1, Nop15 e Nop7) (Schuller et al., 2018; Thoms et al., 2015).

1.5.2 Transporte nucleocitoplasmático

No nucleoplasma, a capacidade de exportação nuclear dos intermediários pré-60S é alcançada por meio de vários eventos de remodelamento e mudanças composicionais, incluindo a rotação 180° do 5S RNP (Fig. 10). Curiosamente, a remoção do *ITS2-foot* não se mostrou um pré-requisito para a exportação nuclear, uma vez que mutantes pontuais *las1*, *mtr4* e *nop53*, que bloqueiam o processamento do ITS2, acumulam no citoplasma fatores de montagem do *ITS2-foot*, além dos pré-rRNAs 7S e 27S (Biedka et al., 2018; Sarkar et al., 2017; Rodríguez-Galán et al., 2015). Dado que subunidades 60S contendo o *ITS2-foot* foram capturadas em ciclos de tradução, propôs-se que a remoção do *ITS2-foot* não afetaria eventos tardios de maturação do 60S (Biedka et al., 2018; Sarkar et al., 2017).

A dissociação da GTPase Nog2, por outro lado, é essencial para a exportação do pré-60S ao citoplasma, pois permite o recrutamento do fator de exportação Nmd3, cujo sítio de ligação é parcialmente ocluído por Nog2 (Matsuo et al., 2014). Nmd3 se estende do L1 *stalk* até o SRL, se sobrepondo aos sítios A, P e E de associação a tRNA na superfície intersubunidade, em contato direto com o PTC (Ma et al., 2017; Malyutin et al., 2017; Zhou et al., 2019b; Kargas et al., 2019). As sequências de exportação nuclear (NES) de Nmd3 são reconhecidas pela exportina RanGTPase-dependente Cmr1 (Gadal et al., 2001; Ho et al., 2000). A grande dimensão do pré-60S, entretanto, impõe a necessidade de mecanismos complementares e redundantes para sua passagem pelo complexo do poro nuclear (NPC) (Nerurkar et al., 2015). Recentemente, alguns detalhes deste processo foram visualizados por eletrotomografia e microscopia confocal, inferindo-se um tempo de trânsito de partículas pré-ribossomais no NPC da ordem de 90ms em levedura, e 25 ms em humanos, sendo cerca de 1/3 das tentativas de exportação nuclear bem-sucedidas (Delavoie et al., 2019; Ruland et al., 2021). Contribuem para este processo: Arx1, que associado à saída do PET é capaz de interagir com nucleoporinas (Bradatsch et al., 2007; Hung et al., 2008); os fatores de exportação de mRNA Mex67/Mtr2, possivelmente associados ao P-*stalk*, CP, ou ao 5.8S (Sarkar et al., 2016; Yao et al., 2007); além da potencial contribuição de Bud20, Npl3, Gle2, Rrp12 e Ecm1 (Occhipinti et al., 2013; Altvater et al., 2012; Baßler et al., 2012; Hackmann et al., 2011; Yao et al., 2010; Oeffinger et al., 2004).

1.5.3 Maturação citoplasmática

No citoplasma, as últimas proteínas-r (eL24, eL40, eL42, eL29, uL16, uL10, P1 e P2) se associam ao pré-60S, enquanto fatores de montagem restantes se dissociam (Fig. 10). Este processo requer o recrutamento e atividade de alguns fatores de montagem exclusivamente

Em paralelo, o PET e o *P-stalk* passam por um processo independente de maturação final (Lo et al., 2010). No primeiro caso, a dissociação de Arx1 da saída do PET é mediada por Jjj1, pelas ATPases Ssa1/Ssa2 e por Rei1, cuja extremidade N-terminal adentra e examina o túnel formado. A dissociação de Arx1 e Rei1 permite que o PET seja examinado pela terceira vez, com a inserção de Reh1, cuja dissociação se dá apenas na última etapa citoplasmática (Meyer et al., 2010; Greber et al., 2012, 2016; Zhou et al., 2019b; Kargas et al., 2019). No caso do *P-stalk*, a dissociação de Nog1 permite o recrutamento da fosfatase de dupla-especificidade Yvh1. O domínio ZBD (*zinc binding domain*) C-terminal de Yvh1 induz alostericamente a liberação de Mrt4, que desde o nucléolo atua como *placeholder* da proteína-r uL10 (Rodríguez-Mateos et al., 2009a). Este processo, apesar de predominantemente citoplasmático, também já foi descrito em etapas tardias no núcleo, favorecendo o recrutamento de Mex67/Mtr2 (Sarkar et al., 2016). A liberação de Mrt4, de qualquer modo, é essencial para a associação das proteínas-r uL10, P1 e P2 que compõem o *P-stalk*, e levam à dissociação de Yvh1 (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009; Rodríguez-Mateos et al., 2009b; Zhou et al., 2019b).

A maturação final do PTC ocorre apenas após a finalização prévia do *P-stalk* e do PET (Lo et al., 2010; Klingauf-Nerurkar et al., 2020). O recrutamento de eL40 e uL16 levam a uma mudança conformacional de Nmd3, promovendo reposicionamento do *L1-stalk* e rearranjos estruturais fundamentais no PTC. A ativação da atividade GTPase de Lsg1, por mecanismos ainda desconhecidos, contribui para a dissociação conjunta de Nmd3 e Lsg1 (Hedges et al., 2005; Ma et al., 2017; Zhou et al., 2019b; Kargas et al., 2019). Nesta etapa, o fator de anti-associação eIF6 continua ocluindo a formação do 80S. Sua dissociação envolve a última checagem funcional e estrutural do PTC, realizada por Sdo1 e pela GTPase Efl1, homóloga do fator de alongação da tradução eEF2 (Weis et al., 2015; Gartmann et al., 2010). A liberação destes fatores torna a subunidade ribossomal 60S madura e apta a se associar a complexos de iniciação da tradução.

1.6 Exossomo eucariótico

O exossomo é um complexo enzimático essencial e altamente conservado, que foi descoberto e inicialmente caracterizado em *S. cerevisiae* na busca pelos fatores responsáveis pelo processamento do pré-rRNA 7S (Mitchell et al., 1997; Mitchell e Tollervey, 2010). Esta função fundamental do exossomo encontra-se inclusive indicada no nome da maioria de seus componentes, iniciados por “Rrp” (*ribossomal RNA processing*) como em Rrp4, Rrp41, Rrp44 ou Rrp6. Notavelmente, além de seu papel direto na biogênese ribossomal, estudos subsequentes ampliaram a abrangência dos transcritos alvos (Allmang et al., 1999a; Gudipati et al., 2012;

Schneider et al., 2012; Szczepińska et al., 2015), revelando a participação do exossomo no processamento e degradação de diversas classes de RNAs não-codificadores e codificadores tanto no núcleo quanto no citoplasma (Schmid e Jensen, 2019; Zinder e Lima, 2017; Kilchert et al., 2016; Houseley et al., 2006).

Para tanto, o complexo exossomo, com cerca de 300 a 400 kDa, conta com atividades exorribonucleolítica 3'-5' e endorribonucleolítica. As subunidades catalíticas e cofatores do complexo associam-se a um *core* de 9 subunidades, fazendo com que o exossomo apresente diferentes composições em diferentes processos biológicos e compartimentos subcelulares (Chlebowski et al., 2013; Kilchert et al., 2016; Schmid e Jensen, 2019).

1.6.1 Estrutura e Composição

Recentemente, avanços da biologia estrutural permitiram a elucidação em alta resolução da estrutura do exossomo de *S. cerevisiae* e humano, com 9 a 14 subunidades, revelando alta conservação estrutural, além do papel de cofatores, efeitos alostéricos, e vias de acesso dos transcritos alvo aos sítios catalíticos (Liu et al., 2006, 2016; Bonneau et al., 2009; Makino et al., 2013, 2015; Wasmuth et al., 2014; Wasmuth e Lima, 2017; Kowalinski et al., 2016; Zinder et al., 2016; Falk et al., 2017a; Gerlach et al., 2018; Weick et al., 2018). Ensaios com o complexo reconstituído *in vitro* contribuíram para a caracterização do impacto de cofatores, domínios e outros parâmetros na cinética enzimática (Zinder e Lima, 2017; Lingaraju et al., 2019; Weick et al., 2020).

Em *S. cerevisiae* e demais eucariotos, o *core* do exossomo, também denominado Exo9, é composto por 9 subunidades distintas (Fig 11A), todas essenciais, assumindo uma estrutura toroidal. As 6 subunidades com domínio *RNase PH-like* (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 e Mtr3) formam um anel heterohexamérico delimitando um canal central capaz de acomodar um RNA de fita simples. Acima deste anel associam-se, em torno do canal central, 3 subunidades (Rrp4, Csl4 e Rrp40) que possuem domínios S1/KH de ligação a RNA, formando o denominado *cap* do exossomo. Esta arquitetura do Exo9 eucariótico é altamente conservada (Fig. 11B), sendo encontrada em exonucleases dos três Domínios da vida: do exossomo de *archaea* à RNase PH e PNPase de bactérias. Tanto em *archaea* quanto bactéria, o RNA é degradado no interior do canal hexamérico onde se encontram sítios catalíticos com atividade 3'-5' exonucleolítica fosforolítica. O mesmo não é verificado na maioria dos eucariotos, incluindo *S. cerevisiae* e humanos, para os quais o *core* Exo9 é desprovido de atividade catalítica. O exossomo eucariótico depende, portanto, de subunidades adicionais denominadas Rrp6 e Rrp44, que são providas de sítios catalíticos ativos e se associam estavelmente ao *core*.

Rrp44 (também denominada Dis3) pertence à família de RNase R/RNase II e possui tanto atividade exonucleolítica 3'-5' hidrolítica processiva quanto endonucleolítica, com sítios catalíticos em domínios distintos (RNB e PIN), encontrando-se no núcleo e no citoplasma (Figs. 11A,C-D) (Allmang et al., 1999a; Dziembowski et al., 2007; Lebreton et al., 2008a; Lorentzen et al., 2008; Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2009). O domínio PIN de Rrp44, que contém o sítio catalítico de endonuclease, é essencial para sua ancoragem à base do exossomo, na saída do canal central hexamérico do *core*, através do qual a extremidade 3' do transcrito alvo é direcionada a um de seus sítios catalíticos (Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2009; Bonneau et al., 2009). Mutantes pontuais nos sítios catalíticos de Rrp44 revelaram maior impacto da remoção de sua atividade exonucleolítica em relação à endonucleolítica no crescimento celular e processamento do pré-rRNA. A mutação de ambos os sítios tem efeito sinérgico, consistente com o fato de Rrp44 ser essencial para a viabilidade celular (Lebreton et al., 2008a; Schneider et al., 2009). Em humanos, é expressa em três isoformas: DIS3 no exossomo nuclear, DIS3L no exossomo citoplasmático e DIS3L2 independente do *core* (Staals et al., 2010; Tomecki et al., 2010; Lubas et al., 2013).

Rrp6 é a subunidade catalítica que possui atividade exonucleolítica 3'-5' hidrolítica distributiva presente, em levedura, exclusivamente no exossomo nuclear (Figs. 11A,C-D) (Briggs et al., 1998; Januszyk e Lima, 2011). Apesar de não essencial à viabilidade celular, a cepa $\Delta rrp6$ apresenta crescimento lento, termossensibilidade, e acúmulo de pré-rRNA 5.8S + 30, além de precursores de snoRNAs, snRNAs e CUTs. Rrp6 pertence à superfamília DEDD de nucleases, estando relacionada à família RNase D de exonucleases. Seu domínio EXO apresenta o sítio catalítico exposto ao solvente e compõe juntamente com o domínio HRDC2 o módulo catalítico responsável por se ligar ao RNA e degradá-lo distributivamente (Makino et al., 2013, 2015; Wasmuth et al., 2014; Zinder et al., 2016). Na extremidade N-terminal, o domínio PMC2NT interage com o cofator Rrp47, enquanto a extremidade C-terminal possui o domínio "lasso" flexível capaz de interagir com RNA (Stead et al., 2007; Wasmuth e Lima, 2017). Rrp6 se associa ao topo do *core* do exossomo, na extremidade oposta a Rrp44, através do domínio C-terminal EAR (*exosome associating region*) que interage diretamente com o *cap*, especialmente com Csl4, além de Mtr3 e Rrp43 (Makino et al., 2013, 2015; Wasmuth et al., 2014). Esta associação ao *core* aumenta sua atividade catalítica *in vitro* (Wasmuth e Lima, 2012). Em humanos, Rrp6 é denominada PM/SCL-100 ou EXOSC10, tendo conservada função na maturação do rRNA 5.8S (Allmang et al., 1999b; Schilders et al., 2007; Januszyk et al., 2011).

Apesar de cataliticamente inativo, o *core* do exossomo tem papel estrutural essencial, modulando a atividade de ambas as ribonucleases, e seletivamente restringindo o acesso a seus sítios catalíticos de modo a evitar ampla degradação inespecífica (Wasmuth e Lima, 2012;

Drażkowska et al., 2013; Kilchert, 2020). No citoplasma, Exo9 associa-se a Rrp44 formando o Exo10, enquanto no núcleo e nucléolo Exo9 encontra-se associado tanto a Rrp44 quanto a Rrp6, formando o exossomo com 11 subunidades (Exo11) (Fig. 11C). As estruturas disponíveis até então demonstram que o core do exossomo tem a importante função de guiar a extremidade 3' do RNA substrato a um dos sítios catalíticos destas enzimas (Fig 11D). RNAs que entram pelo canal central (>30nt) são guiados até Rrp44, enquanto RNAs menores ou com estrutura mais complexa limitando a extremidade 3' tendem a passar pelo *cap* e serem defletidos em direção ao sítio catalítico exposto de Rrp6 (Zinder et al., 2016; Zinder e Lima, 2017; Bonneau et al., 2009; Liu et al., 2014; Makino et al., 2013, 2015; Wasmuth et al., 2014). Recentemente demonstrou-se que a seletividade de Rrp6 envolve tanto o comprimento da extremidade 3', quanto a sequência dos 4 últimos nucleotídeos (Axhemi et al., 2020). Uma terceira via, denominada acesso direto (Fig. 11D), está associada ao fato de Rrp44 poder se encontrar em duas conformações principais: aberta e fechada. Na conformação aberta, o domínio com atividade exonucleolítica de Rrp44 encontra-se deslocado em relação ao *core* e, portanto, mais acessível, podendo a extremidade 3' de um RNA alcançá-lo sem passar pelo *core*, com a possível participação da extremidade C-terminal de Rrp44 (domínio S1 de ligação a RNA) no recrutamento (Liu et al., 2014; Zinder et al., 2016; Han e van Hoof, 2016; Delan-Forino et al., 2017). Pouco se sabe como diferentes transcritos alvo são destinados a uma via específica de degradação/ou processamento, embora alvos de cada mecanismo tenham sido caracterizados (Kiss e Andrulis, 2010; Schneider et al., 2012; Gudipati et al., 2012; Han e van Hoof, 2016; Delan-Forino et al., 2017; Zinder e Lima, 2017). Postula-se que o mecanismo de recrutamento do exossomo, além da estrutura do transcrito alvo possam influenciar na atividade do exossomo. A título de exemplo, tRNAs hipomodificados e alguns RNAs pequenos altamente estruturados parecem ser degradados preferencialmente pela via de acesso direto à Rrp44 (Delan-Forino et al., 2017; Han e van Hoof, 2016). Sabe-se que a ligação do RNA causa mudanças conformacionais significativas no exossomo, levando, por exemplo, ao afastamento do domínio EXO de Rrp6 sobre o *cap* (Wasmuth et al., 2014; Makino et al., 2015). A ligação de cofatores e mesmo de Rrp6 ao exossomo nuclear têm efeitos na estrutura do complexo. Foi demonstrado, por exemplo, que ao interagir com o exossomo, Rrp6 estimula alostericamente a atividade de Rrp44, aumentando o diâmetro do canal central (Wasmuth e Lima, 2012, 2017).

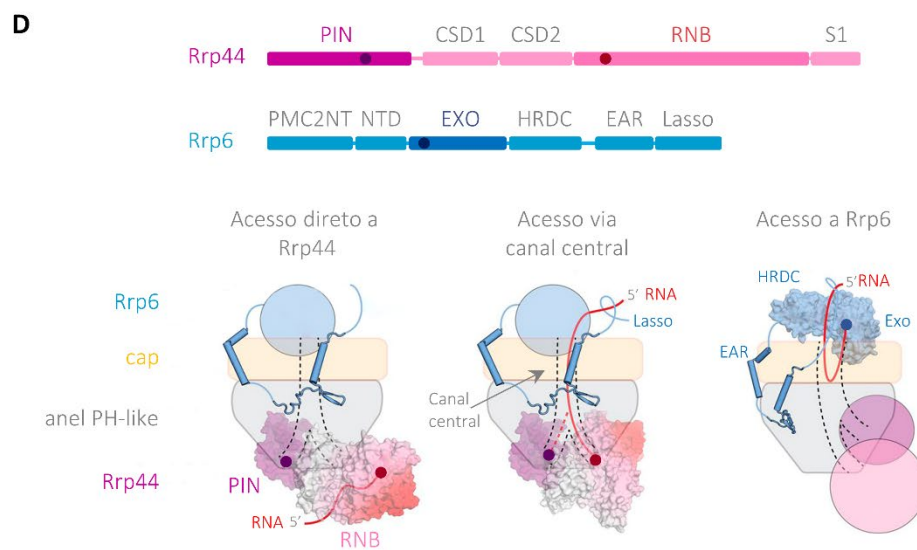
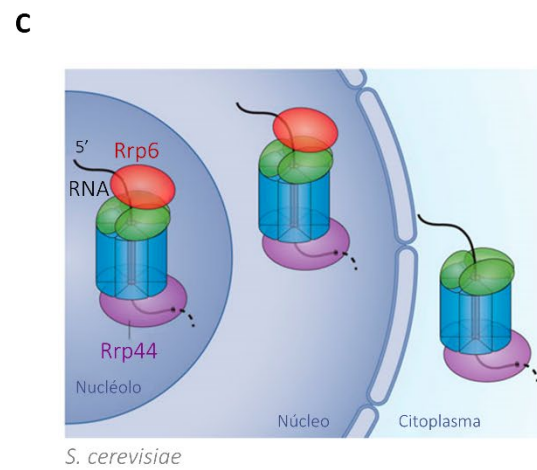
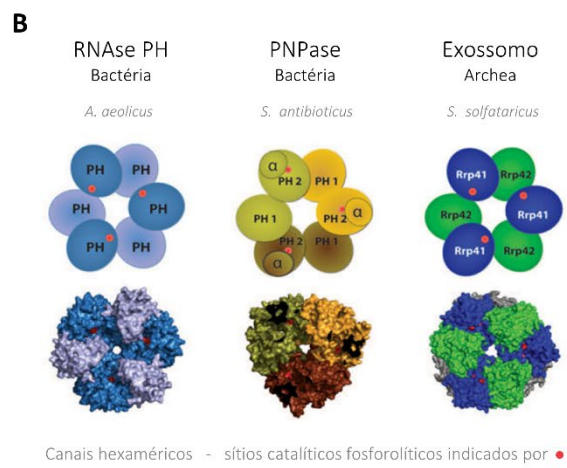
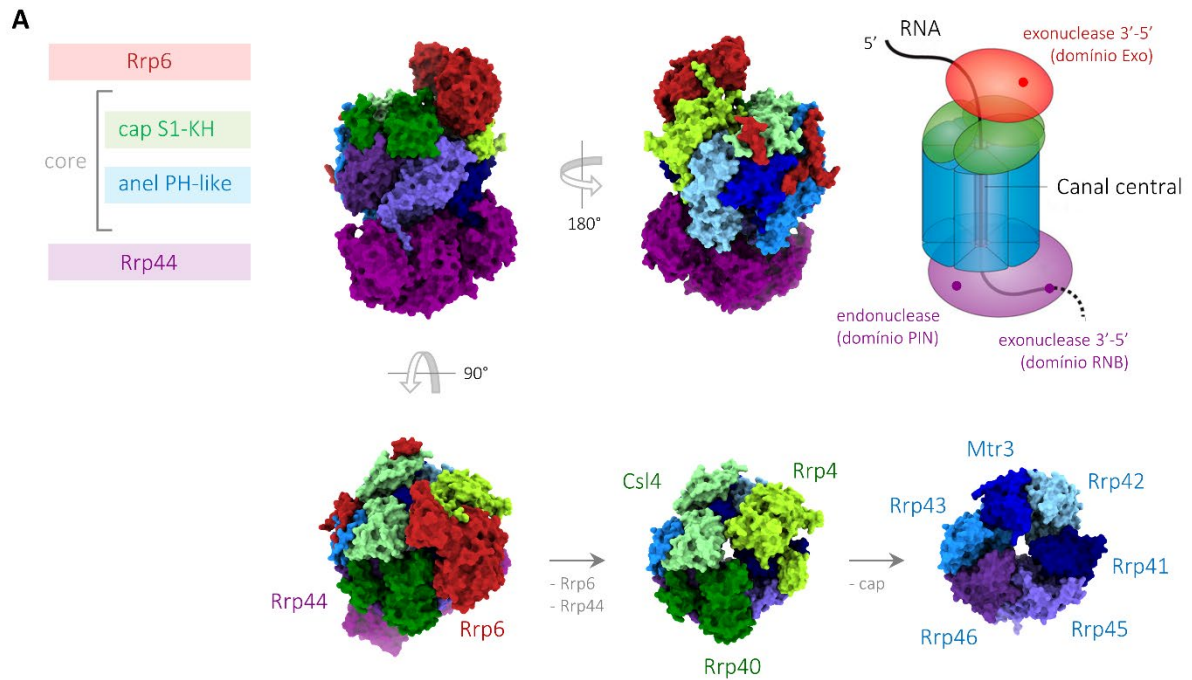


Figura 11. Estrutura, conservação e atividade do exossomo de *S. cerevisiae*. (A) Estrutura do exossomo Exo11 de *S. cerevisiae* (PDB 5VZJ, omitindo Mpp6) composto pelo *core* (Exo9) ao qual se associam, em extremidades opostas, as subunidades catalíticas Rrp6 e Rrp44. Na representação esquemática do exossomo (Adaptada de Kilchert et al., 2016), seus sítios catalíticos são indicados por pontos. Enquanto Rrp6 possui atividade exonucleolítica 3'-5' distributiva, Rrp44 apresenta atividade endonucleolítica e exonucleolítica 3'-5' processiva. O *core* do exossomo eucariótico (Exo9) não possui atividade catalítica. Ele é formado por um anel heterohexamérico composto por proteínas com domínio *PH-like* (azul), ao qual se superpõem três proteínas com domínios S1-KH (verde) que constituem o *cap*. Estas 9 proteínas delimitam um canal central, através do qual a extremidade 3' de um RNA simples fita pode ser guiada para os sítios catalíticos de Rrp44. O *core* do exossomo tem um importante papel estrutural modulando a atividade de ambas subunidades catalíticas. (B) Conservação estrutural do *core* do exossomo eucariótico revelada pela similaridade estrutural com exonucleases de outros Domínios da vida: a RNase PH (homo-hexamero) e PNPase (homotrímero de heterodímeros) de Bacteria; e o exossomo de Archea (homotrímero de heterodímeros e um *cap* de três proteínas – na face oposta). Diferente de eucariotos, o interior do canal central destes três complexos possui sítios catalíticos fosforolíticos ativos indicados por pontos vermelhos. (Adaptado de Januszyk e Lima, 2010) (C) Composição do exossomo nos diferentes compartimentos subcelulares de *S. cerevisiae*. Enquanto Rrp44 é encontrada no nucléolo, núcleo e citoplasma, Rrp6 é exclusivamente nuclear, estando associada ao *core* do exossomo no nucléolo e nucleoplasma. (Adaptado de Kilchert et al., 2016) (D) Vias de degradação do RNA pelo exossomo em *S. cerevisiae*. Na parte superior, esquema dos domínios das subunidades catalíticas Rrp44 e Rrp6 destacando com pontos a posição dos sítios catalíticos. Na parte inferior, esquema das três vias de acesso da extremidade 3' do RNA aos sítios catalíticos do exossomo. Da esquerda para direita: acesso direto à Rrp44 sem passar pelo canal central; acesso à Rrp44 via canal central, durante o qual, o domínio lasso de Rrp6 estabiliza a associação do RNA ao exossomo; e acesso à Rrp6 através do *cap* do exossomo. (Adaptado de Zinder et al., 2017).

1.6.2 Cofatores do exossomo

Cofatores conservados se associam estável ou transientemente ao exossomo modulando a atividade e especificidade do complexo nos diferentes compartimentos subcelulares (Fig. 12). Esta modularidade na composição do exossomo lhe confere grande flexibilidade no reconhecimento de substratos alvo, além da possibilidade de adaptação a diferentes condições e estímulos celulares (Kilchert, 2020; Schmid e Jensen, 2019).

No núcleo, em levedura, destacam-se dois complexos triméricos no recrutamento do exossomo: o NNS e o TRAMP. O primeiro é composto pela helicase Sen1 e pelas proteínas Nrd1 e Nab3 com domínios de ligação sequência-específica a RNA. O complexo NNS reconhece co-transcritionalmente ncRNAs denominados CUTs (*cryptic unstable transcripts*), e interage diretamente com o CTD da RNA Pol II no início da elongação levando à terminação não-canônica da transcrição acoplada à degradação dos transcritos (Vasiljeva e Buratowski, 2006; Tudek et al., 2014; Porrua e Libri, 2015). Vale destacar que, além dos CUTs, alguns snRNAs e snoRNAs também usam Nrd1 e Nab3 para recrutamento do exossomo para processamento da extremidade 3' (Wlotzka et al., 2011; Kilchert et al., 2016). Nestes casos, elementos de estrutura secundária e proteínas de ligação a RNA impedem a total degradação destes RNAs (Coy et al., 2013). Recentemente, alguns mRNAs também foram descritos como alvos do NNS em resposta à depleção de glicose, indicando a participação do exossomo em uma regulação pós-transcricional nuclear estímulo-específica (Bresson et al., 2017). O NNS interage simultaneamente com o exossomo e com o complexo TRAMP que marca e direciona a extremidade 3' dos transcritos alvos para degradação ou processamento.

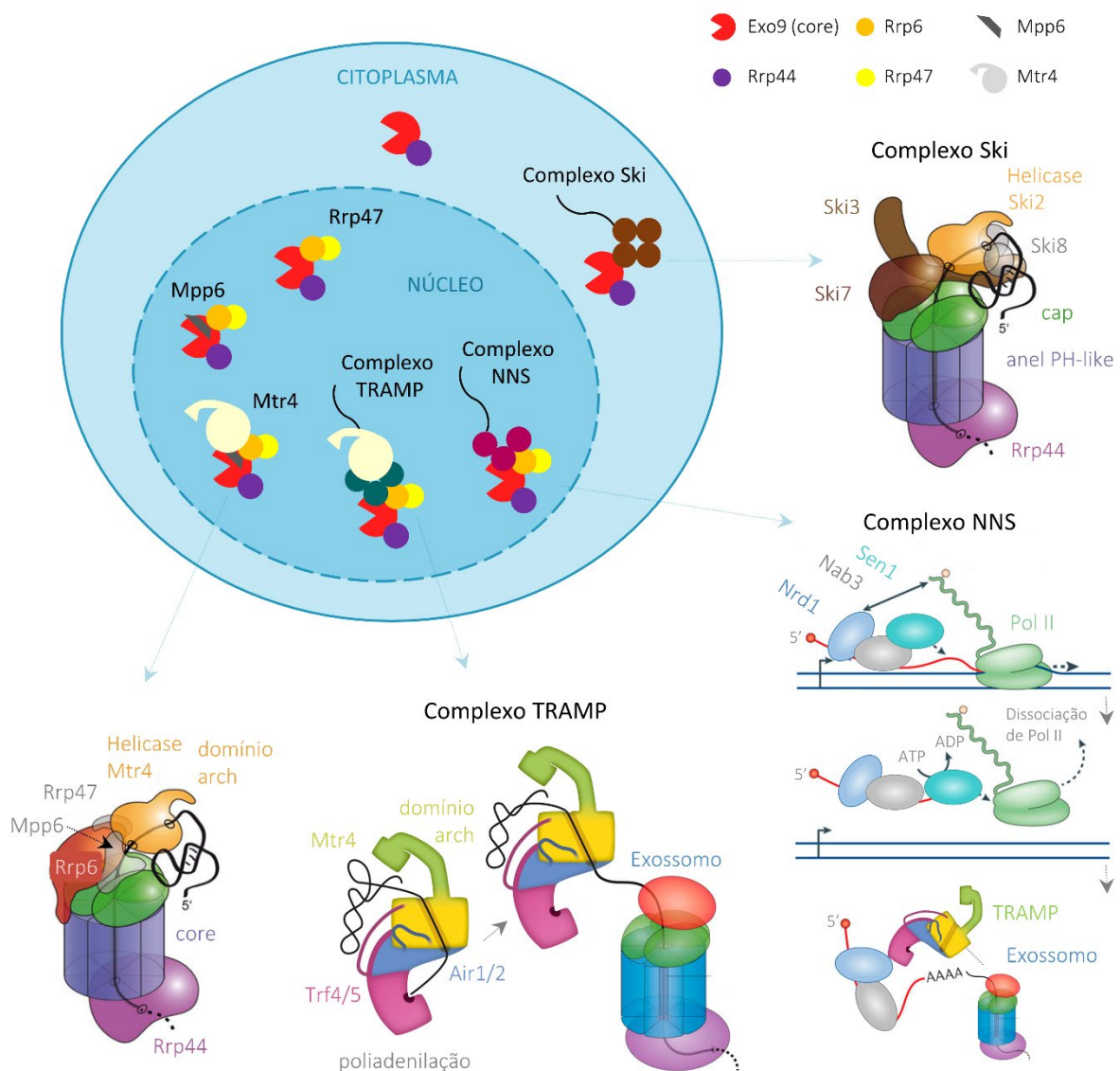


Figura 12. Cofatores do exossomo de *S. cerevisiae*. Esquema da localização subcelular dos diferentes cofatores e complexos que se associam ao exossomo (Baseado em Januszzyk e Lima, 2014). No citoplasma, o complexo Ski apresenta a RNA helicase Ski2 que desfaz a estrutura secundária de RNAs alvo, orientando-os ao canal central. Ski7 se liga ao *cap* na mesma região que Rrp6 o faz no exossomo nuclear. Ski3 e Ski8 têm um papel estrutural. (Adaptado de Kilchert, 2020). No núcleo, Rrp6 está associada a Rrp47. Mpp6 se associa ao *cap*, e a RNA helicase Mtr4 ao se associar ao exossomo, se ancora através da interação com Rrp6, Rrp47 e Mpp6. Estes cofatores estão presentes durante o processamento do pré-rRNA (Adaptado de Kilchert, 2020). No núcleo, o exossomo pode ainda se associar aos complexos TRAMP e NNS. O complexo TRAMP é formado pela helicase Mtr4, pela poli(A) polimerase não-canônica Trf4/5 e pela proteína de ligação a RNA Air1/2. Enquanto Mtr4 desfaz a estrutura secundária do RNA alvo, Trf4/5 poliadenila a extremidade 3', facilitando seu rápido endereçamento ao canal central do exossomo (Adaptado de Falk et al., 2014; Kilchert et al. 2016). O complexo NNS está envolvido na degradação de transcritos crípticos (CUTs, MUTs). Nrd1 e Nab3 se associam à extremidade 5' do RNA alvo durante a elongação. Nrd1 também interage com o C-terminal da RNA polimerase II. A helicase Sen1 leva à terminação não-canônica e prematura da transcrição. Nrd1 e Nab3 recrutam o complexo TRAMP e o exossomo para degradação do RNA liberado (Adaptado de Porrua et al., 2015; Falk et al., 2014; Kilchert et al., 2016).

O complexo TRAMP é formado pela RNA helicase DEXH ATP-dependente Mtr4, por uma poli(A) polimerase não canônica (Trf4 ou Trf5) e por uma proteína de ligação a RNA (Air1 ou Air2) (LaCava et al., 2005; Vaňáčová et al., 2005; Wyers et al., 2005; Falk et al., 2014). Enquanto Mtr4

desfaz elementos de estrutura secundária e remove proteínas de ligação à RNA, a extremidade 3' que sai da helicase é poliadenilada por Trf4 ou Trf5, gerando uma pequena extensão na extremidade 3', que é muito menor que a cauda poli(A) de mRNAs e favorece a degradação pelo exossomo. A deleção de subunidades do exossomo leva à estabilização e acúmulo destes transcritos precursores ou defectivos com pequena cauda poli(A) (Jia et al., 2011; Tuck e Tollervey, 2013). Além de atuar com o NNS, o TRAMP também é recrutado de forma independente, tendo importante papel na degradação de tRNAs e pré-rRNAs defectivos, além de fragmentos de clivagem endonucleolítica (subprodutos de processamento) (Schmidt e Butler, 2013). Recentemente demonstrou-se que Trf4 e Trf5 têm um papel estrutural importante no reconhecimento de transcritos e recrutamento de Mtr4. Diferentes composições do TRAMP parecem apresentar algumas funções não sobreponíveis. Trf5, por exemplo, recruta Mtr4 para o processamento do fragmento de ITS1 formado após clivagem endonucleolítica em A₃ (Delan-Forino et al., 2020).

A helicase Mtr4 é essencial para a atividade do exossomo nuclear, tornando RNAs estruturados em fitas simples aptas a entrarem pelo canal central do exossomo. Sua associação ao exossomo também ocorre de forma independente do complexo TRAMP (Kilchert, 2020). Isto é verificado por exemplo, na degradação do 5'ETS e no processamento do pré-rRNA 7S, que são insensíveis a deleções de Trf4 ou Trf5 (Houseley e Tollervey, 2006). Em ambos os casos, fatores de montagem ribossomal (Utp18 no 90S e Nop53 no pré-60S) possuem um motivo conservado (AIM) que interage com o domínio C-terminal *arch* de Mtr4, recrutando o exossomo (Jackson et al., 2010b; Thoms et al., 2015; Falk et al., 2017b; Lingaraju et al., 2019).

A transiente interação de Mtr4 com o exossomo, por sua vez, é mediada pelo topo do complexo, mais especificamente por Rrp6 e por dois cofatores nucleares adicionais desprovidos de atividade enzimática, Rrp47 e Mpp6 (Lingaraju et al., 2019). Em conjunto, estes fatores compõem o Exo14 - exossomo de 14 subunidades (Falk et al., 2017a; Wasmuth et al., 2017). Rrp6 forma, através de sua extremidade N-terminal, um heterodímero com o cofator Rrp47, que é essencial para a estabilidade de ambas proteínas (Feigenbutz et al., 2013a, 2013b; Stead et al., 2007; Mitchell et al., 2003). Este dímero estável serve de plataforma de interação com o domínio N-terminal de Mtr4 (Schuch et al., 2014). O segundo ponto de ancoragem de Mtr4 ao exossomo é a proteína Mpp6, que interage com Rrp40 no *cap* do exossomo e com o domínio DExH de Mtr4 (Falk et al., 2017a; Wasmuth et al., 2017; Schuller et al., 2018). O fato de Rrp47 e Mpp6 não serem essenciais à viabilidade celular possivelmente reflete a redundância dos pontos de ancoragem de Mtr4 ao exossomo (pelo menos um deve estar presente), como sugerido pela letalidade sintética dos duplo mutantes $\Delta rrp47\Delta mpp6$ e $\Delta rrp6\Delta mpp6$ (Milligan et al., 2008; Feigenbutz et al., 2013b; Shi et al., 2015; Kilchert, 2020). Estas interações são conservadas e

também observadas entre ortólogos humanos (Chen et al., 2001; Schilders et al., 2007; Lubas et al., 2011; Weick et al., 2018; Gerlach et al., 2018). Além de recrutarem Mtr4, os cofatores Rrp47 e Mpp6 estimulam a atividade do exossomo *in vitro*, sobretudo a mediada por Rrp6 (Wasmuth et al., 2017). A presença conjunta de Rrp47 e Mpp6 no exossomo, ao estabilizar e posicionar Mtr4, aumenta a trajetória do RNA auxiliando na transferência de sua extremidade 3' da helicase para o canal central do exossomo (Falk et al., 2017a).

Estes cofatores em conjuntos com Rrp6 ampliam a superfície do exossomo provendo sítios de interação com outras proteínas além de Mtr4. O domínio C-terminal de Mpp6 interage com baixa afinidade com o domínio catalítico de Rrp6 (Kim et al., 2016). Rrp6 e Mpp6 interagem com componentes do complexo NNS, Nrd1 e Nab3 (Fasken et al., 2015; Kim et al., 2016). O domínio C-terminal de Rrp47, por sua vez, interage com as proteínas de snoRNPs de box C/D, Nop56 e Nop58 (Costello et al., 2011). Durante o processamento do pré-rRNA 7S, Rrp47 e Rrp6 interagem respectivamente com os fatores de montagem do pré-60S Nop7 e Nop53 (Schuller et al., 2018; Granato et al., 2008).

Nota-se, portanto, que no núcleo, Rrp6, além de papel catalítico, desempenha importante papel estrutural, não apenas modulando a atividade de Rrp44, mas favorecendo o recrutamento e reconhecimento de cofatores e adaptadores do exossomo. Estudos recentes têm ampliado seu escopo de ação (Stuparević et al., 2021), demonstrando, por exemplo, a importância da atividade catalítica de Rrp6 na discriminação entre transcritos instáveis e estáveis, protegendo estes da degradação associada ao complexo TRAMP (Das et al., 2021). Curiosamente, Rrp6 é capaz de atuar em alguns processos de forma independente do *core* do exossomo (Callahan e Butler, 2008), como na resposta a choque térmico (*heat shock*), afetando a expressão de genes específicos com impacto na manutenção da integridade da parede celular em levedura (Wang et al., 2020; Novačić et al., 2021).

No citoplasma, o exossomo é orientado aos transcritos alvo pelo complexo *superkiller* (SKI), formado, em levedura, pela RNA helicase DExH-box Ski2, pela proteína *scaffold* Ski3, e por duas cópias de Ski8, que também desempenham um papel estrutural (Anderson e Parker, 1998; Brown et al., 2000; van Hoof et al., 2000b; Halbach et al., 2013). Ski2 possui uma estrutura semelhante à de Mtr4, incluindo a presença de um domínio *arch* C-terminal conectado ao *core* RNA helicase DExH. A atividade de Ski2 permite que RNAs com estruturas secundárias, terciárias e/ou protegidos por proteínas sejam direcionados na forma de simples fita para o interior do canal central do exossomo. Um cofator adicional, denominado Ski7, estabelece a ponte entre o complexo Ski e o exossomo. Ski7 se liga ao *cap* do exossomo citoplasmático, ocupando a mesma posição que Rrp6 tem no exossomo nuclear (Kowalinski et al., 2016). Orientado pelo complexo Ski, o exossomo citoplasmático participa de vias de degradação de mRNA dependentes da

tradução. Nestes casos, o complexo SKI se associa cotraducionalmente à subunidade ribossomal 40S com mudanças conformacionais que permitem que o exossomo degrade a extremidade 3' do mRNA traduzido pós-deadenilação (Schmidt et al., 2016). Recentemente, um novo cofator, denominado Ska1, foi descoberto e associado a vias de degradação de mRNA independentes da tradução, permitindo ativar a helicase Ski2 sem a presença de ribossomo (Zhang et al., 2019).

Com exceção do complexo NNS, cujos ortólogos humanos aparentemente não atuam em conjunto, os demais cofatores nucleares (Mpp6, Rrp47) e citoplasmáticos, incluindo os complexos TRAMP e SKI são encontrados e formados em humanos, adicionalmente a outros complexos, como NEXT e PAXT, que não possuem ortólogo em levedura (Kilchert, 2020; Schmid e Jensen, 2019; Zinder e Lima, 2017; Meola et al., 2016; Lubas et al., 2011). Apesar da divergência evolutiva em alguns mecanismos específicos de recrutamento, o papel do exossomo no controle de qualidade e processamento de transcritos no nucléolo, núcleo e citoplasma, bem como diversas interações com cofatores, incluindo helicases similares a Ski2, foram evolutivamente selecionados e mantidos nos eucariotos.

1.6.3 Funções do exossomo no citoplasma e núcleo

Em humanos, mutantes pontuais de cofatores, subunidades estruturais e catalíticas do exossomo estão associados a doenças neurológicas do desenvolvimento (ex. hipoplasias pontocerebelares), com complexa manifestação tecido-específica (ex. retinite pigmentosa), além do câncer (ex. mieloma múltiplo) (Fasken et al., 2020; Morton et al., 2018). Entre outras abordagens, o uso do modelo de *S. cerevisiae* tem sido prolífico na caracterização do mecanismo molecular de tais mutações em ortólogos, refletindo a alta conservação do complexo (Sterrett et al., 2021; Slavotinek et al., 2020; Fasken et al., 2017; Gillespie et al., 2017; Tomecki et al., 2014). Muitas destas manifestações patológicas estão associadas à desregulação de um conjunto específico de RNAs alvos (Mehta et al., 2021; Kawabe et al., 2020; Fraga de Andrade et al., 2020; Belair et al., 2019). Como já descrito, o exossomo tem um papel fundamental na regulação do transcriptoma, afetando a meia-vida de RNAs codificadores e não-codificadores (Fig. 13).

No citoplasma, o exossomo atua no *turnover* e controle de qualidade de mRNAs e outros transcritos (Parker, 2012; Schaeffer et al., 2011). No primeiro caso, participa de uma das vias de degradação dependente de deadenilação, na qual a cauda poli(A) do mRNA previamente reduzida por deadenilases (ex. Ccr4, Pan2) é guiada à atividade 3'-5' exonucleolítica do exossomo pelo complexo SKI (Anderson e Parker, 1998; Decker e Parker, 1993). Tal processo é regulado, sendo a taxa de degradação transcrito-específica e um importante mecanismo de

regulação da expressão gênica (Parker, 2012). Em humanos, por exemplo, a presença de ARES (elementos ricos em AU) nos transcritos é reconhecida por proteínas de ligação a RNA capazes de recrutar o exossomo, aumentando a taxa de degradação (Chen et al., 2001; Schoenberg e Maquat, 2012). Deve-se lembrar que mRNAs deadenilados também podem ser decapados (*decapping*) e degradados através da outra extremidade pela ação 5'-3' exonucleolítica de Xrn1, que consiste na via citoplasmática preponderante (Muhlrad et al., 1994; Hu et al., 2009; Pelechano et al., 2015). Paralelamente, o exossomo tem um papel fundamental na degradação de transcritos aberrantes (ex. sem *stop codon*, com *stop codon* prematuro, produto de splicing defeutivo, fragmento de clivagem endonucleolítica), ou com baixa otimalidade de códons que são alvo de vias de controle de qualidade dependentes da tradução: *non-sense mediated mRNA decay* (NMD), *no-go mRNA decay* (NGD) e *non-stop mRNA decay* (NSD) (Schaeffer et al., 2011). Nestes casos, o complexo SKI é capaz de interagir com a subunidade ribossomal 40S enquanto guia a extremidade 3' do mRNA para o exossomo (Schmidt et al., 2016).

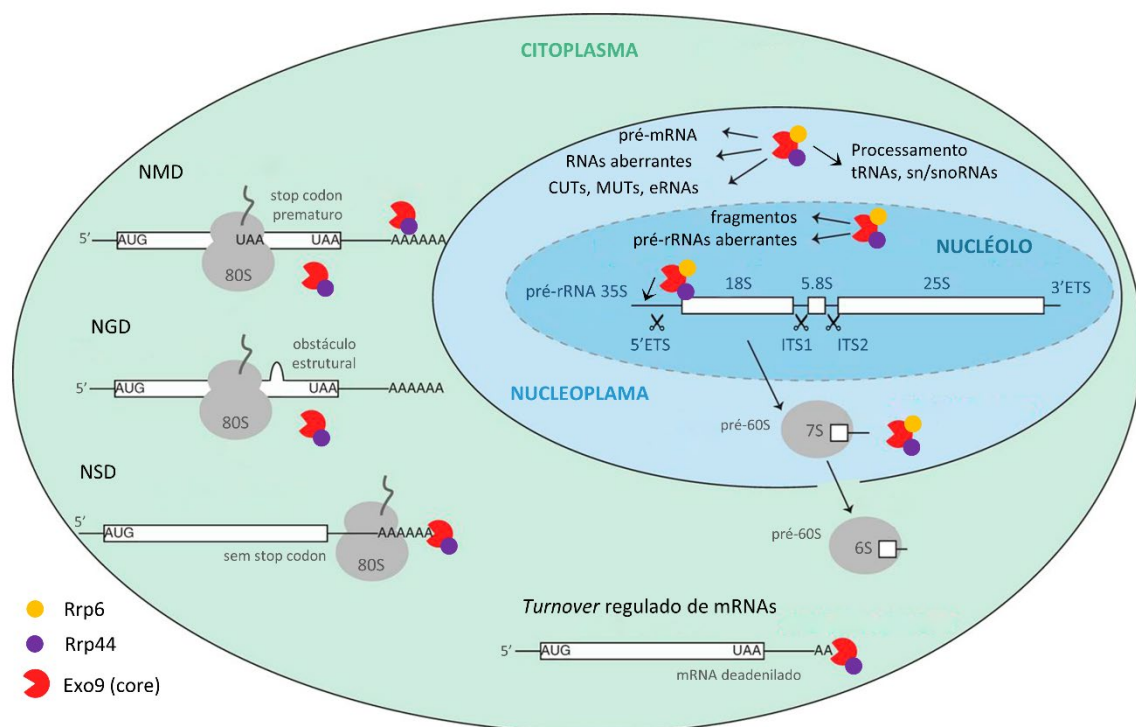


Figura 13. Funções do exossomo em *S. cerevisiae*. Esquema do papel desempenhado pelo exossomo nos diferentes compartimentos celulares. No núcleo e nucléolo, está envolvido no processamento da extremidade 3' de diferentes transcritos (ex. pré-rRNA, snoRNA, snRNAs), bem como na degradação de transcritos defeituosos, fragmentos de clivagem endonucleolítica (ex. 5'ETS) e produtos da transcrição pervasiva (ex. CUTs). No citoplasma, está envolvido na degradação regulada de mRNAs previamente deadenilados, e nos mecanismos de vigilância e vias de controle de qualidade associados à tradução: *non-sense mediated mRNA decay* (NMD), *no-go mRNA decay* (NGD) e *non-stop mRNA decay* (NSD) (Adaptado de Lingaraju et al., 2019)

No núcleo, o exossomo é responsável pela degradação de RNAs aberrantes, fragmentos de clivagem endonucleolítica, e pelo processamento da extremidade 3' de diversos transcritos (Kilchert et al., 2016; Schmid e Jensen, 2019). No primeiro caso, guiado pelo complexo TRAMP,

degrada pré-mRNAs processados incorretamente (*splicing*, sítio de poliadenilação ou exportação nuclear defectivos), além de snRNAs, snoRNAs, rRNAs e tRNAs aberrantes (hipomodificados, hipermodificados, com dobramentos incorretos, ou em intermediários de maturação defectivos no caso dos pré-rRNAs) (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Kadaba et al., 2004; Gudipati et al., 2012; Kilchert et al., 2016). A atividade do exossomo nuclear também é essencial para a eliminação de transcritos crípticos (ex. CUTs, MUTs), oriundos da transcrição pervasiva, como no caso de promotores bidirecionais (Wyers et al., 2005; Davis e Ares, 2006; Xu et al., 2009; Neil et al., 2009; Wlotzka et al., 2011; Lardenois et al., 2011). Em humanos, está envolvido na degradação de PROMPTs (*promoter upstream transcripts*), eRNAs (*enhancer RNAs*), além de lncRNAs (Preker et al., 2008; Pefanis et al., 2015; Kilchert et al., 2016). Alguns desses ncRNAs instáveis têm impacto no silenciamento da expressão de regiões de heterocromatina (Houseley et al., 2007; Bühler et al., 2007; Vasiljeva et al., 2008; Eberle et al., 2015). O controle do nível dos transcritos nucleares é também fundamental para a estabilidade genômica, participando o exossomo na resolução de *loops* R (RNA-DNA) que favorecem a ocorrência de quebras de duplas fita do DNA (Mischo et al., 2011; Richard et al., 2013; Marin-Vicente et al., 2015). Seu papel no núcleo se estende ainda à participação na terminação não-canônica da transcrição mediada por NNS (Castelnuovo et al., 2013; Fox et al., 2015). Ademais, recentes observações têm demonstrado um papel regulatório e passível de modulação do exossomo nuclear no controle de expressão gênica de mRNAs funcionais, competindo com a exportação nuclear (Kilchert et al., 2016; Bresson et al., 2017; Schmid e Jensen, 2019). Por fim, o exossomo participa na maturação da extremidade 3' de diversos ncRNAs estáveis, como precursores de snoRNAs, snRNAs, tRNAs, do rRNA 5.8S, e do RNA da telomerase (Chlebowski et al., 2013; Mitchell, 2014), indiretamente afetando os processos nos quais eles atuam.

Na biogênese ribossomal, que é o escopo deste trabalho, o exossomo tem papel fundamental na montagem de ambas subunidades ribossomais (40S e 60S), auxiliando na remoção de sequências espaçadoras que separam e flanqueiam os rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S. Ao degradar o fragmento do 5'ETS após clivagem endonucleolítica nos sítios A₀ e A₁, a atividade do exossomo permite a reciclagem dos fatores de montagem (UTP-A, UTP-B, U3 snoRNP) necessários para a formação inicial de novos intermediários 90S (precursor do pré-40S) (Allmang et al., 2000; Barandun et al., 2018; Chaker-Margot, 2018). No pré-60S, o exossomo degrada o fragmento de clivagem endonucleolítica A₂-A₃ do ITS1 (Delan-Forino et al., 2020), e é fundamental para o processamento do pré-rRNA 7S (Mitchell et al., 1997), ao clivar exonucleoliticamente o ITS2 desfazendo a estrutura do *ITS2-foot* (Fromm et al., 2017; Schuller et al., 2018).

1.7 Processamento do ITS2

Novos detalhes do mecanismo subjacente ao processamento do ITS2 no pré-60S foram recentemente obtidos por abordagens bioquímicas, genéticas, de reconstituição *in vitro* e por crio-EM (Fig. 14) (Fromm et al., 2017; Pillon et al., 2019a). Este processo tem início uma vez que a partícula Nog2 tenha sido formada, e Las1 é a endonuclease responsável pela clivagem do sítio C₂ no ITS2 (Figs. 14A,D) (Wu et al., 2016; Gasse et al., 2015; Schillewaert et al., 2012; Castle et al., 2010). Embora o mecanismo exato de sua associação ao pré-60S ainda permaneça elusivo, sabe-se que apresenta uma alta especificidade pela sequência e estrutura do RNA substrato, especulando-se que o complexo Rix1 auxiliaria neste recrutamento com base em interações já descritas para o ortólogo humano de Las1 (Castle et al., 2012; Pillon et al., 2017; Kater et al., 2020). A estabilidade e atividade de Las1 depende da polinucleotídeo quinase (PNK) Grc3, com a qual forma um estável complexo tetramérico, essencial para a clivagem em C₂ (Castle et al., 2013; Pillon et al., 2017, 2018, 2019b). Sendo Las1 uma HEPN endonuclease, sua atividade no pré-rRNA 27SB resulta no pré-rRNA 7S com uma extremidade 3' com um grupo fosfato 2'-3' cíclico, e no pré-rRNA 26S com um grupo 5'-hidroxila. Esta extremidade 5' do 26S é então fosforilada por Grc3 (Gasse et al., 2015; Pillon et al., 2017). A atividade das duas enzimas na forma de complexo garante que estas modificações ocorram de forma espaço-temporalmente coordenada, evitando reversão da clivagem (Pillon et al., 2019a). A exonuclease Rat1, que tem por alvo extremidades 5' monofosfatadas, é recrutada juntamente com seu cofator Rai1 na forma de complexo dimérico que interage diretamente com o complexo Las1-Grc3 (Fromm et al., 2017; Gasse et al., 2015; Xiang et al., 2009). A atividade exonucleolítica 5'-3' de Rat1-Rai1 resulta na formação da extremidade 5' madura do rRNA 25S.

Em paralelo, a extremidade 3' do 7S com o grupo fosfato cíclico é direcionada ao exossomo (Exo14). O processamento do 7S, apesar de ocorrer por um mecanismo independente, está indiretamente atrelado à remoção da extremidade 5' do 26S (a qual deve favorecer o acesso do exossomo), sendo afetado por mutações em Grc3, e Rat1-Rai1 (Fang et al., 2005; Castle et al., 2013; Fromm et al., 2017). Neste processo, o fator de montagem Nop53, na base do *ITS2-foot* onde interage com Nop7 e Rlp7 (Wu et al., 2016, 2017), tem um papel fundamental, sendo o responsável pelo recrutamento do exossomo através da helicase Mtr4, com a qual interage diretamente. Esta interação ocorre entre o motivo conservado AIM (*arch interacting motif* – LFX Φ D, X: qualquer aminoácido, Φ : aminoácido hidrofóbico) localizado na extremidade N-terminal (Leu60-Asp64) de Nop53 e o domínio *arch* de Mtr4 (Falk et al., 2017b; Thoms et al., 2015). Mutações pontuais no AIM impedem esta interação, levando ao acúmulo do pré-rRNA 7S (Thoms et al., 2015).

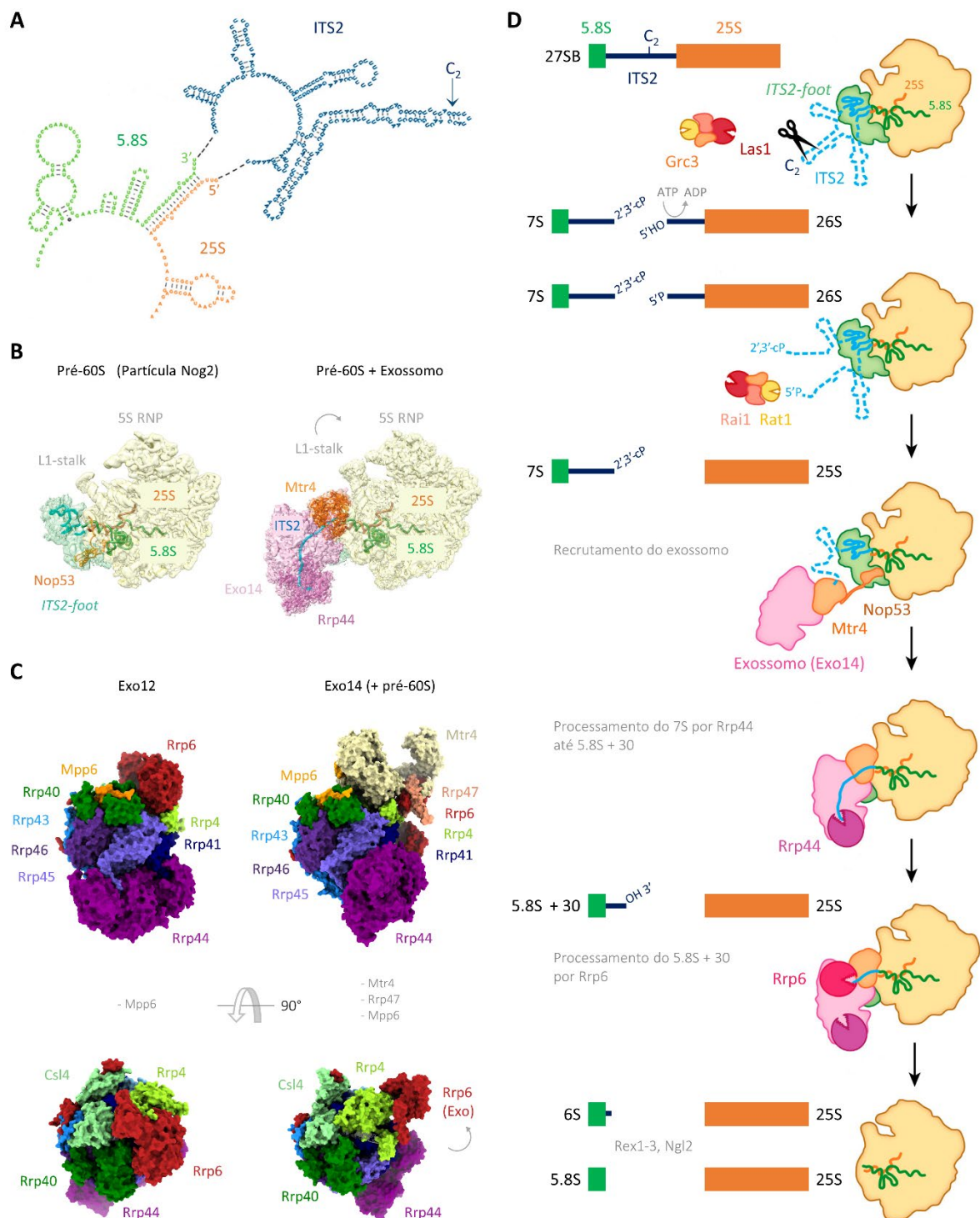


Figura 14. Etapas do processamento do ITS2. (A) Estrutura do espaçador ITS2 destacando a posição do sítio de clivagem C_2 e evidenciando que as extremidades 3' do rRNA 5.8S e 5' do rRNA 25S formam uma dupla fita. (Adaptado de Thoms et al., 2015). (B) Efeito do processamento do pré-rRNA 7S pelo exossomo na estrutura do pré-60S. Comparado à partícula Nog2 (PDB 3JCT), o exossomo associado ao pré-60S (PDB 6FSZ, 6FT6) ocupa o espaço antes preenchido pelo *ITS2-foot*. O processamento do ITS2 é acompanhado pela liberação dos fatores de montagem (Nop15, Cic1, Rlp7) e ele associados. Nop53 e Nop7 são os últimos a se dissociar. A RNA helicase Mtr4 ao se aproximar da partícula pré-60S durante a formação do 5.8S+30, interage com o rRNA 25S (Domínio I e V), empurrando L1-stalk em direção à protuberância central. (Adaptado de Baßler e Hurt, 2019) (C) Mudanças estruturais do exossomo durante processamento do pré-rRNA 7S. À esquerda exossomo Exo12 (PDB 5VZJ; core + Rrp6, Rrp44, Mpp6) não associado a RNA. À direita, exossomo Exo14 (PDB 6FSZ; core + Rrp6, Rrp44, Rrp47, Mpp6, Mtr4) capturado na etapa de formação do 5.8S+30. Mtr4 se ancora no topo do cap, deslocando o domínio catalítico (Exo) de Rrp6 para a lateral do complexo. (D) Esquema das etapas de processamento do ITS2 a partir do pré-rRNA 27SB. Após clivagem

endonucleolítica por Las1, forma-se o pré-rRNA 7S com um grupo fosfato cíclico (2'3'-cP) na extremidade 3'. A polinucleotídeo quinase Grc3, que interage com Las1, fosforila a extremidade 5' do 26S. A exonuclease 5'-3' Rat1, associada a Rai1, processa a extremidade 5' do 26S. O exossomo Exo14 é recrutado pelo fator de montagem Nop53. A extremidade 3' (2'3'-cP) do 7S é direcionada pela Mtr4 através do canal central do exossomo para Rrp44. A clivagem exonucleolítica 3'-5' processiva leva à formação do pré-rRNA 5.8S+30. Este intermediário, por impedimento estérico, não consegue continuar a ser processado por Rrp44, sendo removido do canal central e redirecionado para Rrp6, em um processo ainda pouco compreendido. Rrp6 gera o 6S, cujos 8 nts excedentes são degradados no núcleo e citoplasma por Rex1-3 e Ngl2 levando à formação da extremidade 3' madura do rRNA 5.8S. (Adaptado de Baßler e Hurt, 2019)

Mtr4 desempenha um papel fundamental, não apenas como ponte entre o exossomo e o pré-60S, mas também por sua atividade de RNA helicase. Enquanto a estrutura secundária do ITS2 é desfeita por Mtr4, a extremidade 3' é orientada pelo canal hexamérico do exossomo até o sítio catalítico de Rrp44, que diferentemente da Rrp6, é capaz de acomodar o grupo fosfato cíclico volumoso (Zinder et al., 2016). A atividade exonucleolítica processiva de Rrp44 parece ser mais importante neste processo, embora haja contribuição da atividade endonucleolítica do PIN, resultando no 5.8S+30 após remoção de cerca de 110 nt (Fromm et al., 2017; Schneider et al., 2009). À medida que o 7S é processado e a Mtr4 avança no sentido 3'-5', os fatores de montagem que compõem o ITS2-*foot* se dissociam. Os fatores Cic1, Nop15 e Rlp7, que se ligam diretamente ao ITS2, são prontamente liberados, enquanto Nop53 e Nop7, que se ligam aos rRNA 25S e 5.8S, são os últimos a serem liberados, estando ainda presentes na etapa em que se forma o pré-rRNA 5.8S + 30 (Fromm et al., 2017).

Recentemente, esta etapa do processamento foi reconstituída *in vitro* incubando-se o exossomo e cofatores com partículas pré-ribossomais copurificadas com Nop53, permitindo que a estrutura do exossomo associado ao pré-60S contendo 5.8S+30 fosse obtida com alta resolução por crio-EM (Fig. 14B) (Schuller et al., 2018). Apesar de Nop53 ter sido usado como isca na coimunoprecipitação, ele não foi identificado na estrutura obtida, sugerindo ligação flexível ou pouco estável. De modo geral, tanto o exossomo quanto o pré-60S sofrem alterações estruturais durante o processamento do 7S (Kummer e Ban, 2018). Do ITS2-*foot* original restam apenas 30nt e Nop7, interagindo com o C-terminal de Rrp47. A estrutura do pré-60S se assemelha à da partícula Nog2, exceto pelo L1-stalk que é trazido 30° em direção à CP pela ação de Mtr4, que em sua conformação estendida interage diretamente com os domínios I e V do rRNA 25S, incluindo a base do L1-stalk (Fig. 14B). Mpp6 auxilia na ancoragem de Mtr4 ao core do exossomo, como previamente indicado (Falk et al., 2017a; Wasmuth et al., 2017). Nesta condição, o exossomo assume uma estrutura aberta, com Rrp6 deslocada do topo do *cap*, assumindo uma posição lateral e mais flexível, ligada ao core pelo C-terminal (Fig. 14C) (Schuller et al., 2018).

Por um mecanismo ainda não conhecido, os últimos 30 nt do ITS2, que não conseguem ser processados por Rrp44 por impedimento estérico à progressão de Mtr4, saem do core do

exossomo e a extremidade 3'-OH é conduzida ao sítio catalítico de Rrp6 (Briggs et al., 1998). Especula-se que nesta condição, haja um grande remodelamento do exossomo, com o retorno de Rrp6 para cima do core e o deslocamento de Mtr4, que pode ou não ser assistido por algum fator adicional (Lingaraju et al., 2019; Kummer e Ban, 2018). A atividade exonucleolítica distributiva de Rrp6 resulta no pré-rRNA 6S que possui 8 nt remanescentes, alvo de clivagens por Rex1, Rex2, Rex3 e Ngl2 no citoplasma (Faber et al., 2002; Thomson e Tollervey, 2010). É interessante notar que os fatores de exportação nuclear Mex67-Mtr2, como demonstrado por CRAC e por reconstituição *in vitro*, se ligam à extremidade 3' do 5.8S, ocupando o espaço antes preenchido pela Mtr4, podendo proteger tal extremidade até o citoplasma (Fromm et al., 2017; Sarkar et al., 2016; Tuck e Tollervey, 2013).

O processamento do 7S, completo ou parcial, mostrou-se não ser pré-requisito para a exportação nuclear do pré-60S, que envolve mecanismos complementares e redundantes (seção 1.5.2). Consistente com isto, as cepas de levedura $\Delta rrp6$ e $\Delta ngl2$ são viáveis, e os pré-rRNAs 5.8S+30 e 6S podem ser encontrados em polissomos (Briggs et al., 1998; Faber et al., 2002). A implicação da presença destes pré-rRNAs na tradução ainda é pouco conhecida, devendo-se notar que $\Delta rrp6$, apesar de viável, apresenta fenótipo de crescimento termosensível e meiose defectiva (Briggs et al., 1998; Lardenois et al., 2011). Diferentemente do 5.8S+30, a retenção de 7S ou 27SB nos mutantes pontuais de *las1*, *nop53* e *mtr4* tem uma consequência estrutural maior, levando à retenção da estrutura completa do ITS2-*foot* em partículas pré-ribossomais nucleares tardias. Nestas condições, os fatores de montagem Cic1, Nop15, Rlp7, Nop7 e Nop53 que compõem o ITS2-*foot* são transportados para o citoplasma e encontrados em subunidades ribossomais 60S participando de ciclos defectivos de tradução (Rodríguez-Galán et al., 2015; Sarkar et al., 2017; Biedka et al., 2018). A presença do ITS2-*foot* na superfície exposta ao solvente aparentemente não afeta eventos de maturação citoplasmáticos, nem impede a formação de partículas 80S, como observado por crio-EM em partículas 80S copurificadas com Nop53 na ausência de Las1, nas quais, além da presença do ITS2-*foot*, o 5S RNP está corretamente rotacionado e o *P-stalk* formado. Estas subunidades 60S defectivas, entretanto, desencadeiam estresse traducional, provavelmente por favorecer a colisão de ribossomos nos polissomos ou por alterar a liberdade conformacional do segmento de expansão ES27, sendo alvos do sistema de controle de qualidade RQC, com participação do exossomo e complexo Ski (Sarkar et al., 2017).

De fato, praticamente todos os fatores envolvidos na formação do 5.8S+30 (como Las1, Rrp44, o *core* e o *cap* do exossomo (Exo9), Mtr4 e Nop53) são essenciais em levedura. A remoção do ITS2-*foot* além de necessária para a eficácia do ciclo de tradução, têm implicações estruturais na partícula 60S. A dissociação de Nop7 por exemplo, leva ao reposicionamento do

ES19 próximo ao 5.8S (Wu et al., 2016; Konikkat e Woolford, 2017). Uma vez que a estrutura obtida por crio-EM do 80S na ausência de Las1 é de média resolução, pouco se sabe de deformações estruturais mais sutis que uma subunidade 60S formada sem a desmontagem do *ITS2-foot* pode apresentar, incluindo deslocamento de hélices, má formação do PET ou desestabilização de sítios de ligação. A própria causa do estresse traducional observado na presença de tais partículas permanece especulativa, e ainda não elucidada.

O processamento do *ITS2-foot* ocorre em uma etapa muito específica da maturação do 60S (entre a partícula Nog2 e a Rix1-Rea1), estando possivelmente coordenado com outros eventos de maturação (como do PET e PTC). Assim como esta coordenação permanece elusiva, não se sabe, por exemplo, o momento em que o exossomo é recrutado. A falta de detalhes estruturais do início da atividade do exossomo no ITS2 implica também na falta de detalhes sobre o papel que Nop53 exerce neste processo, além do recrutamento de Mtr4, uma vez que Granato *et al.* (2008) mostraram que Nop53 interage diretamente com a subunidade catalítica do exossomo Rrp6.

1.8 Fator de montagem Nop53: conectando o exossomo ao pré-60S

Nop53 é uma proteína de 52,57 kDa (455 aa) nuclear (Fig. 15), predominantemente nucleolar, conservada, que foi inicialmente descrita em *S. cerevisiae* como um fator de montagem do pré-60S essencial para a viabilidade celular. Sua depleção altera o perfil de polissomos, diminuindo a formação de subunidades ribossomais 60S maduras, além de afetar o processamento do rRNA, levando ao acúmulo de pré-rRNAs 7S e 27S (Sydorsky et al., 2005; Granato et al., 2005; Thomson e Tollervey, 2005). Seu papel como adaptador responsável por recrutar o exossomo via Mtr4 foi recentemente descrito (Fig. 15B) (Thoms et al., 2015), explicando parcialmente o fenótipo observado com sua depleção. Na primeira parte deste trabalho, nós aprofundamos a caracterização da relação de Nop53 com o exossomo, revelando novas interações além de Mtr4 e Rrp6. Avaliando o impacto da depleção de Nop53 no interactoma de Rrp6, nós mostramos que a associação do exossomo com partículas pré-ribossomais ocorre desde estágios nucleolares mais iniciais, inclusive com o 90S (Cepeda et al., 2019), o que foi apenas recentemente confirmado por crio-EM (Du et al., 2020; Lau et al., 2021).

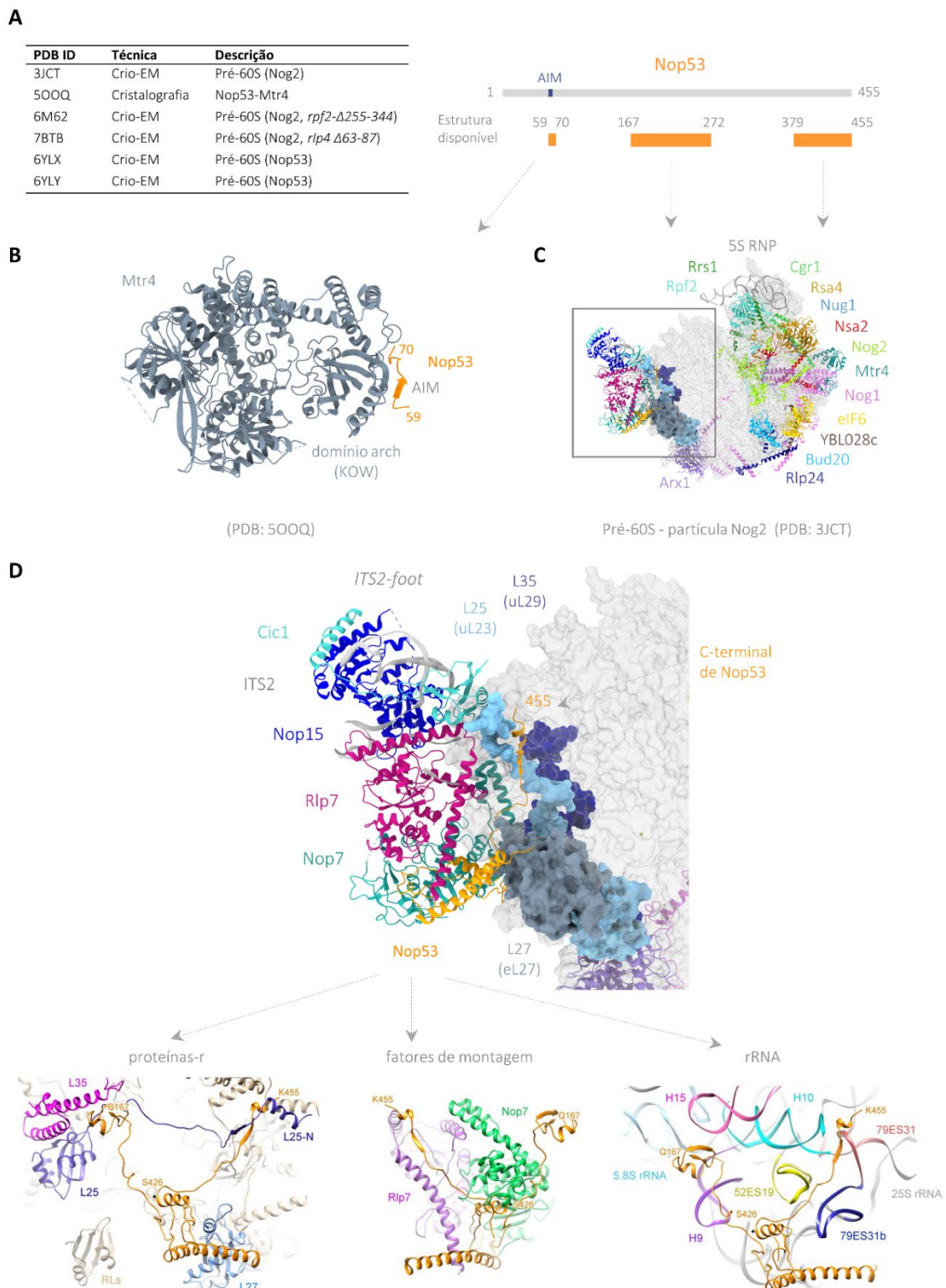


Figura 15. Estrutura e interações de Nop53. (A) À esquerda, tabela com todos PDB IDs em que Nop53 já foi identificada. À direita, esquema da proteína Nop53 (455 aa), destacando na extremidade N-terminal a posição do motivo AIM (*arch interacting motif* - entre os aa 60-64) de interação com a RNA helicase Mtr4. Abaixo, as regiões de Nop53, cuja estrutura já foi resolvida (~40%). (B) Interação de Nop53 com o domínio *arch* de Mtr4, importante durante o recrutamento do exossomo ao pré-60S. (C) Partícula pré-60S Nog2 mostrando em cores todos os fatores de montagem. A posição de Nop53 na base do *ITS2-foot* é destacada, bem como as proteínas-r com as quais interage. (D) *ITS2-foot* da partícula Nog2, destacando as interações que Nop53 estabelece com os rRNAs (25S – domínios I e V, e 5.8S), proteínas-r (uL23, eL27, uL29) e fatores de montagem (Nop7 e Rlp7) (Adaptado de Wu et al., 2017). A maior parte de Nop53 não foi resolvida, tornando possível a existência de interações adicionais. Dados de XL-MS mostram, por exemplo, *crosslinks* entre Nop53 e as proteínas-r eL8, eL13 e eL22 (Wu et al., 2017).

A importância de Nop53 para a adequada maturação do 5.8S é altamente conservada, tendo sido também observada com o silenciamento do ortólogo humano GLTSCR2 (*glioma tumor suppressor candidate region gene 2*) levando ao acúmulo do pré-rRNA 32S (equivalente ao 27S de levedura) (Tafforeau et al., 2013); e com a mutação do ortólogo de *Arabidopsis thaliana* Smo4 (*small organ 4*), afetando tanto o processamento do pré-rRNA quanto o perfil de polissomos (Micol-Ponce et al., 2020; Zhang et al., 2015). Em humanos, GLTSCR2, também denominada PICT1 (*protein interacting with carboxyl terminus 1*), é uma proteína nucleolar codificada por um gene localizado no cromossomo 19q em uma região supressora de tumor frequentemente perdida em certos quadros de neoplasia, com destaque para gliomas (Smith et al., 2000). Diversos estudos associam GLTSCR2 ao desenvolvimento de diferentes tumores, sendo inclusive apontada como um fator de prognóstico (Yoshimoto et al., 2018; Okamura et al., 2014; Uchi et al., 2013; Moon et al., 2013; Ishibashi et al., 2013; Kim et al., 2012, 2008). GLTSCR2 é essencial para sobrevivência e proliferação em células tronco, assim como para a embriogênese, sendo camundongos knock-out (GLTSCR2^{-/-}) não viáveis (Sasaki et al., 2011). Está associada ao estresse nucleolar, indiretamente afetando a estabilidade do supressor de tumor p53, ao regular os níveis de 5S RNP na fração nucleoplasmática (Sasaki et al., 2011; Suzuki et al., 2012; Sloan et al., 2013), além de estabilizar e interagir com o supressor de tumor PTEN (Okahara et al., 2004, 2006; Yim et al., 2007) e apresentar um papel na resposta à infecção viral (Wang et al., 2016; Li et al., 2017). Estudos recentes têm caracterizado ortólogos de Nop53 em outros organismos, como o fungo patogênico fitotóxico *Botrytis cinerea*, demonstrando, neste organismo, sua importância para o crescimento vegetativo e patogenicidade (Cao et al., 2018). Apesar dos avanços na caracterização funcional de muitos de seus ortólogos, mecanismos detalhados de sua participação na biogênese ribossomal são muito mais bem conhecidos em *S. cerevisiae*, único organismo até o momento no qual sua estrutura foi revelada.

O sítio de ligação de Nop53 ao pré-60S, descrito por CRAC e crio-EM, encontra-se próximo à extremidade 3' do 5.8S, na base do *ITS2-foot*, onde se sobrepõe ao de Erb1 (Thoms et al., 2015; Wu et al., 2016). Na transição nucléolo-nucleoplasma entre o estado E e a partícula Nog2, a dissociação de Erb1 permite o recrutamento de Nop53 (Kater et al., 2017, 2020). O fato de tanto 27S quanto 7S serem coimunoprecipitados com Nop53 (Granato et al., 2005; Ohmayer et al., 2013), indica que seu recrutamento antecede a atividade endonucleolítica de Las1, a qual depende da formação da partícula Nog2. Foi na partícula pré-ribossomal copurificada com Nog2 e analisada por crio-EM que a estrutura de Nop53 foi pela primeira vez obtida (Wu et al., 2016). Por modelagem *ab initio* guiada por XL-MS (Wu et al., 2017), cerca de 40% da estrutura de Nop53 (aa. 167-272 e 379-455) pôde ser resolvida (Fig. 15A), revelando uma topologia tetraédrica com múltiplos pontos de interação, incluindo os Domínios I e V do rRNA 25S (Figs. 15 C-D). Apesar

da falta de detalhes estruturais sobre sua região N-terminal, verifica-se o importante papel da extremidade C-terminal de Nop53 na sua ancoragem ao pré-60S. Longas extensões intrinsecamente desordenadas contribuem para interações proteína-proteína a longa distância. De fato, na partícula Nog2, dentre todos os fatores que compõem o *ITS2-foot*, Nop53 interage com o maior número de proteínas diferentes (Nop7, Rlp7, eL8, uL29 e uL23) (Wu et al., 2016, 2017). Essa observação levou à hipótese de que Nop53 também poderia ter um papel estrutural, possivelmente como um *scaffold* capaz de conectar diferentes regiões do pré-60S (Wu et al., 2017). Na segunda parte deste trabalho, nós aprofundamos a caracterização do interactoma e do papel de Nop53 na biogênese ribossomal, avaliando o efeito de sua depleção na composição de intermediários pré-60S desde o nucléolo ao citoplasma. Nós mostramos que Nop53 tem um importante papel na transição entre o estado E nucleolar e a partícula Nog2. Comparando o efeito da depleção de Nop53 com mutantes truncados incapazes de recrutar o exossomo, nós demonstramos diferentes impactos na formação da subunidade 60S, além da já descrita retenção do *ITS2-foot* em intermediários pré-60S tardios. Coletivamente, nossas observações nos permitiram propor um novo modelo (Bagatelli et al., 2021), segundo o qual além de recrutar e posicionar o exossomo para a remoção do *ITS2-foot*, Nop53 auxilia no remodelamento do rRNA 25S (Domínio V), essencial para a progressão nucléolo-nucleoplasma da maturação do pré-60S.

2. OBJETIVOS

Caracterização funcional da proteína Nop53 em *S. cerevisiae*: avaliando o impacto de sua interação com o exossomo nuclear; buscando por potenciais mecanismos regulatórios de sua função; e explorando em detalhes seu papel na biogênese da subunidade ribossomal 60S.

2.1 Objetivos Específicos

Nop53 e o exossomo

- Avaliação da interação de Nop53 com outros componentes do exossomo.
- Caracterização do impacto da depleção de Nop53 no interactoma, localização subcelular e perfil de sedimentação da subunidade catalítica do exossomo Rrp6.

Regulação funcional de Nop53

- Busca por resíduos de aminoácido de Nop53 conservados e alvos de modificação pós-traducional para caracterização funcional por mutação sítio-dirigida.
- Análise do perfil de sedimentação de Nop53 e avaliação de sua participação na composição de subcomplexos.
- Caracterização do interactoma de Nop53. Avaliação dos fatores de montagem mais enriquecidos e de proteínas associadas a outros processos biológicos que possam modular sua função.

Nop53 e a montagem da subunidade 60S

- Caracterização do efeito da depleção de Nop53 na composição de partículas pré-ribossomais, avaliando estágios anteriores e posteriores ao seu recrutamento.
- Avaliação do efeito da depleção de Nop53 na localização subcelular de fatores de montagem ribossomais.
- Comparação dos dados obtidos da análise proteômica com estudos prévios caracterizando mutantes que bloqueiam o processamento do ITS2.
- Análise e interpretação dos dados de proteômica com base na estrutura de todas as partículas pré-60S disponíveis no PDB.
- Construção de mutantes de deleção N- e C-terminal de Nop53 para caracterizar a contribuição de diferentes extensões de Nop53 no processamento do pré-rRNA e na maturação do pré-60S.
- Comparação do efeito da depleção de Nop53 com o de mutantes de Nop53, desprovidos da região de interação com o exossomo, na maturação do pré-60S.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Técnicas de Clonagem Molecular

Os plasmídeos usados neste estudo estão listados na Tabela 1. Para sua obtenção, foram empregados métodos padronizados de biologia molecular (Sambrook e Russell, 2001). Duas técnicas de clonagem molecular foram usadas: [1] baseada na ligação de fragmentos clivados por enzimas de restrição; [2] baseada na recombinação de sequências homólogas.

[1]: sequências de interesse amplificadas por PCR usando oligonucleotídeos contendo sítios de enzimas restrição foram clonadas em vetor pGEM-T easy (Promega). Clones com inserção correta foram checados por sequenciamento. Após clivagem do vetor de interesse e da sequência inserida no pGEM-T easy pelas mesmas enzimas de restrição, os fragmentos de clivagem, separados e purificados de gel de agarose, foram ligados com T4 DNA ligase (Thermo Fisher). A subclonagem foi então checada por clivagem com enzimas de restrição.

[2]: sequências de interesse amplificadas por PCR contêm nas extremidades 5' e 3' 15nt de homologia com o sítio de inserção no vetor de interesse, que foi previamente linearizado por PCR ou clivagem com enzima(s) de restrição. As inserções por recombinação homóloga foram realizadas utilizando o InFusion HD Cloning kit (Takara) e os clones foram checados e selecionados com base no sequenciamento.

Tabela 1. Lista de plasmídeos usados neste estudo

Plasmídeo	Características	Fonte
ptet-OFF-GFP-NOP53	pCM188, (<i>tetO</i>) ₂ -CYC1-yEGFP-NOP53, CMV-tTA, URA3, Amp ^R , CEN4	Este estudo
pGAL1-ProtA-NOP53	YCplac33, GAL1-ProtA-NOP53, URA3, Amp ^R , CEN4	(Granato et al., 2005)
pGAL1-His-NOP53	YCplac111, GAL1-6xHis-NOP53, LEU2, Amp ^R , CEN4	(Granato et al., 2005)
pMET-GFP-NOP53 ^(FL)	pUG34, MET25-yEGFP-NOP53 FL, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP(-)	pUG34, MET25-yEGFP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ^{Δ1-26}	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ^{Δ1-26} , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ^{Δ1-47}	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ^{Δ1-47} , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ^{Δ1-71}	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ^{Δ1-71} , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ^{Δ48-98}	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ^{Δ48-98} , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ¹⁻¹⁵⁷	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ¹⁻¹⁵⁷ , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ¹⁻²³⁰	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ¹⁻²³⁰ , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ¹⁻³⁰⁰	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ¹⁻³⁰⁰ , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-nop53 ¹⁻³⁸⁰	pUG34, MET25-yEGFP-nop53 ¹⁻³⁸⁰ , HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-GFP-RRP6	pUG34, MET25-yEGFP-RRP6, HIS3, Amp ^R , CEN6	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
pTAP-NOP53	pMET, MET25-TAP-NOP53, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo
pMET-NOP7-TAP	pMET, MET25-NOP7-TAP, HIS3, Amp ^R , CEN6	Este estudo

pMET-NMD3-TAP	pMET, <i>MET25-NMD3-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-RSA4-TAP	pMET, <i>MET25-RSA4-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-ARX1-TAP	pMET, <i>MET25-ARX1-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-ERB1-TAP	pMET, <i>MET25-ERB1-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-YVH1-TAP	pMET, <i>MET25-YVH1-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-LSG1-TAP	pMET, <i>MET25-LSG1-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-MRT4-TAP	pMET, <i>MET25-MRT4-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pMET-TAP	pMET, <i>MET25-TAP</i> , <i>HIS3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
YCplac111- YVH1-TAP	YCplac111, <i>MET25-YVH1-TAP</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN4</i>	Este estudo
YCplac111- NOP7-TAP	YCplac111, <i>MET25-NOP7-TAP</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN4</i>	Este estudo
YCplac111- RFP-NOP1	YCplac111, <i>MET25-DsRed-NOP1</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN4</i>	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
pMET-RFP-NOP1	pUG36, <i>MET25-DsRed-NOP1</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	(Goldfeder e Oliveira, 2010)
pET28a	pET-28a, <i>Kan^R</i>	Novagen
pET28a-NOP53	pET-28a, <i>6xHis-NOP53</i> , <i>Kan^R</i>	(Granato et al., 2008)
pGEX-4T-1	pGEX-4T-1, <i>GST</i> , <i>Amp^R</i>	GE Healthcare
pGEX-4T-1-MPP6	pGEX-4T-1, <i>GST-Mpp6</i> , <i>Amp^R</i>	Este estudo
pGEX-4T-1-RRP44	pGEX-4T-1, <i>GST-Rrp44</i> , <i>Amp^R</i>	Este estudo
pGBKT7-BD	pGBKT7, <i>ADH1-GAL4 (BD)</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan^R</i> , <i>2μ</i>	Clontech (Takara)
pGADT7-AD	pGADT7, <i>ADH1-GAL4 (AD)</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp^R</i> , <i>2μ</i>	Clontech (Takara)
pGBKT7- p53	pGBKT7, <i>ADH1-GAL4 (BD)-p53</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan^R</i> , <i>2μ</i>	Clontech (Takara)
pGBKT7- Lam	pGBKT7, <i>ADH1-GAL4 (BD)-Lamin C</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan^R</i> , <i>2μ</i>	Clontech (Takara)
pGADT7-T	pGADT7, <i>ADH1-GAL4 (AD)-T(SV40)</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp^R</i> , <i>2μ</i>	Clontech (Takara)
pGADT7-NOP53	pGADT7, <i>ADH1-GAL4 (AD)-NOP53</i> , <i>LEU2</i> , <i>Amp^R</i> , <i>2μ</i>	Este estudo
pGBKT7-YRA1	pGBKT7, <i>ADH1-GAL4 (BD)-YRA1</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan^R</i> , <i>2μ</i>	Este estudo
pGBKT7-HAS1	pGBKT7, <i>ADH1-GAL4 (BD)-HAS1</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan^R</i> , <i>2μ</i>	Este estudo
pGBKT7-MPP6	pGBKT7, <i>ADH1-GAL4 (BD)-MPP6</i> , <i>TRP1</i> , <i>Kan^R</i> , <i>2μ</i>	Este estudo
pGEMT-easy	pGEMT-easy, <i>lacZ</i> , <i>Amp^R</i>	Promega
pGAL1-MS2-ITS2	pUG36, <i>GAL1-6XMS2-ITS2</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^R</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo

3.1.1 Construção de plasmídeos

A ORF NOP53 foi inserida nos vetores: pCM188 (Euroscarf, aqui denominado ptet-OFF), pMET25-TAP-N-terminal (aqui denominado pTAP), pUG34 (aqui denominado pMET25-GFP) e pGADT7 (Takara). Para a obtenção do plasmídeo ptet-OFF-GFP-NOP53, a fusão GFP-NOP53 foi amplificada a partir do plasmídeo YCplac111-GFP-NOP53 (Cepeda, *não publicado*), previamente construído pela ligação da ORF NOP53 em vetor YCplac111-GFP (Gonzales-Zubiate et al., 2017). O produto de PCR flanqueado nas extremidades 5' e 3' por 15nt de homologia à região de inserção no pCM188 (Euroscarf) foi inserido neste vetor previamente linearizado com BamHI. A clonagem foi realizada por recombinação homóloga. Para a obtenção de pTAP-NOP53, a ORF NOP53 flanqueada pelos sítios de restrição de NdeI e Sall foi amplificada a partir do plasmídeo YCplac111-GAL1-His-NOP53 (Granato et al., 2005). O fragmento NOP53

(NdeI–Sall) foi subclonado no vetor pTAP previamente linearizado com a remoção da ORF CWC24 (NdeI–Sall).

O plasmídeo pMET25-GFP-NOP53 (*full length*) foi obtido pela amplificação de NOP53 a partir de DNA genômico de cepa WT com oligonucleotídeos flanqueados por sítios de BamHI e Sall. O fragmento NOP53 (BamHI–Sall) foi inserido no vetor pUG34 linearizado com BamHI e Sall. A mesma abordagem foi utilizada para a clonagem dos mutantes truncados na extremidade C-terminal *nop53* (1-157, 1-230, 1-300, 1-380). A clonagem dos mutantes truncados na extremidade N-terminal de *nop53* (Δ 1-26, Δ 1-47, Δ 48-98, Δ 1-71) e dos mutantes pontuais *nop53* (S31A, S403A) no vetor pUG34, previamente clivado com BamHI e Sall, foi realizada por recombinação homóloga.

Para os ensaios de duplo híbrido, utilizou-se o plasmídeo pGADT7-NOP53, construído pela inserção do fragmento NOP53 (NdeI–XhoI), obtido do plasmídeo pTAP-NOP53, no vetor pGADT7 AD (Takara) clivado com as mesmas enzimas de restrição. Neste ensaio foram usados também os plasmídeos pGBKT7-MPP6, pGBKT7-YRA1 e pGBKT7-HAS1, obtidos por inserção de fragmentos (SmaI–NotI) contendo as referidas ORFs e obtidos respectivamente de pGEX-4T-1-MPP6, pGEX-4T-1-YRA1 e pGEX-4T-1-HAS1, em vetor pGBKT7 BD (Takara) clivado com as mesmas enzimas de restrição.

Para os ensaios de *pull down*, foram construídos os plasmídeos pGEX-4T-1-MPP6 e pGEX-4T-1-RRP44. As respectivas ORFs foram amplificadas a partir de DNA genômico e clonadas por recombinação homóloga em vetor pGEX-4T-1 (GE Healthcare) previamente clivado com Sall.

Os plasmídeos pMET-NOP7-TAP, pMET-NMD3-TAP, pMET-ARX1-TAP, pMET-RSA4-TAP, pMET-ERB1-TAP, pMET-YVH1-TAP, pMET-LSG1-TAP e pMET-MRT4-TAP foram construídos pela amplificação das respectivas ORFs sem códon de parada, a partir de DNA genômico de cepa WT, e inserção por recombinação homóloga no vetor pMET-TAP(C-terminal) resultante da clivagem de pMET-CWC24-TAP (Perona et al., *não publicado*) com BamHI e NcoI. O plasmídeo YCplac111- NOP7-TAP foi obtido pela ligação do fragmento (PvuII–PvuII) de pMET-NOP7-TAP contendo [promotor-ORF-NOP7-terminador] com o fragmento (PvuII–PvuII) de YCplac111-GFP-RRP6 (Gonzales-Zubiate et al., 2017) sem [promotor-GFP-RRP6-terminador]. YCplac111-YVH1-TAP foi construído pela inserção do fragmento YVH1 (BamHI–NcoI), obtido de pMET-YVH1-TAP, no vetor YCplac111- NOP7-TAP clivado com as mesmas enzimas, liberando NOP7(BamHI–NcoI).

Para a reação de sequenciamento de Sanger usada como marcador no ensaio de SHAPE *in vivo*, utilizou-se o plasmídeo pGAL1-MS2-ITS2 construído por recombinação homóloga a partir do vetor pUG36 clivado com SacI e XhoI com inserção de três fragmentos nesta ordem: promotor GAL1 amplificado de YCplac33-GAL1-ProtA-NOP53 (Granato et al., 2005); sequência com 6x

MS2 amplificada do plasmídeo pSL-MS2-6X (Addgene); e parte da sequência do ITS2 amplificada de DNA genômico de cepa WT.

3.1.2 PCR, análise e purificação de fragmentos de DNA

Reações de PCR foram realizadas a partir de 1.5ng de DNA plasmidial ou 500ng de DNA genômico. Utilizou-se a Platinum *Taq* DNA polimerase HiFi (Invitrogen) para sequências clonadas em vetor pGEMT-esay (Promega), a CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara) para sequências clonadas com o sistema InFusion HD Cloning (Takara), e a Phusion High-Fidelity DNA polimerase (Thermo Fisher) para sequências integradas no genoma. Os oligonucleotídeos usados para clonagem e sequenciamento encontram-se listados na Tabela 2. O número de ciclos e o tempo e temperatura das etapas de desnaturação e extensão foram definidos de acordo com o fabricante. Para a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, adotou-se 4°C abaixo da T_m (*melting temperature*) - calculada com o T_m *calculator* disponível no site da Thermo Fisher.

Produtos de PCR, vetores linearizados, e fragmentos de clivagem por enzimas de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0-1,5% (40 mM Tris-acetato pH 8,5; 2 mM EDTA) com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo à voltagem de 80-100V. Após excisão de bandas, o DNA foi purificado com QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com protocolo do fabricante, e quantificado em equipamento NanoDrop (Thermo Fisher).

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos usados para clonagens e sequenciamento de DNA plasmidial.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' - 3'	Fonte
GFP_IF For	CGGATCAATTCGGGGGATCCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGG	Este estudo
Nop53_IF Rev	AGGCCTGTTTAAACGGATCCCTATTTGAAGTCCTTATGTGTCCACTTTTCAG	Este estudo
Nop53 NdeIFor	CATATGGCTCCAATAATCTAACCAAG	Este estudo
Nop53 SallRev	GTGACCTATTTGAAGTCCTTATGTGTCC	Este estudo
Nop53 ForBamHI	GGATCCATGGCTCCAATAATCTAAC	(Cepeda et al., 2019)
Nop53 157 RevSall	GTGACTATAAGTCGCCAGCCGTTGTTTTAAC	(Cepeda et al., 2019)
Nop53 230 RevSall	GTGACTAGTTGGGATTGTAGGATTTACC	(Cepeda et al., 2019)
Nop53 300 RevSall	GTGACTAACTACATTGCGTACTTTTCATTTTC	(Cepeda et al., 2019)
Nop53 380 RevSall	GTGACTATTTCTTATTTTCTTGCTTTTTTTAACC	(Cepeda et al., 2019)
IF_Nop53_Δ26_ForBamHI	TAGAACTAGTGGATCCAATATCGATTTATCTGACGTAGAACAATATATG	Este estudo
IF_Nop53_Δ47_ForBamHI	TAGAACTAGTGGATCCGGTACCAGTGATATAACCTCTTTGC	Este estudo
IF_Nop53_Δ71_ForBamHI	TAGAACTAGTGGATCCAAAAATAAATTAATAAAAGGAAACAAATTAAGAAGG	Este estudo
Nop53_Δ48-98_REV	ATGCGTAATTTTCATGATCAATTTTCTTTTCC	Este estudo
Nop53_Δ48-98_FOR	CATGAAATTACGCATTCAAAAATTGCAGCACTAAATCACC	Este estudo
IF_NOP53RevSall	ATGACTCGAGGTCGACCTATTTGAAGTCCTTATGTGTC	Este estudo
IF_NOP53ForBamHI	TAGAACTAGTGGATCCATGGCTCCAATAATCTAAC	Este estudo
Nop53_Formut31	CTGACGTAGAACAATATATGG	Este estudo
Nop53_Revmut31	ATATTGTTCTACGTCAGCTAAATCGATATTTTTC	Este estudo

Nop53_Formut403	CTGACTCATTGAGAAAACCTG	Este estudo
Nop53_Revmut403	GTTTTCTCAATGAGTCAGCTAATTCGTCAGAAA	Este estudo
Mpp6_IF FOR	GAATTCCTCCGGGTCGAATGAGTGCTAACAAATGGTGTCCAC	Este estudo
Mpp6_IF REV	GGCCGCTCGAGTCGACTACTTTTTGAATTTCTATTTTTATTTTTAC	Este estudo
Rrp44_IF FOR	GAATTCCTCCGGGTCGAATGTCAGTTCCTCCGCTATCGC	Este estudo
Rrp44_IF REV	GGCCGCTCGAGTCGACTATTTTAAACAATAATTCTGCCTTACGC	Este estudo
Nop7_IF FOR	TAGAACTAGTGGATCCATGAGAATCAAGAAGAAAAACACC	Este estudo
Nop7_IF REV	ATCTTCTCTCCATGGTTTCTTGGAACTAGTTTATTTCAG	Este estudo
Nmd3_IF FOR	TAGAACTAGTGGATCCATGGAATTCACACCTATAGATCC	Este estudo
Nmd3_IF REV	ATCTTCTCTCCATGGCTGCTGAGATTCAACGGG	Este estudo
Rsa4_IF FOR	TAGAACTAGTGGATCCATGTCCACCCTGATTCTCTCC	Este estudo
Rsa4_IF REV	ATCTTCTCTCCATGGATGCGTCCACAATCTTACCATC	Este estudo
Arx1_IF FOR	TAGAACTAGTGGATCCATGGCTCTAGCTATCTCCAC	Este estudo
Arx1_IF REV	ATCTTCTCTCCATGGCATTTCATGGTTTCTTCAACTCC	Este estudo
Erb1 IF_For BamHI	TAGAACTAGTGGATCCATGATGGCTAAGAACAACAAAACCTACC	Este estudo
Erb1 IF_Rev NcoI	ATCTTCTCTCCATGGGGTGGTCCATAAGCGAGCC	Este estudo
Yvh1 IF_For BamHI	TAGAACTAGTGGATCCATGGCTGGAAATGCAAACCTCAGTAG	Este estudo
Yvh1 IF_Rev Sall	ATCTTCTCTCCATGGTCTATTTACTTTCTCGGATTCAAAATTAACCATG	Este estudo
Lsg1 IF_For BamHI	TAGAACTAGTGGATCCATGCCACCAAAAAGAAGCTCCCAAG	Este estudo
Lsg1 IF_Rev Sall	ATCTTCTCTCCATGGATTATTTTCAATGCTAAAACTTTGCTTTTCGC	Este estudo
Mrt4 IF_For BamHI	TAGAACTAGTGGATCCATGCCAAGATCAAACGTTCCAAG	Este estudo
Mrt4 IF_Rev Sall	ATCTTCTCTCCATGGTTCATGTTGATGTTAGTGCTTTCAAC	Este estudo
FOR-Nop7 1559	GCTCAAAAAGAGCTTGAATTGGAAGC	Este estudo
REV-Nop7 3'UTR	GAACAACAGTAACCACTTTTAAATGTACAGG	Este estudo
FOR-Nmd3 1412	GTTAACCTATACAAAACCGCGAAGC	Este estudo
REV-Nmd3 3'UTR	CAACATGTGGTGGCTTGTCTTCC	Este estudo
FOR-Arx1 1659	CCACAAGATTCAATTGTTCAAGGGATC	Este estudo
REV-Arx1 3'UTR	GGCGAAACAGGCGTGAGATATTTAATC	Este estudo
FOR-Mrt4 442	CATTGTCTACTCACGTGGTGGTC	Este estudo
REV-Mrt4 3'UTR	CGCTAAAGAGCTGTGAAGATCAAAAG	Este estudo
TAP_HIS_RRP6 For	AGGCCTGCCGCAAAGGTAAGAATCTGTCAATTTAAAGGAAGAGAAGATGGAAAAAGAATTC	Este estudo
TAP_HIS_RRP6 Rev	GAGAAAATGGTGTGCATGGGGGAGCCATAACTCCATGACACAGCTAGTACACTCTATATTTTTATGCC	Este estudo
Gal1_For_IF	GGGAACAAAAGCTGGAGCTCCGACAGGTTATCAGCAACAACAC	Este estudo
Gal1_Rev_IF	GAATAAGAAGTAATACAACTGAAAATGTTGAAAG	Este estudo
MS2_gal -For_IF	TATTACTTCTTATTCGTAATTATAACCCGGGCCCTATATATGG	Este estudo
MS2_Rev- ITS2-long_IF	GTTGTTGAAAGTTTTGATATCGATCGCGCGCAGATC	Este estudo
ITS2long_For_IF	AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG	Este estudo
ITS2long_Rev-END_IF	AATTACATGACTCGAGCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTC	Este estudo
Usados apenas para sequenciamento:		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Promega
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	Promega
M13/pUC For	CCCAGTCACGACGTTGTAACAACG	Invitrogen
M13/pUC Rev	AGCGGATAACAATTCACACAGG	Invitrogen
GFP(S65T) rev	GAAAGTAGTGACAAGTGTGGCCATGG	Este estudo
Erb1 453pb For	GATAGCGATGATAGTGATGCC	Este estudo
Erb1 2153pb For	GCTAGCACACCTTACAAGAC	Este estudo

Erb1 1542pb Rev	CGTAGCCGAATATTGGTGG	Este estudo
Erb1 1965pb Rev	CTGACATATCTTTGGGAACAGAC	Este estudo
Yvh1 739pb For	GGCGTTATCTACATCTTTCATCG	Este estudo
Lsg1 1547pb For	CACCTTACACTAGAGAAGAGTG	Este estudo
Lsg1 1487pb Rev	CGGAGGGTTGACATACAGT	Este estudo
Lsg1 474pb For	GATAGGCAAGAAAAGGAAGCG	Este estudo
Nop7 For693	CGTCCTATATAAGTTATACACCGA	Este estudo
Arx1 For656	CAGGCCAATTGATTAGAACTATAG	Este estudo
Nmd3 For365	CCATGACAAATACTATTATTCAGCA	Este estudo
Rrp44 For2531	CACCTATTAGACGTTACTGTGAT	Este estudo
TEVsite_rev	ACCCTGAAAATACAAATTCTCGC	Este estudo

3.1.3 Mutação sítio-dirigida

Para a mutação sítio-dirigida de NOP53, empregou-se o sistema InFusion HD Cloning (Takara). A sequência de NOP53 foi amplificada por PCR em dois fragmentos complementares com 15nt de homologia entre si. A mutação pontual foi introduzida por substituição de nucleotídeos em um dos oligonucleotídeos. Os dois fragmentos foram inseridos simultaneamente por recombinação homóloga no vetor plasmidial linearizado.

3.1.4 Manipulação, cultura e transformação de cepas de *E. coli*

As cepas de *E. coli* usadas para clonagem e estoque de plasmídeos estão listadas na Tabela 3. Foram mantidas e cultivadas em meio LB (1,0% tripton; 0,5% extrato de levedura; 1,0% NaCl; meio sólido: 2% ágar) a 37°C e estocadas em 25% glicerol a -80°C. Células DH5α quimicamente competentes, preparadas de acordo com Sambrook e Russell (2001), foram usadas para transformação por choque térmico. 1-10ng de DNA plasmidial ou cerca de 400ng de DNA da reação de ligação foram adicionados a 50µl da suspensão de células DH5α. Após adição de 80µl de tampão de transformação (100mM KCl, 30mM CaCl₂, 50mM MgCl₂, 7% PEG) e incubação no gelo por 30min, as células foram submetidas à choque térmico à temperatura ambiente por 10min. Após adição de 1ml de LB e incubação por 30min a 37°C, as células foram plaqueadas em meio LB seletivo. As células Stellar (Clontech) competentes também foram transformadas por choque térmico (45s a 42°C), seguindo protocolo do fabricante. As cepas transformadas foram cultivadas e mantidas em meio LB suplementado com antibiótico (ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, cloranfenicol 50 µg/ml) de acordo com o gene de resistência presente no plasmídeo.

Tabela 3. Lista de cepas de *E. coli* usadas para clonagem molecular

Cepa	Genótipo	Fonte
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 LacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
Stellar Competent Cells	F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA-argF) U169, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ-	Clontech (Takara)

3.1.5 Reação de sequenciamento de plasmídeos

Plasmídeos previamente purificados com kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) foram analisados por sequenciamento pelo método de Sanger usando o kit BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acordo com protocolo do fabricante. 200 a 600ng de DNA plasmidial e 2.5 pmol de oligonucleotídeo são adicionados à cada reação realizada em tubos de 0,2ml ($V_f = 15\mu\text{l}$). Após desnaturação a 96°C por 2min e 35 ciclos de (96°C por 45s; 50°C por 30s, 60°C por 4min), o DNA foi precipitado com adição de 23 μl de etanol absoluto gelado, 1 μl de solução 3M NaOAc (pH 5,2), 1 μg de glicogênio e incubação por 15min no gelo. Foi lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. As reações foram analisadas por eletroforese capilar em equipamento ABI 3130xl Genetic Analyzer (Serviço de Sequenciamento da Central Analítica IQ-USP) ou ABI 3730 DNA Analyzer (Serviço de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco IB-USP). Os cromatogramas e alinhamento de sequências foram analisados usando o software SnapGene (Insightful Science, LLC).

3.1.6 Extração e purificação de DNA plasmidial de *E. coli*

O DNA plasmidial de *E. coli* foi extraído usando kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante, ou através do seguinte protocolo de lise alcalina: partindo do inóculo de uma colônia isolada de *E. coli* em 2mL de meio LB seletivo, a cultura foi mantida a 37°C sob agitação por uma noite. As células foram coletadas por centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 100 μL de tampão GET (25mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 1% glicose). Após adição de 200 μL de solução de lise (1% SDS, 200 mM NaOH) e leve homogeneização, as células foram mantidas sem agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. 150 μL de NH_4OAc 7,5M foram adicionados, e misturados sem vigorosa agitação. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada novamente a 13000 rpm por 5 minutos. O DNA plasmidial do sobrenadante foi precipitado com adição de 500 μL de isopropanol e incubação por 10min à temperatura ambiente. Após centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm e lavagem com 500 μL de

etanol 70%, o pellet foi seco em bloco de aquecimento a 42°C por 5 min, e ressuspendido em 50-100 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1.0 mM EDTA pH 8,0).

3.2. Manipulação e cultura de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

A manutenção, crescimento e manipulação genética das culturas de levedura foram realizados de acordo com protocolos padronizados (Sherman et al., 1986; Guthrie e Fink, 2004). As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste estudo estão listadas na Tabela 4. Elas foram cultivadas a 30° C em meio mínimo (YNB) suplementado com 2% de glicose ou galactose conforme indicado, além dos aminoácidos e bases nitrogenadas necessários. Foram estocadas em 500µl de glicerol 30% estéril a -80°C.

3.2.1 Cepas de levedura *S. cerevisiae*

Tabela 4. Lista de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo

Cepa	Descrição	Fonte
<i>Δnop53</i>	haploide (n) derivada de BY4743 (2n); <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 MET15 nop53::kanMX4</i>	(Granato et al., 2005)
BY4741	haploide (n) derivada de BY4743 (2n); isogênica da cepa S288C: <i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>Δrrp6</i>	haploide (n) BY4742; <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rrp6::kanMX4</i>	Euroscarf
FBY083	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53	Este estudo
FBY033	<i>Δnop53</i> , pTAP-NOP53	Este estudo
FBY119	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-TAP	Este estudo
FBY124	<i>Δnop53 rrp6::RRP6-TAP HIS3</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53	Este estudo
FBY110	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP-RRP6	Este estudo
FBY109	<i>Δnop53</i> , pGAL1-His-NOP53, pMET-GFP-RRP6, pMET-RFP-NOP1	Este estudo
Y187	haploide (n), <i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, URA3::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ, MEL1</i>	Este estudo
Y2HGold	haploide (n), <i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3, GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2 URA3 :: MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA} AUR1-C MEL1</i>	Este estudo
FBY069	Y187, pGADT7-T	Clontech (Takara)
FBY071	Y2HGold, pGBKT7-p53	Clontech (Takara)
FBY072	Y2HGold, pGBKT7-Lam	Clontech (Takara)
FBY073	Y187, pGADT7-NOP53	Este estudo
FBY074	Y2HGold, pGBKT7-MPP6	Este estudo
FBY075	Y2HGold, pGBKT7-HAS1	Este estudo
FBY076	Y2HGold, pGBKT7-YRA1	Este estudo
FBY087	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP-NOP53 (FL)	Este estudo
FBY086	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP(-)	Este estudo
FBY130	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53Δ1-26</i>	Este estudo
FBY131	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53Δ1-47</i>	Este estudo
FBY133	<i>Δnop53</i> , ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53Δ1-71</i>	Este estudo

FBY132	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 48-98	Este estudo
FBY088	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> 1-157	Este estudo
FBY089	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> 1-230	Este estudo
FBY090	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> 1-300	Este estudo
FBY091	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> 1-380	Este estudo
FBY156	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP-NOP53(FL), YCplac111-YVH1-TAP	Este estudo
FBY157	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP(-), YCplac111-YVH1-TAP	Este estudo
FBY158	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 1-26, YCplac111-YVH1-TAP	Este estudo
FBY159	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 1-47, YCplac111-YVH1-TAP	Este estudo
FBY160	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 1-71, YCplac111-YVH1-TAP	Este estudo
FBY161	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 48-98, YCplac111- YVH1-TAP	Este estudo
FBY162	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP(-), YCplac111- NOP7-TAP	Este estudo
FBY163	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 1-71, YCplac111- NOP7-TAP	Este estudo
FBY164	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-GFP- <i>nop53</i> Δ 48-98, YCplac111- NOP7-TAP	Este estudo
FBY121	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-NOP7-TAP	Este estudo
FBY120	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-RSA4-TAP	Este estudo
FBY122	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-ARX1-TAP	Este estudo
FBY123	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-NMD3-TAP	Este estudo
FBY134	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-ERB1-TAP	Este estudo
FBY135	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-YVH1-TAP	Este estudo
FBY136	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-MRT4-TAP	Este estudo
FBY137	$\Delta nop53$, ptet-OFF-GFP-NOP53, pMET-LSG1-TAP	Este estudo
FBY007	$\Delta nop53$, pGAL1-ProtA-NOP53	(Granato et al., 2005)
FBY139	$\Delta nop53$ <i>nop7::NOP7-GFP HIS3</i> pGAL1-ProtA-NOP53 YCplac111- RFP-NOP1	Este estudo
FBY142	$\Delta nop53$ <i>arx1::ARX1-GFP HIS3</i> pGAL1-ProtA-NOP53 YCplac111- RFP-NOP1	Este estudo
FBY138	$\Delta nop53$ <i>nmd3::NMD3-GFP HIS3</i> pGAL1-ProtA-NOP53 YCplac111- RFP-NOP1	Este estudo
FBY141	$\Delta nop53$ <i>mrt4::MRT4-GFP HIS3</i> pGAL1-ProtA-NOP53 YCplac111- RFP-NOP1	Este estudo

3.2.2 Meios de cultura

Meios de cultura (Tabela 5) e soluções para leveduras foram preparados de acordo com Sherman *et al.* (1986).

Tabela 5. Composição dos meios de cultura de *Saccharomyces cerevisiae*

Meio de cultura	Composição
YPD (meio rico para levedura - glicose)	1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose (2% ágar para meio sólido)
YPDA (meio rico para levedura (glicose) - suplementado com adenina)	1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 0,003% adenina (2% ágar para meio sólido)

YNB Glu (meio mínimo para levedura - glicose)	0,7% YNB, 2% glicose, suplementado com bases nitrogenadas e aminoácidos necessários (2% ágar para meio sólido)	
YNB Gal (meio mínimo para levedura - galactose)	0,7% YNB, 2% galactose, suplementado com bases nitrogenadas e aminoácidos necessários (2% ágar para meio sólido)	
Bases nitrogenadas (concentração final)	adenina (20µg/ml)	uracila (20µg/ml)
Aminoácidos (concentração final)	histidina (20µg/ml),	arginina (20µg/ml),
	leucina (100µg/ml),	fenilalanina (50µg/ml),
	isoleucina (30µg/ml),	treonina (200µg/ml),
	lisina (30µg/ml),	tirosina (30µg/ml),
	triptofano (20µg/ml)	valina (150µg/ml)
	metionina (20µg/ml)	

3.2.3 Cepas de *S. cerevisiae* com expressão regulável de Nop53

Para a avaliação do efeito da depleção de Nop53, utilizaram-se neste trabalho dois sistemas de expressão regulável de Nop53. A maior parte das análises foram realizadas com a cepa mutante condicional, obtida neste estudo, $\Delta nop53/ptet\text{-OFF-GFP-NOP53}$, na qual Nop53 fusionada pela extremidade N-terminal à proteína GFP é regulada por promotor CYC1 com elementos de resposta a um ativador da transcrição (tTA) modulado por tetraciclina, o qual é codificado no mesmo plasmídeo. A expressão sob este promotor é reprimida na presença de doxiciclina. Esta cepa foi obtida pela transformação da cepa haploide $\Delta nop53/ YCplac111\text{-GAL1-6xHis-NOP53}$ com $ptet\text{-OFF-GFP-NOP53}$, e subsequente cura do plasmídeo $YCplac111\text{-GAL1-6xHis-NOP53}$ com confirmação em meio seletivo. Nos ensaios de depleção de Nop53, o pré-inoculo da cepa $\Delta nop53/ ptet\text{-OFF-GFP-NOP53}$ em 2ml de meio mínimo YNB Glu foi dividido em duas culturas de volume maior com a mesma composição de meio de cultura (YNB Glu), uma delas com e outra sem adição de doxiciclina (1,5µg/ml) a partir de solução concentrada 5mg/ml preparada no mesmo dia. As células foram cultivadas a 30°C a 160rpm por 18h, sendo coletadas conjuntamente a uma mesma OD_{600} (~1,0). Para os ensaios de microscopia de fluorescência, empregou-se a cepa mutante condicional $\Delta nop53/ pGAL1\text{-ProtA-NOP53}$, na qual Nop53 está fusionada pela extremidade N-terminal ao domínio ZZ da proteína A de *S. aureus* e é regulada por promotor GAL1, ou a cepa $\Delta nop53/ YCplac111\text{-GAL1-6xHis-NOP53}$, na qual Nop53 fusionada pela extremidade N-terminal a uma cauda de poli(histidina) também é regulada pelo promotor GAL1. Sendo o promotor GAL1 ativado na presença de galactose e reprimido na

presença de glicose (Lohr et al., 1995), o pré-inóculo destas cepas em 2ml de meio YNB Gal foi dividido em duas culturas de volume maior, uma em YNB Gal e outra em YNB Glu. As células foram cultivadas a 30°C por 18h e coletadas conjuntamente a uma mesma OD₆₀₀.

3.2.4 Transformação de *S. cerevisiae*

Para transformação de leveduras com DNA plasmidial, foram empregados dois protocolos: transformação rápida com LiOAc; e transformação de alta eficiência com LiOAc e carreador. Pelo protocolo de transformação rápida, células de 200 µL de cultura em fase estacionária foram coletadas por centrifugação a 6000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente, e lavadas com 200µL de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) estéril. Após ressuspender as células em 100 µL de solução de acetato de lítio estéril (0,2M LiOAc, 40% PEG₃₅₀₀, 100 mM DTT), adicionaram-se 2 a 5µg de DNA plasmidial, incubando-se a 42°C por 30 minutos. Após o choque térmico, o volume total foi plaqueado em meio mínimo seletivo incubando-se a 30°C até o aparecimento de colônias transformantes.

Para a transformação de alta eficiência, utilizou-se o módulo *Yeast Transformation System 2* do kit *Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System* (Takara) de acordo com protocolo do fabricante com pequenas modificações. As células de levedura foram cultivadas em meio mínimo YNB (Glu ou Gal) *drop out*, sendo coletado um volume de 20ml a OD₆₀₀ ~0,4-0,5 por centrifugação a 6000rpm por 5 min a temperatura ambiente. As células foram lavadas com H₂O, estéril e deionizada, e com solução 1.1X TE/LiOAc (11mM Tris-HCl pH 8,0, 1,1mM EDTA pH 8,0, 0,11M LiOAc). As células foram ressuspensas em 240µl de solução 1.1X TE/LiOAc e mantidas a temperatura ambiente. Em um tubo *ependorf* novo e estéril no gelo foram adicionados nesta ordem: 100ng de DNA plasmidial ou 5µg de produto de PCR purificado; 50µg de *Yeastmaker carrier DNA* (Takara) previamente desnaturado a 95°C por 5min; 50µl da suspensão de células de levedura em solução 1.1X TE/LiOAc; 500µl de solução PEG/LiOAc (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0, 0,1 M LiOAc, 40% PEG₃₃₅₀). Após incubação a 30°C por 30min, foram adicionados 20µl de DMSO antes do choque térmico a 42°C por 15 min. As células foram coletadas por *spin* de 15s em microcentrífuga e ressuspensas em 1,0ml de *YPD plus medium* (Takara). Após incubação a 30°C por 20min, as células foram coletadas por centrifugação a 6000 rpm 5min à temperatura ambiente, ressuspensas em 1mL de solução 0,9% NaCl e plaqueadas em mais de uma placa com meio seletivo, mantidas a 30°C até o aparecimento de colônias transformantes.

3.2.5 Integração genômica em *S. cerevisiae*

A integração genômica de *tags* foi realizada por recombinação homóloga a partir de produtos de PCR contendo nas extremidades 5' e 3' 40nts de homologia ao sítio de inserção. 5µg do produto de PCR amplificado com *Phusion High-Fidelity DNA polimerase* (Thermo Scientific) e purificado com kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) foram inseridos na cepa de interesse usando o protocolo de transformação de alta eficiência com LiOAc e carreador (seção 3.2.4). A cepa transformada com o produto de PCR foi plaqueada em meio seletivo. A inserção no genoma foi checada por PCR, usando como molde o DNA total extraído das colônias que cresceram em meio seletivo, e por sequenciamento (BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing). A inserção do TAP à extremidade C-terminal de RRP6 na cepa $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53 foi realizada com o produto de PCR, contendo o TAP *tag* e HIS3 como marca de seleção, obtido a partir do plasmídeo pMET-CWC24-TAP(C-terminal) como molde. Foram usados um oligonucleotídeo *forward* com homologia à extremidade 3' da ORF RRP6 sem o códon de parada, e um oligonucleotídeo *reverse* com homologia à 3'-UTR de RRP6. As cepas utilizadas para microscopia de fluorescência derivam de $\Delta nop53$ /pGAL1-ProtA-NOP53 e foram obtidas com a integração de GFP no genoma. Para tanto, utilizou-se o DNA genômico extraído de cepas específicas (doadas pelo Prof. Dr. Cleslei F. Zanelli, UNESP) da biblioteca *Yeast-GFP Clone Collection* (Huh et al., 2003), que possuem GFP integrado à extremidade C-terminal. O produto de PCR, contendo a fusão C-terminal com GFP e HIS3MX6 como marca de seleção, foi usado para inserir a mesma construção da biblioteca no genoma da cepa haploide $\Delta nop53$.

3.2.6 Extração de DNA total de *S. cerevisiae*

10 ml de cultura de levedura em fase estacionária foram coletados por centrifugação a 4000rpm por 10min a 4°C. As células foram lavadas em 1ml de H₂O e ressuspendidas em 200µl de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0; 100mM NaCl; 1mM EDTA pH 8,0; 1% SDS; 2% Triton X-100). Após adição de igual volume de pérolas de vidro, 200 µl de fenol/clorofórmio e 200µl de TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0), as células foram rompidas por agitação em vórtex por 30s. Os *debris* celulares foram separados por centrifugação a 13000 rpm por 5min a temperatura ambiente. 350µl de sobrenadante foram transferidos para tudo novo. O DNA do sobrenadante foi precipitado pela adição de 750µl de etanol absoluto gelado. Após centrifugação a 13000 rpm por 5min a temperatura ambiente, o pellet foi lavado com 500µl de etanol 70%, seco a 42°C por 5min e ressuspendido em 50µl de TE 1X.

3.3 Análise do crescimento celular de *S. cerevisiae*

Pré-culturas da cepa condicional $\Delta nop53$ / tet-OFF-GFP-NOP53 expressando mutantes de *nop53* ou controles (GFP e GFP-Nop53 FL) foram inoculadas em meio mínimo YNB Glu com ou sem doxiciclina (DOX - 1,5 $\mu\text{g/ml}$) e cultivadas a 30°C até $OD_{600} \sim 1,0$. Alíquotas de cada cultura de levedura foram coletadas para análise por SDS-PAGE e *western blot*.

3.3.1 Curva de Crescimento

Estas culturas, a uma mesma OD_{600} , foram diluídas em 200 μl de meio mínimo YNB Glu novo com ou sem doxiciclina (DOX - 1,5 $\mu\text{g/ml}$) para $OD_{600} = 0,1$ em microplaca estéril de 96 poços (Costar). Foram analisadas triplicatas biológicas. A microplaca foi incubada durante 24h a 30 ° C em equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices) configurado para ler, por 24h, a $OD_{600\text{nm}}$ a cada 60 min após agitação orbital.

3.3.2 Diluição seriada

Diluição decimal seriada de pré-inóculos com $OD_{600\text{nm}} = 1,0$ foi realizada com meio mínimo YNB Glu novo com ou sem doxiciclina (DOX - 1,5 $\mu\text{g/ml}$). 3-5 μl de cada diluição foram aplicados sobre meio mínimo sólido (YNB Glu). As placas foram incubadas por um período de 2 a 9 dias. Foram testadas diferentes condições de crescimento: 16 °C ou 30 °C; doxiciclina (1,5 $\mu\text{g/ml}$), rapamicina (400 nM) ou higromicina B (200 $\mu\text{g/ml}$).

3.4 Ensaios de interação proteína-proteína

3.4.1 Ensaio de duplo híbrido

Os ensaios de duplo híbrido foram realizados usando o kit *Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System* (Takara), de acordo com protocolo do fabricante. Neste sistema, a sequência da proteína presa é clonada em vetor pGADT7, em fusão ao domínio de Gal4 de ativação da transcrição (Gal4-AD), enquanto a sequência da proteína isca é clonada em vetor pGBKT7, em fusão ao domínio de Gal4 de ligação a DNA (Gal4-BD). As cepas haploides Y187 (Takara) e Y2HGold (Takara) foram transformadas respectivamente com os plasmídeos pGADT7 e pGBKT7. Após teste de toxicidade das fusões, e de autoativação pela isca, foram realizados os testes de interação através do cruzamento das cepas em 500 μl de YPDA (a 30°C 200 rpm por 24h). Utilizou-se como controle positivo a interação entre p53 de *M. musculus* (pGBKT7-53) e o

antígeno T (pGADT7-T) de SV40; e como controle negativo, entre lamina tipo C de *H. sapiens* (pGBKT7-Lam) e o antígeno T (pGADT7-T) de SV40. A cepa expressando a proteína isca fusionada a Gal4-BD foi cruzada com a cepa expressando a proteína presa fusionada a Gal4-AD. As cepas diploides resultantes foram plaqueadas em meio seletivo [-Leu-Trip] e testadas para a ativação de quatro genes repórteres sob promotor regulável por Gal4: *ADE2* (via de síntese de adenina), *HIS3* (via de síntese de histidina), *AUR1-C* (resistência a Aureobasidina A – inibidor de inositol fosfoceramida sintase) e *MEL1* (α -galactosidase). Estes testes foram realizados por diluição seriada em placas com meio mínimo (YNB Glu) *drop out* [-Leu-Trp-Ade], [-Leu-Trp-His]; [-Leu-Trp +Aureobasidina A 200ng/ml] e [-Leu-Trp + X- α -Gal 40 μ g/ml] cultivadas a 30°C por 2 a 3 dias.

3.4.2 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Para a expressão das proteínas recombinantes 6xHis-Nop53, GST-Mpp6, GST-Rrp44 e do controle GST, a cepa de *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL* (Agilent Technologies) foi transformada por choque térmico com os plasmídeos pET28a-Nop53, pGEX-4T-1-Mpp6, pGEX-4T-1-Rrp44 e o vetor vazio pGEX-4T-1. (*Genótipo: *E. coli* B F *ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]). Estas cepas foram inoculadas em 5mL de meio LB seletivo a 37°C *overnight*. Para os testes das condições de indução, estas culturas foram diluídas 1:100 em 10ml de meio 2YT (1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 1% NaCl) seletivo novo e cultivadas a 37°C e 180rpm. Ao se atingir OD₆₀₀ ~ 0,5, realizou-se a indução com diferentes concentrações de IPTG, ou lactose, a diferentes temperaturas e tempos de incubação. A alíquotas de células não-induzidas (NI) e induzidas a diferentes condições adicionou-se tampão de amostra 1X (62mM Tris-HCl pH 6,8; 5% glicerol; 2% SDS; 1,5% β -mercaptoetanol; 0,016% azul de bromofenol). Após incubação a 95°C por 5min, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por coloração com *Coomassie blue*. As condições otimizadas de indução são: His-Nop53 - 0,5mM de ITPG por 5h a 37°C; GST-Mpp6 - 0,5mM de ITPG por 4h a 30°C; GST-Rrp44 - 0,5mM de ITPG por 4h a 30°C; e GST - 0,5mM de ITPG por 2h a 37°C.

Para os ensaios de GST-*pull down*, a indução das cepas também foi realizada a OD₆₀₀ ~ 0,5, porém em volume de cultura de 500ml (meio 2YT seletivo). Para a purificação de GST-Mpp6 e de His-Nop53, a indução foi feita em 2-4L de cultura (meio 2YT seletivo). Antes da lise do *pellet* de células induzidas, coletadas e mantidas a -20°C, alíquotas da cultura não-induzida e induzida foram analisadas por SDS-PAGE com coloração por *Coomassie blue* para confirmar a indução.

3.4.3. Purificação de His-Nop53 e GST-Mpp6

Células de *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL expressando a proteína de fusão His-Nop53 (previamente induzidas com IPTG e coletadas por centrifugação) foram ressuspendidas em tampão de lise (20mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 10mM Imidazol, 5% glicerol) com 40µg de RNase A (Conert – Invitrogen), 4U de DNase I (Fermentas), 1mM PMSF, e *Pierce Protease Inhibitor* (Thermo Scientific). O extrato total obtido por lise em French Press (1500 psi) foi clarificado por centrifugação a 17000rpm por 30min a 4°C em rotor F21-8X-50y (Fiberlite - Thermo Scientific) e filtrado (0,45µm, 25 mm, polipropileno - Whatman) antes de ser carregado no *superloop* de 50ml. His-Nop53 foi purificada do extrato total por cromatografia de afinidade usando coluna HiTrap Chelating HP (5ml, GE Healthcare) previamente niquelada (Ni²⁺), equilibrada em tampão de lise e acoplada a um sistema ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences). Após lavagem com 15 volumes de coluna com tampão de lise, a eluição foi realizada por gradiente linear de imidazol em 15 volumes de coluna (1,0 ml/min): 0-100% tampão B (20mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 500mM Imidazol, 5% glicerol). Aliquotas das frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por *Coomassie blue*. As frações (31 e 32) com His-Nop53 purificada foram concentradas usando Amicon Ultra-15 10K (Millipore) de acordo com instruções do fabricante. O tampão foi substituído por (50mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM NaCl, 5mM MgCl₂ 2mM DTT, 1mM PMSF) e alíquotas da proteína purificada foram congeladas em N₂ líquido e mantidas a -80°C.

Para a purificação da proteína de fusão GST-Mpp6, células de *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL com pGEX-4T-1-Mpp6 (previamente induzidas com IPTG e coletadas por centrifugação) foram ressuspendidas em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 5mM MgCl₂) com 40µg de RNase A (Conert – Invitrogen), 4U de DNase I (Fermentas), 1mM PMSF, e *Pierce Protease Inhibitor* (Thermo Scientific). O extrato total também foi obtido por lise em French Press (1500 psi) e clarificado por centrifugação a 17000rpm por 30min a 4°C em rotor F21-8X-50y (Fiberlite – Thermo Scientific) antes de incubação por 2h a 4°C com 5ml de suspensão de glutathiona sepharose fast flow (GE- Healthcare) previamente equilibrada em tampão de lise em uma coluna Econo-Pac (Bio-Rad). Uma alíquota do *flow-through* foi coletada e a resina foi lavada com 20ml de tampão de lise antes da eluição com 5ml de 25mM glutathiona reduzida em 50mM Tris-HCl pH 8,0. A eluição concentrada em Amicon Ultra-15 10K (Millipore) foi submetida à cromatografia em coluna Hitrap Heparin HP (5ml, GE Healthcare) previamente equilibrada em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 5mM MgCl₂) e acoplada a um sistema ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences). Após lavagem com 10 volumes de coluna com tampão de lise (1ml/min), a eluição foi realizada por gradiente linear 0,1-1M NaCl em 10 volumes de coluna

com fluxo 1,0 ml/min: 0-100% tampão B (50mM Tris-HCl pH 8,0; 1M NaCl; 5mM MgCl₂). Alíquotas das frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por *Coomassie blue*. A fração (19) com GST-Mpp6 purificada foi concentrada em Amicon Ultra-15 10K (Millipore) de acordo com instruções do fabricante. O tampão foi substituído por (50mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM NaCl, 5mM MgCl₂ 2mM DTT, 1mM PMSF) e alíquotas da proteína purificada foram congeladas em N₂ líquido e mantidas a -80°C.

3.4.4. Ensaio de interação proteína-proteína in vitro (GST pull-down)

Células da cepa de *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL (Agilent Technologies) carregando plasmídeos codificando as proteínas de fusão e cultivadas em 500ml de meio LB seletivo, foram coletadas, após indução com IPTG, por centrifugação a 4000 rpm a 4°C por 30 min. As células foram ressuspensas em tampão de lise gelado (20mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl, 1mM EDTA pH 8,0; 0,8% Nonidet, 1mM DTT, 1mM PMSF). O extrato total foi obtido por lise mecânica em *French press* (1500 psi) e clarificado por centrifugação a 17000rpm por 30min a 4°C em rotor F21-8X-50y (Fiberlite - Thermo Scientific). Os ensaios de *pull down* foram realizados com 50-100µl de resina glutationa-sepharose fast flow (GE-Healthcare) previamente lavada com H₂O e equilibrada com tampão de lise. O extrato total (Input 1) contendo a proteína de fusão com GST foi incubado com a resina em agitação orbital por 1h a 4°C. O *flow-through* (FT1) foi coletado, sendo realizadas duas lavagens: 10mL tampão de lise com 250mM NaCl; 10mL tampão de lise com 150mM NaCl). O segundo extrato total (Input 2) contendo a proteína fusionada à cauda de 6x-His foi adicionado e incubado com a resina em agitação orbital por 1h a 4°C, sendo novamente coletado o *flow-through* (FT2) e realizadas duas lavagens (W2). A eluição (Elu) foi realizada com 500µL de 10mM glutationa reduzida em 50 mM Tris-HCl pH 8,0.

Os ensaios de interação com His-Nop53 e GST-Mpp6 purificadas foram realizados incubando-se as duas proteínas (respectivamente ~0,40nmol e ~0,20nmol) por 1h à 4°C em 200µl de tampão de incubação (50mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM NaCl, 5mM MgCl₂; 2mM DTT, 1mM PMSF). Foram adicionados 75 µl de resina glutationa-sepharose fast flow (GE-Healthcare) previamente lavada com H₂O e equilibrada com mesmo tampão. Após 2h de incubação a 4°C, coletou-se o *flow-through* (FT) e foram realizadas duas lavagens com tampão de incubação. Uma vez que a precipitação com TCA 10% da eluição com 700µl 10mM glutationa reduzida não foi eficaz (nenhum sinal detectado por *western blot*), realizou-se uma eluição desnaturante, incubando-se as *beads* a 95°C em tampão de amostra 1X (62mM Tris-HCl pH 6,8; 5% glicerol; 2% SDS; 1,5% β-mercaptoetanol; 0,016% azul de bromofenol). Alíquotas de cada etapa foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com anti-polyHis (Sigma Aldrich) e anti-GST (Sigma Aldrich).

3.5 Análise de proteínas

3.5.1 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada por dois métodos colorimétricos: [1] Medida de absorvância em 562nm após adição, a uma alíquota (1-10 μ l) da amostra (diluída ou não), de 1,0ml de solução de 5mM CuSO₄ em BCA (Sigma Aldrich) e incubação por 30min a 37°C. [2] Medida de absorvância em 595nm após adição de 800 μ l de solução de Bradford (Bio-Rad *Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) diluída 5X (com H₂O deionizada) a uma alíquota da amostra diluída (volume final 200 μ l) e incubação por 5min à temperatura ambiente. Nos dois casos, a concentração de proteínas foi determinada com base em curva padrão de BSA (diluída no mesmo tampão da amostra analisada).

3.5.2 SDS-PAGE

As proteínas de extratos totais, de amostras de perfil de sedimentação, de ensaios de coimunoprecipitação ou de ensaios de *pull down* foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante (SDS-PAGE - gel de empilhamento: 6% acrilamida/bis-acrilamida (29:1); 300 mM Tris-HCl pH 6,8; SDS 0,1%; gel de separação: 10 ou 12% acrilamida/bis-acrilamida; 375mM Tris-HCl pH 8,8; SDS 0,1%). As amostras foram aplicadas no gel após adição de tampão de amostra 6x (375mM Tris-HCl pH 6,8; 30% glicerol; 12% SDS; 9% β -mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol) e desnaturação a 95°C por 5 min. A separação foi realizada a 100-150V em tampão Tris-glicina 1X (25mM Tris-HCl pH 8,3, 192mM glicina, 0,1% SDS).

3.5.3 Coloração por Coomassie blue e por impregnação com prata

Após incubação do gel de poli(acrilamida) em solução 0,25% *Coomassie Brilliant Blue* R-250 em 45% metanol e 10% ácido acético por 2 horas, ele foi descorado em solução de etanol 50% e ácido acético 30%. Para coloração por impregnação de prata, o gel de poli(acrilamida) foi fixado em solução de 50% metanol, 12% ácido acético e 0,0185% de formaldeído por 30min. Após uma lavagem com 35% etanol por 3min e 3x com H₂O destilada, foi incubado em solução sensibilizante (1,26 mM NaS₂O₃ em H₂O) por 2min. Em seguida, foi incubado em solução corante (11,77 mM AgNO₃, 0,0266% de formaldeído) por 10min. A redução de Ag⁺ foi obtida pela incubação em

solução reveladora (0,025 mM NaS₂O₃, 0,60M CaCO₃, 0,0185% formaldeído). A reação foi parada com solução 5% ácido acético, lavando-se o gel com 35% etanol e H₂O destilada.

3.5.4 Western blot

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Hybond P – GE Healthcare) em tampão de transferência (25 mM Tris pH 8,0, 192 mM glicina, 15% metanol) por 2h a 250 mA, ou para membrana de nitrocelulose (Amersham Protran, poro 0,45µm) em tampão de transferência (25 mM Tris pH 8,0, 192 mM glicina) por 1h a 100V. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em TBST (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20). Após lavagem com TBST, a membrana foi incubada por 2h a 4°C em agitação orbital com anticorpo primário em solução de leite desnatado 0,5% em TBST. A membrana foi lavada por 3x com TBST e incubada com anticorpo secundário em TBST por 2h a 4°C em agitação orbital. Após uma lavagem com TBST e duas com TBS (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl), a revelação foi feita por detecção no infravermelho-próximo em equipamento Odyssey (LI-COR) ou ChemiDoc MP Imaging System (BioRad). Alternativamente, quando indicado na figura, a revelação foi baseada em detecção de quimioluminescência usando o kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). As imagens foram processadas usando o software Image Studio™ Lite (versão 5.2) (LI-COR).

Foram utilizados os anticorpos primários: anti-GST (Sigma Aldrich), anti-GFP (Sigma Aldrich), anti-CBP (Millipore), anti-polyHis (Sigma Aldrich), anti-uL18 (alíquota doada pelo Prof. Dr. Cleslei F. Zanelli, UNESP), anti-Nog1 (alíquota doada pelo Prof. Dr. John L. Woolford Jr., Carnegie Mellon University) e anti-Pgk1 (Abcam). Foram utilizados os anticorpos secundários: anti-IgG de coelho (GE Healthcare®) e anti-IgG de camundongo (GE Healthcare®) conjugados à peroxidase HRP; e anti-IgG de coelho (LI-COR) e anti-IgG de camundongo (LI-COR) conjugados respectivamente a IRDye680 e IRDye800.

3.6 Ensaios de coimunoprecipitação

3.6.1 Coimunoprecipitação para análise proteômica

As cepas empregadas nos ensaios de coimunoprecipitação foram cultivadas em 2L de meio mínimo (YNB Glu) a 30°C e 160rpm em triplicatas biológicas. Com exceção de $\Delta nop53/$ pTAP-NOP53, as demais cepas $\Delta nop53/$ ptet-OFF-GFP-NOP53 expressando Rrp6 ou fatores de

montagem ribossomal fusionados ao TAP-tag foram cultivadas com e sem adição de doxiciclina (1,5µg/ml) por 18h. As células foram coletadas em fase exponencial de crescimento ($OD_{600} = 1,0$) por centrifugação a 10000rpm por 10min a 4°C em rotor F12-6x 500 LEX (Fiberlite – Thermo Scientific), ressuspendidas em tampão A (20 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 5 mM MgOAc, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 1:50 cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)), gotejadas sobre N₂ líquido e mantidas a -80°C. Após lise mecânica criogênica em equipamento Ball Mill PM 100 (Retsch), o extrato total foi clarificado por centrifugação a 17000 rpm por 30 min a 4°C e a quantidade de proteínas determinada por ensaio de Bradford ou CuSO₄/BCA. Os ensaios de coimunoprecipitação foram realizados como descrito anteriormente (Ohmayer et al., 2013; Gamalinda et al., 2014), com pequenas modificações. Quantidades equivalentes de proteína total (~50mg) foram incubadas por 2h a 4°C em agitação orbital com 200µl de resina IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão A. No caso específico de TAP-Nop53, adicionou-se nesta etapa 240µg RNase A (PureLink, Invitrogen) em apenas uma das duas triplicatas de $\Delta nop53$ /pTAP-NOP53. Após quatro lavagens com 1,0ml do tampão A e duas com 1,0ml de tampão B (100mM NH₄OAc pH 7,4; 0,1mM MgCl₂) com agitação orbital a 4°C, a eluição foi realizada em condições desnaturantes por duas vezes com 500µl de 500 mM NH₄OH com agitação orbital por 20min a temperatura ambiente. Todas as eluições foram secas (Savant SpeedVac Plus SC210A – Thermo Scientific) e processadas (como descrito na seção 3.7.1) antes da análise por LC-MS/MS. Alíquotas dos extratos totais e das eluições foram separadas para análise por SDS-PAGE e *western blot*.

3.6.2 Coimunoprecipitação de RNA

Os ensaios de coimunoprecipitação de RNA seguiram o mesmo protocolo que a seção 3.6.1, com algumas modificações. Adicionou-se inibidor de RNase (RNAsin - Promega) à concentração final 0,04U/ mL ao extrato total antes da incubação com a resina de IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). Foram realizadas 6 lavagens com 1,0ml de tampão (20 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 5 mM MgOAc, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 1:50 cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)) suplementado com 0,04U/mL de RNAsin (Promega). Após a última lavagem, o RNA foi extraído diretamente da resina pelo método de fenol quente modificado, como descrito na seção 3.11.1.

3.7 Análise Proteômica Quantitativa *label-free*

3.7.1 Preparo das amostras para LC-MS/MS

As eluições liofilizadas foram submetidas à digestão em solução para análise por LC-MS/MS, como anteriormente descrito (Villén e Gygi, 2008). As proteínas foram ressuspensas em solução A (50mM NH_4HCO_3 , 8 M ureia) e reduzidas com DTT, à concentração final de 5mM, a 56 ° C por 25 min. Todas as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e alquiladas por incubação com 14 mM de iodoacetamida (IAA) ao abrigo da luz por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de DTT (concentração final de 5mM) e incubação por 15 min ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Após diluição de 5X com 50 mM NH_4HCO_3 para reduzir a concentração de ureia, e adição de CaCl_2 à concentração final 1mM, as amostras foram incubadas a 37 ° C por 16 h com adição de *Sequencing Grade Modified Trypsin* (Promega) a uma razão de 1:50 (E:S). A proteólise foi interrompida pela adição de TFA a uma concentração final de 0,4% (v/v), verificando-se $\text{pH} < 3,0$. Os peptídeos resultantes foram dessalinizados por extração em fase sólida utilizando-se cartuchos SepPak tC18 (Waters) previamente condicionados com 2,0ml de metanol absoluto, lavados com 2,0ml de solução (0,1%TFA, 50%ACN) e equilibrados com 2,0ml 0,1%TFA. Após aplicação da amostra na coluna por 3 vezes, a dessalinização foi realizada com 4,0ml de 0,1%TFA e eluição com 2,0ml de solução 0,1%TFA 50%ACN. Os peptídeos dessalinizados foram secos em equipamento *Savant SpeedVac Plus SC210A* (Thermo Scientific).

3.7.2 LC-MS/MS (*Rrp6-TAP e TAP-Nop53*)

As eluições dos ensaios de coimunoprecipitação com Rrp6-TAP (Nop53 +, Nop53 -, controle negativo) e TAP-Nop53 (RNase +, RNase -, controle negativo) foram submetidas à análise por LC-MS/MS na Unidade de Proteômica do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC)/IQ-UFRJ (RJ, Brasil). Os peptídeos previamente digeridos com tripsina e dessalinizados foram ressuspensos em 0,1% ácido fórmico e analisados em duplicata técnica. Utilizou-se uma Proxeon EASY-nLC II acoplada *online* a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). A mistura de peptídeos foi carregada em uma coluna *trap* ReproSil-Pur C18-AQ (tamanho de partícula: 5 μm ; comprimento: 2 cm; diâmetro interno: 100 μm , Dr. Maish HPLC GmbH) e separada usando uma coluna New Objective PicoFrit (comprimento: 25 cm; diâmetro interno: 75 μm) empacotada *in-house* com resina ReproSil-Pur C18- AQ (tamanho de partícula: 3 μm , Dr. Maisch HPLC GmbH). Empregou-se um fluxo de 200 nL/min por

90 min aplicando-se um gradiente (fase móvel A: 0,1% ácido fórmico; fase móvel B: 95% acetonitrila em 0,1% ácido fórmico) em três etapas: de 5% a 40% da fase móvel B em 75 min; 40% a 95% de B em 5 min; e 95% de B por 10 min. Após cada corrida, as colunas foram equilibradas com fase móvel A. O LTQ-Orbitrap Velos foi configurado para aquisição dependente de dados (DDA) para alternar automaticamente entre MS *full scan* e MS/MS com uma exclusão dinâmica de 90s. A aquisição dos espectros de massas em 375-2000 m/z foi realizada no sistema Orbitrap com resolução de 60000 (em 400 m/z). Os 10 íons mais intensos, excluindo os não atribuídos e com estado de carga 1+, foram sequencialmente isolados e fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) empregando-se uma energia de colisão normalizada de 30. Os íons fragmento foram analisados no *Linear Trap Quadrupole* (LTQ).

3.7.3 LC-MS/MS (análise dos estágios de maturação do pré-60S)

As eluições dos ensaios de coimunoprecipitação (Nop53 +, Nop53 -) com os fatores de montagem do pré-60S (Nop7, Nmd3, Rsa4, Arx1, Erb1, Yvh1 e Lsg1) fusionados a *TAP-tag*, foram submetidas à análise por LC-MS/MS no Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular (CeTICS)/Instituto Butantã (SP, Brasil). Os peptídeos previamente digeridos com tripsina e dessalinizados foram ressuspensos em 0,1% ácido fórmico e separados por cromatografia de fase reversa em uma coluna *capillary emitter* (comprimento: 10cm; diâmetro interno: 75µm) empacotada *in-house* com resina C18 Acqua HPLC (tamanho de partícula: 5µm, Phenomenex) e acoplada a um nano-HPLC (nLC-Proxeon - Thermo Scientific). A separação foi realizada em 60 min através de um gradiente de 2-80% acetonitrila em 0,1% ácido fórmico (tampão B) realizado em três etapas (0-28% de tampão B em 45 min, 28-80% em 13 min; 80-5% por 2 min) a um fluxo de 300nl/min. Os peptídeos eluídos foram analisados por MS/MS em um LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) (voltagem da fonte: 1,9 kV; temperatura do capilar: 200 °C). O espectrômetro de massas foi operado no modo de aquisição dependente de dados (DDA) com exclusão dinâmica habilitada (duração da exclusão de 45s), resolução MS1 de 30000 e energia de colisão normalizada MS2 de 30. Para cada ciclo, a análise do MS1 com uma varredura completa de 200-2000 m/z foi seguida por dez análises de MS2 (para os íons mais intensos) usando um tamanho de janela de isolamento de 1,0 m/z e dissociação induzida por colisão (CID). Os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por CID em DDA.

3.7.4 Análise dos dados de MS/MS (Rrp6-TAP)

A análise dos dados do ensaio de coimunoprecipitação com Rrp6-TAP (Nop53 +, Nop53 -, controle negativo) foi realizada com o software *PatternLab for proteomics* 4.1.1.4 (Carvalho et al.,

2016). O proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa ATCC 204508 / S288c) utilizado foi baixado em 7 de maio de 2019 do UniProtKB / Swiss-Prot (*Proteome ID*: UP000002311). Um banco de dados de *target-decoy* foi gerado pela inclusão de todas as sequências do proteoma em ordem reversa, além de 127 contaminantes comuns em ensaios de MS/MS. A ferramenta de busca espectral Comet (2016.01, revisão 3) foi usada para identificar os espectros de massas. Os parâmetros de pesquisa consideraram: candidatos a peptídeo (trípticos e semi-trípticos) com massa entre 550 e 5500 Da, com máximo de duas clivagens perdidas, tolerância de 40 ppm para massa máxima do precursor e *bins* de 1,0005 m/z para MS/MS. Carbamidometilação de cisteína e oxidação de metionina foram consideradas, respectivamente, como modificações fixa e variável. A validade das correspondências espectrais (*peptide spectrum matching* - PSM) foi avaliada usando a ferramenta *Search Engine Processor (SEPro)* (Carvalho et al., 2012a). Nesta abordagem, as identificações foram agrupadas de acordo com estado de carga (2+ e \geq 3+) e status tríptico em quatro subgrupos distintos que foram analisados de modo independente. Para cada grupo, foram usados os valores XCorr, DeltaCN, DeltaPPM e Peaks Matches para gerar um discriminador Bayesiano. Foram fixados: *score cut-off* com FDR de 1% a nível de peptídeo com base no número de *decoys*, um comprimento mínimo de sequência de cinco resíduos de aminoácidos e pontuação de proteína maior que 3. Foram descartadas as identificações que se desviaram em mais de 10 ppm da massa teórica. Este filtro resultou em FDR < 1% para as proteínas identificadas na busca.

3.7.5 Análise dos dados de MS/MS (TAP-Nop53 e fatores de montagem ribossomal)

Os dados dos ensaios de coimunoprecipitação com TAP-Nop53 e com os fatores de montagem do pré-60S foram analisados com o software MaxQuant (versão 1.5.3.12) utilizando o proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* - cepa ATCC 204508 / S288c baixado em 02 de dezembro de 2019 do banco de dados UniProtKB /Swiss-Prot (*Proteome ID*: UP000002311). Foram estabelecidos: tolerância de 20 ppm para massa máxima do precursor na busca inicial e de 4.5 ppm na busca principal, de 0,5 Da para massa do fragmento por CID; digestão por tripsina, com um máximo de até duas clivagens perdidas; carbamidometilação de cisteína como uma modificação fixa; oxidação de metionina e acetilação da extremidade N-terminal de proteína como modificações variáveis; e identificação de proteínas com FDR < 1%. Foi selecionada a análise *label-free quantification* (LFQ). A opção de “*match between runs*” foi usada para aumentar o número de IDs confiáveis. Os valores de *LFQ Intensity* normalizados do arquivo proteingroups.txt foram usados para a análise quantitativa.

3.7.6 Análise proteômica quantitativa label-free (Rrp6-TAP)

A análise proteômica quantitativa *label-free* foi realizada com o módulo XIC do software *PatternLab for proteomics* 4.1.1.4 (Carvalho et al., 2016), permitindo desvio de até 20 ppm do precursor. Os dados foram filtrados considerando-se apenas proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos únicos e em pelo menos uma condição (Nop53+, Nop53-, controle negativo) em duas replicatas biológicas. Diferenças quantitativas estatisticamente significativas foram identificadas usando o módulo TFold do software *PatternLab for proteomics*, adotando como parâmetros: p-value ajustado por Benjamini-Hochberg: q-value < 0,05; *F-Stringency*: 0,070; *L-Stringency*: 0,400 (Carvalho et al., 2012b). O módulo de diagrama de Venn do software *PatternLab* foi usado para avaliar o número de proteínas identificadas, a sobreposição entre os três ensaios de coimunoprecipitação avaliados, e as proteínas identificadas exclusivamente em uma única condição em pelo menos duas replicatas biológicas. A análise funcional das proteínas com diferenças estatisticamente significativas foi feita usando o banco de dados STRING 11.5 e curadoria manual com base nas referências bibliográficas do SGD. A classificação dos fatores de montagem ribossomal identificados foi realizada com base em Klinge e Woolford (2019).

3.7.7 Análise proteômica quantitativa label-free (TAP-Nop53 e fatores de montagem de ribossomal)

Os dados de proteômica quantitativa *label-free* dos ensaios com TAP-Nop53 e com os fatores de montagem do pré-60S foram analisados usando o software Perseus (v.1.6.10.50, Max Planck Institute of Biochemistry) conforme descrito anteriormente (Tyanova et al., 2016), com pequenas alterações. Foram analisados separadamente os ensaios de coimunoprecipitação com cada isca (TAP-Nop53 e 7 fatores de montagem do pré-60S fusionados a TAP). Os dados obtidos com o software MaxQuant foram filtrados removendo-se contaminantes, identificações presentes no banco de dados de sequências reversas, e proteínas identificadas apenas por um sítio de modificação. Os valores de *label-free quantification* (LFQ) *Intensity* foram transformados em log₂ e as triplicatas biológicas foram agrupadas por anotação categórica nas condições avaliadas: depleção [Nop53 -] e não depleção [Nop53 +] de Nop53; ou RNase+, RNase - e controle negativo.

Uma lista com todas as proteínas-r da subunidade 60S e os fatores de montagem do pré-60S classificados de acordo com o estágio de maturação de que participam (Klinge e Woolford, 2019) foi adicionada como uma coluna de anotação. As proteínas identificadas foram filtradas considerando-se apenas aquelas com pelo menos dois valores de intensidade LFQ válidos em

pelo menos uma triplicata biológica. Desta lista, as proteínas que foram identificadas em uma única triplicata biológica foram consideradas identificadas exclusivamente em uma condição ([Nop53 -] ou [Nop53 +]; RNAse+, ou RNAse -, ou controle negativo). No caso específico de TAP-Nop53, a lista de Uniprot IDs das proteínas identificadas em cada uma das três condições foi analisada com o software online Venny 2.1 (bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) para a construção do gráfico de Venn.

Com o software Perseus, foram obtidos gráficos de dispersão e *heatmaps*. Os gráficos de dispersão mostram a correlação entre as amostras baseada na intensidade LFQ das proteínas identificadas e foram usados para avaliar a reprodutibilidade entre as replicatas, mostrando o coeficiente de correlação de Pearson para cada comparação. *Heatmaps* foram obtidos com base nos valores de \log_2 (intensidades LFQ) de todas as proteínas ou de todos os fatores de montagem do pré-60S (identificados em pelo menos duas réplicas biológicas). Eles foram gerados com a clusterização hierárquica das amostras (colunas) e das proteínas identificadas (linhas). Foram usados os parâmetros: distância euclidiana; ligação média; pré-processo com k-médias; número de clusters definido em 300; número de iterações definido em 10.

Os valores de Intensidade LFQ ausentes (*missing values*) foram imputados com o software Perseus a partir da distribuição normal em torno do limite de detecção (largura definida em 0,3, *downshift* de 2,0 desvios-padrão). Os histogramas de Intensidades LFQ foram avaliados para confirmar que a distribuição desses valores imputados se ajustava à distribuição normal. Um teste t de Student bicaudal ($S_0 = 0$, cut-off p-value = 0,05) foi realizado comparando-se: no caso dos dados dos fatores de montagem fusionados ao TAP: [Nop53 -] com [Nop53 +]; e no caso de TAP-Nop53: RNAse(-) vs. Controle; RNAse(+) vs. Controle; RNAse(+) vs. RNAse(-). Usando o software GraphPad 8 (Prism), os valores de $-\log_{10}$ (p-value) foram plotados contra \log_2 (Fold Change) em *volcano plots*. As diferenças estatisticamente significativas estão acima da linha *cut-off* horizontal (p-value < 0,05) à esquerda da linha *cut-off* $x = -1$ (Fold Change < 0,5) ou à direita da linha *cut-off* $x = 1$ (Fold Change > 2). Os valores de Fold Change dos fatores de montagem ribossomal identificados também foram representados em gráfico de barras ordenados da esquerda para a direita de acordo com as etapas de maturação do pré-60S de que participam (desde estágios nucleolares iniciais a citoplasmáticos tardios). Os fatores de montagem copurificados exclusivamente em uma condição foram representados como barras tracejadas.

9 conjuntos de fatores de montagem ribossomal (Tabela 6), representativos de intermediários pré-60S específicos, foram definidos com base no modelo atualizado da via de montagem do 60S (Bagatelli et al., 2021), excluindo-se os componentes presentes em quase todos os estágios de maturação.

Tabela 6. Conjuntos de fatores de montagem ribossomal representativos de intermediários pré-60S específicos

Intermediários pré-60S / subcomplexos	Fatores de Montagem do pré-60S
Nucleolar inicial	Rrp5, Noc1, Noc2, Nop4, Npa1, Npa2, Nop8, Rsa3, Dbp6, Dbp3, Dbp7, Dbp9, Mak5, Fpr3, Fpr4, Dbp10, Puf6, Pwp1, Nop12, Drs1, Loc1
Nucleolar – Estados A – D	Ssf1, Rrp15, Rrp14, Mak11, Nsa1, Rrp1, Rpf1, Mak16, Rix7
Nucleolar – Estados D \cap E	Nip7, Spb1, Nop2, Noc3, Spb4, Brx1, Ebp2, Nop16, Has1, Erb1, Ytm1
<i>ITS2-foot</i>	Cic1, Nop15, Rlp7, Nop7
Partícula Nog2/ Partícula Rix1-Rea1	Nog2, Rsa4, Cgr1
Partícula Rix1-Rea1	Sda1, lpi1, lpi3, Rix1, Rea1
Partícula Nog2 – até citoplasmático inicial	Alb1, Arx1, Bud20
Nuclear tardio - citoplasmático	Mex67, Mtr2, Ecm1, Yvh1, Nmd3, Lsg1, Drg1, Rei1, Jjj1, Reh1, Sqt1
Exclusivamente citoplasmático	Lsg1, Drg1, Rei1, Jjj1, Reh1, Sqt1
Não compõem nenhum conjunto	Nop53, Rlp24, eIF6, Nog1, Nsa2, Mrt4, Nug1, YBL028C, Rrs1, Rpf2, Sdo1, Efl1

Para a representação destes conjuntos, *violin plots* foram criados usando o *software* GraphPad 8 (Prism), e mostrando para cada conjunto a distribuição dos valores de \log_2 (intensidade LFQ) dos fatores de montagem copurificados. Para cada *violin plot*: a altura é delimitada pelos valores de intensidade LFQ mais alto (limite superior) e mais baixo (limite inferior) encontrados no conjunto; a mediana é representada por uma linha cinza escura; e sua forma decorre de um gráfico (de densidade estimada por kernel) girado e suavizado refletindo a distribuição de frequência dos valores \log_2 (intensidade LFQ) observados no conjunto. Os fatores de montagem identificados exclusivamente em uma condição foram representados como triângulos cinza. Um teste U de Mann-Whitney não-paramétrico bicaudal (nível de confiança: 95%) foi realizado utilizando o GraphPad 8 (Prism) para comparar as distribuições de fatores de montagem em ambas as condições ([Nop53-] e [Nop53 +]).

Adicionalmente, no caso específico da comparação de mutantes truncados *nop53* com a depleção de Nop53, uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada usando o *software* Perseus, comparando-se as replicatas biológicas (Parâmetros: FDR corrigido por Benjamini-Hochberg = 0,05; número de componentes definido em 5).

3.7.8 Análise Funcional do interactoma de TAP-Nop53

Para a análise funcional do interactoma de Nop53, foram consideradas proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 em relação ao controle negativo tanto aquelas exclusivamente identificadas na eluição com TAP-Nop53 em pelo menos duas replicatas biológicas, quanto aquelas com \log_2 Fold Change (TAP-Nop53/ TAP vazio) ≥ 1.0 (p -value $< 0,05$). Os ensaios com e sem tratamento com RNase foram analisados de forma independente. As duas listas (RNase(-) e RNase(+)) de Uniprot IDs das proteínas co-enriquecidas com TAP-Nop53 foram submetidas a uma análise de enriquecimento funcional (PANTHER *Overrepresentation Test*) de termos e categorias de ontologia genética (*GO Biological Process Complete*) utilizando o software PANTHER 16.0. Para cada categoria identificada foram indicados o FDR (*cut off* = 0,05; Teste exato de Fischer), o número de proteínas da lista presentes na categoria, o número total de proteínas que compõe a categoria e o *Fold Enrichment*, com base no qual avaliamos as categorias e termos mais enriquecidos.

A rede de interações das 90 proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 em relação ao controle negativo nas duas condições testadas (RNase + e -) foi obtida usando o banco de dados STRING 11.5. Foram adotados os parâmetros: *network type: full STRING network; meaning of network edges: confidence; interaction sources: experiments, databases; minimum required interaction score: high confidence (0.700); max number of proteins to show: query proteins only*. A rede de interações foi editada com o software Cytoscape v3.7.2.

3.8 Visualização molecular com ChimeraX, PyMOL e RiboVision

Os softwares UCSF ChimeraX (1.0-rc-2020.05.22) e PyMOL (v.2.4) foram empregados para a visualização molecular de estruturas depositadas no PDB. Os seguintes PDB IDs foram usados: 4V88 (Ben-Shem et al., 2011), 3JCT (Wu et al., 2016), 6ELZ (Kater et al., 2017), 6C0F (Sanghai et al., 2018), 6FT6, 6FSZ (Schuller et al., 2018), 6N8K, 6N8O (Zhou et al., 2019b), 6RZZ, 6RI5 (Kargas et al., 2019), 6YLY, 6YLH (Kater et al., 2020), 5VZJ (Wasmuth et al., 2017), 5OOQ (Falk et al., 2017b) e 7AJT (Lau et al., 2021). As estruturas secundárias dos rRNAs de *S. cerevisiae* foram obtidas e editadas com o software RiboVision 1.15 (apollo.chemistry.gatech.edu/RiboVision/).

3.9 Análise de perfil de sedimentação

3.9.1 Gradiente de sacarose (perfil de polissomos)

Células de levedura em 200 ml de cultura tratadas com cicloheximida (100µg/ml) por 15min no gelo foram coletadas e ressuspensas em 500µl de tampão A (20mM Tris-HCl pH 7,4; 50mM NaCl, 10mM MgCl₂; 200µg/ml heparina; cicloheximida 100µg/ml; 1mM DTT; 1mM PMSF). Extrato proteico total foi obtido por lise mecânica com pérolas de vidro. O lisado foi clarificado por centrifugação a 10000 rpm por 20min a 4°C, seguido de 12000 rpm por 10min a 4°C. A OD₂₅₄ (ODU) do sobrenadante foi verificada em espectrofotômetro. 25ODUs foram aplicadas sobre 12 mL de gradiente linear de sacarose 7%-47% (50mM Tris-Acetato pH 7,0; 50mM NH₄Cl, 12mM MgCl₂) previamente obtido em equipamento Gradient Master (Biocomp). A separação do extrato foi realizada por ultracentrifugação a 39000rpm por 3h a 4°C em rotor P40ST (Hitachi), sendo coletadas 24 alíquotas de 0,5 ml a partir do topo do tubo em coletor de amostras EconoSystem (BioRad) equipado com detector de UV e com injeção linear de sacarose 50% pelo fundo do tubo. O perfil de polissomos foi obtido por leitura de absorbância a 254nm.

3.9.2 Gradiente de glicerol

Extratos totais de levedura (cultura de 1L) obtidos por moagem criogênica em um equipamento Ball Mill PM 100 ou MM 200 (Retsch) foram fracionados após sedimentação em gradiente linear de glicerol conforme descrito anteriormente (Dez et al., 2006; Milligan et al., 2008). 5 mg de proteína total do lisado clarificado foram aplicados sobre o topo de 12 ml de um gradiente linear 10-30% de glicerol (20mM Tris-HCl pH 8,0, 200mM KCl, 5mM MgOAc, 5% glicerol, 1mM PMSF) previamente obtido usando equipamento Gradient Master (BioComp). A separação de GFP-Rrp6 e de TAP-Nop53 foi realizada a 40000 rpm por 16h a 4°C em um rotor P40ST (Hitachi). Os demais fatores de montagem ribossomal fusionados a TAP-tag foram submetidos a centrifugação a 23000 rpm por 12,5h a 4 °C em um rotor P40ST (Hitachi). Cada gradiente foi fracionado a partir do topo em 24 alíquotas (500 µl) usando o equipamento EconoSystem (BioRad) com detector de UV e com injeção linear de 40% glicerol pelo fundo do tubo. Todas as frações do gradiente foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e posteriormente precipitadas com TCA 10% gelado antes da análise por SDS-PAGE e *western blot*. Todas as frações de um mesmo gradiente e as correspondentes a uma mesma cepa em duas condições testadas (Nop53+, Nop53 -) foram processadas e analisadas em conjunto em todas as etapas.

3.10 Microscopia de Fluorescência

As cepas $\Delta nop53$ /pGAL1-NOP53 expressando proteínas de interesse fusionadas a GFP e Nop1-RFP como controle nucleolar foram usadas para avaliar o efeito da depleção de Nop53 na localização subcelular de Rrp6 e de fatores de montagem do pré-60S. Células em crescimento exponencial ($OD_{600} = 0,6$) cultivadas por 18h em meio mínimo contendo glicose ou galactose foram avaliadas por microscopia de fluorescência. Uma alíquota de cada cultura de células também foi analisada por SDS-PAGE e *western blot*. No caso de GFP-Rrp6, as células foram fixadas em metanol 70% por 15 minutos e lavadas com PBS. Nos demais casos, células vivas foram analisadas sobre *agarose pads* como descrito anteriormente (Okuda et al., 2020). As células de levedura foram analisadas usando um microscópio Nikon Eclipse Ti equipado com uma objetiva Plan Apo VC 100x Oil DIC N2 e uma câmera EM-CCD (DU-885, Andor) controlada com software NIS Elements AR (v.4.11 - Nikon). As imagens foram capturadas em tempos de exposição variando de 1 a 3s, com 13 MHz de *readout speed*, usando filtros para fluorescência verde (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) e vermelha (Texas Red BrightLine set, TXRED4040-B, Semrock). As imagens foram processadas e analisadas usando o software FIJI (Fiji Is Just ImageJ) 2.0.0-rc-69 / 1.53c (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Mais de 150 células foram analisadas em ambas as condições, em replicata. Gráficos de perfil RGB foram analisados usando o plugin *open source* RGB_Profiler.

3.11 Análise de RNA

3.11.1 Extração de RNA total de levedura

RNA total de levedura foi obtido através do método de extração líquido-líquido fenol-quente modificado, como anteriormente descrito (Granato et al., 2005; Linnemann et al., 2019). Células coletadas por centrifugação (4000rpm, 10 min, 4°C) a partir de 50ml de cultura ($OD = 1,0$) foram lavadas em água e ressuspensas em 500 μ l de tampão NaOAc (50mM NaOAc pH 5,0, 10mM EDTA). As células foram rompidas, após adição de pérolas de vidro, 100 μ l de 10% SDS e 500 μ l de fenol/tampão NaOAc (pré-aquecido a 65°C), por agitação em vórtex (3x de 1 min intercaladas com incubação em bloco a 65°C por 10 min ao todo). Após resfriar em gelo por 2 min, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 10min. O sobrenadante separado em tubo novo foi submetido a uma nova etapa de extração com 500 μ l fenol/tampão NaOAc, com os mesmos ciclos de vórtex, incubação a 65°C e centrifugação. Ao sobrenadante transferido para tubo novo foram adicionados 500 μ l de fenol/clorofórmio à temperatura ambiente. Após agitação em vórtex

por 3 min, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 10min. Foram adicionados 50 µl de 3M NaOAc (pH 5,3) ao sobrenadante em tubo novo. A etapa de extração com 500 µl de fenol/clorofórmio foi repetida. O RNA do sobrenadante foi precipitado com a adição de 1.0 ml de etanol absoluto gelado e incubação a -20°C (por 1h ou mais). O pellet obtido por centrifugação 12000 rpm por 10min a 4°C, após lavagem com 500µl de etanol 70%, foi seco a 42°C por 5 min, ressuspenso em 50 µl de H₂O (tratada com DEPC), quantificado em equipamento NanoDrop (Thermo Fischer) e mantido a -20°C ou -80°C. Este método também foi utilizado para a extração de RNA coimunoprecipitado diretamente das *beads* de IgG sepharose, ressuspendidas em tampão NaOAc. Pela menor abundância de RNA nas amostras de coimunoprecipitação, 20 µg de glicogênio (*RNA grade*, Thermo Fischer) foram adicionados como carreador na etapa de precipitação com etanol absoluto.

3.11.2 Separação do RNA por eletroforese em gel de agarose e poli(acrilamida)

Quantidades equivalentes de RNA coimunoprecipitado ou 20 µg de RNA total foram desnaturados com glioxal (2M glioxal, 25% DMSO, 10mM fosfato de sódio pH 7,0) a 50°C por 1h, como descrito em Sambrook e Russel (2001). Após adição de tampão de amostra (concentração final (1X): 0,04% azul de bromofenol, 0,04% xilenocianol, 5,0% glicerol), os RNAs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 150V por 1h em tampão fosfato de sódio (10mM, pH 7,0) circulado com bomba peristáltica entre os polos da cuba. Para separação de RNAs de menor tamanho, quantidades equivalentes de RNA coimunoprecipitado ou 10 µg de RNA total, após adição de tampão de amostra (concentração final (1X): 15,5% formamida, 3,3mM EDTA pH 8,0, 0,02% azul de azul de bromofenol, 0,02% xilenocianol), foram desnaturados a 95°C por 5 min e separados em gel desnaturante de poli(acrilamida) (6% poli(acrilamida), 7M ureia, tampão TBE: 90mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0) em tampão TBE 1X a 200V por 2h.

3.11.3 Northern blot

Os RNAs foram transferidos para membrana de nylon Hybond N+ (GE Healthcare) por capilaridade (em 3,0M NaCl, 0,3M citrato de sódio) a partir de géis de agarose, ou por campo elétrico (250V por 2h em TBE 0,5X) a partir de géis de poli(acrilamida). As membranas foram incubadas em solução de pré-hibridização (5X SSPE [0,75M NaCl, 50mM NaH₂PO₄ 0,5mM EDTA], 50% formamida deionizada, 5X Denhardt [0,1% Ficoll 400, 0,1% polivinil pirrolidona, 0,1% BSA], 0,1% SDS, 0,05µg/ml de *Herring sperm* DNA desnaturado) por 2h a 37°C. A hibridização

da membrana foi realizada a 37°C *overnight* com a sonda marcada adicionada a 10ml de solução de pré-hibridização nova. Os oligonucleotídeos usados como sondas estão listados na Tabela 7. Para a análise do efeito de mutantes pontuais de Nop53, foram empregadas sondas com marcação radioativa. A reação de marcação foi realizada com 10pmol de oligonucleotídeo, 5µl de γ -³²P-ATP (Perking Elmer) e 3U de T4 PNK (Promega) de acordo com protocolo do fabricante. A detecção foi realizada por exposição da membrana a filme radiográfico. Para os demais ensaios deste trabalho, as sondas foram biotinizadas na extremidade 3' usando o kit *Biotin 3'End DNA Labeling* (Thermo Fischer) de acordo com o protocolo do fabricante. Após 3 lavagens de 15 min a 25°C com 5x SSPE por duas vezes, e uma com 1x SSPE, a detecção das sondas marcadas com biotina foi realizada usando o *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Thermo Fischer), segundo recomendações do fabricante.

Tabela 7. Lista de oligonucleotídeos utilizados como sondas em ensaios de *Northern blot*

Sonda	Sequência 5'-3'	Fonte
DA2	TGTTACCTCTGGCCCCG	(Zanchin et al., 1997)
DA3	CCAGTTACGAAAATTCTT	(Zanchin et al., 1997)
DE	CTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGG	(Oliveira et al., 2002)
5.8S	CGTATCGCATTTCGCTGCGTTC	(Zanchin et al., 1997)
5S	GGTCACCCACTACTACTCGG	(Granato et al., 2005)
25S	GCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGC	(Gonzales et al., 2005)
UC2	TAAAACGACCGTACTTGCATTATACC	Este estudo
U3	ATGGGGCTCATCAACCAAGTTGG	(Dez et al., 2002)
scR1	TCTAGCCGCGAGGAAGGA	(Baker e Parker, 2006)

3.11.5 SHAPE *in vivo*

A estrutura do pré-rRNA/ rRNA foi indiretamente avaliada pelo ensaio de SHAPE *in vivo* (*Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*), como previamente descrito, com pequenas alterações (Biedka et al., 2018; Konikkat et al., 2017; Spitale et al., 2013; Wilkinson et al., 2006). Células de levedura em fase *log* de crescimento (OD₆₀₀ = 0,6), foram incubadas, após lavagem com tampão PBS (137mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4), com o reagente acilante ácido 2-metilnicotínico imidazolida (NAI – EMD Millipore 03-310), dissolvido em DMSO, a uma concentração final de 100 mM por 20min a 30°C. Como controle, metade de cada cultura de levedura foi submetida ao mesmo protocolo substituindo-se NAI por DMSO. As células foram coletadas por centrifugação e o RNA total imediatamente extraído pelo método de fenol quente modificado (como descrito na seção 3.11.1). Aliquotas de cada cultura de levedura foram separadas para posterior análise por SDS-PAGE e *western blot*. Para a

detecção dos 2'-O-adutos formados, 5 µg de RNA total foram submetidos a *primer extension* com Transcriptase Reversa SuperScript III (Invitrogen), de acordo com protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos usados na *primer extension* são marcados na extremidade 5' com IRDye700 (Alpha DNA, Québec) e estão listados na Tabela 8. Após a etapa de anelamento com 2,0 pmol de oligonucleotídeo (65°C 5min; rampa até 35°C; 4°C), foram adicionados dNTPs (0,5 mM), DTT (5.0mM) e *First Strand Buffer* (1X). Com a adição de 200U de Transcriptase reversa SuperScript III, a síntese do cDNA foi realizada a 52°C por 10 min e interrompida pela adição de NaOH (0.18M), e incubação a 95°C por 5min para desnaturação da enzima e degradação do RNA. Para cada amostra, adicionaram-se 29µl de *acid stop buffer* (4:25 (v/v) de Tris-HCl 1 M não-tamponado em *stop buffer* - 85% formamida, 45mM Tris-borato, 50 mM EDTA, pH 8.0, 0,05% azul de bromofenol).

Para a exata identificação dos sítios de modificação do rRNA com resolução a nível de nucleotídeo, foram realizadas reações de sequenciamento de DNA usando o plasmídeo pMS2-ITS2 (com sequência diferente do 25S rRNA) como molde, previamente purificado com kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). As reações de sequenciamento foram realizadas usando o oligonucleotídeo UC2 marcado na extremidade 5' com IRDye700, e o kit Sequenase v2.0 DNA Sequencing (Affymetrix), de acordo com recomendações do fabricante. Utilizou-se por cada reação 0,25 pmol de oligonucleotídeo, 25ng de DNA plasmidial, 0,81U da DNA polimerase Sequenase e uma das misturas de dNTPs + ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Foram realizados 50 ciclos de [95°C 30s, 52°C 30s, 72°C 60s] e a reação foi parada pela adição de *acid stop buffer* (sem xileno cianol). Os cDNAs e o produto das quatro reações de sequenciamento (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), todos marcados com IRDye700 (Ying et al., 2007), foram resolvidos em paralelo em um gel (altura: 40cm) 8% poliacrilamida desnaturante (8% poliacrilamida, 7,5M uréia, 90mM Tris-borato, 2mM EDTA, pH 8,0) sob proteção da luz. A detecção no infravermelho próximo foi realizada usando equipamento Odyssey *Imaging System* (LI-COR) e as imagens foram processadas usando o software Image Studio™ Lite (versão 5.2) (LI-COR).

Tabela 8. Lista de oligonucleotídeos utilizados nas reações de *primer extension* dos ensaios de SHAPE *in vivo*

Oligo	Sequência 5'-3'	Modificação	Fonte
25S_543rev	GCAAGCTACATTCCTATGGATTTATCC	5' IRDye700	Este estudo
25S_1330rev	TAGGTAACACGCTTGAGCGC	5' IRDye700	Este estudo
25S_3166rev	GTGTGGAGCAAAGAAATCACCGCGTTC	5' IRDye700	Este estudo
UC2	TAAAACGACCGTACTTGCATTATACC	5' IRDye700	Este estudo

4. RESULTADOS

4.1 Interação de Nop53 com o complexo exossomo

Subunidades ribossomais 60S funcionais e maduras são desprovidas do *ITS2-foot*, cuja remoção, no núcleo, depende do processamento da extremidade 3' do pré-rRNA 7S pela atividade do exossomo (Fromm et al., 2017; Schuller et al., 2018). Nop53 é o fator de montagem responsável pelo recrutamento do exossomo ao pré-60S através da RNA helicase Mtr4 (Thoms et al., 2015) que interage diretamente com Rrp6, Rrp47 e Mpp6 (Schuch et al., 2014; Falk et al., 2017a). Notavelmente, Nop53 também interage com a subunidade catalítica Rrp6 (Granato et al., 2008), sugerindo a existência de pontos adicionais de contato durante a clivagem do pré-rRNA 7S. Tendo por objetivo complementar estas observações, avaliou-se a interação de Nop53 com outros componentes do exossomo. Parte dos resultados obtidos neste trabalho e apresentados nas seções 4.1 e 4.2 compõem o artigo Cepeda, Bagatelli *et al.* (2019) - Anexo B - *doi:10.1074/jbc.RA119.010193*.

4.1.1 Nop53 interage com o cofator do exossomo Mpp6

Ensaio de *pull down* foram realizados com proteínas de fusão recombinantes expressas em *E. coli*, verificando-se a interação de Nop53 com componentes do exossomo (Fig. 16). Esta mesma abordagem foi utilizada por Granato *et al.* (2008), demonstrando que Nop53 fusionada a um *tag* N-terminal de hexahistidina (His-Nop53) não interage com o componente do *core* Mtr3, mas com a subunidade catalítica Rrp6.

Inicialmente, selecionamos Rrp44 e Mpp6, visando avaliar se Nop53 interage com a outra subunidade catalítica do exossomo, bem como com o outro ponto de ancoragem de Mtr4 ao *core* do complexo. Estas proteínas foram fusionadas a GST e sua interação testada com His-Nop53 (Fig 16A). Como controle negativo, utilizamos GST. O extrato total (Input) das cepas *E. coli* BL21 (DE3)-RIL expressando as fusões com GST foi incubado com resina glutationa-sepharose. O *flow-through* (FT) foi coletado e após lavagem, a resina foi incubada com o extrato total contendo His-Nop53. Após coleta do FT e lavagens extensivas, a eluição foi realizada com glutationa reduzida. As frações coletadas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por *western blot* com anticorpos anti-GST e anti-His. Os resultados apresentados na Figura 16A mostram, como esperado, que Nop53 não é copurificada com o controle negativo GST. Observamos que Nop53 não interage com a subunidade catalítica Rrp44, mas com o cofator nuclear do exossomo Mpp6.

Esta observação é consistente com a proximidade de Mpp6 à Rrp6 e Mtr4, todas acima do *cap* do exossomo, indicando que Nop53 possui nesta região outros pontos de interação, mas não na extremidade oposta do exossomo, na saída do canal hexamérico ocupada por Rrp44.

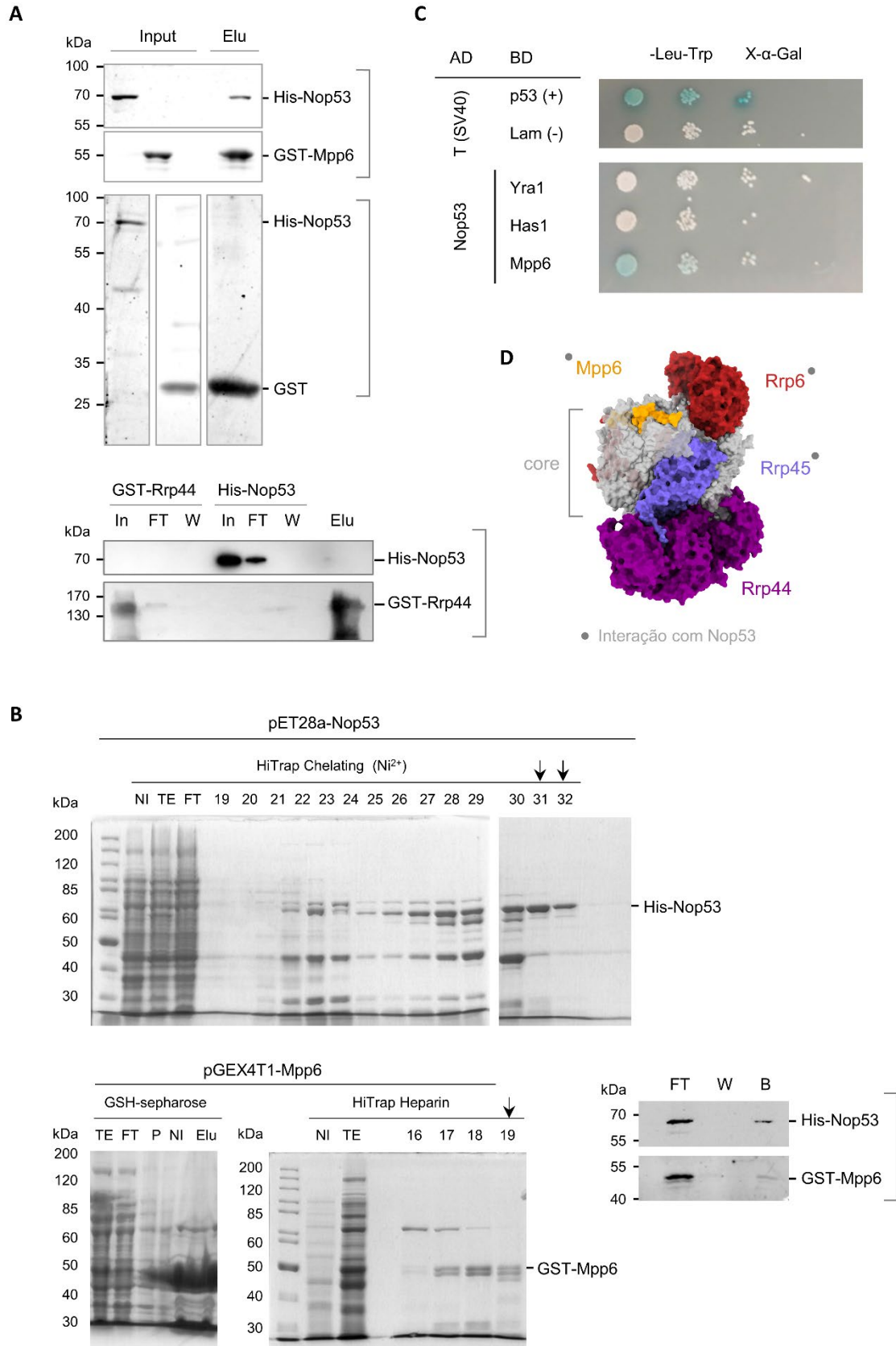


Figura 16. Interação de Nop53 com o cofator do exossomo Mpp6. (A) Ensaios de *pull down* para avaliação da interação de His-Nop53 com Rrp44 e Mpp6 fusionadas a GST. Extrato total de *E. coli* expressando as proteínas de fusão foram incubados em resina de GSH-sepharose. A eluição foi realizada com glutatona reduzida. GST foi usada como controle negativo. Frações do Input, eluição (Elu), lavagem (W) e *flow-through* (FT) foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por *western blot* com os anticorpos indicados. (Colchetes indicam resultados de um mesmo gel) (B) Avaliação da interação de Nop53 com Mpp6 usando proteínas de expressão heteróloga purificadas. À esquerda, análise por SDS-PAGE e coloração com *Coomassie Blue* das etapas de purificação de His-Nop53 e GST-Mpp6. (NI: expressão não induzida; P: *pellet* do processo de clarificação do extrato total, TE: extrato total clarificado com expressão induzida, FT: *flow-through*) Setas indicam as frações que foram concentradas e utilizadas no ensaio de interação em resina GSH-sepharose. À direita, análise por SDS-PAGE e *western blot* do *pull down* com proteínas purificadas (*flow-through* (FT), lavagem (W), e eluição desnaturante (B - *beads*) a 95°C). (C) Avaliação da interação de Nop53 com Mpp6 por ensaio de duplo híbrido. (AD: domínio de Gal4 de ativação da transcrição. BD: domínio de Gal4 de ligação a DNA). A ativação do gene repórter α -galactosidase (MEL1) foi testada em placas com meio mínimo (YNB Glu -Leu, -Trp) suplementadas com seu substrato incolor e cromogênico X- α -Gal. Na parte superior, o controle positivo [AD-T(SV40) x BD-p53(*M. musculus*)] ativa a expressão de MEL1 que gera o produto de coloração azul, o qual não é detectado no controle negativo [AD-T (SV40) x BD-lamina C (*H. sapiens*)]. Na parte inferior, teste de interação entre AD-Nop53 e as proteínas indicadas (fusionadas a BD). A placa foi mantida a 30°C e o registro realizado 2 dias após a diluição seriada. Apesar de cortados, para facilitar a visualização, os resultados provêm da mesma placa e mesma foto. (D) Estrutura do exossomo (PDB ID: 5VZJ) Exo12 (core + Rrp44, Rrp6 e Mpp6) destacando em cores os componentes cuja interação com Nop53 já foram testadas (Mtr3 na face oposta não é mostrada). A interação do exossomo com Nop53 é mediada por subunidades (destacadas por um ponto) que compõem uma mesma face do complexo.

Para confirmar a interação direta de Nop53 com Mpp6, realizamos o mesmo ensaio de *pull down* com proteínas purificadas (Fig. 16B). Isso nos permitiu observar que Nop53 e Mpp6 estabelecem uma interação fraca e sensível à concentração de sal. Consistente com esta observação, o ensaio de duplo híbrido (Fig. 16C) realizado com Mpp6 fusionada ao domínio de Gal4 de ligação ao DNA (BD-Mpp6) e com Nop53 fusionada ao domínio de Gal4 de ativação da transcrição (AD-Nop53) levou à ativação da expressão de apenas um gene repórter (MEL1: α -galactosidase que hidrolisa o substrato cromogênico X- α -GAL em um produto azul).

Estes resultados foram complementados pelo trabalho de mestrado de L. P. Cepeda que mostrou que a região N-terminal de Nop53 é responsável pela interação com Rrp6, além de revelar a interação de Nop53 com o componente do *core* Rrp45 (Cepeda et al., 2019). Como destacado na estrutura do exossomo na Figura 16D, Mpp6, Rrp45, bem como parte de Rrp6 e Mtr4 ocupam uma mesma face do exossomo, levando-nos a propor um modelo, segundo o qual, através destas interações adicionais, Nop53 seria capaz de estabilizar e posicionar corretamente o exossomo durante o dinâmico processo de clivagem do pré-rRNA 7S.

4.2. Efeito da depleção de Nop53 no exossomo

O fato de Nop53 atuar como uma ponte entre o exossomo e o pré-60S nos levou a questionar qual seria o impacto de sua depleção neste complexo enzimático. Focando em Rrp6, com a qual Nop53 interage diretamente, analisamos em detalhes o efeito da depleção de Nop53 na expressão, localização subcelular, perfil de sedimentação e interactoma desta subunidade catalítica do exossomo.

4.2.1 Nível de expressão de Rrp6 não é afetado pela depleção de Nop53

Inicialmente, obtivemos a cepa condicional $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53, na qual a expressão de GFP-NOP53 é regulada por um promotor sensível à doxiciclina (Tet-Off). Neste sistema (Fig. 17A), com a adição de doxiciclina, o transativador transcricional tTA (tetR de *E. coli* fusionado ao domínio de ativação da transcrição da proteína VP16 de HSV) não se liga ao elemento de resposta à tetraciclina (TRE) do promotor, havendo repressão da expressão do gene alvo.

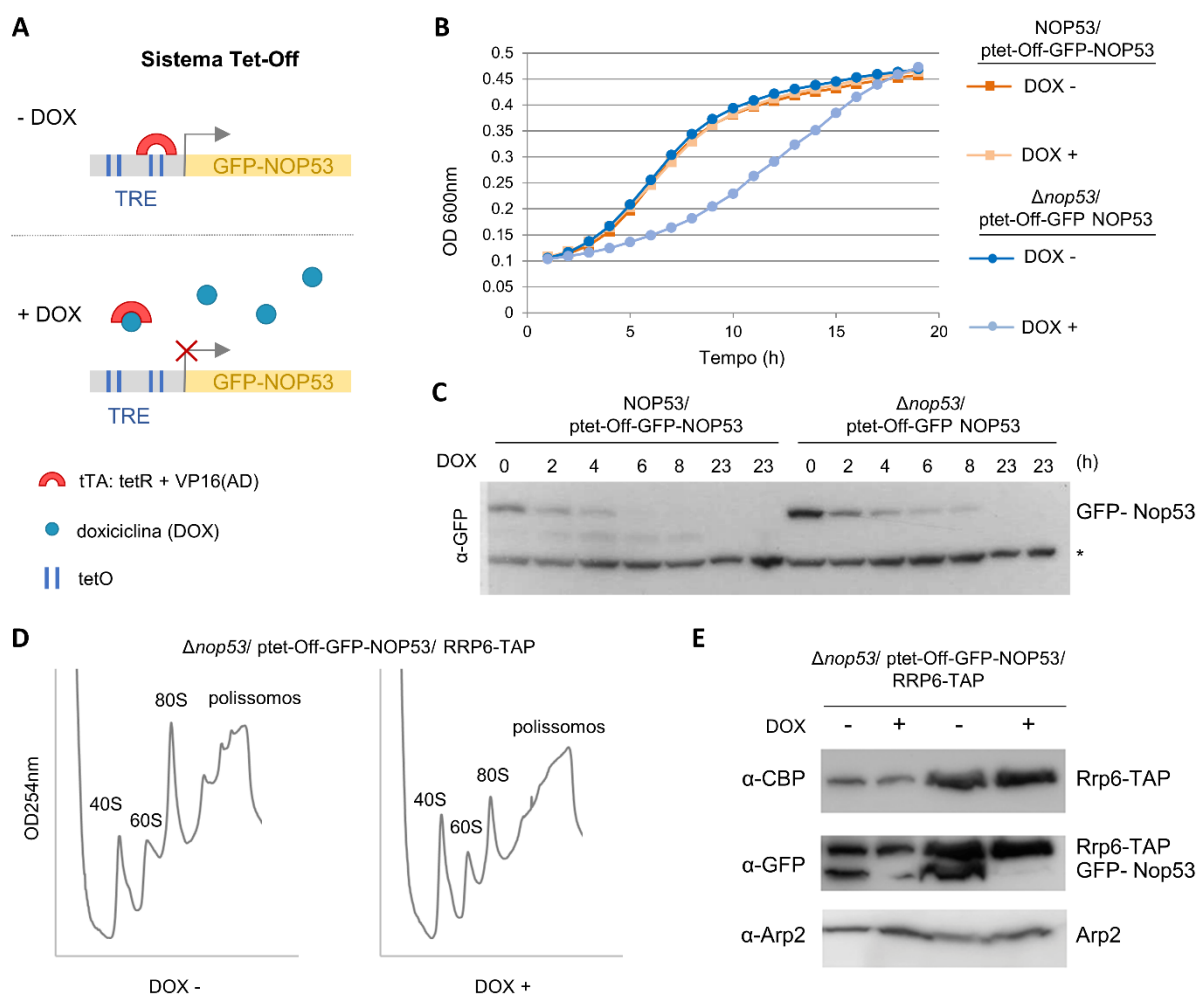


Figura 17. Expressão da subunidade catalítica Rrp6 não é afetada pela depleção de Nop53. (A) Esquema do sistema Tet-Off utilizado para regular a expressão de GFP-NOP53. (TRE: elemento de resposta à tetraciclina; tTA: transativador de tetraciclina; tetR: repressor; VP16(AD): domínio de ativação da transcrição de VP16 de HSV; tetO: sítio operador; DOX: doxiciclina) (B) Curva de crescimento de $\Delta nop53$ e da cepa isogênica selvagem NOP53 (BY4741), ambas transformadas com ptet-OFF-GFP-NOP53 e cultivadas na presença e ausência de doxiciclina (1,5 μ g/mL) a 30°C. (C) Análise por SDS-PAGE e *western blot* do perfil de expressão no extrato total de GFP-Nop53, regulado pelo sistema Tet-Off, após diferentes tempos de tratamento com doxiciclina (1,5 μ g/mL) a 30°C. (D) Análise do perfil de polissomos da cepa $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53/RRP6-TAP integrada no genoma, cultivada em meio mínimo com e sem doxiciclina (1,5 μ g/ml) por 18h. O extrato total foi separado em gradiente de sacarose 7-47% por ultracentrifugação e o perfil foi obtido por detecção UV (OD_{254nm}). (E) Análise do efeito da depleção de Nop53 na expressão de Rrp6-TAP. Extrato total da cepa $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53/RRP6-TAP cultivada em meio mínimo com e sem doxiciclina (1,5 μ g/ml) por 18h foi analisado em duas replicatas por SDS-PAGE e *western blot* com os anticorpos indicados.

Na Figura 17C, observamos, como esperado, que a suplementação com doxiciclina foi suficiente para depletar significativamente os níveis da proteína de fusão GFP-Nop53, a qual mostrou-se capaz de complementar o crescimento da cepa $\Delta nop53$. A análise das curvas de crescimento (Fig. 17B) mostra ainda que o tratamento com doxiciclina não teve efeito detectável no crescimento celular da cepa selvagem isogênica NOP53, mas sim no da cepa condicional $\Delta nop53$, indicando ser a depleção de Nop53, e não a doxiciclina, responsável pelo fenótipo observado. Consistente com o papel de Nop53 como fator de montagem da subunidade 60S, a depleção de Nop53 nesta cepa também se mostrou suficiente para afetar o perfil de polissomos (Fig. 17D). Para avaliar o efeito desta depleção em Rrp6, fusionamos à extremidade C-terminal de RRP6 o TAP *tag* (*tandem affinity purification*) por integração genômica, tendo em vista não apenas à detecção de Rrp6 endógena por *western blot*, mas também sua utilização em ensaios de coimunoprecipitação. É importante notar que Gonzales-Zubiate *et al.* (2017) mostraram ser a fusão Rrp6-TAP funcional e capaz de copurificar os demais componentes do exossomo, além de carioferinas associadas ao seu transporte nuclear. Na Figura 17E, a análise por *western blot* do extrato proteico total da cepa $\Delta nop53$ /ptet-Off-GFP-Nop53/RRP6-TAP cultivada em meio mínimo com glicose, com ou sem adição de doxiciclina, nos permitiu confirmar que a depleção de Nop53 não afeta significativamente os níveis de expressão de Rrp6-TAP.

4.2.2 A depleção de Nop53 afeta o interactoma de Rrp6

Utilizando a cepa $\Delta nop53$ /ptet-Off-GFP-NOP53/ RRP6-TAP, foi possível avaliar o impacto de Nop53 no interactoma de Rrp6. Para tanto, ensaios de coimunoprecipitação com Rrp6-TAP foram realizados em triplicata biológica a partir de células cultivadas com e sem depleção de Nop53, induzida por doxiciclina (Figs. 18A,B). Como controle, utilizou-se a cepa condicional $\Delta nop53$ /ptet-Off-GFP-NOP53 expressando o TAP *tag* não-fusionado (TAP vazio). Todas as amostras foram processadas em conjunto e as eluições submetidas a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas (LC-MS/MS). A análise dos espectros de massas, bem como a filtragem e análise estatística dos dados quantitativos foram feitas utilizando o software *PatternLab for Proteomics* (4.1.1.4).

Na Figura 18C, as proteínas identificadas em pelo menos duas replicatas biológicas para cada condição (presença e depleção de Nop53) são apresentadas em um diagrama de Venn (Fig. 1B) juntamente com o controle negativo. Do total de 403 proteínas, 94 foram identificadas na eluição com Rrp6-TAP, mas não com o controle negativo (TAP vazio). Destas, 47 foram detectadas exclusivamente com a depleção de Nop53 e 2 exclusivamente na presença de Nop53. Deve-se

ressaltar que Nop53 foi identificada entre as proteínas exclusivamente coimunoprecipitadas com Rrp6-TAP (Fig. 1B), o que é consistente com a interação direta previamente caracterizada de Nop53 com Rrp6 (Granato et al., 2008). O resultado mais interessante a partir destes dados, no entanto, foi a detecção de fatores de montagem de intermediários pré-60S nucleolares, bem como componentes do 90S/SSU processado coimunoprecipitados e enriquecidos com Rrp6 após depleção de Nop53.

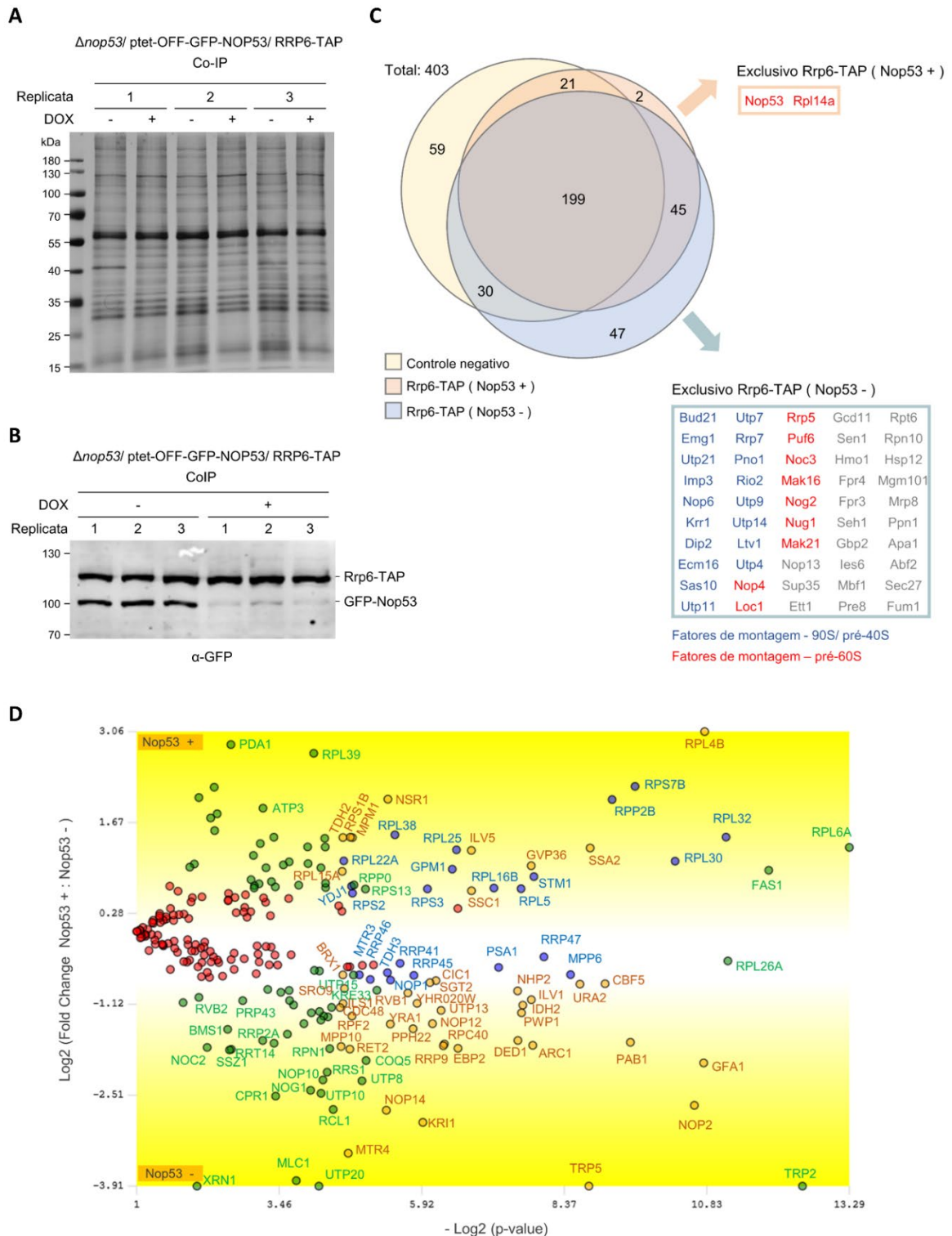


Figura 18. A depleção de Nop53 afeta o interactoma de Rrp6. Ensaios de coimunoprecipitação com Rrp6-TAP expressa na cepa condicional $\Delta nop53/ptet$ -Off-GFP-NOP53 cultivada tanto na presença (doxiciclina -) quanto ausência (doxiciclina +) de Nop53. Uma alíquota de cada eluição foi separada por SDS-PAGE e analisada por (A) coloração com nitrato de prata e (B) *western blot* com anti-GFP. (C) As triplicatas biológicas, incluindo o controle negativo (TAP tag não fusionado), foram submetidas a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os resultados analisados e filtrados com o software *PatternLab for Proteomics* (4.1.1.4) mostram para cada condição testada o número de proteínas identificadas em pelo menos duas replicatas biológicas. Dentre as proteínas não identificadas no controle negativo, 2 foram exclusivamente identificadas com Rrp6-TAP na presença de Nop53 (+), e 47 exclusivamente com a depleção de Nop53 (-). A lista destas proteínas é apresentada, destacando-se em cores os fatores de montagem das partículas pré-ribossomais. (D) As proteínas coimunoprecipitadas com Rrp6, que foram identificadas tanto na presença quanto ausência de Nop53, foram comparadas através de uma análise TFold (p-value ajustado BH: q-value 0,05; F-Stringency: 0,070; L-Stringency: 0,400) usando o software *PatternLab for Proteomics* (4.1.1.4). O *volcano plot* mostra para cada proteína identificada os valores de $\log_2(\text{Fold change Nop53 + : Nop53 -})$ e $-\log_2(\text{p-value})$. As extremidades superior e inferior do gráfico apresentam proteínas coimunoprecipitadas com Rrp6 em níveis respectivamente diminuídos e aumentados após depleção de Nop53. Dentre as 244 proteínas analisadas, 104 não apresentaram mudança estatisticamente significativa após a depleção de Nop53 (pontos vermelhos), 74 (pontos verdes) atenderam os critérios de *fold change*, mas estas mudanças não são estatisticamente significativas, 43 são proteínas de baixa abundância que atenderam ao critério de *fold change* e aos critérios estatísticos (pontos laranja) e 23 proteínas satisfizeram tanto os critérios de *fold change*, quanto o *cut off* estatístico (pontos azuis).

Para as proteínas identificadas na eluição de Rrp6 em ambas as condições (presença e ausência de Nop53) em pelo menos duas replicatas biológicas, a comparação quantitativa foi feita através de uma análise TFold (Carvalho et al., 2012b). Essencialmente, este algoritmo do software *PatternLab for Proteomics* realiza um teste-t e estabelece um *cut-off* de *fold change* [Nop53 + / Nop53 -] variável em função do *p-value* obtido, visando maximizar a identificação de diferenças estatisticamente significativas, além de limitar falsos-positivos com base em um *cut-off* de FDR. Na Figura 18D, o *volcano plot* aponta a existência de proteínas coimunoprecipitadas com Rrp6 com diferenças estatisticamente significativas entre as duas condições testadas. Enquanto pontos verdes (74) e vermelhos (104) não satisfazem o *cut off* de FDR, tanto pontos laranjas (43), que indicam proteínas com menor abundância nas amostras, quanto pontos azuis (23) apresentam diferenças estatisticamente significativas, satisfazendo também o *cut off* de *fold change*.

A função biológica destas proteínas com diferenças estatisticamente significativas (pontos laranja e azuis da Fig. 18D) é apresentada na Figura 19. Em consonância com o papel do exossomo nuclear, ao qual Rrp6 está associada, as proteínas coimunoprecipitadas, cujos níveis foram significativamente afetados pela depleção de Nop53, estão relacionadas principalmente à biogênese ribossomal. Notavelmente, tanto fatores de montagem da subunidade ribossomal 60S quanto componentes do 90S e pré-40S foram enriquecidos com Rrp6 após a depleção de Nop53. O fato de algumas proteínas-r de ambas subunidades terem sido copurificadas em níveis reduzidos pode refletir o impacto da depleção de Nop53 em estágios específicos da maturação de intermediários pré-ribossomais, embora possível contaminação com ribossomos maduros não possa ser excluída, impedindo atribuições inequívocas. É importante notar que componentes do exossomo também foram coimunoprecipitados com Rrp6, sugerindo, como esperado, que a

depleção de Nop53 não afeta a estabilidade do complexo. Dentre os cofatores do exossomo, destaca-se um significativo enriquecimento de Mtr4, indicativo de um aumento do recrutamento de Rrp6 para atividades de processamento e degradação mediados por esta helicase que, dentre outros, tem por alvo pré-rRNAs.

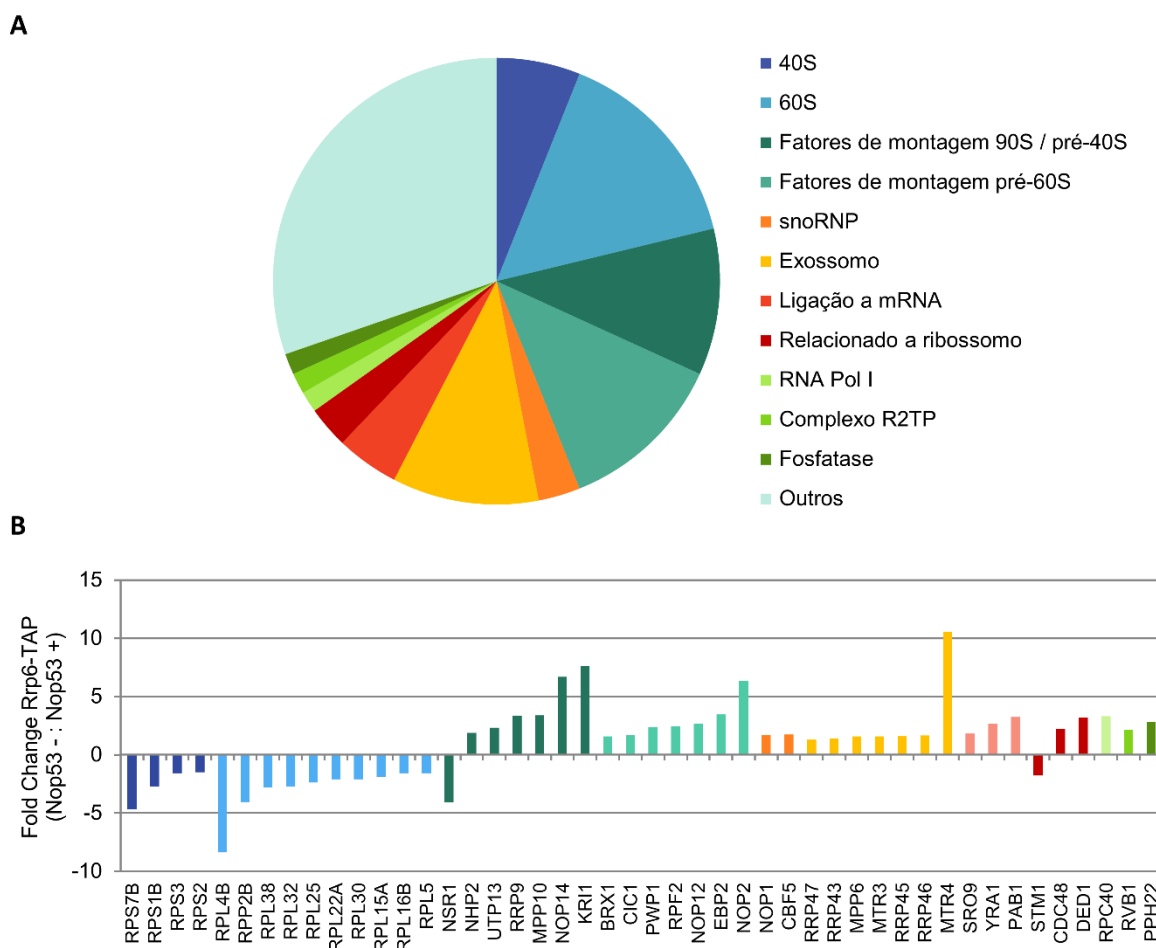


Figura 19. Com a depleção de Nop53, Rrp6 permanece associada ao core do exossomo e aumenta significativamente a associação a componentes de partículas pré-ribossomais. Análise das proteínas coimunoprecipitadas com Rrp6-TAP, que apresentaram, na ausência de Nop53, uma mudança estatisticamente significativa (pontos laranja e azuis na Fig.18 D). **(A)** Classificação da sua função biológica, revelando dentre os grupos mais representativos, componentes das subunidades ribossomais e fatores de montagem **(B)** Valores de *fold change* (Nop53 - : Nop53 +) destas proteínas agrupadas de acordo com sua função biológica. Dentre as proteínas com níveis mais aumentados na ausência de Nop53, destacam-se fatores de biogênese ribossomal. Componentes do exossomo foram identificados levemente enriquecidos, com destaque para a RNA helicase Mtr4.

Para avaliar se este efeito da depleção de Nop53 é verificado exclusivamente com Rrp6, ou se o complexo exossomo estaria sendo retido em partículas pré-ribossomais, experimentos similares foram realizados por L. P. Cepeda com a cepa $\Delta nop53/tet\text{-}Off\text{-}GFP\text{-}NOP53$ expressando Rrp43-TAP. Os resultados (não mostrados) apontaram que a subunidade do core do exossomo Rrp43 também copurificou mais fatores do pré-60S, 90S e pré-40S após a depleção de Nop53, indicando que o core do exossomo, juntamente com Rrp6, estariam retidos em partículas pré-ribossomais mais iniciais (Cepeda et al., 2019).

A análise dos fatores de montagem das partículas pré-ribossomais que tiveram seus níveis aumentados em associação com o exossomo após a depleção de Nop53 nos permitiu identificar os estágios específicos da maturação ribossomal mais enriquecidos (Fig. 20). Para a subunidade 40S, como esperado, poucos fatores de montagem tardios (Ltv1, Rio2) foram enriquecidos. A maioria dos componentes do 90S e pré-40S identificados corresponde a fatores de montagem nucleolares iniciais recrutados co-transcricionalmente (como Pol5, Kri1, Nop6), incluindo inúmeros componentes do 5'ETS (como Utp9, Mpp10, Sas10), o que é consistente com o papel já descrito do exossomo na degradação deste espaçador para a reciclagem dos fatores de montagem iniciais (Fig. 7B). Curiosamente, vários fatores do 90S/SSU processomo (como Nop14, Krr1, Kre33, Pno1 e Emg1) também foram encontrados enriquecidos nas amostras, sugerindo uma associação do exossomo à própria partícula 90S, anteriormente à liberação do 5'ETS, que ocorre após as clivagens endonucleolíticas em A₀ e A₁ formando extremidades 3' livres que são alvo do exossomo. A própria RNA helicase Dhr1, que está diretamente envolvida na transição entre o 90S e o pré-40S (Sardana et al., 2015), auxiliando na dissociação do snoRNA U3, também foi identificada, reforçando a hipótese de que o exossomo estaria associado ao 90S antes e durante a liberação do pré-40S do arcabouço 5'ETS.

Outra observação igualmente interessante proveio da análise dos fatores de montagem da subunidade 60S enriquecidos com Rrp6 e Rrp43 após a depleção de Nop53 (Fig. 20). Destacam-se fatores nucleolares/nucleares constituintes da partícula Nog2 (Cic1, Nog1, Nug1, Nog2, Rpf2 e Rlp24) à qual o exossomo sabidamente se associa para processar o pré-rRNA 7S, dos quais a maioria (Cic1, Nog1, Nug1, Rpf2 e Rlp24) também compõe intermediários pré-60S anteriores dificultando uma atribuição inequívoca. Outros fatores de montagem, entretanto, sugerem de forma mais clara uma associação do exossomo a intermediários anteriores, como é o caso de componentes encontrados exclusivamente nos intermediários pré-60S nucleolares mais iniciais (como Rrp5, Mak21, Nop4). Notavelmente, vários fatores de montagem que compõem estágios nucleolares anteriores (estados A-E) ao recrutamento de Nop53 encontraram-se entre os mais enriquecidos. Estes fatores do estado E (Noc3, Brx1, Nop2, Ebp2, Has1 e Nop2) precisam ser liberados para permitir a subsequente formação da partícula Nog2. Esse remodelamento composicional coincide com a saída do pré-60S do nucléolo para o nucleoplasma. Fatores de montagem tardios, por sua vez, incluindo os exclusivamente citoplasmáticos, não foram enriquecidos com a depleção de Nop53. De modo geral, estes resultados convergem, sugerindo fortemente uma associação precoce do exossomo durante a maturação do 90S/pré-40S e pré-60S.

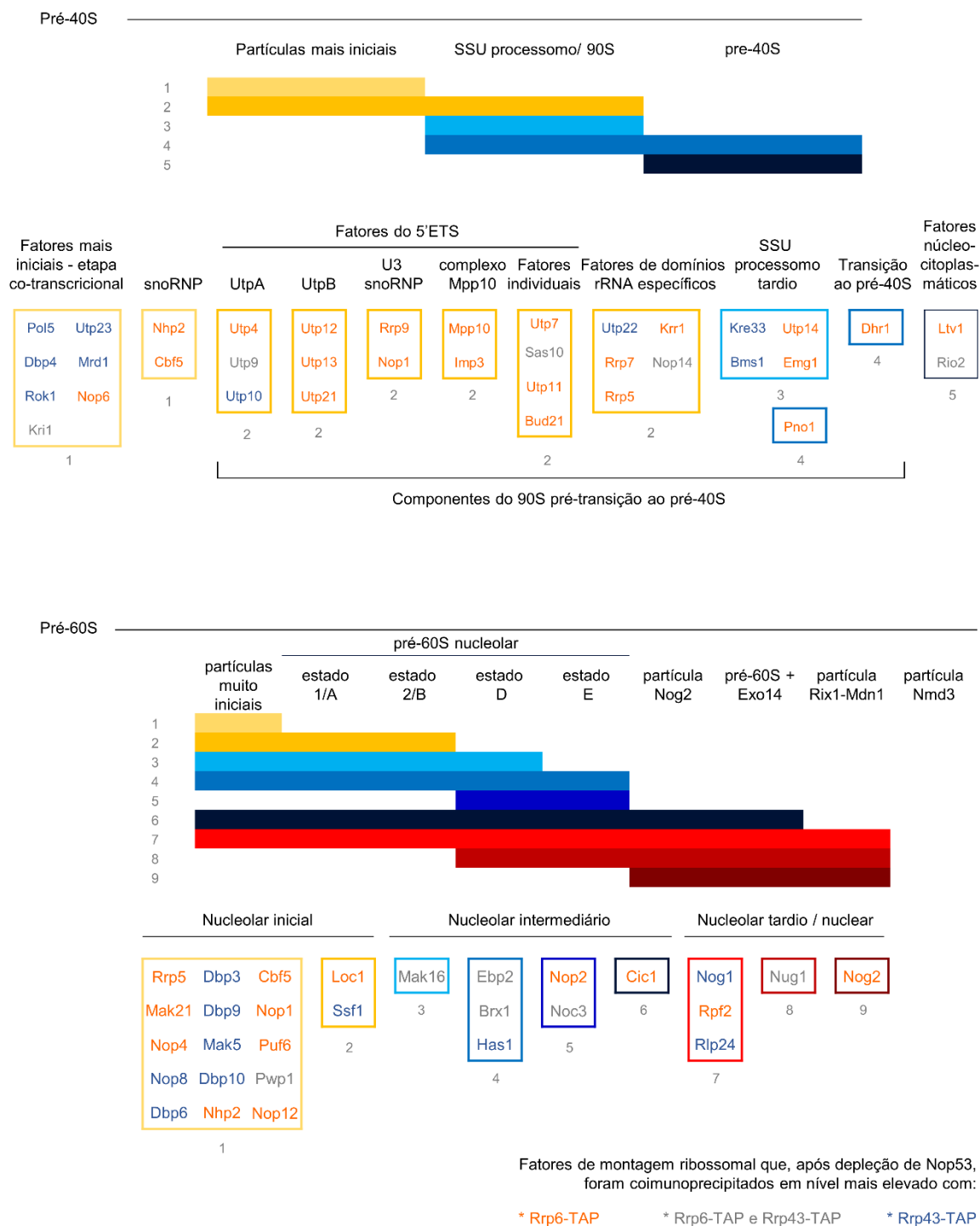


Figura 20. Classificação dos fatores de montagem ribossomal coimunoprecipitados com subunidades do exossomo em níveis aumentados após depleção de Nop53. Representação esquemática das vias de biogênese das subunidades ribossomais 40S e 60S. Os fatores de montagem enriquecidos com Rrp6-TAP, Rrp43-TAP ou ambos, após depleção de Nop53, são ordenados e classificados de acordo com o estágio de maturação do qual participam. A classificação foi baseada em Klinge e Woolford (2019).

Em consonância com estes resultados, a depleção de Nop53 não afetou a localização subcelular de Rrp6 fusionada a GFP (Fig. 21A). Nesta condição, Rrp6 continua nuclear, estando concentrada no nucléolo, onde as partículas pré-ribossomais se formam. No nucléolo, Rrp6 e o exossomo poderiam se encontrar tanto livres quanto associados aos dinâmicos complexos pré-

ribossomais em formação. Avaliou-se então o perfil de sedimentação de Rrp6-GFP em gradiente linear de glicerol tanto na presença quanto ausência de Nop53. Para cada condição, após sedimentação do extrato total, 24 amostras foram coletadas do topo para o fundo do gradiente, e todas as frações ímpares precipitadas e analisadas por SDS-PAGE e *western blot*. Na Figura 21B observamos que, com a depleção de Nop53, não há aumento da fração livre de Rrp6, mas sim seu deslocamento do meio do gradiente (pico em canaletas 15-16) para frações mais densas (pico em canaletas 17-18), que cossedimentam com a proteína-r Rpl5 (uL18) da subunidade 60S. Estas observações, consistentes com os dados de proteômica, indicam que, com a depleção de Nop53, Rrp6 continua associada ao exossomo (13-17) e a complexos de grande massa molecular encontrados na porção pré-ribossomal/ribossomal do gradiente.

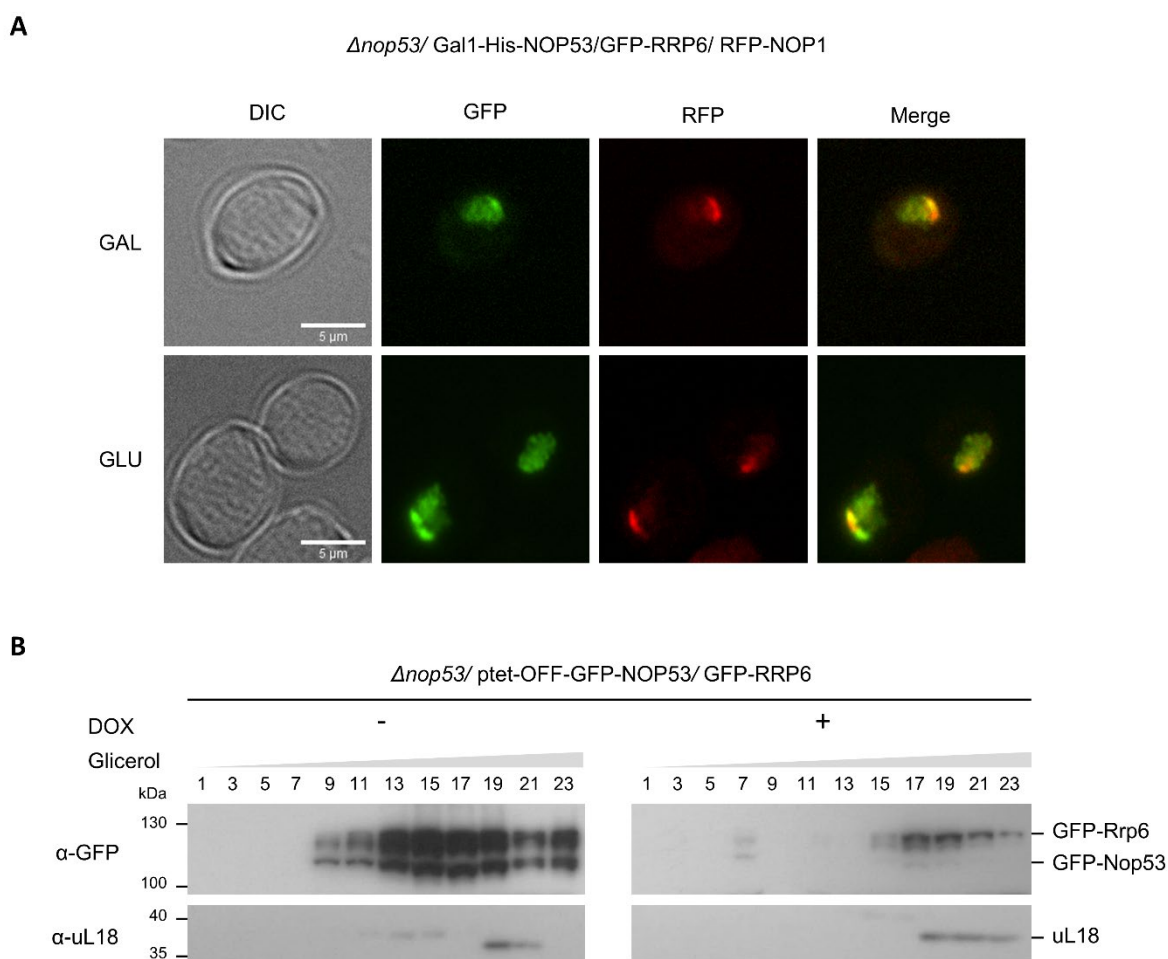


Figura 21. Efeito da depleção de Nop53 na localização subcelular e no perfil de sedimentação de Rrp6. (A) Análise por microscopia de fluorescência da localização subcelular de GFP-Rrp6 e do marcador nucleolar Nop1-RFP expressos na cepa $\Delta nop53$ /pGAL1-His-NOP53 cultivada em galactose (Nop53 +) e glicose (Nop53 -). *Merge* indica a sobreposição dos sinais de Rrp6 e Nop1. Rrp6 continua concentrada no núcleo e nucléolo após depleção de Nop53. (Barra de escala: 5μm; DIC: contraste de interferência diferencial) (B) Perfil de sedimentação de GFP-Rrp6 expressa na cepa $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53 cultivada em meio mínimo com e sem doxiciclina (1,5μg/ml) por 18h. Extrato proteico total aplicado sobre gradiente linear de glicerol 10-30% foi separado por ultracentrifugação a 40000 rpm por 16h a 4°C. 24 alíquotas foram coletadas a partir do topo. Todas as alíquotas ímpares foram precipitadas e analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com os anticorpos indicados. Com a depleção de Nop53, Rrp6 encontra-se associada a complexos de alta massa molecular e cossedimenta com a proteína-r uL18.

Ensaio similares e complementares realizados por L.P. Cepeda para outros componentes do exossomo são coerentes com estas observações, confirmando a retenção do exossomo em complexos de grande massa molecular na ausência de Nop53 (Cepeda et al., 2019).

Para melhor caracterizar o efeito da depleção de Nop53 e confirmar a hipótese de seu impacto na associação do exossomo a intermediários pré-ribossomais, analisou-se em duplicata biológica o RNA coimunoprecipitado com Rrp6-TAP utilizando-se a mesma cepa condicional $\Delta nop53/RRP6-TAP/ptet-OFF-GFP-NOP53$ e as mesmas condições de crescimento empregadas na análise proteômica. Corroborando os dados apresentados anteriormente, o *northern blot* realizado com diferentes sondas mostrou que Rrp6 copurificou, após depleção de Nop53, maior nível de diversos pré-rRNAs, incluindo componentes de partículas pré-ribossomais mais iniciais (Fig. 22), como o 35S e o 32S.

O enriquecimento de 27S, sobretudo 27A₂/A₃, foi maior que o de 7S, reforçando a associação do exossomo a intermediários pré-60S anteriores à partícula Nog2. Curiosamente, apesar da depleção de Nop53 não levar a um significativo acúmulo de 23S (como observado na canaleta de extrato total), verificou-se nesta condição maior coimunoprecipitação de pré-rRNA 23S com Rrp6 (Figs. 22A,C). Este intermediário de processamento é gerado por clivagem prematura no sítio A₃ em condições de crescimento celular lento, sendo normalmente um substrato para degradação pelo exossomo, mas podendo também gerar rRNA 18S maduro (Allmang et al., 2000; Ferreira-Cerca et al., 2007; Talkish et al., 2016; Kos-Braun et al., 2017). Como o 23S compõe o SSU processomo/ 90S, esta observação é totalmente coerente com os achados da análise proteômica, indicando que o exossomo se associa a este intermediário pré-ribossomal antes da liberação da partícula 5'ETS. É importante notar que o snoRNA U3 que faz parte da partícula 5'ETS e do 90S também se encontrou enriquecido com Rrp6 (Figs. 22A,C). Restaria definir se o exossomo, nesta condição, é recrutado para degradação do pré-rRNA 23S ou para seu processamento, aguardando a liberação da extremidade 3' do 5'ETS.

Consistente com os resultados deste trabalho e com nosso modelo de associação do exossomo aos intermediários pré-ribossomais nucleolares mais iniciais, estudos recentes resolveram por crio-EM a estrutura do exossomo acoplado ao 90S, mostrando que, de fato, o recrutamento do exossomo antecede a clivagem em A₁ e que o processamento do 5'ETS se dá sem sua prévia separação da partícula pré-ribossomal.

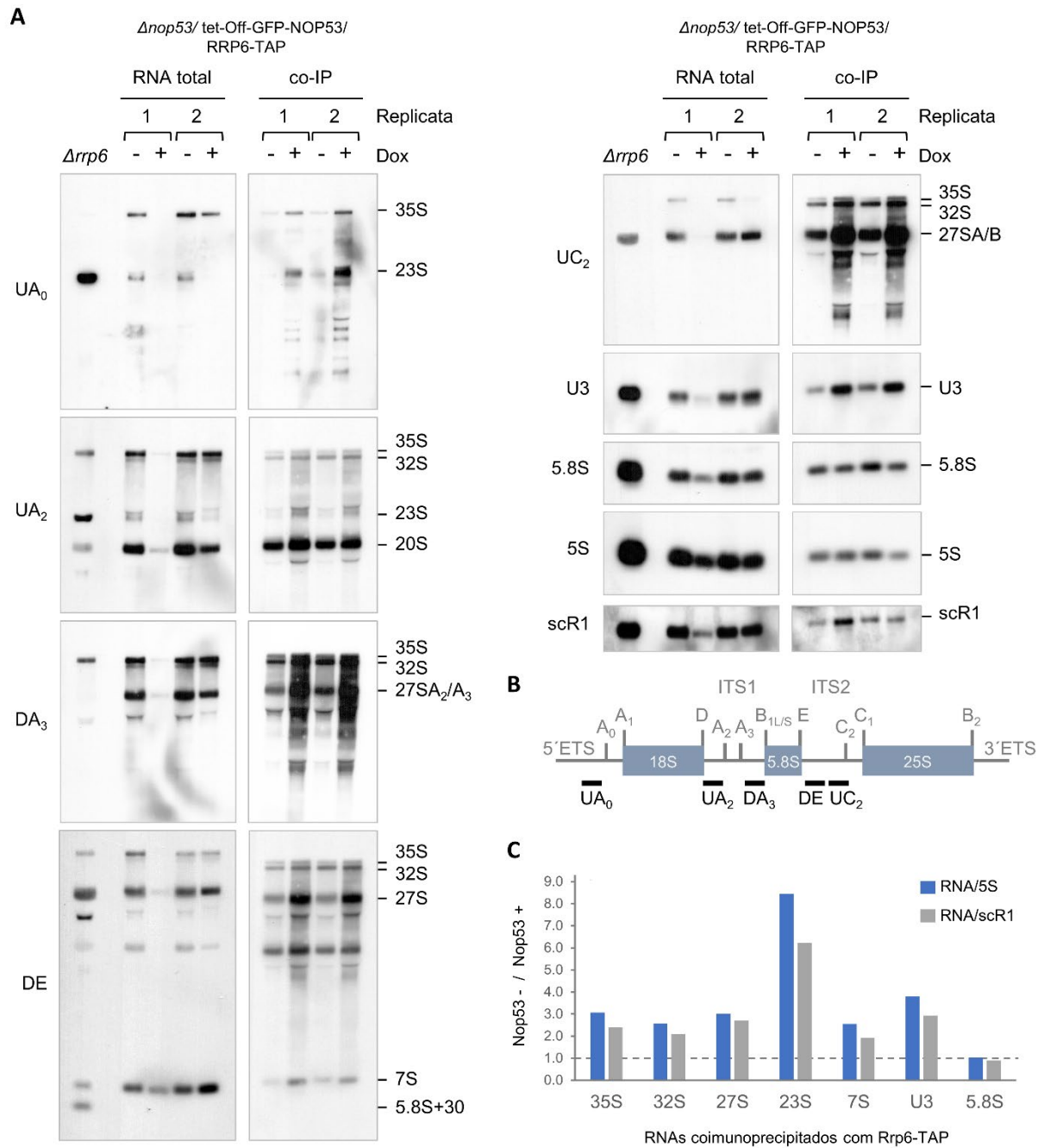


Figura 22. Rrp6 coimunoprecipita pré-rRNAs de estágios nucleolares iniciais de maturação das subunidades ribossomais. (A) Análise por *Northern blot* dos RNAs coimunoprecipitados (co-IP) com Rrp6-TAP em duas replicatas biológicas na presença (Dox-) e ausência (Dox+) de Nop53. O RNA total das células utilizadas nos ensaios de coimunoprecipitação também foi analisado. A cepa $\Delta rrp6$ foi utilizada como controle para o pré-rRNA 5.8S+30, que acumula na ausência de Rrp6. Os RNAs foram separados por eletroforese em gel de agarose e analisados por hibridização com sondas específicas biotinizadas e detecção por quimioluminescência. As sondas empregadas são indicadas ao lado esquerdo, e os RNAs identificados ao lado direito. scr1 foi utilizado como controle. (Menor quantidade de material foi carregado na canaleta RNA total 1 Dox+) (B) Representação esquemática do pré-rRNA 35S com seus sítios de clivagem, indicando as posições de hibridização das diferentes sondas empregadas (D: *downstream*, U: *upstream*). (C) Variação no nível dos RNAs copurificados com Rrp6 (Nop53^{-/-} / Nop53^{+/+}) baseada na quantificação das bandas realizada com ImageJ®, usando scr1 ou 5S para normalização.

4.3 Interações e modificações pós-traducionais de Nop53

Apesar da função bem descrita de Nop53 no processamento do pré-rRNA, pouco se sabe sobre o mecanismo de seu recrutamento nucleolar, de transporte nuclear, o papel de modificações pós-traducionais, bem como da sua interação com outros componentes nucleolares, nucleares e citoplasmáticos. Somente 40% de sua estrutura foi resolvida, e apenas no contexto do pré-60S, havendo inúmeros aspectos ainda pouco compreendidos. Abrangendo algumas destas questões, esta seção apresenta observações iniciais que podem contribuir para aprofundar a caracterização molecular de Nop53.

4.3.1 Mutantes pontuais de resíduos fosforilados de Nop53

Tanto a estrutura já descrita (Wu et al., 2016), quanto a predição estrutural (Fig. 23) das regiões ainda não resolvidas de Nop53 (Jumper et al., 2021) mostram a presença de alfa-hélices entremeadas por regiões intrinsecamente desordenadas. A flexibilidade conformacional e exposição dos resíduos de aminoácidos destas regiões podem favorecer a ocorrência de certas modificações pós-traducionais (Dyson e Wright, 2005). De fato, a maioria dos sítios de modificação pós-traducional, como fosforilação, são encontrados em regiões intrinsecamente desordenadas de proteínas alvo (Darling e Uversky, 2018; Bah e Forman-Kay, 2016; Dunker et al., 2002; Iakoucheva et al., 2004).

Um estudo com o ortólogo humano de Nop53, PICT1, sugeriu uma possível influência da fosforilação na sua localização nucleolar. O tratamento da linhagem celular HEK-293T com staurosporina, um inibidor competitivo de quinases inespecífico, levou ao acúmulo de PICT1 no nucleoplasma e redução do sinal nucleolar (Kalt et al., 2012).

Tendo em vista avaliar o possível impacto de modificações pós-traducionais na função de Nop53, resíduos alvo previamente detectados por espectrometria de massas em ensaios *high-throughput* foram buscados nos bancos de dados SGD (*Saccharomyces cerevisiae Database*) e BioGRID 4.4. Os resultados obtidos da busca estão descritos na Tabela 9, mostrando os 6 resíduos de serina fosforilados identificados por análises de fosfoproteômica. Comparativamente, o banco de dados *PhosphositePlus* (v.6.5.9.3 – acessado em Jun/2021) indica para o ortólogo humano PICT1 além de sítios de fosforilação de serina e treonina (em posições diferentes das observadas em levedura), metilação de arginina, acetilação de lisina e ubiquitinação. Deve-se notar que poucos estudos têm explorado o papel de modificações pós-traducionais de fatores de montagem durante a biogênese ribossomal (Strunk e Karbstein, 2009).

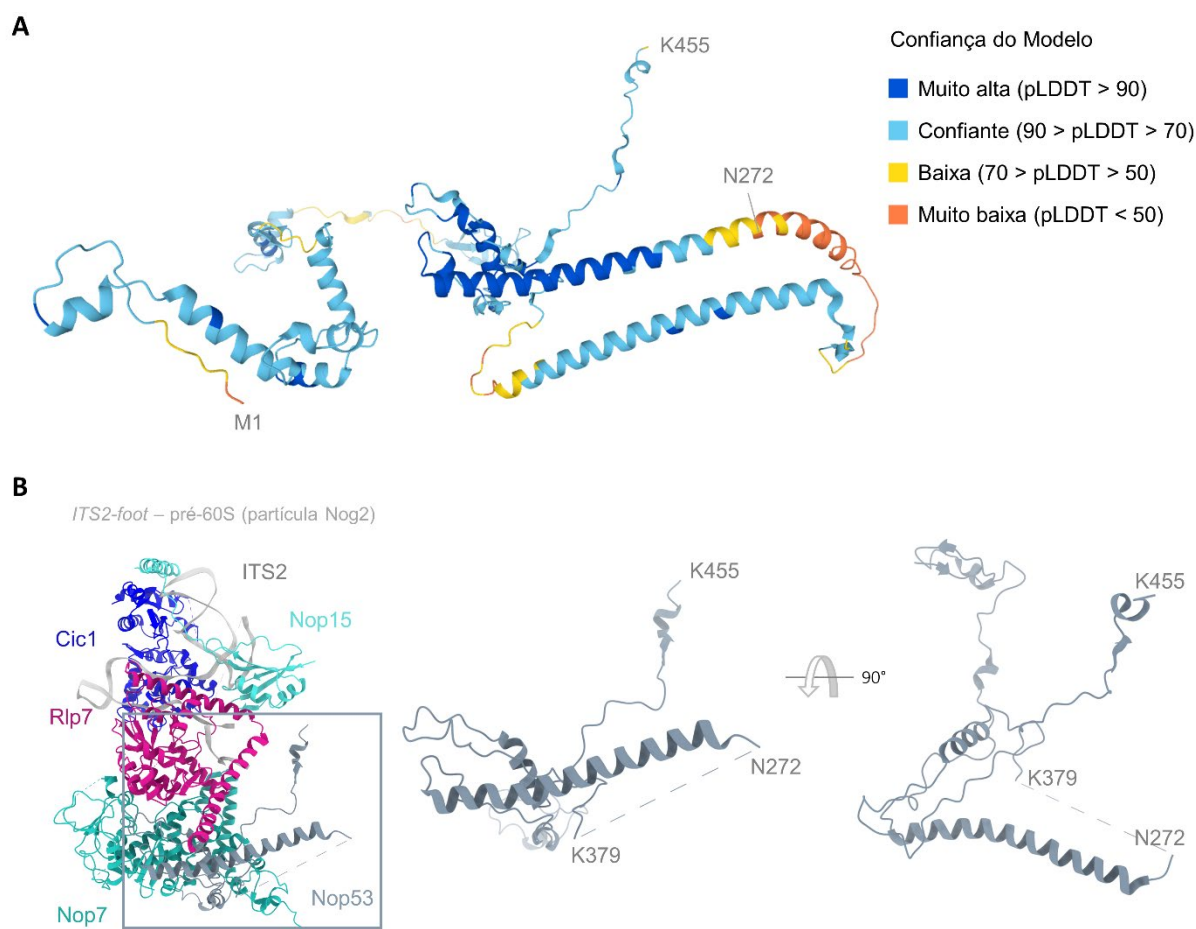


Figura 23. Predição estrutural de Nop53. (A) Predição da estrutura de Nop53 pelo programa AlphaFold v2.0 (DeepMind), atualizada em 01-Jul-2021, e disponível no AlphaFold *Protein Structure Database* (DeepMind, EMBL-EBI). Cores distintas indicam o grau de confiança do modelo. São apontados na estrutura os aminoácidos (M1, K455) das extremidades N- e C- terminal de Nop53 (pLDDT: *per residue confidence score*, cujo valor varia entre 0 e 100 e mede a acurácia local. Regiões com pLDDT < 50 podem ser desestruturadas quando isoladas). A estrutura predita revela uma topologia estendida de Nop53, com regiões desordenadas entremeadas por α -hélices (B) Estrutura de Nop53 no *ITS2-foot* resolvida na partícula Nog2 (PDB 3JCT).

Tabela 9. Sítios de fosforilação de Nop53 indexados nos bancos de dados SGD e BioGRID

Posição	Modificação pós-traducional	Resíduo	Banco de dados	Referência Bibliográfica
31	Fosforilação	S	SGD BioGRID	(Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013; Soulard et al., 2010; Soufi et al., 2009; Huber et al., 2009; Holt et al., 2009; Gnad et al., 2009; Albuquerque et al., 2008; Smolka et al., 2007)
173	Fosforilação	S	BioGRID	(Gnad et al., 2009; Soufi et al., 2009)

363	Fosforilação	S	BioGRID	(Gnad et al., 2009; Soufi et al., 2009)
367	Fosforilação	S	SGD	(Lanz et al., 2021)
403	Fosforilação	S	SGD	(Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013)
405	Fosforilação	S	BioGRID	(Lanz et al., 2021; Bodenmiller et al., 2010)

<http://www.yeastgenome.org/locus/S000006067/protein> (SGD acessado em Jun/2021)

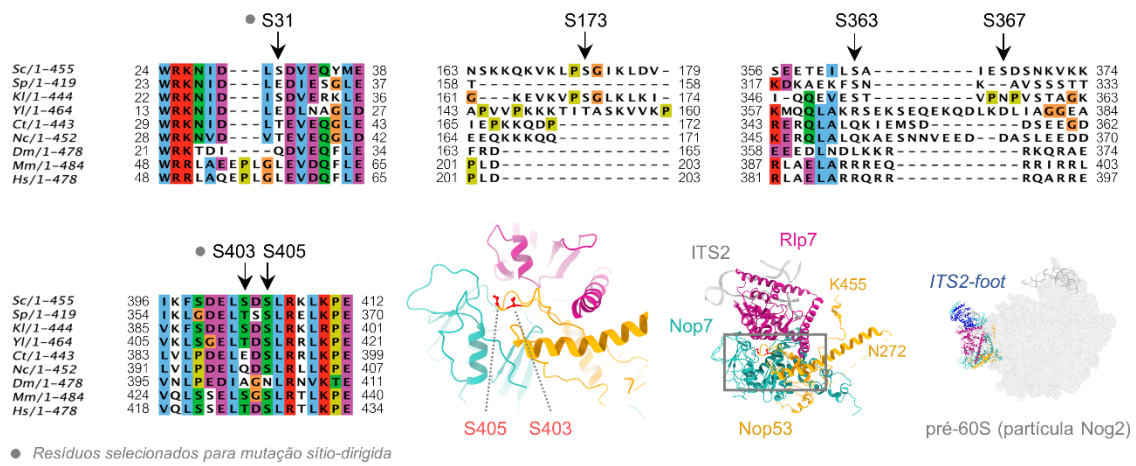
<https://thebiogrid.org/36037/summary/saccharomyces-cerevisiae/nop53.html> (BioGRID 4.4 acessado em Jun/2021)

O alinhamento múltiplo de sequências (Fig. 24A) revelou que dentre estes alvos de fosforilação, apenas os resíduos S403 e S405 são conservados evolutivamente. S31, embora não conservado, encontra-se em uma região altamente conservada na extremidade N-terminal de Nop53. Resolvemos então nos focar inicialmente nos resíduos S403 e S31, sendo este último selecionado não apenas pela vasta referência bibliográfica o apontando como sítio de fosforilação, mas principalmente por sua proximidade com o motivo AIM (aa. 60-64) de interação com Mtr4, envolvido no recrutamento do exossomo. Na estrutura de Nop53, resolvida na partícula pré-60S Nog2, S403 encontra-se em uma região desordenada próxima a alças do fator de montagem Nop7. S31, por sua vez, faz parte da extremidade N-terminal, cuja estrutura e posição no pré-60S ainda permanecem não caracterizados.

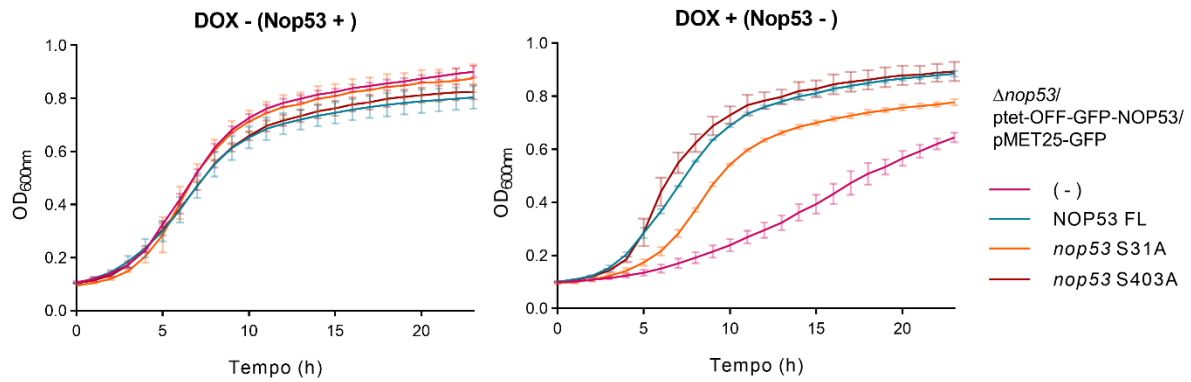
Para a análise funcional dos potenciais alvos de fosforilação S31 e S403, mutações sítio-dirigidas foram realizadas convertendo-os em alaninas (S31A e S403A). Estes mutantes pontuais de NOP53 foram clonados em plasmídeo, estando fusionados a GFP pela extremidade N-terminal, do mesmo modo que o controle positivo NOP53 selvagem (Figs. 24B-D). Como controle negativo, utilizou-se o vetor vazio expressando GFP. A cepa condicional $\Delta nop53/ptet$ -OFF-GFP-NOP53 foi então transformada com estes plasmídeos. Na Figura 24D, a expressão dos mutantes pontuais de Nop53 e controles foi confirmada por *western blot*.

Curvas de crescimento celular foram realizadas para avaliar a capacidade destes mutantes complementarem a depleção de Nop53. Para tanto, triplicatas biológicas das cepas foram cultivadas em meio mínimo com glicose com e sem adição de doxiciclina. Os resultados na Figura 24B mostram que ambos mutantes pontuais não apresentam fenótipo dominante negativo. Enquanto *nop53* S403A complementou totalmente o crescimento da cepa $\Delta nop53$, *nop53* S31A o complementou apenas parcialmente, podendo sugerir alguma implicação funcional deste resíduo ou de sua fosforilação.

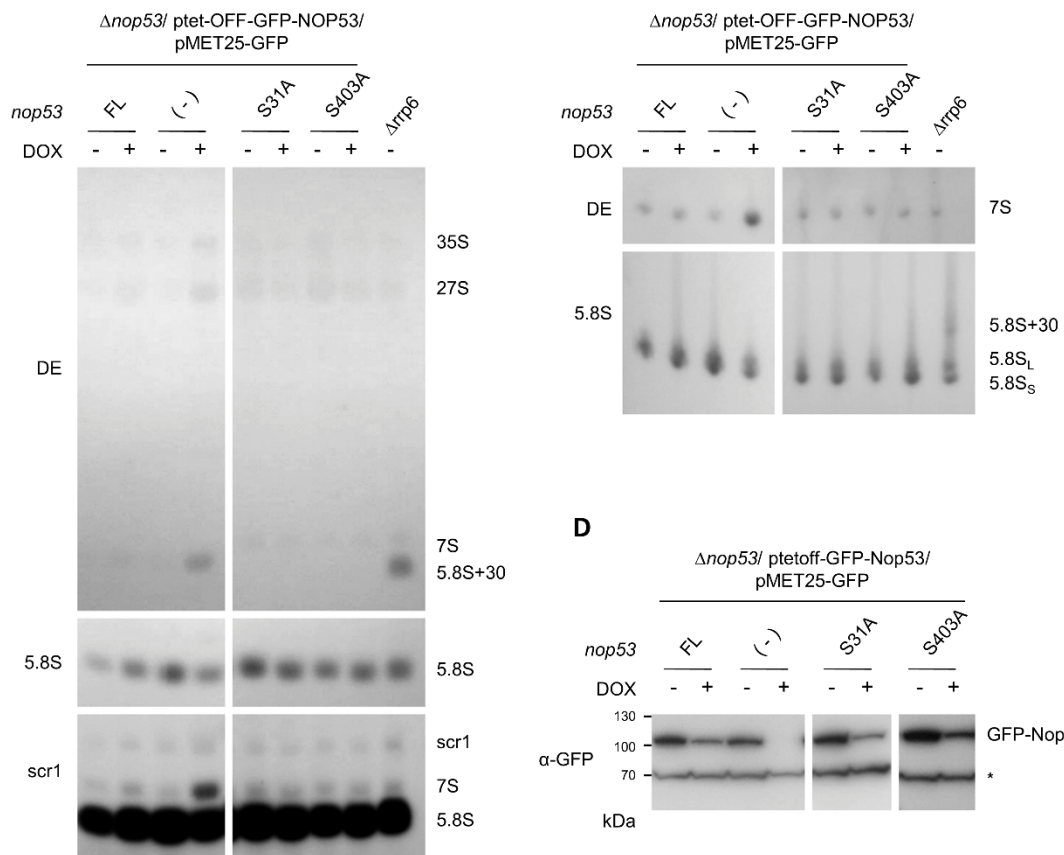
A



B



C



D

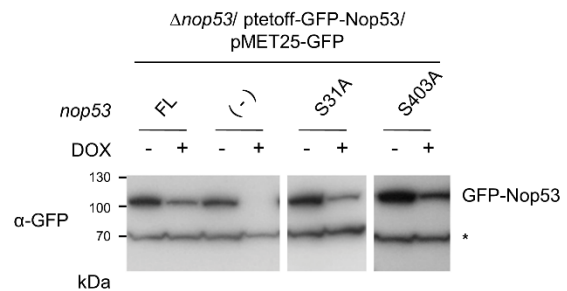


Figura 24. Efeito dos mutantes *nop53* S31A e *nop53* S403A no crescimento celular e processamento do pré-rRNA. (A) Análise da conservação dos resíduos de serina apontados como alvo de fosforilação por estudos de fosfoproteômica (SGD e BioGRID). Setas indicam a posição dos resíduos sobre o alinhamento múltiplo de sequências de Nop53 e homólogos (Organismo - Uniprot ID: *S. cerevisiae* - Q12080, *S. pombe* - Q9UUI4, *K. lactis* - Q6CKD5, *Y. lipolytica* - Q6CHT5, *C. thermophilum* - G0S495, *N. crassa* - Q7S8H5, *D. melanogaster* - Q9W3C2, *M. musculus* - Q8VD18 e *H. sapiens* - Q9NZM5, adaptado de Thoms et al., 2015). Os resíduos de serina S31 e S403 (destacados por pontos) foram selecionados para mutação sítio-dirigida, convertendo-os em alaninas. Na parte inferior direita, estrutura de Nop53 no *ITS2-foot* da partícula Nog2 (PDB 3JCT) destacando, dentre os resíduos de serina apontados, os únicos para os quais existem dados estruturais. S403 e S405 localizam-se em uma alça flexível próxima ao fator de montagem Nop7. (B) Análise do impacto dos mutantes pontuais de Nop53 no crescimento celular. Curvas de crescimento da cepa $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53 transformada com plasmídeo codificando os mutantes pontuais GFP-*nop53* S31A, GFP-*nop53* S403A ou os controles GFP (vetor vazio) e GFP-NOP53 FL (*full length*). As culturas foram realizadas em triplicata em meio mínimo (YNB GLU) com e sem adição de DOX (doxiciclina 1,5µg/ml), e as curvas foram obtidas em equipamento Spectramax® com incubação a 30°C e leituras de OD_{600nm} a cada hora por 24h. (C) Análise do efeito dos mutantes pontuais de Nop53 no processamento do pré-rRNA. RNA total extraído das cepas indicadas e cultivadas em meio mínimo com e sem DOX por 18h, foi separado em condições desnaturantes em gel de agarose (à esquerda) e de poliacrilamida (à direita) e analisados por *northern blot* usando sondas marcadas com ³²P. As sondas empregadas são indicadas à esquerda dos painéis e os RNAs identificados, à direita. A cepa $\Delta rrp6$ foi utilizada como controle para o pré-rRNA 5.8S+30. scR1 foi utilizado como *loading control*. Os mutantes *nop53* S31A e *nop53* S403A não acumulam os pré-rRNAs 27S e 7S. (D) Análise da expressão dos mutantes pontuais de Nop53. Extrato total das cepas indicadas e cultivadas em meio mínimo com e sem DOX por 18h foi analisado por SDS-PAGE e *western blot* com anti-GFP. *banda inespecífica.

Avaliamos então o efeito destas mutações no processamento do pré-rRNA. Para tanto, o RNA total extraído destas cepas, cultivadas com e sem doxiciclina, foi analisado por *northern blot* com sondas específicas para detecção do rRNA 5.8S, dos pré-rRNAs 27S, 7S, e do controle scR1. Como esperado, na Figura 24C verifica-se considerável acúmulo do pré-rRNA 7S no controle negativo (-) tratado com doxiciclina, mas não no controle positivo (FL) expressando Nop53 sob promotor insensível à doxiciclina. Os resultados mostram ainda que ambos mutantes pontuais não levaram a um acúmulo de 7S ou 27S.

Estas observações indicam que tais mutantes não afetam o recrutamento do exossomo para o pré-60S, apesar de S31A ter um impacto no crescimento celular. Outros aspectos ainda não testados como localização subcelular, estabilidade proteica e efeito no interactoma poderão responder pelo efeito de S31A. Podemos especular ainda que o fato de S403A não ter apresentado um efeito detectável pode estar correlacionado a um papel redundante de S405 como sítio de fosforilação vizinho. Ensaios futuros, portanto, poderão complementar estes resultados incluindo a análise de duplo mutantes e de mutações fosfomiméticas.

4.3.2 Nop53 não foi encontrada associada estavelmente a complexos menores que o pré-60S

Durante a biogênese ribossomal, alguns fatores de montagem e proteínas-r formam complexos proteicos ou ribonucleoproteicos estáveis facilitando seu recrutamento conjunto à partícula pré-ribossomal. Este é o caso dos complexos UtpA, UtpB e, UtpC, por exemplo, que integram o 90S, e do 5S RNP no caso do pré-60S (Klinge e Woolford, 2019). Outro exemplo da subunidade

ribossomal maior é Erb1, que juntamente com Nop7 e Ytm1 também constitui um subcomplexo recrutado nos estágios nucleolares mais iniciais de formação do 60S (Konikkat et al., 2017; Tang et al., 2008; Miles et al., 2005). Tendo por objetivo avaliar se Nop53 também estaria estavelmente associada a subcomplexos menores que o pré-60S, o extrato total da cepa $\Delta nop53/pTAP-NOP53$ foi submetido à separação em gradiente linear de glicerol e cromatografia de exclusão molecular (Fig. 25). As frações foram precipitadas e analisadas por SDS-PAGE e *western blot*.

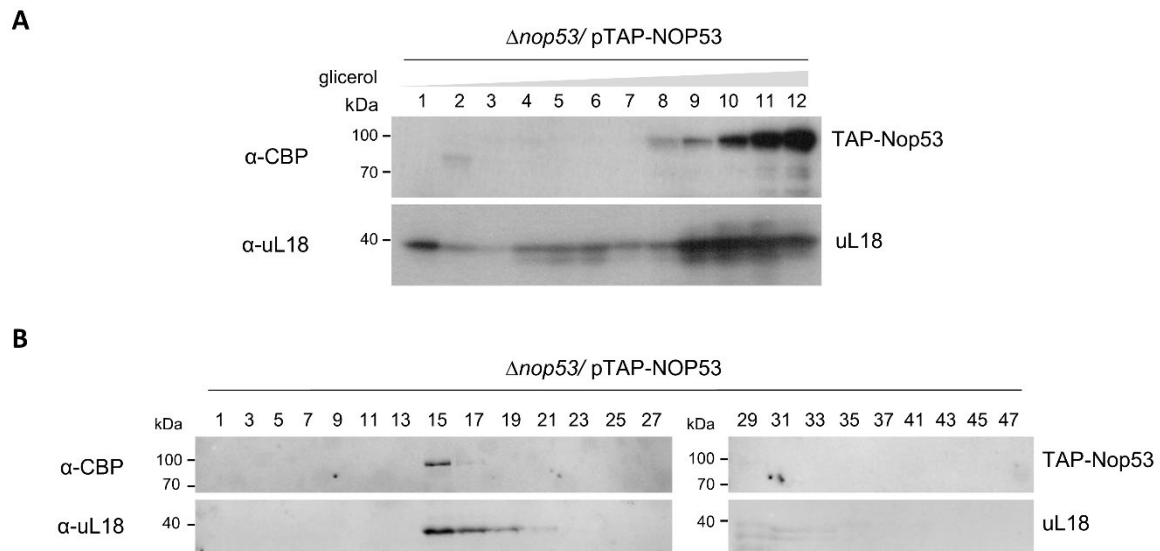


Figura 25. Nop53 encontra-se estavelmente associada a partículas pré-ribossomais e parece não compor complexos menores. (A) Perfil de sedimentação de TAP-Nop53 e da proteína-r uL18. Extrato total da cepa $\Delta nop53/pTAP-NOP53$ foi aplicado sobre gradiente linear de glicerol 10-30% e separado por ultracentrifugação. 12 frações foram coletadas a partir do topo, precipitadas e analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com os anticorpos indicados (B) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 6 10/300 GL com extrato total da cepa $\Delta nop53/pTAP-NOP53$. (faixa de separação: 5 kDa-5 MDa, limite de exclusão 40 MDa, volume de coluna: 24 ml, fluxo: 0.5ml/min, volume de eluição: 48ml, coleta de frações de 1.0ml) Todas as frações ímpares foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com os anticorpos indicados.

Na Figura 25A, o perfil de sedimentação mostra que TAP-Nop53 encontra-se concentrada nas últimas frações (10, 11 e 12) do gradiente de glicerol 10-30%, correspondentes a complexos de grande massa molecular (maior coeficiente de sedimentação), coincidindo com as frações da proteína-r uL18. Resultado similar foi obtido na análise do perfil de sedimentação da eluição nativa de TAP-Nop53, no qual Nop53 foi detectada em uma única fração, a mais densa do gradiente (não mostrado). Consistente com estas observações, a separação do extrato total clarificado de $\Delta nop53/pTAP-NOP53$ por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 6 10/300 GL também revelou a co-eluição de Nop53 com uL18 concentrada em um único pico (Fig. 25B). Com as condições utilizadas e dentro do limite de resolução das abordagens empregadas, Nop53 foi encontrada concentrada em complexos de alta massa molecular (presumivelmente partículas pré-60S), mas não associada estavelmente a complexos menores.

4.3.3 Interactoma de Nop53

Tendo por objetivo aprofundar a caracterização de interações proteína-proteína envolvendo Nop53, utilizou-se a cepa $\Delta nop53/pTAP-NOP53$ para ensaios de coimunoprecipitação. A cepa $\Delta nop53$ expressando GFP-Nop53 e TAP *tag* não fusionado (vazio) foi empregada como controle negativo. Deve-se destacar que a fusão do TAP *tag* à extremidade N-terminal de Nop53 mostrou-se funcional e capaz de complementar o crescimento celular de $\Delta nop53$. Estudos anteriores utilizando Nop53 como isca em ensaios de coimunoprecipitação também empregaram a fusão de um *tag* similar (TAP-Flag) à sua extremidade N-terminal (Thoms et al., 2015; Sarkar et al., 2017; Schuller et al., 2018; Kater et al., 2020). Utilizando uma abordagem distinta de coimunoprecipitação e análise proteômica, nós objetivamos neste estudo capturar novas interações de Nop53, avaliando também sua associação aos intermediários pré-ribossomais. Para tanto, realizamos a coimunoprecipitação com uma única etapa de purificação seguindo protocolo similar a Ohmayer *et al.* (2013) para análise de intermediários pré-60S (Fig. 26A). Visando enriquecer interações independentes de RNA, os ensaios de coimunoprecipitação foram realizados com e sem adição de RNase A ao extrato proteico total clarificado. As triplicatas biológicas do controle negativo (TAP vazio) e TAP-Nop53 (com e sem tratamento com RNase) foram incubadas com IgG sepharose. Após 6 lavagens e eluição desnaturante (NH₄OH 500mM), todas as 9 amostras foram liofilizadas, processadas e submetidas em conjunto a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas (Figs. 26B-D). Os dados brutos e as quantificações foram analisados respectivamente utilizando os softwares MaxQuant e Perseus (*Max Planck Institute of Biochemistry*).

Na Figura 26C, os coeficientes de correlação de Pearson do *multi-scatterplot*, comparando cada replicata com todas as demais, atestam alta reprodutibilidade das triplicatas biológicas, com certa diminuição do coeficiente de correlação na comparação de amostras TAP-Nop53 com e sem RNase. Diferenças maiores, como esperado, verificam-se na comparação entre TAP-Nop53 (com ou sem RNase) e TAP vazio. Do total de proteínas identificadas em pelo menos duas replicatas biológicas (Fig. 26B), 110 foram exclusivamente copurificadas com TAP-Nop53 e não com o controle negativo. Destas, 45 foram identificadas com e sem tratamento com RNase. O *heatmap*, baseado no log₂(Intensidade LFQ) das proteínas identificadas, mostra que apesar de muitas proteínas serem igualmente enriquecidas com TAP-Nop53 com e sem RNase, há diferenças pontuais, que fazem com que a clusterização hierárquica (Fig. 26D) agrupe as triplicatas biológicas (com e sem RNase) de TAP-Nop53 em clusters separados.

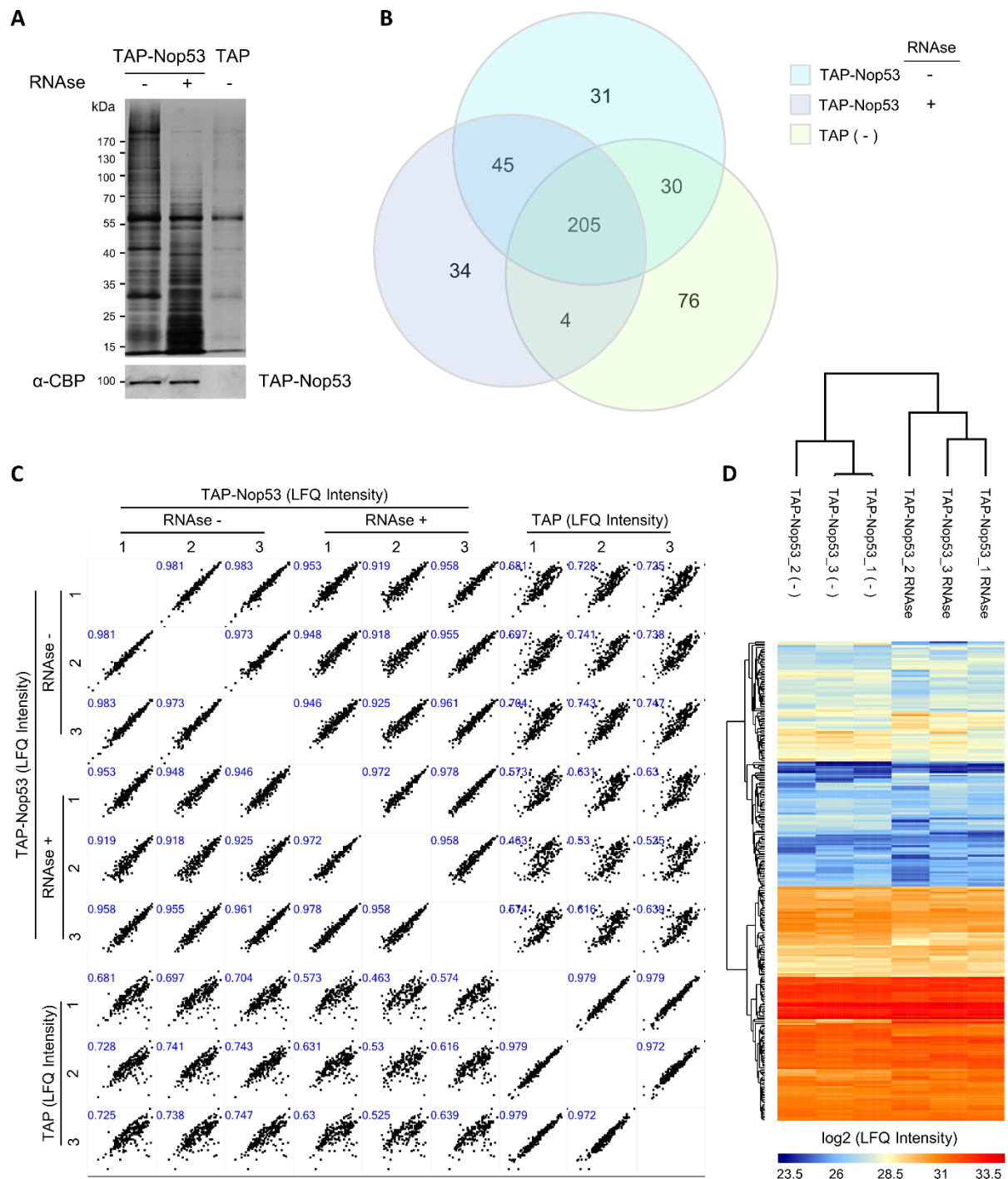
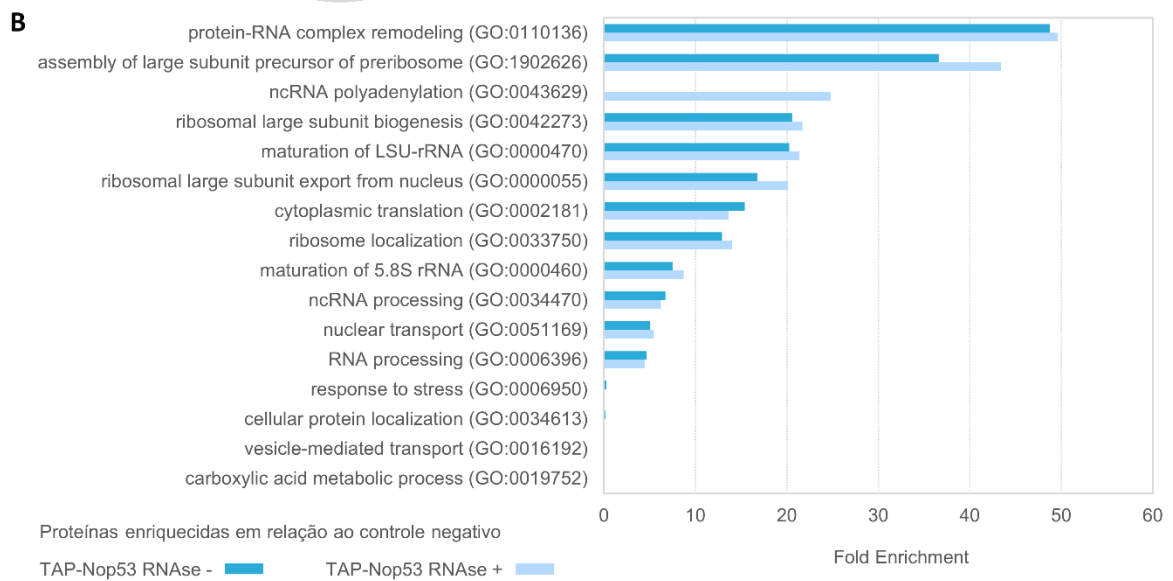
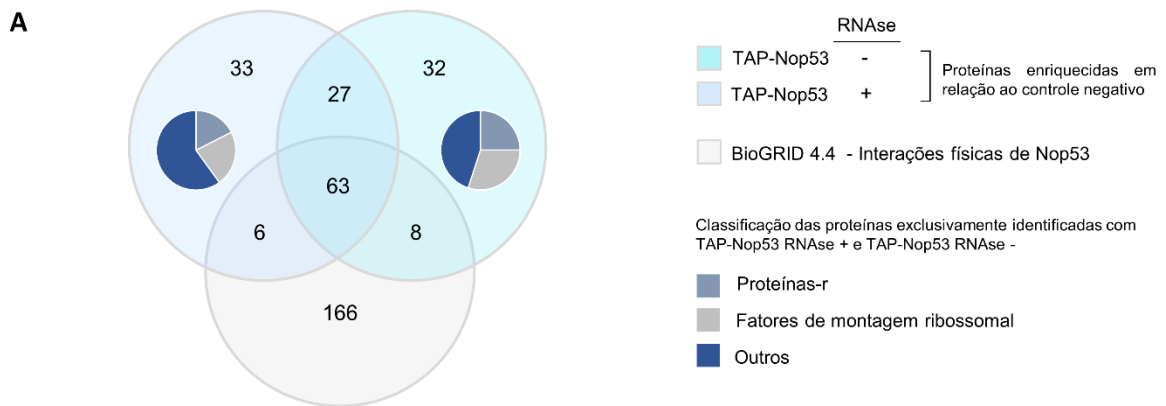


Figura 26. Ensaios de co-IP com TAP-Nop53. (A) Análise dos ensaios de coimunoprecipitação com TAP-Nop53 expressa na cepa $\Delta nop53$. O extrato total de três replicatas biológicas foi incubado com IgG sepharose com e sem adição de RNase A. Como controle negativo, utilizou-se o extrato total da cepa $\Delta nop53/ptet-OFF-GFP-NOP53$ expressando o TAP tag não fusionado. Uma fração de cada eluição foi precipitada, separada por SDS-PAGE e analisada por coloração com nitrato de prata e *western blot* com anti-CBP. (B) As eluições em triplicata biológica foram submetidas à uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os resultados analisados e filtrados com os softwares MaxQuant (v. 1.5.3.12) e Perseus (v. 1.6.10.50) são apresentados no diagrama de Venn, mostrando, para cada condição testada, o número de proteínas identificadas em pelo menos duas replicatas biológicas. (C) Matriz de correlação de todas as replicatas biológicas com base nos valores de *LFQ Intensity*, mostrando os coeficientes de correlação de Pearson em azul. (D) *Heatmap* obtido com base nos valores de $\log_2(LFQ Intensity)$ e na clusterização hierárquica das proteínas identificadas (linhas) e das replicatas biológicas (colunas). As amostras TAP-Nop53_(-) e TAP-Nop53_RNase foram agrupadas em *clusters* separados

Da lista de proteínas enriquecidas com Nop53 (130 RNase -, 129 RNase +) em relação ao controle negativo, considerando tanto aquelas exclusivamente identificadas na eluição com TAP-Nop53 em pelo menos duas replicatas biológicas, quanto aquelas com \log_2 Fold Change (TAP-Nop53/ TAP vazio) ≥ 1.0 (p-value $< 0,05$), algumas foram exclusivamente identificadas com ou sem o tratamento com RNase (Fig. 27A). A título de exemplo, a importina Kap123 foi identificada apenas em amostras sem adição de RNase, sendo um putativo mecanismo de transporte nuclear de Nop53, até então desconhecido. A incubação com RNase, apesar de não eliminar todas as partículas pré-ribossomais e demais RNPs, foi suficiente para alterar o perfil da eluição analisado por SDS-PAGE corado com prata, impactando na complexidade da amostra analisada por espectrometria de massas (Fig. 26A). Foram identificados exclusivamente nas amostras incubadas com RNase os componentes do TRAMP Air1 e Trf5 além de subunidades da serina-treonina quinase CK2. Ensaios futuros, com base nestas observações, poderão testar novas hipóteses ampliando a compreensão dos mecanismos regulatórios que modulam a localização subcelular e interações de Nop53. É interessante notar ainda que comparando-se as proteínas identificadas neste estudo com as indexadas no banco de dados BioGRID 4.4 (Fig. 26A) como interação física de Nop53 com pelo menos uma evidência experimental (*low-throughput* ou *high-throughput*), observamos que 77 também foram identificadas em outros estudos, usando outras iscas inclusive.

Estas listas de proteínas enriquecidas com Nop53 em relação ao controle negativo foram submetidas a uma análise de enriquecimento funcional (PANTHER *Overrepresentation Test*) de termos e categorias de ontologia genética (*GO Biological Process Complete*) utilizando o software PANTHER 16.0. Esta análise avaliou os resultados de coimunoprecipitação com e sem tratamento com RNase de forma independente. Como resultado, foram identificadas com e sem RNase respectivamente 77 e 83 diferentes classes funcionais (teste exato de Fischer: FDR $< 0,05$), das quais 71 presentes em ambas as listas. Na Figura 27B são apresentadas apenas as categorias com os maiores e menores valores de *Fold Enrichment* (definido como razão entre: a proporção de genes de uma categoria presentes na lista de busca sobre o número total de genes da lista; e a proporção de todos os genes desta categoria sobre o número total de genes do genoma de referência *S. cerevisiae*). Para facilitar a visualização, termos sinônimos e parentais mais genéricos foram omitidos, focando-se nas subclasses mais específicas.



C Proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 em relação ao controle negativo (tanto com e sem RNase)

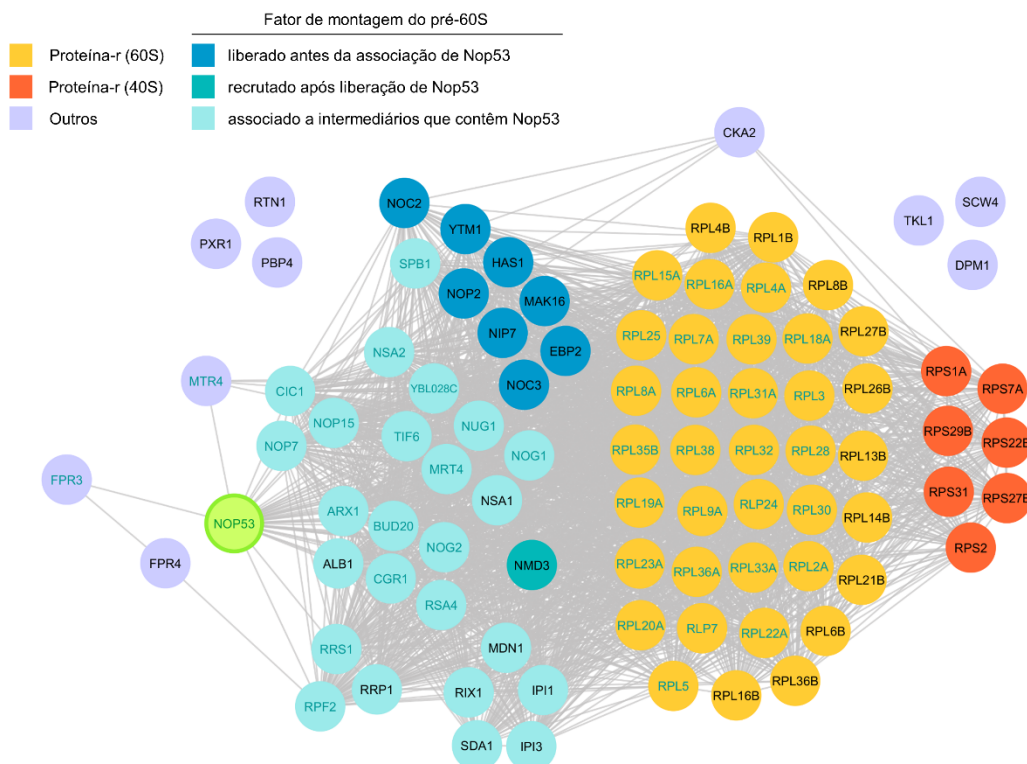


Figura 27. Análise das proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 em relação ao controle negativo. (A) Proteínas identificadas exclusivamente na eluição com TAP-Nop53 em pelo menos duas replicatas biológicas, e proteínas com \log_2 Fold Change (TAP-Nop53 / TAP vazio) ≥ 1.0 (p -value < 0.05) foram consideradas enriquecidas com Nop53 (130 RNase -, 129 RNase +) em relação ao controle negativo. Estas proteínas são apresentadas em um diagrama de Venn, mostrando que 90 foram enriquecidas com e sem tratamento com RNase; 40 apenas sem RNase; e 39 apenas após tratamento com RNase. Gráficos de setores mostram a classificação das proteínas exclusivamente enriquecidas em uma única condição. As proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 foram comparadas com os dados disponíveis no BioGRID 4.4 (interações físicas de Nop53 com pelo menos uma evidência experimental *low-throughput* ou *high-throughput*), evidenciando uma sobreposição com resultados de ensaios anteriores (inclusive com outras iscas), e apontando a identificação neste estudo de potenciais novas interações. **(B)** Análise de enriquecimento funcional (PANTHER *Overrepresentation Test*) de termos e categorias de ontologia genética (*GO Biological Process Complete*) utilizando o software PANTHER 16.0. As listas de proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 com (129) e sem (130) tratamento com RNase, em relação ao controle negativo, foram analisadas de forma independente. As categorias de processos biológicos com enriquecimento estatisticamente significativo (teste exato de Fischer: FDR < 0.05) com os maiores e menores valores de *Fold Enrichment* são apresentados. Para facilitar a visualização, termos sinônimos e parentais mais genéricos foram omitidos. **(C)** Análise das proteínas enriquecidas com TAP-Nop53 nas duas condições (RNase + e RNase -) em relação ao controle negativo. Rede de interações destas 90 proteínas obtida usando o banco de dados STRING 11.5 (Parâmetros usados - *network type: full STRING network; meaning of network edges: confidence; interaction sources: experiments, databases; minimum required interaction score: high confidence (0.700); max number of proteins to show: query proteins only*) e editada com o software Cytoscape v3.7.2. As conexões ligam nós funcionalmente relacionados com base nas evidências (experimentos, banco de dados) curadas pelo banco de dados SRING. Proteínas que apresentam uma conexão direta com Nop53 nesta rede estão escritas em azul. As cores dos nós refletem a classificação das proteínas de acordo com sua função. (Fpr3 e Fpr4 já foram encontradas associadas ao pré-60S – mas a etapa em participam permanece desconhecida)

Os processos biológicos mais enriquecidos correspondem à biogênese da subunidade ribossomal 60S (que inclui remodelamento de complexo RNA-proteína), e à maturação do rRNA 5.8S (Fig. 27B). A presença de grande quantidade de proteínas-r na eluição com Nop53 repõe pelo enriquecimento da categoria “tradução citoplasmática”. Comparativamente, processos metabólicos e de tráfico de membranas, por exemplo, apresentam valores de *Fold Enrichment* quase nulos. Estas observações são totalmente consistentes com o papel de Nop53 como fator de montagem ribossomal, atestando a qualidade dos protocolos empregados de coimunoprecipitação e filtragem de dados. É curioso notar, entretanto, que apenas nas amostras com tratamento com RNase há o enriquecimento da categoria associada à poliadenilação de ncRNAs. Isto se deve ao fato da identificação, nesta condição, de componentes do complexo TRAMP.

A maioria das proteínas copurificadas com Nop53 e enriquecidas em relação ao controle negativo foi identificada nas duas condições testadas (Fig. 27A), isto é, independentemente do tratamento com RNase em pelo menos 4 (2 RNase- e 2 RNase+) a 6 replicatas de TAP-Nop53 ao todo. Na Figura 27C observamos a rede de interações estabelecida entre estas 90 proteínas, obtida a partir do banco de dados STRING v11.5 e editada com auxílio do *software* Cytoscape v3.7.2. Como esperado, são coimunoprecipitados com Nop53 componentes de partículas pré-ribossomais, incluindo proteínas-r, sobretudo as que compõem a subunidade 60S. Fatores de montagem dos intermediários pré-60S aos quais Nop53 se associa na transição entre o estado E e a formação das partículas Nog2 e Rix1-Rea1 estão entre os mais enriquecidos, havendo poucos remanescentes da etapa anterior. Esta observação é consistente e complementar aos

resultados anteriores do perfil de sedimentação de TAP-Nop53 em gradiente de glicerol e da separação por gel filtração (Fig. 25), indicando sua estável e preponderante associação a estes grandes complexos pré-ribossomais.

A helicase Mtr4, com a qual Nop53 interage diretamente no recrutamento do exossomo (Thoms et al., 2015), também foi detectada (Fig. 27C). Outros componentes e cofatores do exossomo, entretanto, não foram identificados, nem entre as proteínas exclusivamente observadas com ou sem RNase. Isto deve refletir o fato de se tratarem de interações bastante transientes e sensíveis às condições de coimunoprecipitação. De fato, a estrutura por crio-EM do pré-60S acoplado ao exossomo não foi obtida por simples coimunoprecipitação, mas apenas através de reconstituição *in vitro* incubando-se partículas pré-60S Nop53 com o complexo exossomo reconstituído com proteínas recombinantes (Schuller et al., 2018).

Algumas proteínas associadas a outras funções celulares são destacadas à margem da rede de interações (Fig. 27C), estabelecendo poucas ou nenhuma interação (ex. Pbp4, Rtn1, Pxr1) com os componentes das partículas pré-ribossomais no centro da rede (Fig. 27C). De destaque, pode-se citar a subunidade Cka2 da quinase CK2, cujo possível papel na fosforilação de Nop53 pode ainda ser explorado. Destacam-se também as peptidil-prolil cis-trans isomerases homólogas Fpr3 e Fpr4, membros da família FKBP (*FK506-binding protein*), cujo papel na biogênese ribossomal ainda é desconhecido, apesar de já terem sido copurificadas com intermediários pré-60S nucleolares (Chaker-Margot e Klinge, 2019; Klinge e Woolford, 2019).

Os *volcano plots* da Figura 28 mostram as proteínas copurificadas com TAP-Nop53 (com e sem RNase) e seu respectivo enriquecimento em relação ao controle negativo. Proteínas com maior *fold change* e $p\text{-value} < 0,05$ correspondem aos componentes das partículas às quais Nop53 se associa, com destaque para Nop7 com a qual interage diretamente na base do *ITS2-foot*. A comparação entre ensaios de coimunoprecipitação de TAP-Nop53 com e sem RNase, por sua vez, apresenta uma grande sobreposição, como discutido anteriormente, havendo algumas diferenças pontuais. Observamos na Figura 28C que, de modo coerente, componentes de snoRNPs (Nhp2, Gar1, Cbf5) foram menos copurificados após tratamento com RNase. Nesta mesma condição, alguns poucos fatores de montagem copurificados com Nop53 foram enriquecidos. O elevado *fold change* de Fpr3 e de seu homólogo Fpr4 foram os achados mais interessantes, podendo sugerir a existência de uma interação direta e estável entre estas peptidil-prolil cis-trans isomerases homólogas com Nop53. Estudos futuros, com base nestes achados, poderão validar novas interações de Nop53, elucidando novos mecanismos de regulação.

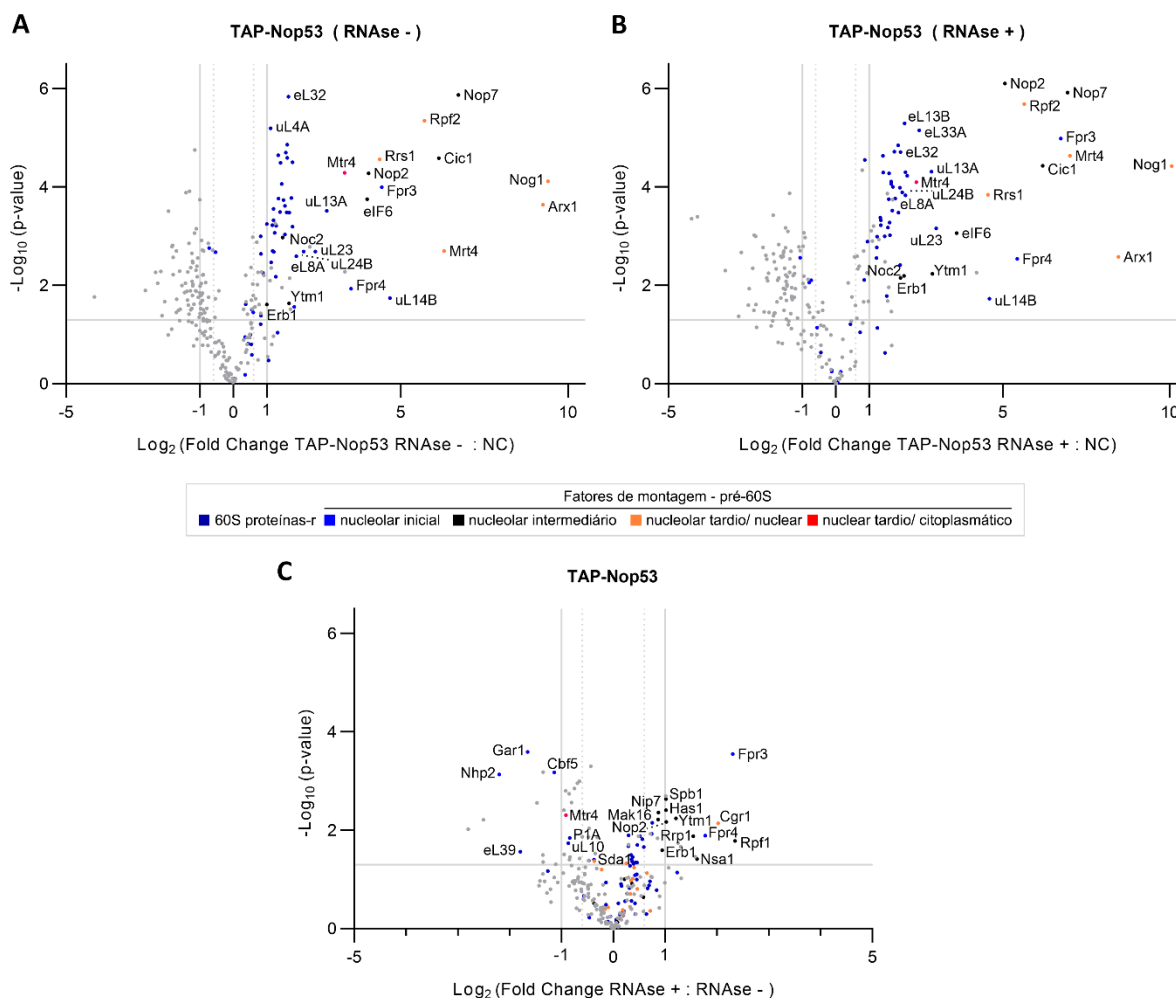


Figura 28. Análise quantitativa do interactoma de Nop53 (RNase+ e RNase-). Resultados da análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas dos ensaios de coimunoprecipitação com TAP-Nop53 (com e sem incubação com RNase A) e com TAP vazio. *Volcano plots* mostram a comparação das eluições de **(A)** TAP-Nop53 (RNase -) e **(B)** TAP-Nop53(RNase +) com o controle negativo (NC: TAP vazio), além da **(C)** comparação das eluições de TAP-Nop53, com e sem RNase, entre si. O valor de $-\log_{10}(p\text{-value})$ foi plotado contra o valor de $\log_2(\text{fold change})$ para cada proteína identificada em pelo menos duas replicatas biológicas. Linhas cinzas delimitam os valores de *cut-off* ($p\text{-value} < 0.05$; $\text{fold change} < 0.5$ ou > 2.0). Proteínas-r da subunidade 60S são destacadas, assim como fatores de montagem do pré-60S, classificados de acordo com o estágio de maturação de que participam.

4.4. Efeito da depleção de Nop53 na montagem da subunidade 60S

Em 2016, Wu et al. resolveram parcialmente a estrutura de Nop53 no pré-60S, mostrando não apenas seu posicionamento na base do *ITS2-foot*, mas revelando também sua topologia estendida estabelecendo uma rede de interações com proteínas-r e fatores de montagem. Esta observação levantou a hipótese de Nop53 não apenas atuar como um adaptador para o recrutamento do exossomo, mas de também desempenhar um papel estrutural local, conectando diferentes domínios do pré-60S. Tendo em vista avaliar em detalhes como o recrutamento de Nop53 impacta a biogênese da subunidade ribossomal maior, resolvemos avaliar o efeito de sua

depleção nas mudanças de composição do pré-60S, realizando, para tanto, uma abrangente análise dos diferentes estágios de maturação desde o nucléolo ao citoplasma. Os resultados, análises e discussões que compõem as seções 4.4 e 4.5 fazem parte do artigo Bagatelli et al. (2021) – Anexo C - *doi: 10.1093/nar/gkab494* – com permissão da *Oxford University Press*

4.4.1 A depleção de Nop53 afeta a transição do estado E para a partícula Nog2, com impacto em intermediários pré-60S tardios

Inicialmente quatro fatores de montagem representativos de diferentes estágios de maturação da subunidade 60S foram selecionados para serem marcados com TAP *tag*. Destes, Nop7, Rsa4 e Arx1 estão presentes em partículas pré-ribossomais contendo Nop53, enquanto Nmd3 é recrutado após a liberação de Nop53 (Figs. 29A,E 30A,E e 31A). Nop7 se associa ao pré-60S nas etapas mais iniciais de maturação, sendo um componente do *ITS2-foot* que interage diretamente com Erb1 e Nop53 de maneira mutuamente exclusiva. A substituição de Erb1 por Nop53 ocorre na transição entre o estado E nucleolar e a partícula Nog2 nucleoplasmática, sendo essencial para a própria liberação de Nop7, que requer o processamento exossomo-dependente do ITS2 (Adams et al., 2002; Tang et al., 2008; Wu et al., 2016; Kater et al., 2017; Fromm et al., 2017; Schuller et al., 2018). Após o recrutamento de Nop53, Rsa4 e Arx1 são incorporados para formar a partícula Nog2, estando o primeiro próximo à CP e o segundo sobre a saída do PET em formação (Kater et al., 2020). Enquanto Rsa4 é liberado ainda no nucleoplasma pela ação do complexo Rix1-Rea1 (Ulbrich et al., 2009; Leidig et al., 2014; Wu et al., 2016; Ahmed et al., 2019; Kater et al., 2020), Arx1 permanece associado ao pré-60S até o citoplasma (Bradatsch et al., 2012; Greber et al., 2012; Leidig et al., 2014; Wu et al., 2016; Kater et al., 2020). Nos estágios nucleares tardios, após a remoção do *ITS2-foot*, Nmd3 é recrutado para o pré-60S, associando-se à superfície intersubunidade em maturação, onde contribuirá com a maturação do PTC (Ma et al., 2017; Malyutin et al., 2017; Zhou et al., 2019b; Kargas et al., 2019). Tanto Arx1 quanto Nmd3 são fatores de exportação nuclear que auxiliam no transporte nucleocitoplasmático do pré-60S (Ho et al., 2000; Bradatsch et al., 2007), ambos se dissociando apenas após etapas específicas de maturação citoplasmática (Hedges et al., 2005; Meyer et al., 2010; Lo et al., 2010; Greber et al., 2016; Zhou et al., 2019b; Kargas et al., 2019).

Os quatro fatores de montagem fusionados ao TAP foram expressos de forma independente na cepa condicional $\Delta nop53$ com GFP-NOP53 sob o controle de um promotor regulado por tetraciclina (tet-OFF), como descrito na seção 4.2.1 (Fig. 17A). Após tratamento com doxiciclina, a expressão de GFP-NOP53 é transcricionalmente reprimida (Figs. 29B,F e 30B,F) com suficiente depleção dos níveis de Nop53 para afetar o crescimento celular e o processamento de pré-rRNA,

de modo consistente com o fenótipo anteriormente descrito de $\Delta nop53$ (Sydorsky et al., 2005; Granato et al., 2005; Thomson e Tollervey, 2005). Os pré-ribossomos coimunoprecipitados em triplicatas biológicas utilizando IgG sepharose, tanto na presença quanto ausência de Nop53, foram submetidos a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas (Figs. 29C-D,G-I, 30C-D,G-I e 31B-I). Diferentes intermediários pré-ribossomais copurificados após depleção de Nop53 exibiram mudanças significativas e específicas na composição (Figs. 31B-I). Visando contornar qualquer possível contaminação com partículas ribossomais maduras, focamos nossa análise exclusivamente em fatores de montagem do pré-60S, inferindo as etapas de maturação que foram afetadas pela avaliação de seus valores de $\log_2(\text{Intensidade LFQ})$. Os fatores de montagem do pré-60S coimunoprecipitados e identificados foram analisados tanto em *volcano plots*, como agrupados em *violin plots* representativos de intermediários pré-60S específicos (Figs. 31F-I). A composição destes grupos (*violin plots*), apresentada na Tabela 6, foi definida com base em um modelo atualizado da via de montagem da subunidade 60S. Mudanças na forma ou altura dos *violin plots* após depleção de Nop53 refletem diretamente o aumento (mediana maior) ou diminuição (mediana menor) no nível dos componentes copurificados de intermediários pré-60S específicos. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas usando o teste U de Mann-Whitney.

Dado o conhecido papel de Nop53 no recrutamento do exossomo para o processamento do pré-rRNA 7S, questionamos inicialmente qual seria o efeito da depleção de Nop53 no *ITS2-foot*. Observamos, nesta condição, que, enquanto Nop7, um componente do *ITS2-foot*, copurificou poucos fatores de montagem de recrutamento tardio (Reh1 e Lsg1), as partículas tardias copurificadas com Nmd3 enriqueceram alguns componentes do *ITS2-foot* (Cic1 e Rlp7) (Figs. 29I e 31C,F,I), sugerindo que, com a depleção de Nop53, o *ITS2-foot*, cuja desmontagem encontra-se bloqueada, pode ser encontrado retido em intermediários pré-60S nucleares tardios e citoplasmáticos. Estudos anteriores mostraram que mutantes pontuais de *nop53*, *mtr4* e *las1* que afetam o processamento do ITS2 levam ao enriquecimento de componentes do *ITS2-foot* em partículas citoplasmáticas (Rodríguez-Galán et al., 2015; Sarkar et al., 2017; Biedka et al., 2018). Teríamos esperado, portanto, sob repressão da expressão de Nop53, um significativo enriquecimento de vários fatores de montagem de associação tardia ao pré-60S copurificados com Nop7. Em vez disso, as partículas Nop7 enriqueceram, nesta condição, sobretudo fatores de montagem de estágios nucleolares (Figs. 31B, F), sugerindo a existência de um impacto da depleção de Nop53 nos estágios iniciais de maturação da subunidade 60S, potencialmente capaz de afetar indiretamente a formação de intermediários pré-60S tardios.

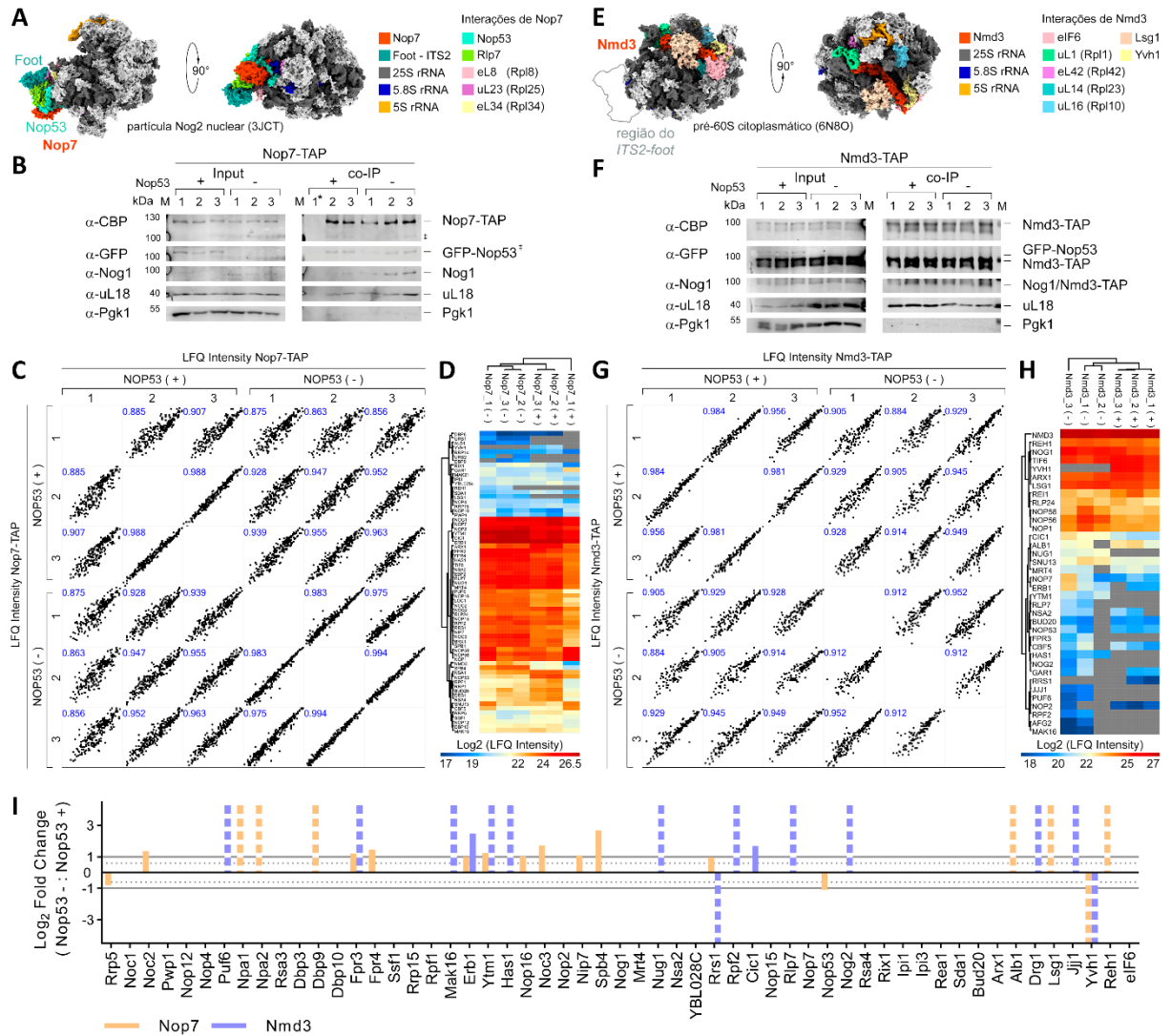


Figura 29. Ensaios de co-IP com Nop7-TAP e Nmd3-TAP. Análise dos resultados dos ensaios de coimunoprecipitação com (A-D) Nop7-TAP e (E-H) Nmd3-TAP, expressos na cepa $\Delta nop53/ptet$ -OFF-GFP-NOP53 e realizados com (-) e sem (+) depleção de Nop53. (A) Partícula Nog2 nuclear, destacando o fator de montagem Nop7 e suas interações. Nop7 interage diretamente com Nop53 e compõe o *ITS2-foot*. (E) Partícula Nmd3 citoplasmática (estágio RI: rpl10 inserida), destacando o fator de montagem Nmd3 e suas interações. O fator nucleocitoplasmático Nmd3 é recrutado ao pré-60S após desmontagem do *ITS2-foot* (indicado como “região do *ITS2-foot*”), e se liga sobre o corredor de tRNA, acima do PTC em formação. (B, F) Análise por SDS-PAGE e *western blot* do input (extrato total) e de uma aliquota de cada eluição (co-IP) mostrando todas as replicatas biológicas. (A barra “/” indica sobreposição de bandas. * perda de material durante aplicação no gel. † fragmentos de Nop7-TAP sobrepostos. M: marcador de massa molecular de proteínas). (C, G) As eluições foram submetidas a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas. Matriz de correlação das replicatas biológicas com base nos valores de *LFC Intensity*, mostrando coeficientes de correlação de Pearson em azul. (D, H) *Heatmap* obtido com base nos valores de $\log_2(LFC Intensity)$ de todos os fatores de montagem do pré-60S identificados em pelos menos duas replicatas biológicas, com clusterização hierárquica dos fatores de montagem (linhas) e das replicatas biológicas (colunas). (I) Valores de $\log_2(Fold Change(Nop53^- : Nop53^+))$, normalizados pela isca, de todos fatores de montagem do pré-60S identificados. Da esquerda para direita os fatores de montagem são organizados do estágio nucleolar mais inicial até o estágio mais tardio de maturação citoplasmática. Barras tracejadas indicam fatores de montagem identificados em uma única condição (Nop53⁺ ou Nop53⁻).

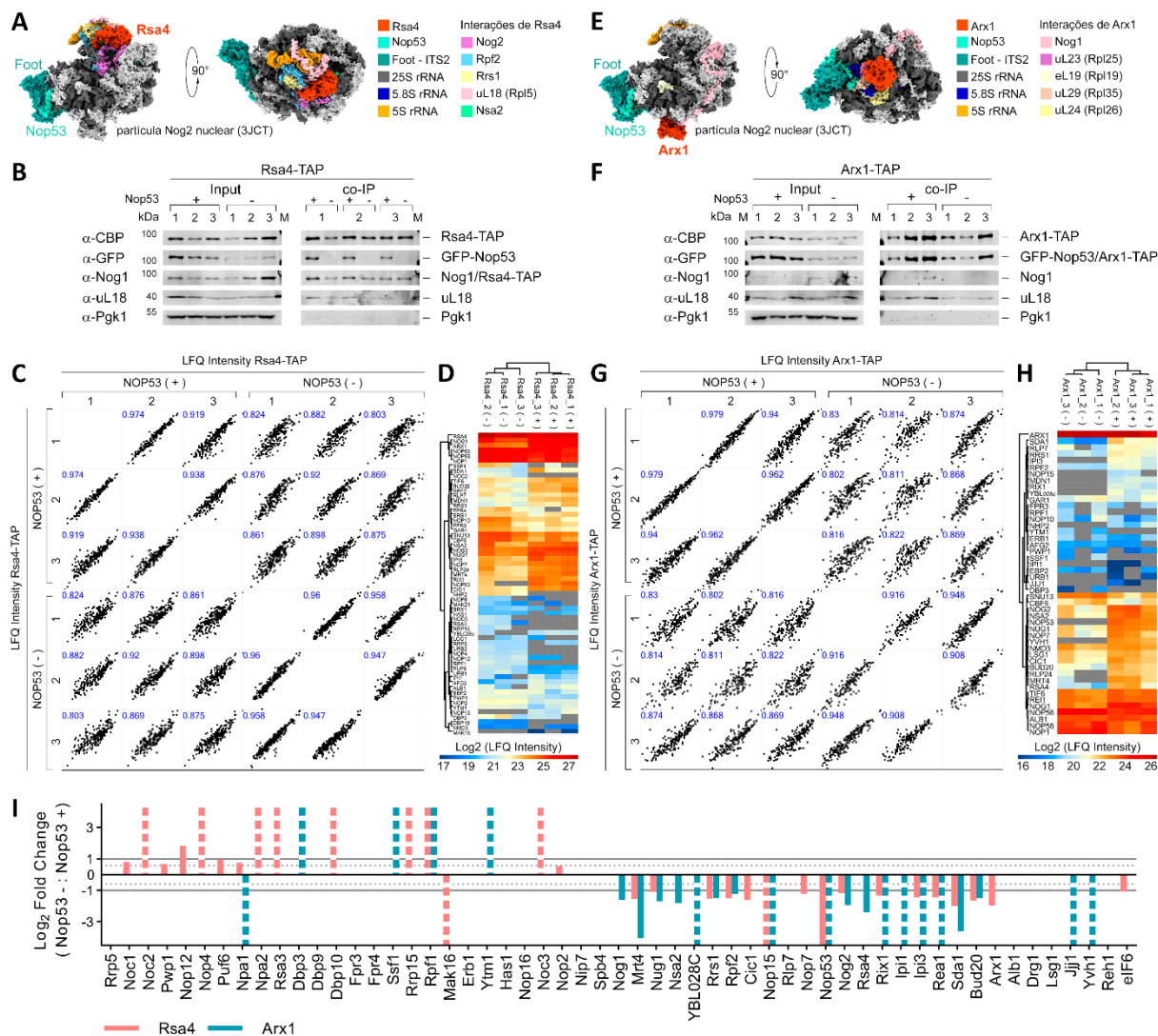


Figura 30. Ensaios de co-IP com Rsa4-TAP e Arx1-TAP. Análise dos resultados dos ensaios de coimunoprecipitação com (A-D) Rsa4-TAP e (E-H) Arx1-TAP, expressos na cepa $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53 e realizados com (-) e sem (+) depleção de Nop53. Ambos, Rsa4 e Arx1, são fatores de montagem recrutados após Nop53 e compõem a partícula Nog2. (A) Partícula Nog2, destacando Rsa4 e suas interações. O fator nuclear Rsa4 se associa próximo ao 5S RNP, na base da protuberância central em formação. (E) Partícula Nog2, destacando Arx1 e suas interações. O fator nucleocitoplasmático Arx1 encontra-se sobre a saída do PET (túnel de saída de polipeptídeo). (B, F) Análise por SDS-PAGE e *western blot* do input (extrato total) e de uma alíquota de cada eluição (co-IP) mostrando todas as replicatas biológicas. (A barra “/” indica sobreposição de bandas. M: marcador de massa molecular de proteínas). (C, G) As eluições foram submetidas a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas. Matriz de correlação das replicatas biológicas com base nos valores de *LFQ Intensity*, mostrando coeficientes de correlação de Pearson em azul. (D, H) *Heatmap* obtido com base nos valores de $\log_2(\text{LFQ Intensity})$ de todos os fatores de montagem do pré-60S identificados em pelos menos duas replicatas biológicas, com clusterização hierárquica dos fatores de montagem (linhas) e das replicatas biológicas (colunas). (I) Valores de $\log_2(\text{Fold Change}(\text{Nop53-} : \text{Nop53+}))$, normalizados pela isca, de todos fatores de montagem do pré-60S identificados. Da esquerda para direita os fatores de montagem são organizados do estágio nucleolar mais inicial até o estágio mais tardio de maturação citoplasmática. Barras tracejadas indicam fatores de montagem identificados em uma única condição (Nop53+ ou Nop53-).

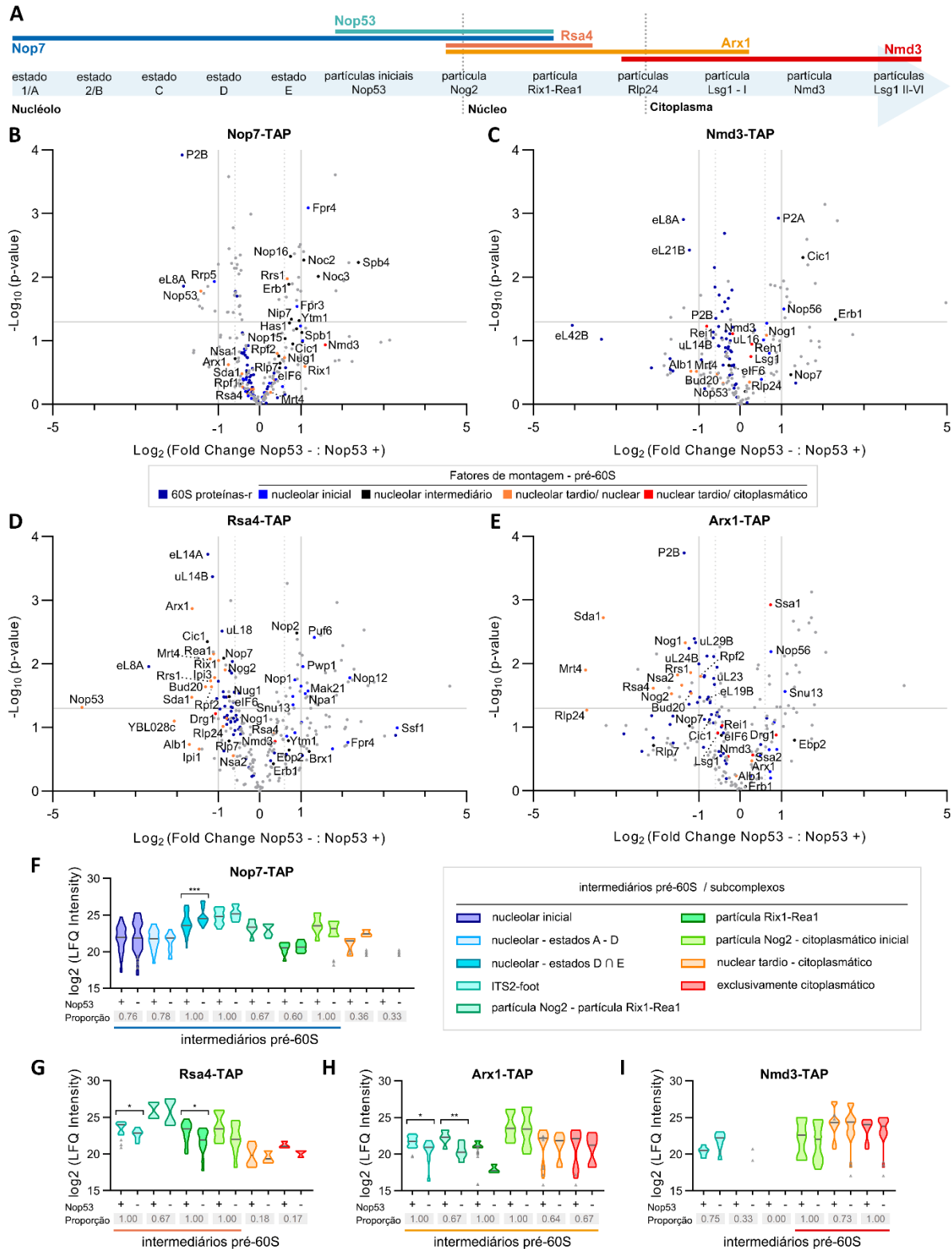


Figura 31. Alterações na composição de intermediários pré-60S causadas pela depleção de Nop53. Os fatores de montagem ribossomal Nop7, Nmd3, Rsa4 e Arx1 foram selecionados para avaliar o efeito da depleção de Nop53 na biogênese da subunidade 60S. (A) A ordem de recrutamento e liberação destes fatores de montagem é indicada acima da representação esquemática da via de maturação do pré-60S, desde o nucléolo ao citoplasma, ordenada com base nas partículas pré-ribossomais já isoladas e estruturalmente descritas. (B-I) Análise proteômica quantitativa *label-free*, baseada em espectrometria de massas, dos pré-ribossomos coimunoprecipitados em triplicatas biológicas com os fatores de montagem indicados e fusionados ao TAP tag. *Volcano plots* mostram a comparação entre depleção (-) e não-depleção (+) de Nop53 para as partículas (B) Nop7-TAP (C) Nmd3-TAP, (D) Rsa4-TAP e (E)

Arx1-TAP. Os valores de $-\log_{10}(\text{p-value})$ e de $\log_2(\text{fold change Nop53}^- : \text{Nop53}^+)$ são plotados para cada proteína, identificada em pelo menos duas replicatas biológicas. Linhas cinzas delimitam os valores de *cut-off* ($\text{p-value} < 0.05$; $\text{fold change} < 0.5$ ou > 2.0). Proteínas-r da subunidade 60S são destacadas, assim como fatores de montagem do pré-60S, classificados de acordo com o estágio de maturação de que participam. **(F-I)** Análise dos fatores de montagem agrupados em conjuntos representativos de intermediários pré-60S específicos. Cada cor de *violin plot* indica um conjunto definido de fatores que compõem intermediários pré-60S específicos. Os *violin plots* mostram a distribuição dos valores de $\log_2(\text{LFQ Intensity})$ dos fatores de montagem copurificados que os compõem. (estados D e E designa fatores comuns entre as partículas do estado D e E). A altura do *violin plot* é delimitada pelo maior e pelo menor valor de *LFQ Intensity* do conjunto; A largura do *violin plot* representa a frequência de observação dos valores de *LFQ Intensity* no grupo (quanto mais alta a frequência, mais largo). Os fatores de montagem identificados em apenas uma condição (Nop53^+ ou Nop53^-) são representados como triângulos cinza. A mediana é indicada por uma linha cinza escuro. Comparando-se a forma e mediana de *violin plots* de mesma cor (com depleção (-) e não-depleção (+) de Nop53), pode-se avaliar se a depleção de Nop53 aumentou (mediana mais alta) ou diminuiu (mediana mais baixa) a associação da isca aos componentes dos intermediários pré-60S representados. Diferenças estatisticamente significativas ($\text{p} < 0.05$) são destacadas no gráfico ($\text{Nop7-TAP}^{***} \text{ p} = 0.0007$; $\text{Rsa4-TAP}^* \text{ p} = 0.0188$, $^* \text{ p} = 0.0186$; $\text{Arx1-TAP}^* \text{ p} = 0.0315$, $^{**} \text{ p} = 0.0087$). Abaixo de cada par de *violin plots* (Nop53^+ , Nop53^-) é indicada a proporção de fatores daquele conjunto que foi copurificada e identificada (número de componentes do conjunto que foram copurificados / número total de fatores de montagem que definem o grupo). Uma barra horizontal indica os intermediários pré-60S aos quais se espera que a isca esteja associada.

Analisando estes fatores de montagem nucleolares coimunoprecipitados com Nop7 , observamos um enriquecimento, após depleção de Nop53 , de constituintes dos estados D e E (ex. Spb4 , Noc3 , Nip7) (Figs. 29I e 31B,F), que correspondem justamente aos estágios de maturação do pré-60S anteriores ao recrutamento de Nop53 . Seria concebível, portanto, sugerir, nesta condição, que a transição entre estágios nucleolares e a partícula Nog2 nuclear, que contém Nop53 , se encontrasse afetada. Esta hipótese foi confirmada quando analisamos o efeito da depleção de Nop53 na partícula Nog2 copurificada com Rsa4 e Arx1 (Figs. 30I e 31D-E,G-H). Em ambos os casos, o nível de vários componentes da partícula Nog2 (ex. Bud20 , Nog2 , Rsa4 , Arx1) encontrou-se significativamente reduzido após depleção de Nop53 , incluindo componentes do *ITS2-foot* e remanescentes de estágios anteriores de maturação (Rrs1 , Rpf2 , Nog1 , eIF6 , Nug1 , Nsa2 , Mrt4 , YBL028c) (Wu et al., 2016; Kater et al., 2020). Da mesma forma, os fatores de montagem da partícula Rix1-Rea1 (Sda1 , Rix1 , Ipi1 , Ipi3 , Rea1) que se associam à partícula Nog2 para desencadear a remoção de Rsa4 e remodelamento da CP (Ulbrich et al., 2009; Wu et al., 2016; Kater et al., 2020), também foram encontrados em níveis diminuídos. Todos esses achados apontam fortemente que a depleção de Nop53 causa um acúmulo de intermediários pré-60S nucleolares, o que é consistente com o acúmulo previamente descrito do pré-rRNA 27S nessa condição (Sydorsky et al., 2005; Granato et al., 2005; Thomson e Tollervey, 2005).

A análise de pré-ribossomos copurificados com Nmd3 e Arx1 nos permitiu avaliar partículas pré-ribossomais nucleares tardias e citoplasmáticas, revelando um pequeno efeito da depleção de Nop53 em fatores de montagem de ligação tardia ao pré-60S (Figs. 29H-I, 30H-I e 31H-I). Curiosamente, entretanto, sob repressão da expressão de Nop53 , tanto partículas Arx1 como Nmd3 foram depletadas do fator de montagem de associação tardia Yvh1 , envolvido na maturação do *P-stalk* (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009; Sarkar et al., 2016). Com bases nestes resultados, verificamos que intermediários pré-60S nucleares tardios e citoplasmáticos

ainda são formados após depleção de Nop53, embora em menor extensão e com eventos específicos de maturação tardia afetados.

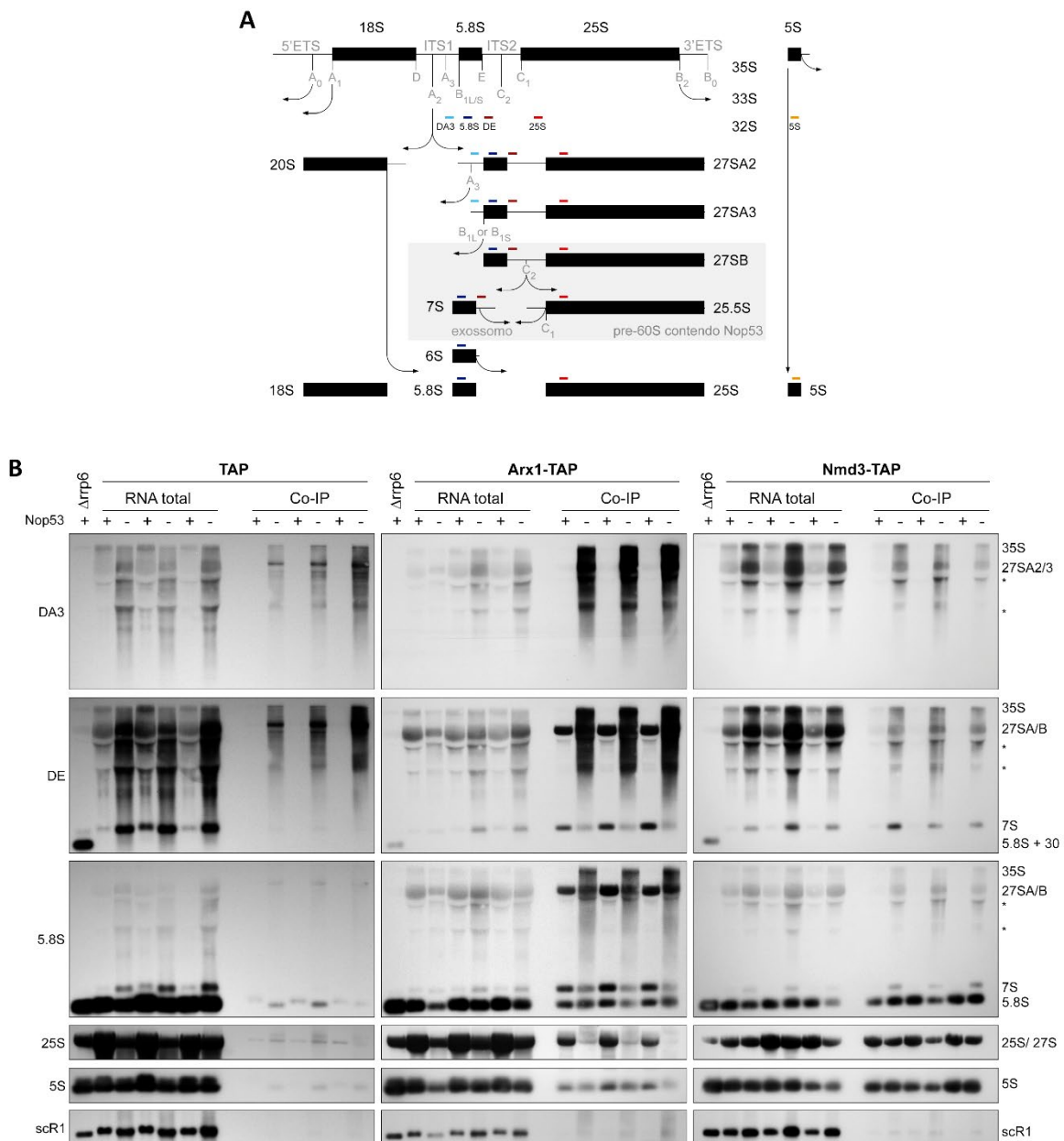


Figura 32. A depleção de Nop53 afeta diferencialmente a associação dos fatores nucleocitoplasmáticos Arx1 e Nmd3 a intermediários pré-60S. (A) Representação esquemática do processamento do pré-rRNA em *S. cerevisiae*, destacando em cinza os estágios durante os quais Nop53 encontra-se associado ao pré-60S. A posição de hibridização das sondas empregadas nos ensaios de *northern blot* é indicada sobre os pré-rRNAs. (B) Os pré-rRNAs coimunoprecipitados (co-IP) com Arx1-TAP e Nmd3-TAP em triplicata biológica tanto na presença (+) quanto ausência (-) de Nop53 foram analisados, juntamente com o RNA total, por *northern blot* usando as sondas indicadas biotiniladas. O TAP vazio, expresso na mesma cepa condicional $\Delta nop53$ /ptet-OFF-GFP-NOP53, foi utilizado como controle negativo e a cepa $\Delta rrp6$ como controle para o acúmulo do pré-rRNA 5.8S+30. * banda inespecífica.

Complementando a análise proteômica, o conteúdo de pré-rRNA dos pré-ribossomos copurificados com Arx1 e Nmd3 foi avaliado em triplicatas biológicas por *northern blot* (Fig. 32). Como esperado, a depleção de Nop53 causou um acúmulo significativo dos pré-rRNAs 7S e 27S, visível nas canaletas do extrato total (Fig. 32B). O controle negativo (Fig. 32B, painéis à esquerda)

foi importante para revelar níveis contaminantes de pré-rRNAs 35S e 27SA, que não fazem parte das partículas pré-ribossomais Arx1 ou Nmd3. Os resultados obtidos confirmaram a análise proteômica, mostrando níveis mais baixos de 7S, 5.8S e 25S copurificados com Arx1 após depleção de Nop53, mesmo havendo nesta condição um acúmulo celular do pré-rRNA 7S (Fig. 32B, painéis do meio). Comparativamente, as análises de *northern blot* com Rsa4 mostraram um perfil semelhante ao de Arx1, enquanto Nop7 enriqueceu pré-rRNAs 27S e 7S (Fig. 33A). Estas observações também são coerentes com os dados de proteômica indicando um recrutamento menos eficiente de Arx1 e Rsa4 para intermediários pré-60S nucleoplasmáticos. Notavelmente, este impacto da depleção de Nop53 pareceu um pouco mais pronunciado com Arx1.

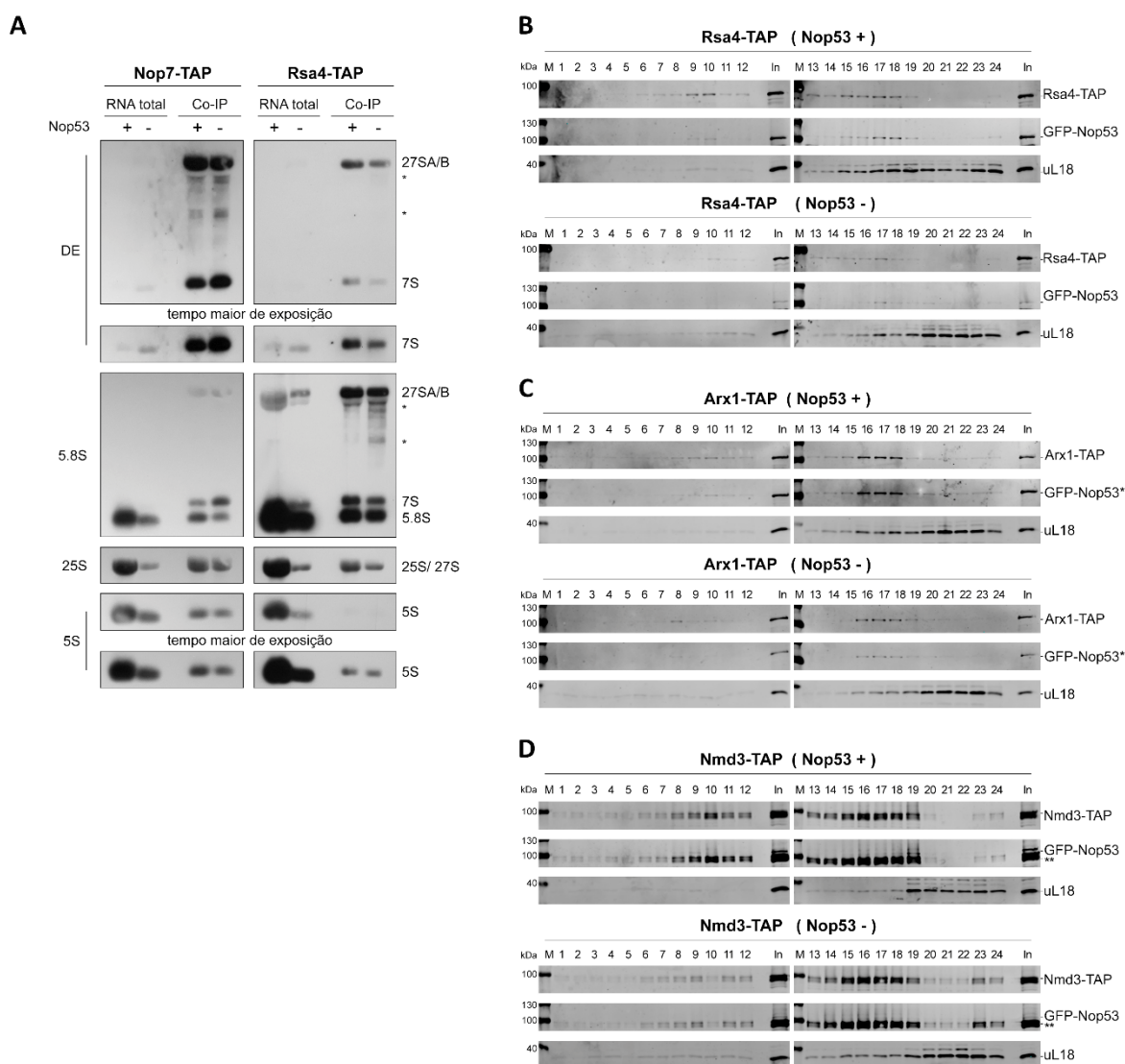


Figura 33. Partículas pré-60S nucleares intermediárias e tardias ainda são formadas após depleção de Nop53. (A) Análise por *northern blot* dos pré-rRNAs coimunoprecipitados (co-IP) com Nop7-TAP e Rsa4-TAP na presença (+) e ausência (-) de Nop53, juntamente com o RNA total, usando as sondas indicadas biotinizadas. * banda inespecífica. (B-D) Análise do efeito da depleção de Nop53 no perfil de sedimentação dos fatores de montagem Rsa4, Arx1 e Nmd3 fusionados ao TAP tag e expressos na cepa $\Delta nop53/ptet$ -OFF-GFP-NOP53. O extrato total obtido das cepas cultivadas com depleção (-) e sem depleção (+) de Nop53 foi aplicado sobre gradiente linear de glicerol 10-30% e separado por ultracentrifugação. Todas as 24 frações coletadas a partir do topo foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com anti-CBP, anti-GFP e anti-uL18. * banda de Arx1-TAP se sobrepõe completamente à GFP-Nop53. ** Nmd3-TAP é detectado abaixo de GFP-Nop53. In: Input – extrato total; M: Marcador de massa molecular de proteína.

Uma vez que na ausência de Nop53 a formação de partículas Nog2 encontra-se afetada, mas não totalmente bloqueada, observamos através da análise do perfil de sedimentação em gradiente de glicerol (Figs. 33B-D), que ambos Arx1 e Rsa4, com perfis de sedimentação muito similares, encontram-se, do mesmo modo que Nmd3, ainda associados a intermediários pré-60S após depleção de Nop53. Consistente com este resultado e com a retenção do *ITS2-foot* em estágios tardios, Nmd3, que normalmente coimunoprecipita apenas rRNAs maduros, copurificou, após a depleção de Nop53, o pré-rRNA 7S, com uma ligeira diminuição nos níveis do rRNA 25S (Fig. 32B, painéis à direita).

Questionamos então se dentre os efeitos da depleção de Nop53, também a localização subcelular de fatores de montagem nucleocitoplasmáticos ou de componentes do *ITS2-foot* seria afetada. Para tanto, analisamos por microscopia de fluorescência Nmd3, Arx1 e Nop7 fusionados a GFP, tanto na presença quanto ausência de Nop53 (Fig. 34). Consistente com os resultados acima descritos, a localização subcelular de Nmd3 foi afetada pela depleção de Nop53 (Fig. 34A). Embora ainda presente no citoplasma, Nmd3 foi encontrado altamente concentrado no núcleo após depleção de Nop53, indicando retenção parcial de Nmd3 em associação com intermediários pré-60S nucleares. Curiosamente, o componente do *ITS2-foot* Nop7, que em um estudo anterior havia acumulado no citoplasma em mutantes pontuais do motivo AIM de *nop53* (Sarkar et al., 2017), encontrou-se retido no núcleo na condição de depleção de Nop53 (Fig. 34B). A localização subcelular de Arx1, por sua vez, não foi afetada pela depleção de Nop53, permanecendo também concentrada no núcleo (Fig. 34C). Em conjunto, estas observações apontam que a depleção de Nop53, para além do efeito em intermediários nucleolares, também causa retenção parcial de fatores de montagem nucleocitoplasmáticos no núcleo, reduzindo a formação de intermediários pré-60S citoplasmáticos.

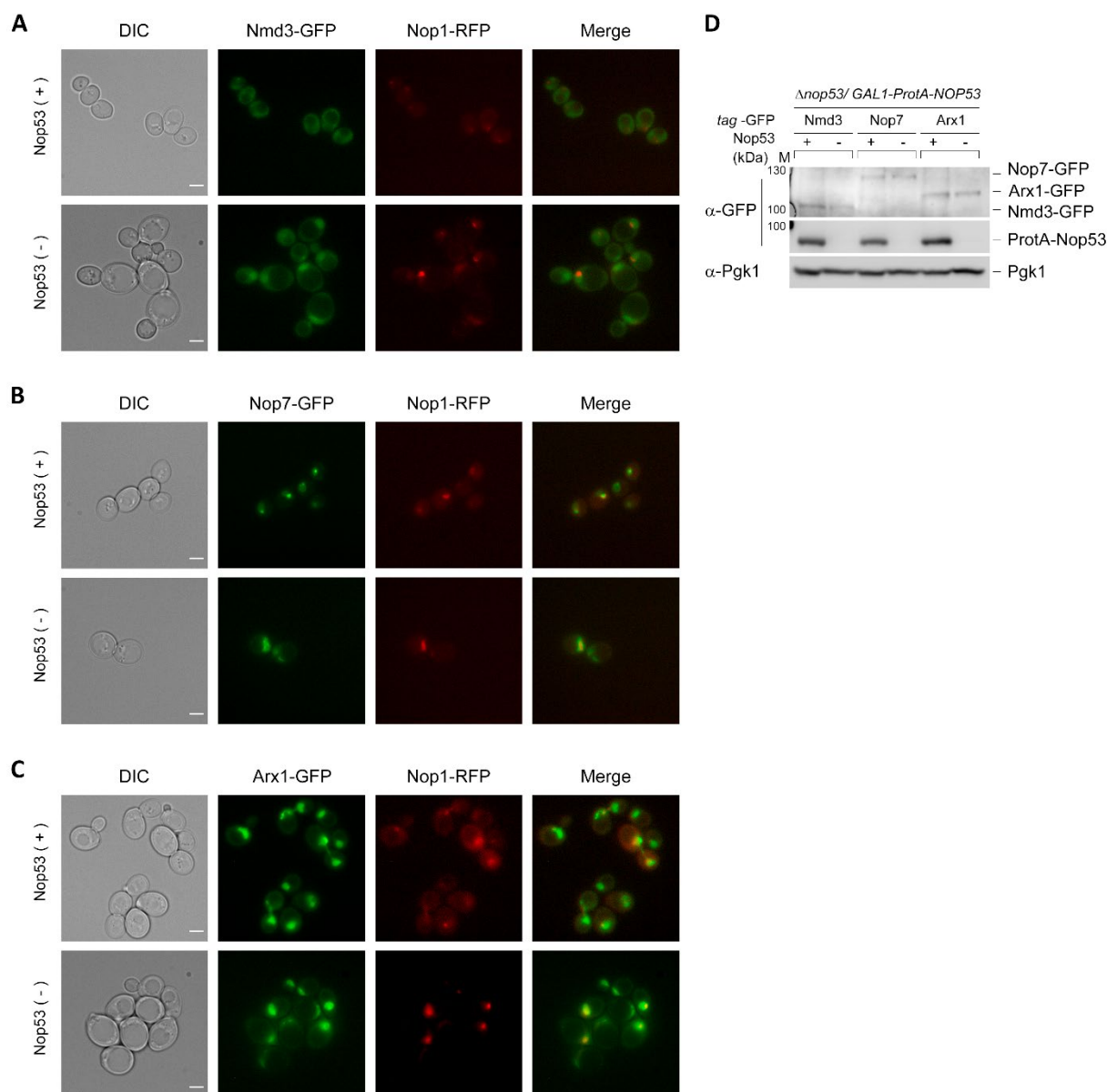


Figura 34. Depleção de Nop53 afeta a localização subcelular de Nmd3 e Nop7. (A) Nmd3, (B) Nop7 e (C) Arx1 foram fusionados à GFP na cepa condicional $\Delta nop53 / GAL1-ProtA-NOP53$ expressando RFP-Nop1 como um marcador nucleolar. A localização subcelular destes fatores de montagem ribossomal foi analisada por microscopia de fluorescência em células vivas cultivadas em meio com galactose (Nop53 +) ou transferidas para meio com glicose (Nop53-). Nmd3 e Nop7 exibem sinal nucleoplasmático aumentado após depleção de Nop53. (Barra de escala: 2 μ m) (D) Extrato total de uma alíquota das culturas de células utilizadas para microscopia de fluorescência foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com os anticorpos indicados.

4.4.2 A depleção de Nop53 leva ao acúmulo de partículas pré-ribossomais nucleolares (estado E) e à associação de Erb1 a intermediários pré-60S tardios

Para melhor caracterizar o impacto da depleção de Nop53 nos estágios nucleolares mais iniciais de maturação do 60S (particularmente no estado E), analisamos por LC-MS/MS e *northern blot* os pré-ribossomos coimunoprecipitados com Erb1-TAP tanto na presença quanto ausência de Nop53 (Figs. 35 e 36). Erb1 é um fator de montagem nucleolar que se associa muito cedo aos intermediários pré-60S nascentes (Sahasranaman et al., 2011; Chen et al., 2017; Kater

et al., 2017; Sanghai et al., 2018; Zhou et al., 2019a; Chaker-Margot e Klinge, 2019), interagindo com vários fatores de montagem (Fig. 35A), incluindo componentes do *ITS2-foot*, como Nop7 (Kater et al., 2017). No entanto, diferentemente de Nop7, que se dissocia apenas após o recrutamento de Nop53 e formação da partícula Nog2, Erb1 permanece associado unicamente a intermediários nucleolares até o estado E (Wu et al., 2016; Kater et al., 2017). Por impedimento estérico, a dissociação de Erb1 é necessária para que haja o recrutamento de Nop53 ao pré-60S (Wu et al., 2016; Kater et al., 2017, 2020). Foi, portanto, escolhida como uma isca adequada para avaliar os estágios de maturação nucleolar que precedem a associação de Nop53.

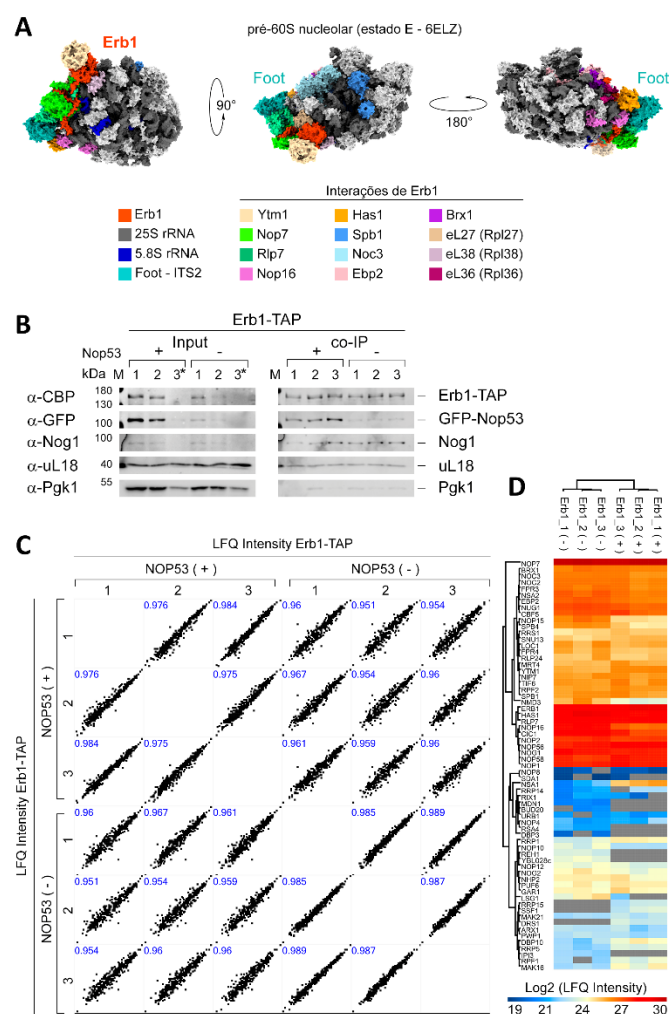


Figura 35. Ensaios de co-IP com Erb1-TAP. Análise dos resultados dos ensaios de coimunoprecipitação com Erb1-TAP, expressa na cepa $\Delta nop53/ptet$ -OFF-GFP-NOP53, e realizados com (-) e sem (+) depleção de Nop53. **(A)** Partícula nucleolar do estado E, destacando o fator de montagem Erb1 e suas interações. O fator nucleolar Erb1 se associa à base do ITS2-foot bloqueando a associação prematura de Nop53. Sua extremidade N-terminal longa se estende no interior e pela lateral do pré-60S estabelecendo múltiplos contatos com fatores de montagem e proteínas-r. **(B)** Análise por SDS-PAGE e *western blot* do input (extrato total) e de uma alíquota de cada eluição (co-IP) mostrando todas as replicatas biológicas. (* perda de material durante aplicação no gel. M: marcador de massa molecular de proteínas). **(C)** As eluições foram submetidas a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas. Matriz de correlação das replicatas biológicas com base nos valores de *LRFQ Intensity*, mostrando coeficientes de correlação de Pearson em azul. **(D)** *Heatmap* obtido com base nos valores de $\log_2(LRFQ Intensity)$ de todos os fatores de montagem do pré-60S identificados em pelos menos duas replicatas biológicas, com clusterização hierárquica dos fatores de montagem (linhas) e das replicatas biológicas (colunas).

Após a depleção de Nop53, Erb1 copurificou níveis mais elevados de fatores de montagem do estado E (ex. Spb4, Has1, Nop16, Ebp2), alguns dos quais remanescentes de estágios anteriores. Sua associação com fatores de montagem específicos dos estados A-D (ex. Nsa1, Rrp1, Mak16, Rrp15 e Ssf1), no entanto, diminuiu significativamente (Fig. 36A-C), sugerindo uma associação reduzida de Erb1 a essas partículas pré-ribossomais nucleolares mais iniciais. Em consonância, fatores de montagem nucleolares que constituem os primeiros intermediários pré-60S (Rrp5, Drs1, Dbp10) também foram copurificados com Erb1 em níveis diminuídos após depleção de Nop53, indicando fortemente que nesta condição a maioria das partículas Erb1 nucleolares correspondem a intermediários no estado E.

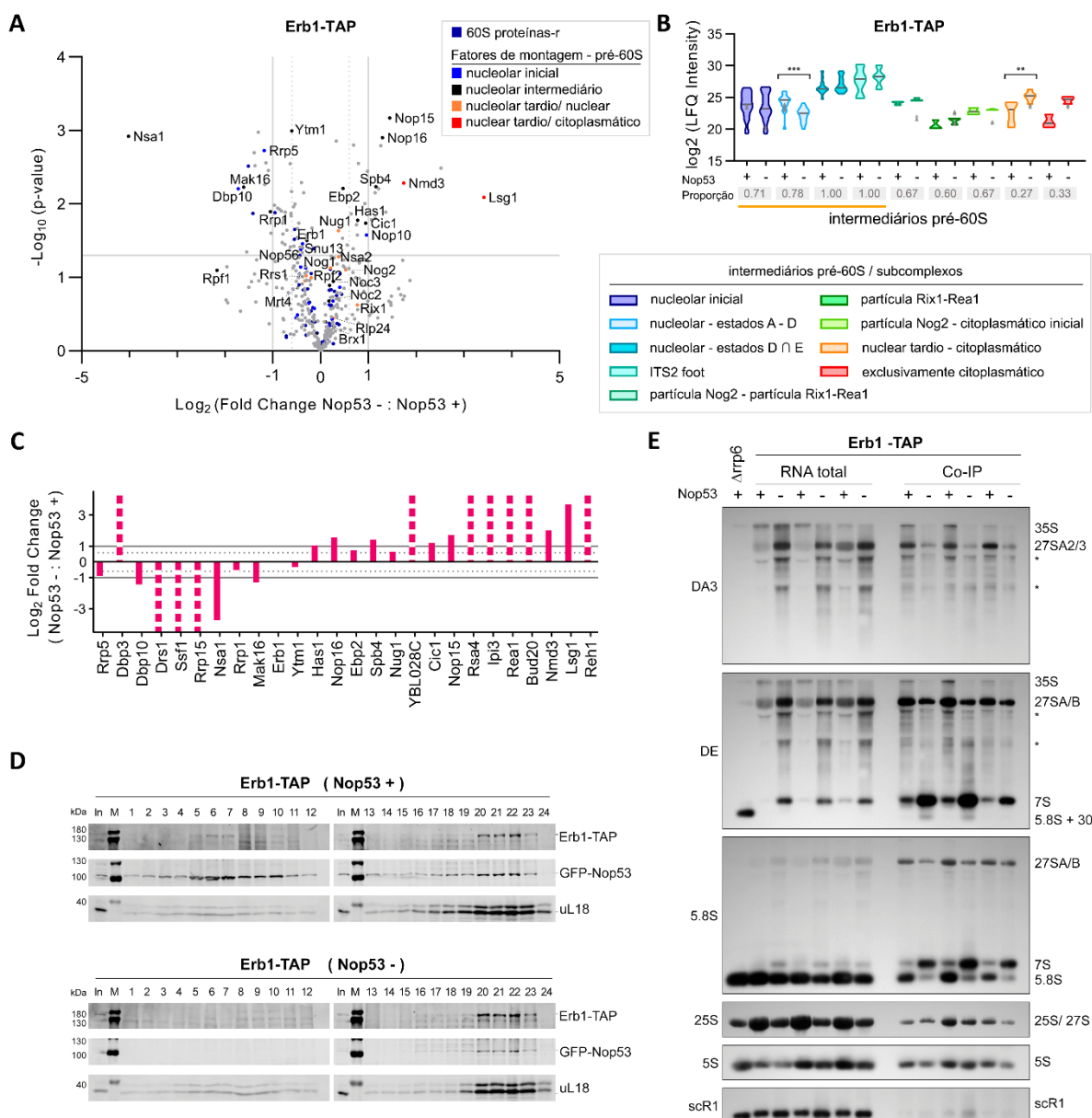


Figura 36. Erb1 encontra-se associada predominantemente ao estado E e a partículas pré-60S tardias após depleção de Nop53. (A) Análise proteômica quantitativa *label-free*, baseada em espectrometria de massas, dos pré-ribossomos coimunoprecipitados em triplicatas biológicas com Erb1-TAP. O *volcano plot* mostra a comparação entre depleção (-) e não-depleção (+) de Nop53, apresentando os valores de $-\log_{10}(\text{p-value})$ e de $\log_2(\text{fold change Nop53 - : Nop53+})$ para cada proteína, identificada em pelo menos duas replicatas biológicas. Linhas cinzas delimitam os

valores de *cut-off* (p -value < 0.05; fold change < 0.5 ou > 2.0). Proteínas-r da subunidade 60S são destacadas, assim como fatores de montagem do pré-60S, classificados de acordo com o estágio de maturação de que participam. **(B)** Análise dos fatores de montagem agrupados em conjuntos representativos de intermediários pré-60S específicos. Cada cor de *violin plot* indica um conjunto definido de fatores que compõem intermediários pré-60S específicos. Os *violin plots* mostram a distribuição dos valores de $\log_2(LFQ\ Intensity)$ dos fatores de montagem copurificados que os compõem. (estados D \cap E designa fatores comuns entre as partículas do estado D e E). Os fatores de montagem identificados em apenas uma condição (Nop53 + ou Nop53-) são representados como triângulos cinza. A mediana é indicada por uma linha cinza escuro. Comparando-se a forma e mediana de *violin plots* de mesma cor (com depleção (-) e não-depleção (+) de Nop53), pode-se avaliar o impacto da depleção de Nop53 na associação de Erb1 aos componentes dos intermediários pré-60S representados. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) são destacadas no gráfico (** $p = 0.0001$; * $p = 0.0043$). Abaixo de cada par de *violin plots* (Nop53 +, Nop53 -) é indicada a proporção de fatores daquele conjunto que foi copurificada e identificada com Erb1-TAP. Uma barra horizontal indica os intermediários pré-60S aos quais se espera que Erb1 esteja associada. **(C)** Valores de $\log_2(Fold\ Change(Nop53- : Nop53+))$, normalizados pela isca, de todos fatores de montagem do pré-60S identificados. Da esquerda para direita os fatores de montagem são organizados do estágio nucleolar mais inicial até o estágio mais tardio de maturação citoplasmática. Barras tracejadas indicam fatores de montagem identificados em uma única condição (Nop53 + ou Nop53 -). **(D)** Análise do perfil de sedimentação de Erb1-TAP. Extratos totais de culturas obtidas com depleção (-) e sem depleção (+) de Nop53 foram submetidos à separação em gradiente linear de glicerol 10-30%. As 24 frações coletadas a partir do topo foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com anti-CBP, anti-GFP e anti-uL18. (In: input – extrato total; M: marcador de massa molecular de proteína). **(E)** Análise por *northern blot* dos pré-rRNAs copurificados (co-IP) com Erb1-TAP na ausência (-) e presença (+) de Nop53, juntamente com o RNA total, usando as sondas indicadas biotinizadas. *banda inespecífica. A sonda usada para o rRNA 25S também reconhece o pré-rRNA 27S, conforme indicado à direita por 25S/27S. (Embora não possamos descartar um possível nível contaminante de rRNA 25S copurificado com Erb1, a banda visualizada com esta sonda provavelmente corresponde ao pré-rRNA 27S). A cepa $\Delta rrp6$ foi usada como controle para o acúmulo do pré-rRNA 5.8S+30.

Consistente com estas observações, Erb1 coimunoprecipitou, na ausência de Nop53, menos pré-rRNAs 27SA₂/A₃, estando ainda associada ao pré-rRNA 27SB, que compõe partículas do estado E (Fig. 36E). Nenhuma mudança significativa foi observada no perfil de sedimentação de Erb1 após a depleção de Nop53 (Fig. 36D), confirmando estar nesta condição estavelmente associada a subunidades pré-ribossomais.

Curiosamente, Erb1 coimunoprecipitou, na ausência de Nop53, níveis mais elevados de pré-rRNA 7S, bem como de componentes da partícula Nog2 (ex. Rsa4, Bud20) e fatores de montagem nucleoplasmáticos/citoplasmáticos tardios (ex. Nmd3, Lsg1, Reh1), indicando sua associação, nesta condição, a partículas pré-60S não-nucleolares. Estas observações são consistentes com o fato do fator de montagem tardio Nmd3, nesta mesma condição, ter coimunoprecipitado níveis mais elevados de Erb1 (Fig. 31C). Resultado similar foi obtido em um estudo anterior, mostrando que Erb1 é copurificada com Nmd3 em mutantes da endonuclease Las1, responsável pela clivagem endonucleolítica do ITS2 (Biedka et al., 2018). De modo geral, estes achados convergentes indicam que a formação de partículas pré-60S tardias retendo o *ITS2-foot* não processado leva à ligação de Erb1, de outra forma não verificada, a estes intermediários pré-ribossomais nucleares tardios, o que é particularmente favorecido neste estudo, dado que o sítio de ligação Erb1 no *ITS2-foot* está exposto e disponível na ausência de Nop53.

4.4.3 A depleção de Nop53 afeta eventos tardios de maturação da subunidade ribossomal maior, tendo impacto na associação de Yvh1 ao pré-60S

Como discutido anteriormente, o fator de montagem nucleocitoplasmático tardio Yvh1, que é necessário para a maturação do *P-stalk* (Fig. 37A) (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009; Sarkar et al., 2016), não foi detectado após depleção de Nop53 em partículas pré-ribossomais coimunoprecipitadas tanto com Nmd3 como com Arx1 (Figs. 29H-I e 30H-I). Para confirmar se a depleção de Nop53 poderia, de fato, afetar o recrutamento de Yvh1 a partículas pré-60S tardias, analisamos pré-ribossomos copurificados com Yvh1-TAP tanto na presença quanto ausência de Nop53 por *northern blot* e análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em LC-MS/MS (Figs. 37-39). Como controle, o fator de montagem exclusivamente citoplasmático Lsg1-TAP também foi utilizado como isca (Figs. 37E).

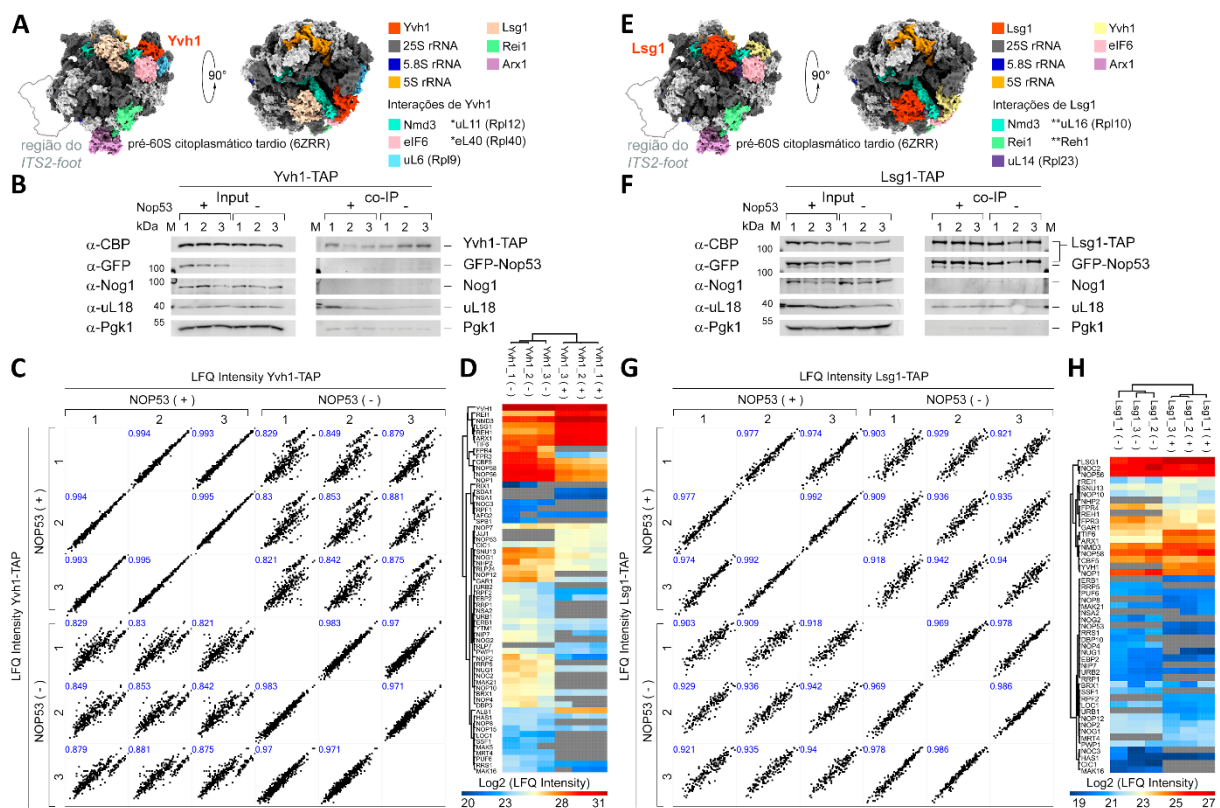


Figura 37. Ensaios de co-IP com Yvh1-TAP e Lsg1-TAP. Análise dos resultados dos ensaios de coimunoprecipitação com (A-D) Yvh1-TAP e (E-H) Lsg1-TAP, expressos na cepa $\Delta nop53/ptet\text{-OFF-GFP-NOP53}$ e realizados com (-) e sem (+) depleção de Nop53. (A) Partícula Lsg1 (I) citoplasmática, destacando o fator de montagem Yvh1 e suas interações. O fator nucleocitoplasmático Yvh1 é uma fosfatase com um domínio C-terminal de ligação a zinco que, ao se associar à base do *P-stalk* em formação, induz alostericamente a dissociação de Mrt4 (*placeholder* de uL10), permitindo o subsequente recrutamento das proteínas-r que compõem o *P-stalk*. (E) Partícula Lsg1 (I) citoplasmática, destacando o fator de montagem Lsg1 e suas interações. O fator exclusivamente citoplasmático Lsg1 é uma GTPase que interage diretamente com Nmd3, e cuja dissociação está ligada à liberação de Nmd3, e ao remodelamento do PTC. (B, F) Análise por SDS-PAGE e *western blot* do input (extrato total) e de uma alíquota de cada eluição (co-IP) mostrando todas as replicatas biológicas. (M: marcador de massa molecular de proteínas). (C, G) As eluições foram submetidas a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas. Matriz de correlação das replicatas biológicas com base nos valores de *LFQ Intensity*, mostrando coeficientes de correlação de Pearson em azul. (D, H) *Heatmap* obtido com base nos valores de $\log_2(\text{LFQ Intensity})$ de todos os fatores de montagem do pré-60S identificados em pelos menos duas replicatas biológicas, com clusterização hierárquica dos fatores de montagem (linhas) e das replicatas biológicas (colunas).

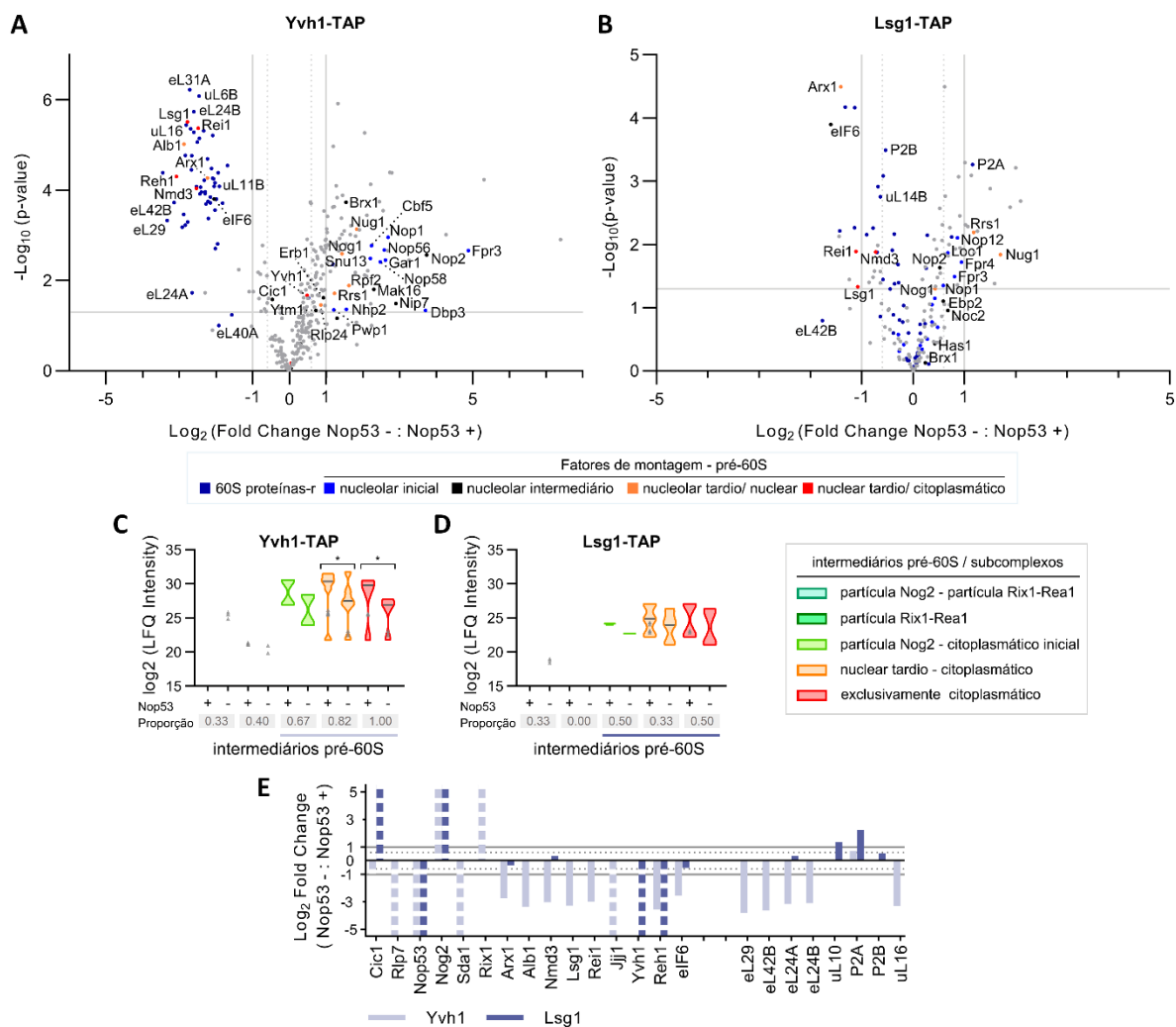


Figura 38. A depleção de Nop53 tem diferentes impactos no interactoma de Yvh1 e Lsg1. (A-E) Avaliação do efeito da depleção de Nop53 nos estágios de maturação tardia do pré-60S. Análise proteômica quantitativa *label-free*, baseada em espectrometria de massas, dos pré-ribossomos coimunoprecipitados em triplicatas biológicas com os fatores de montagem Yvh1-TAP e Lsg1-TAP. **(A, B)** *Volcano plots* mostram a comparação entre depleção (-) e não-depleção (+) de Nop53, apresentando os valores de $-\log_{10}(\text{p-value})$ e de $\log_2(\text{fold change Nop53- : Nop53+})$ para cada proteína, identificada em pelo menos duas replicatas biológicas. Linhas cinzas delimitam os valores de *cut-off* ($\text{p-value} < 0.05$; $\text{fold change} < 0.5$ ou > 2.0). Proteínas-r da subunidade 60S são destacadas, assim como fatores de montagem do pré-60S, classificados de acordo com o estágio de maturação de que participam. **(C, D)** Análise dos fatores de montagem agrupados em conjuntos representativos de intermediários pré-60S específicos. Cada cor de *violin plot* indica um conjunto definido de fatores que compõem intermediários pré-60S específicos. Os *violin plots* mostram a distribuição dos valores de $\log_2(\text{LFQ Intensity})$ dos fatores de montagem copurificados que os compõem. Os fatores de montagem identificados em apenas uma condição (Nop53 + ou Nop53-) são representados como triângulos cinza. A mediana é indicada por uma linha cinza escuro. Comparando-se a forma e mediana de *violin plots* de mesma cor (com depleção (-) e não-depleção (+) de Nop53), pode-se avaliar o impacto da depleção de Nop53 na associação da isca aos componentes dos intermediários pré-60S representados. Diferenças estatisticamente significativas ($\text{p} < 0.05$) são destacadas no gráfico (Yvh1-TAP * $\text{p} = 0.03150$; * $\text{p} = 0.00205$). Abaixo de cada par de *violin plots* (Nop53 +, Nop53 -) é indicada a proporção de fatores daquele conjunto que foi copurificada e identificada com **(C)** Yvh1-TAP ou **(D)** Lsg1-TAP. Uma barra horizontal indica os intermediários pré-60S aos quais se espera que a isca esteja associada. **(E)** Valores de $\log_2(\text{Fold Change}(\text{Nop53- : Nop53+}))$, normalizados pela isca, de todos fatores de montagem do pré-60S identificados. Da esquerda para direita os fatores de montagem são organizados segundo sua ordem de associação ao pré-60S. Barras tracejadas indicam fatores de montagem identificados em uma única condição (Nop53 + ou Nop53 -).

Tanto Yvh1 quanto Lsg1, após depleção de Nop53, coimunoprecipitaram alguns fatores montagem iniciais e pré-rRNAs nucleolares, refletindo o acúmulo destes intermediários observado nesta condição (Fig. 32B, painéis à esquerda). Focando a análise apenas em fatores de montagem tardios, os resultados revelaram um efeito significativo da depleção de Nop53 no interactoma de Yvh1, consistente com os ensaios com Nmd3-TAP e Arx1-TAP (Figs. 38A,C,E). Tanto fatores de montagem nucleocitoplasmáticos (ex. Arx1, Alb1, Nmd3), quanto citoplasmáticos (ex. Lsg1, Rei1, Jjj1, Reh1), componentes de partículas pré-60S nucleares tardias e citoplasmáticas, foram significativamente menos coimunoprecipitados com Yvh1-TAP na ausência de Nop53, do mesmo modo que a maioria das proteínas-r do 60S, incluindo aquelas de associação tardia que são exclusivamente citoplasmáticas (eL29, eL42, eL24, uL16). Consistente com esta observação, os níveis de pré-rRNA 7S e dos rRNAs maduros 5.8S, 25S e 5S copurificados com Yvh1 foram significativamente reduzidos (Fig. 39A, painéis à esquerda). Comparando-se estes dados com os de todas as iscas utilizadas neste estudo, Yvh1 foi a única para a qual a associação com todos os rRNAs maduros foi drasticamente reduzida após depleção de Nop53.

Nesta mesma condição, Lsg1 coimunoprecipitou menores níveis do rRNA 25S (Fig. 39A, painéis à direita), e de alguns fatores de montagem de associação tardia (ex. Arx1, Rei1, Reh1), incluindo o próprio Yvh1 (Figs. 38B,D,E), indicando uma formação diminuída de intermediários pré-60S citoplasmáticos após depleção de Nop53. Deve-se notar, no entanto, que a eluição de Lsg1, na ausência de Nop53, não exibiu uma diminuição significativa no nível da maioria das proteínas-r coimunoprecipitadas, ou do rRNA 5S, além de apresentar um aumento do pré-rRNA 7S (Fig. 39A, painéis direitos). Estas observações, em conjunto, sugerem que a depleção de Nop53 tem um maior impacto no recrutamento de Yvh1 do que na associação de Lsg1 a intermediários pré-60S.

Esta hipótese foi corroborada pela análise dos perfis de sedimentação de Yvh1 e Lsg1 em gradiente de glicerol (Fig. 39B-C). Enquanto Lsg1 ainda co-sedimenta com grandes complexos (frações 18-24), assim como a proteína-r uL18, após a depleção de Nop53, a proteína Yvh1 torna-se concentrada nas frações superiores (1-10) do gradiente, com quase nenhum sinal detectado nas frações inferiores correspondentes aos intermediários pré-60S. A depleção de Nop53, portanto, afeta não apenas etapas nucleolares de maturação da subunidade 60S, impactando também estágios tardios como o recrutamento de Yvh1.

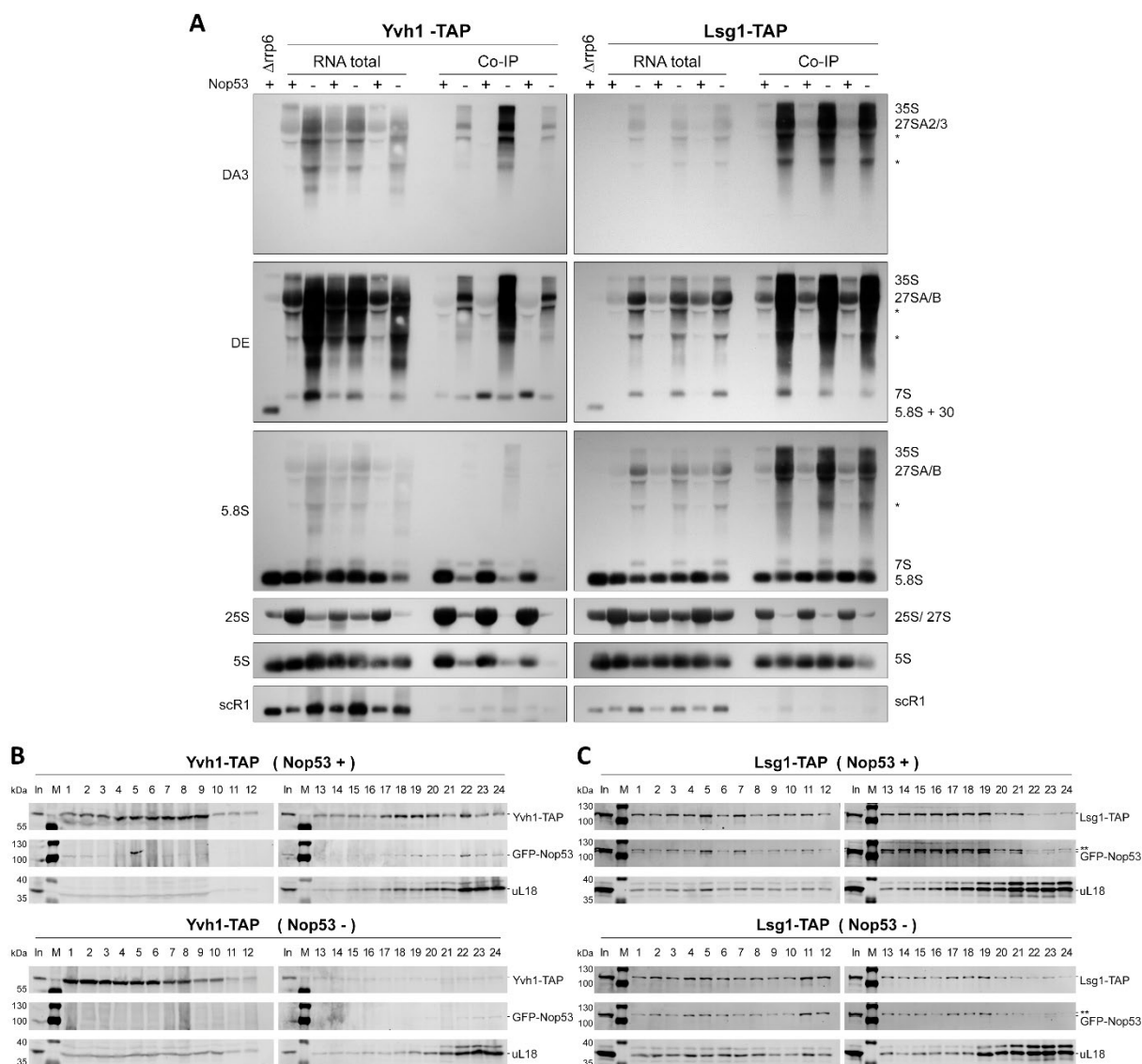


Figura 39. O recrutamento de Yvh1 ao pré-60S é afetado pela depleção de Nop53. (A) Os pré-rRNAs coimunoprecipitados (co-IP) com Yvh1-TAP e Lsg1-TAP em triplicata biológica tanto na presença (+) quanto ausência (-) de Nop53 foram analisados, juntamente com o RNA total, por *northern blot* usando as sondas indicadas biotiniladas. A cepa $\Delta rrp6$ foi usada como controle para o acúmulo do pré-rRNA 5.8S+30. * banda inespecífica. **(B-C)** Análise do efeito da depleção de Nop53 no perfil de sedimentação de Yvh1-TAP e Lsg1-TAP expressos na cepa $\Delta nop53/ptet$ -OFF-GFP-NOP53. O extrato total obtido das cepas cultivadas com depleção (-) e sem depleção (+) de Nop53 foi aplicado sobre gradiente linear de glicerol 10-30% e separado por ultracentrifugação. Todas as 24 frações coletadas a partir do topo foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com anti-CBP, anti-GFP e anti-uL18. ** indica a banda de Lsg1-TAP próxima a de GFP-Nop53. (In: Input – extrato total; M: Marcador de MM de proteína).

Sendo Yvh1 necessário para a liberação do fator de montagem Mrt4 (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009), questionamos se a depleção de Nop53 também afetaria a associação deste último aos intermediários pré-60S (Fig. 40). Mrt4 é um fator recrutado ainda nas etapas iniciais de formação do 60S no nucléolo (estado C) (Kater et al., 2017; Sanghai et al., 2018; Zhou et al., 2019a) e que se dissocia do pré-60S apenas no núcleo/citoplasma após a associação de Yvh1, que desencadeia uma mudança conformacional no seu sítio de ligação (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009; Rodríguez-Mateos et al., 2009a, 2009b; Sarkar et al., 2016; Zhou et al., 2019b; Klingauf-Nerurkar et al., 2020).

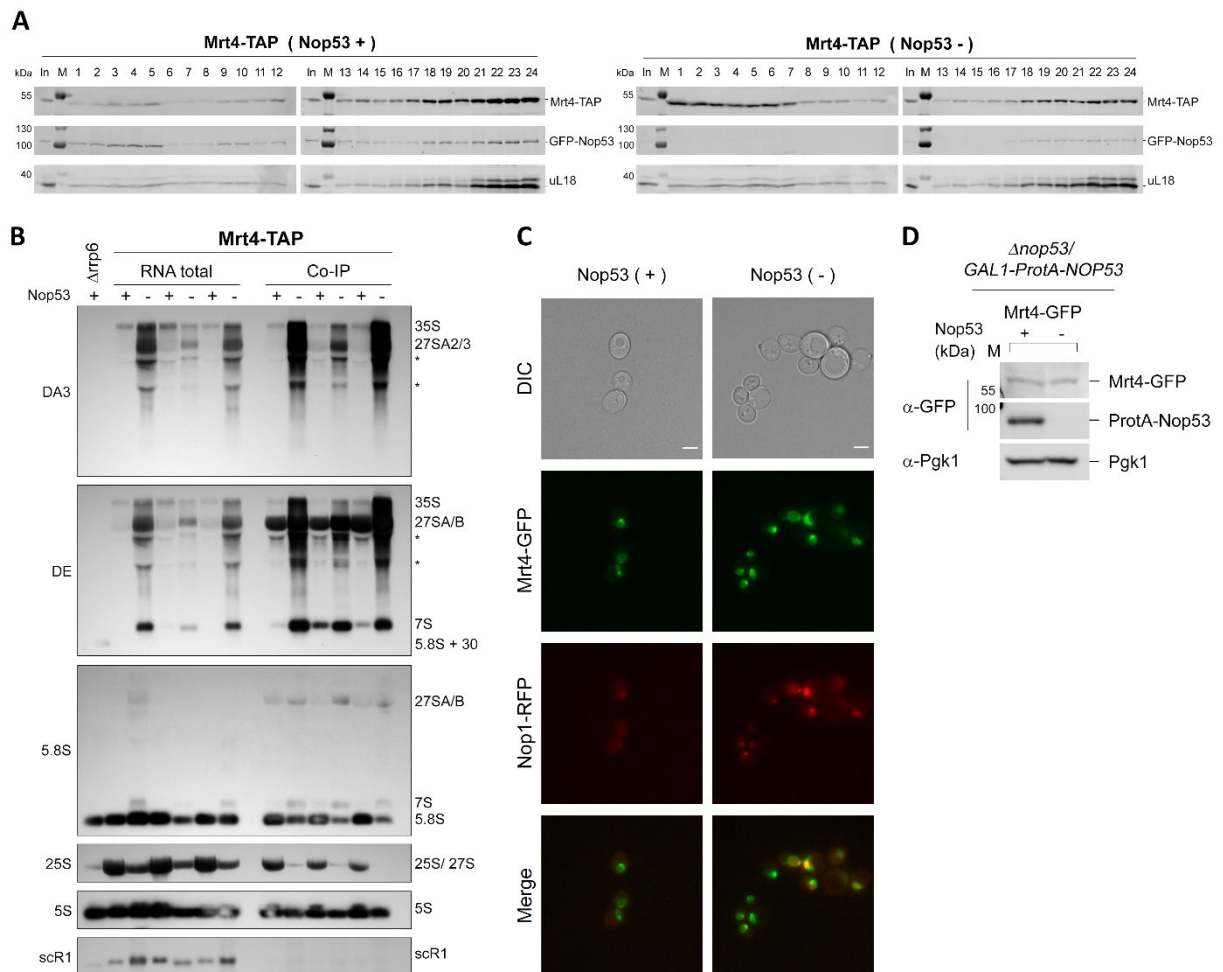


Figura 40. O fator de montagem Mrt4 não se encontra retido em intermediários pré-60S citoplasmáticos após a depleção de Nop53. Avaliação se a depleção de Nop53, ao afetar o recrutamento de Yvh1, também impacta a liberação de Mrt4 de partículas pré-ribossomais. **(A)** Análise do perfil de sedimentação de Mrt4-TAP expressa na cepa condicional Δ nop53/ptet-OFF-GFP-NOP53. Extratos totais de culturas obtidas com depleção (-) e sem depleção (+) de Nop53 foram submetidos à separação em gradiente linear de glicerol 10-30%. As 24 frações coletadas a partir do topo foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com anti-CBP, anti-GFP e anti-uL18. (In: input – extrato total; M: marcador de MM de proteína). **(B)** Análise por *northern blot* dos pré-rRNAs copurificados (co-IP) com Mrt4-TAP na ausência (-) e presença (+) de Nop53, juntamente com o RNA total, usando as sondas indicadas biotinizadas. *banda inespecífica. A cepa Δ rrp6 foi usada como controle para o acúmulo do pré-rRNA 5.8S+30. **(C)** A localização subcelular de Mrt4-GFP na cepa condicional Δ nop53/GAL1-ProtA-NOP53 expressando RFP-Nop1 como marcador nucleolar foi avaliada por microscopia de fluorescência em células vivas cultivadas em meio com galactose (Nop53 +) ou após transferência para meio com glicose (Nop53-). (Barra de escala: 2 μ m). **(D)** Extrato total de uma alíquota das culturas de células utilizadas para microscopia de fluorescência foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* com os anticorpos indicados.

Os resultados mostram que, após depleção de Nop53, Mrt4 se encontra associada a intermediários pré-60S nas frações inferiores (18-24) do gradiente de glicerol, mas também enriquecida na fração livre (1-10) (Fig. 40A), indicando, nesta condição, que Mrt4 não está retida em intermediários pré-60S citoplasmáticos, como anteriormente observado na cepa Δ yvh1 (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009). Consistente com esta interpretação, a depleção de Nop53 levou a um aumento da associação de Mrt4 a partículas pré-ribossomais contendo os pré-rRNAs 7S e 27SA/B, e a uma associação diminuída a rRNAs maduros (Fig. 40B). Nesta condição, a

maioria dos pré-ribossomos associados a Mrt4 deve corresponder a intermediários nucleolares e nucleares. Como esperado, portanto, observamos que a localização subcelular de Mrt4 não foi significativamente afetada após a depleção de Nop53, permanecendo nuclear e concentrada no nucléolo (Figs. 40C-D).

4.5. Mutantes truncados de Nop53

Estudos iniciais de caracterização funcional e estrutural de Nop53 foram essenciais para a compreensão da importância de algumas de suas regiões proteicas conservadas. A região N-terminal, por exemplo, é altamente conservada e abriga entre os resíduos de aminoácido 60 e 64 o motivo (AIM) de interação com a helicase Mtr4, que interage com o exossomo, auxiliando no processamento 3'-5' do pré-rRNA 7S (Schuch et al., 2014; Thoms et al., 2015; Falk et al., 2017b). A extremidade C-terminal, por sua vez, está envolvida principalmente em interações com proteínas-r, o rRNA 25S e fatores de montagem como Rlp7 e Nop7 (Wu et al., 2016, 2017). A contribuição destas diferentes regiões para a função de Nop53, entretanto, ainda não foi totalmente explorada, sobretudo a extremidade N-terminal cuja estrutura e interações, à exceção do AIM, ainda permanecem desconhecidas. Visando aprofundar a caracterização do papel das diferentes regiões de Nop53 durante a montagem da subunidade ribossomal maior, construímos novos mutantes truncados nas extremidades N- e C-terminal de Nop53 fusionados a GFP (Fig. 41A). Os resultados, análises e discussões desta seção fazem parte do artigo Bagatelli et al. (2021) – Anexo C - *doi: 10.1093/nar/gkab494* - com permissão da Oxford University Press.

4.5.1 Efeito de mutantes truncados de Nop53 no crescimento celular e eventos tardios de maturação do pré-60S

Quatro mutantes de deleção no N-terminal foram criados para avaliar o papel da região em torno do AIM: *nop53* Δ 1-26 e *nop53* Δ 1-47, que ainda contêm o AIM; e *nop53* Δ 48-98 e *nop53* Δ 1-71, ambos desprovidos do AIM. Em paralelo, quatro mutantes do C-terminal foram construídos removendo-se progressivamente 50-80 aminoácidos desta extremidade (*nop53* 1-157, *nop53* 1-230, *nop53* 1-300 e *nop53* 1-380). Estes mutantes fusionados à GFP foram expressos na cepa Δ *nop53*/tet-Off-GFP-NOP53 (Figs. 41-42), permitindo que com o tratamento com doxiciclina (DOX) houvesse repressão transcricional exclusiva de NOP53, mas não do mutante ou do controle testado. GFP foi usado como controle negativo (-), e GFP-Nop53 *full length* (FL) como controle positivo (Fig. 42A).

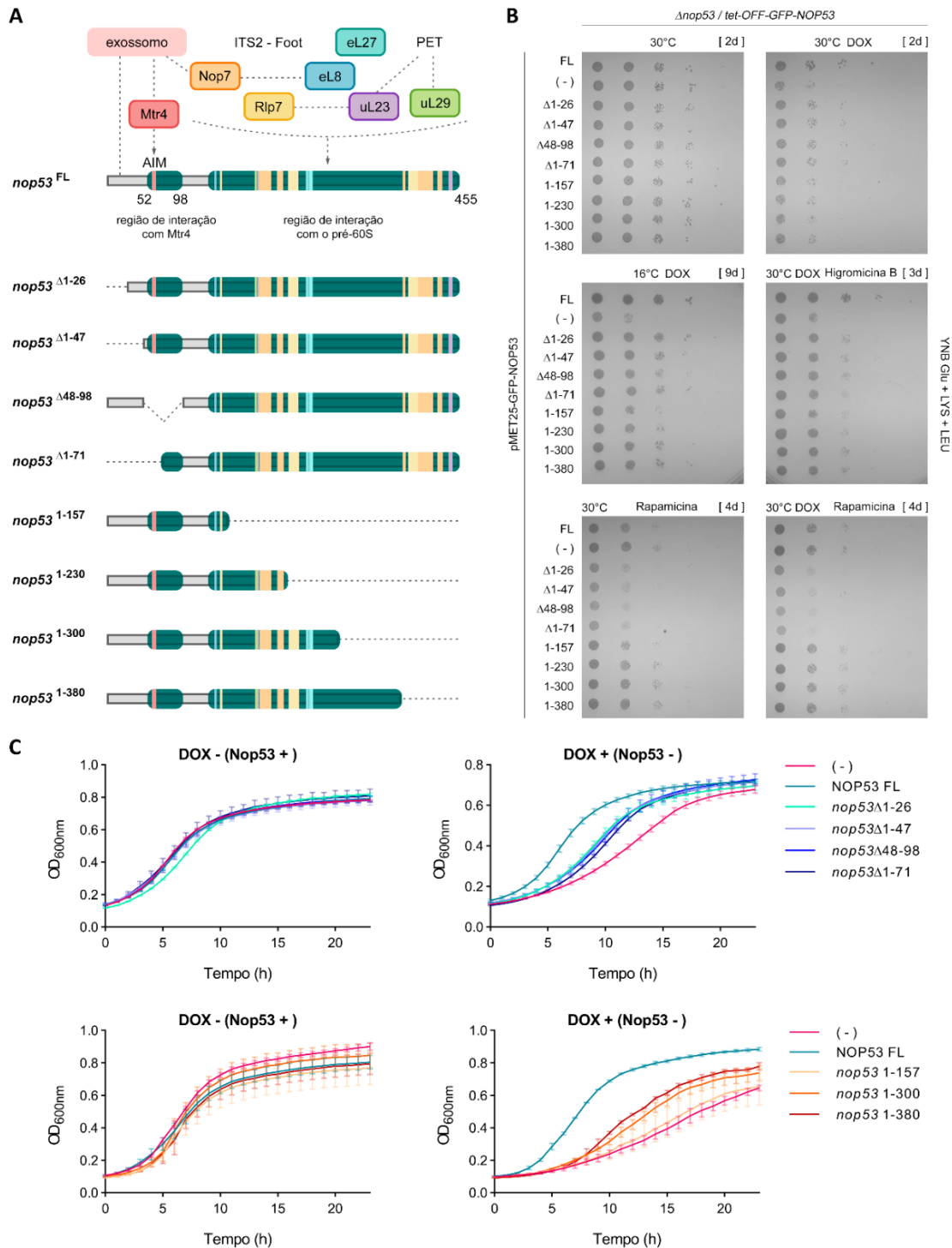


Figura 41. Efeito dos mutantes de deleção N- e C-terminal de Nop53 no crescimento celular. (A) Representação esquemática dos mutantes truncados *nop53* ($\Delta 1-26$, $\Delta 1-47$, $\Delta 48-98$, $\Delta 1-71$, 1-157, 1-230, 1-300, 1-380) indicando, na parte superior, as regiões envolvidas em interações proteína-proteína já descritas. O exossomo e a RNA helicase Mtr4 interagem com a extremidade N-terminal de Nop53 onde o conservado motivo AIM é encontrado. Fatores de montagem (Rlp7, Nop7) e proteínas-r (eL8, uL23, eL27 e uL29) que estão associadas ao ITS2-foot ou PET interagem diretamente com Nop53 em diferentes pontos ao longo da sua porção mediana e C-terminal (B) Ensaio de crescimento celular realizados com a cepa condicional $\Delta nop53 / tet-OFF-GFP-NOP53$ transformada com plasmídeo codificando o controle positivo GFP-NOP53 full length (FL), o controle negativo vetor vazio (-) ou mutantes truncados *nop53* fusionados a GFP. Diluições seriadas destas cepas foram aplicadas sobre meio sólido YNB Glu + Lys + Leu nas condições indicadas. Foram testadas seis condições de crescimento: [30°C], [30°C + doxiciclina (DOX) 1,5 μ g/ml], [16°C], [30°C + higromicina B 200 μ g/ml], [30°C + rapamicina 400nM], [30°C + rapamicina 400nM + doxiciclina (DOX) 1,5 μ g / ml]. O número de dias de incubação é indicado entre colchetes. (C) Curvas de crescimento das mesmas cepas realizadas em triplicatas biológicas a 30°C em YNB Glu +Lys+Leu suplementado (DOX+) ou não (DOX-) com doxiciclina (1,5 μ g/ml). As curvas foram obtidas em equipamento Spectramax® com leituras de OD_{600nm} a cada hora por 24h.

O ensaio de complementação do crescimento mostra que os mutantes truncados complementaram parcialmente o crescimento de $\Delta nop53$ a 30 ° C (Figs. 41B,C). Consistente com este fenótipo, todos os mutantes testados acumularam o pré-rRNA 7S, embora em níveis diferentes (Fig. 42B). As deleções no N-terminal e o mutante *nop53* 1-157 exibiram os maiores aumentos nos níveis de pré-rRNA 7S, semelhantes, mas inferiores ao efeito da depleção de Nop53. Estas observações não apenas confirmam o papel essencial do AIM, e a importante função da região central de Nop53 (aa 157 a 300) estabilizando sua associação com o pré-60S, mas também indicam que a região N-terminal imediatamente anterior ao AIM, compreendendo os primeiros 47 resíduos de aminoácido, é importante para garantir o processamento adequado do pré-rRNA 7S.

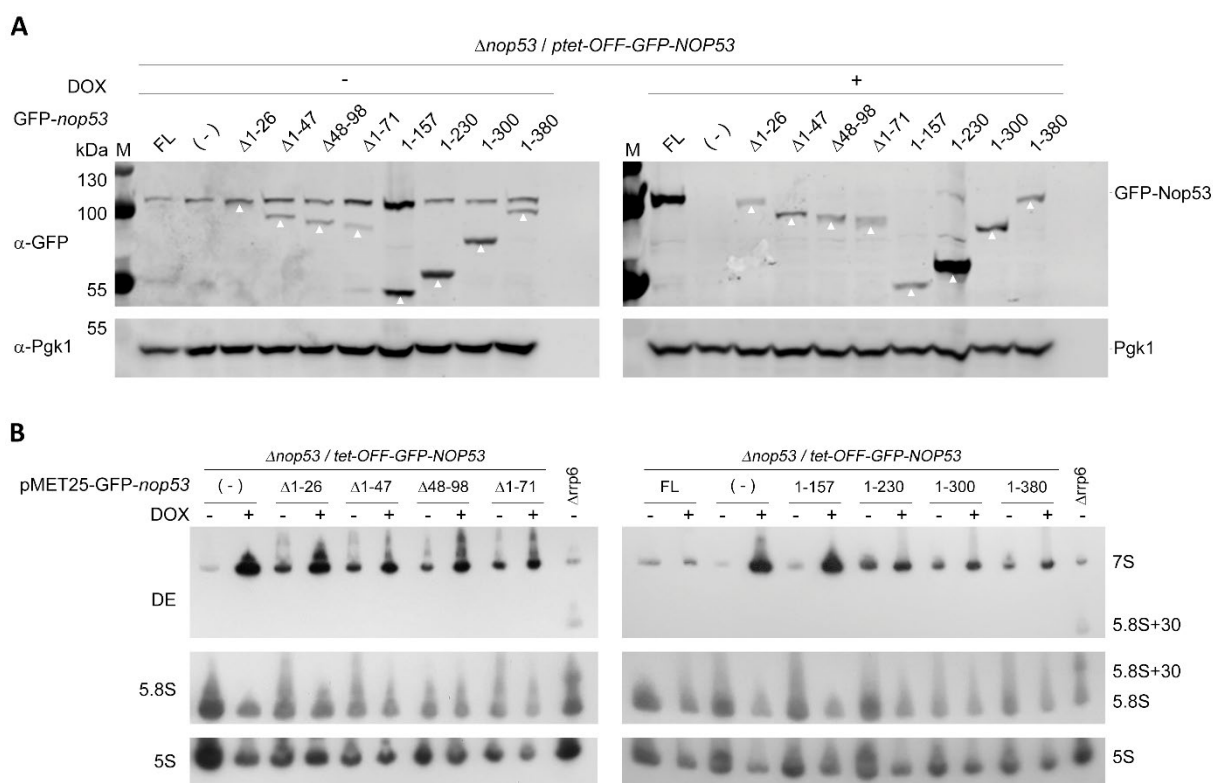


Figura 42. Efeito dos mutantes de deleção N- e C-terminal de Nop53 no processamento do pré-rRNA. Análise da cepa condicional $\Delta nop53$ /*tet-OFF-GFP-NOP53* expressando o controle positivo GFP-Nop53 *full length* (FL), o controle negativo vetor vazio (-) ou mutantes de deleção N- e C-terminal *nop53* fusionados a GFP. **(A)** Análise por *western blot* do extrato total de frações das culturas usadas nos ensaios de crescimento celular (Fig. 41), com e sem suplementação de doxiciclina (DOX - 1,5 μ g/ml). (Setas brancas indicam bandas dos mutantes truncados *nop53*. GFP-Nop53 designa a cópia *full length* de Nop53. *banda inespecífica. M: marcador de MM de proteína) **(B)** Análise por *northern blot* do RNA total extraído das mesmas cepas cultivadas a 30°C com ou sem doxiciclina (DOX - 1,5 μ g/ml) para avaliar o efeito dos mutantes truncados *nop53* no processamento do pré-rRNA. O RNA separado através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 8% foi analisado usando as sondas indicadas biotinizadas. A cepa $\Delta rrp6$ foi utilizada como controle para o acúmulo do pré-rRNA 5.8S+30. Todos os mutantes truncados *nop53* acumularam pré-rRNA 7S, embora em níveis diferentes.

Para melhor diferenciar o efeito destes mutantes truncados, realizou-se o ensaio de complementação em diferentes condições de crescimento (Fig. 41A). Os mutantes de deleção no C-terminal mostraram-se ligeiramente mais sensíveis ao crescimento a 16°C (*cold sensitive*) do que os mutantes de deleção no N-terminal. Todos os mutantes testados apresentaram sensibilidade similar à higromicina B, um inibidor da tradução que afeta a fidelidade da tradução (Borovinskaya et al., 2008), do mesmo modo que anteriormente demonstrado para o mutante *nop53* AIM(5xAla) (Sarkar et al., 2017). Curiosamente, ao se testar o tratamento com rapamicina, o inibidor de TOR (*target of rapamycin*), que desencadeia diminuição da síntese proteica e da biogênese ribossomal (Jorgensen et al., 2004; Loewith e Hall, 2011; Albert et al., 2016; Zencir et al., 2020), os mutantes de deleção no N-terminal foram significativamente mais sensíveis do que os mutantes de deleção do C-terminal, afetando mais o crescimento celular do que a própria depleção de Nop53. Este efeito também foi observado sem doxiciclina (na presença da cópia Nop53 FL), caracterizando um fenótipo dominante negativo.

Como os mutantes de deleção no N-terminal afetam sobretudo a interação de Nop53 com o exossomo, presumivelmente sem impedir a associação de Nop53 com o pré-60S, resolvemos comparar seu efeito com o da depleção de Nop53. Embora em ambos os casos haja o acúmulo do pré-rRNA 7S não processado com a consequente retenção do *ITS2-foot* em intermediários pré-60S tardios, a composição do *ITS2-foot* retido não será a mesma. No primeiro caso, os mutantes truncados *nop53* deverão estar integrados na base do *ITS2-foot* estabelecendo a maior parte das interações proteína-proteína mediadas por Nop53, enquanto que no segundo caso o sítio de ligação de Nop53 estará totalmente vacante.

Inicialmente avaliamos se o recrutamento de Yvh1 ao pré-60S poderia também ser afetado pelos diferentes mutantes do N-terminal de Nop53, analisando, para tanto, o perfil de sedimentação em gradiente de glicerol (Fig. 43). Os resultados mostram que todos os mutantes de deleção no N-terminal testados cossedimentam com a proteína-r uL18 nas frações inferiores do gradiente, confirmando que a extremidade N-terminal não é necessária para a associação estável de Nop53 com o pré-60S (Figs. 43C-F). Como anteriormente discutido, a depleção de Nop53 diminuiu a associação de Yvh1 a intermediários pré-60S, deslocando-a das frações 13-19 para as frações livres 1-5 (Figs. 43A-B). Curiosamente, os mutantes do N-terminal exibiram diferentes impactos no perfil de sedimentação de Yvh1. No mutante *nop53* Δ 1-26, Yvh1 ainda se encontra associado ao pré-60S, com ligeiro aumento das frações livres. Em contraste, os mutantes *nop53* Δ 1-47, *nop53* Δ 48-98 e *nop53* Δ 1-71 afetaram significativamente a associação de Yvh1 ao pré-60S, de modo similar à depleção de Nop53. Estes resultados, em conjunto, sugerem a importância da extremidade N-terminal de Nop53 e da desmontagem do *ITS2-foot* para o recrutamento de Yvh1 ao pré-60S.

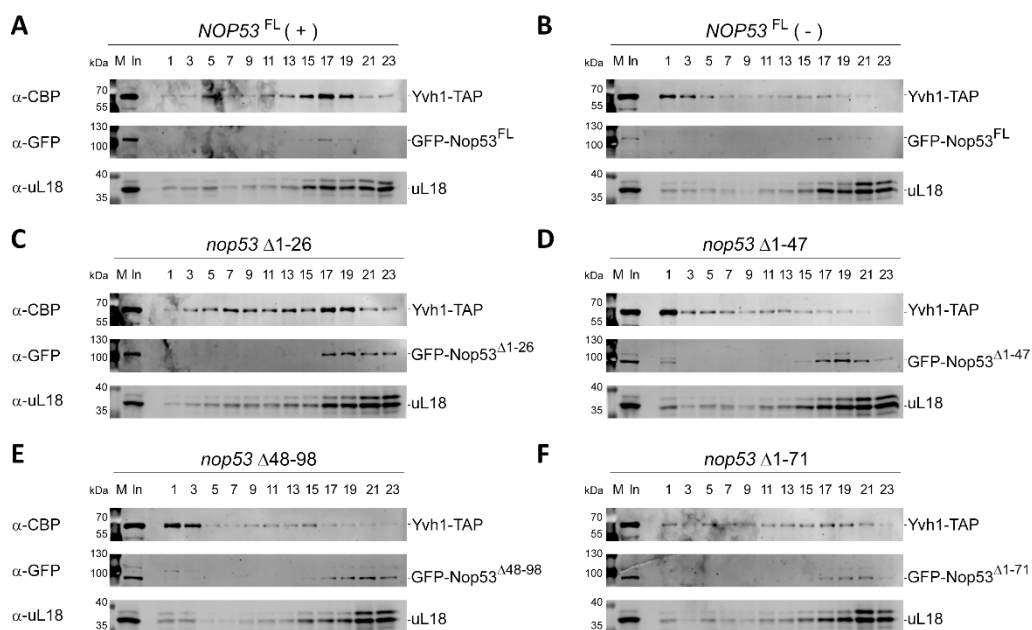


Figura 43. Mutantes de deleção N-terminal de Nop53 afetam a associação de Yvh1 ao pré-60S. Análise do perfil de sedimentação de Yvh1-TAP expressa na cepa condicional $\Delta nop53$ / tet-OFF-GFP-NOP53 transformada com plasmídeo expressando (A) o controle positivo GFP-NOP53 *full length* (+), (B) o controle negativo vetor vazio (-) ou os mutantes truncados fusionados a GFP (C) $nop53\Delta 1-26$, (D) $nop53\Delta 1-47$, (E) $nop53\Delta 48-98$ e (F) $nop53\Delta 1-71$. Os extratos totais destas cepas, cultivadas na presença de doxiciclina 1,5 $\mu\text{g/ml}$, foram aplicados sobre gradiente linear de glicerol 10-30% e separados por ultracentrifugação. Todas as frações ímpares coletadas a partir do topo foram analisadas por *western blot* com anti-CBP, anti-GFP e anti-uL18. (In: input – extrato total; M: marcador MM de proteína)

Comparamos então o efeito da depleção de Nop53 com o de seus mutantes do N-terminal nas subunidades pré-60S e 60S maduras formadas, avaliando a estrutura do rRNA 25S por meio do ensaio SHAPE *in vivo* (Fig. 44) (Spitale et al., 2013). Nesta abordagem, o breve tratamento da cultura de células com o composto NAI (ácido 2-metilnicotínico imidazolidina) que acila grupos 2'-OH livres, permite que resíduos de ribonucleotídeos em regiões flexíveis e expostas ao solvente sejam preferencialmente modificados em relação aos resíduos protegidos pela ligação de proteínas, em regiões de dupla fita ou envolvidos no interior de estruturas terciárias. A identificação dos sítios de acilação é realizada por *primer extension* utilizando oligonucleotídeos marcados (neste caso com IRDye700). Foram selecionados para análise os sítios de ligação ao pré-60 de Nop53 (H16-17 no Domínio I (Thoms et al., 2015)) e de Yvh1 (*P-stalk* e SRL nos Domínios II e VI, respectivamente (Zhou et al., 2019b)). Se o efeito da depleção de Nop53 e dos mutantes testados fosse o mesmo nas subunidades 60S, teríamos observado um padrão de modificação química (formação de adutos com o agente acilante) muito similar. Em vez disso, a reatividade de várias regiões do rRNA 25S foi afetada diferencialmente comparando-se as condições testadas (Fig. 44).

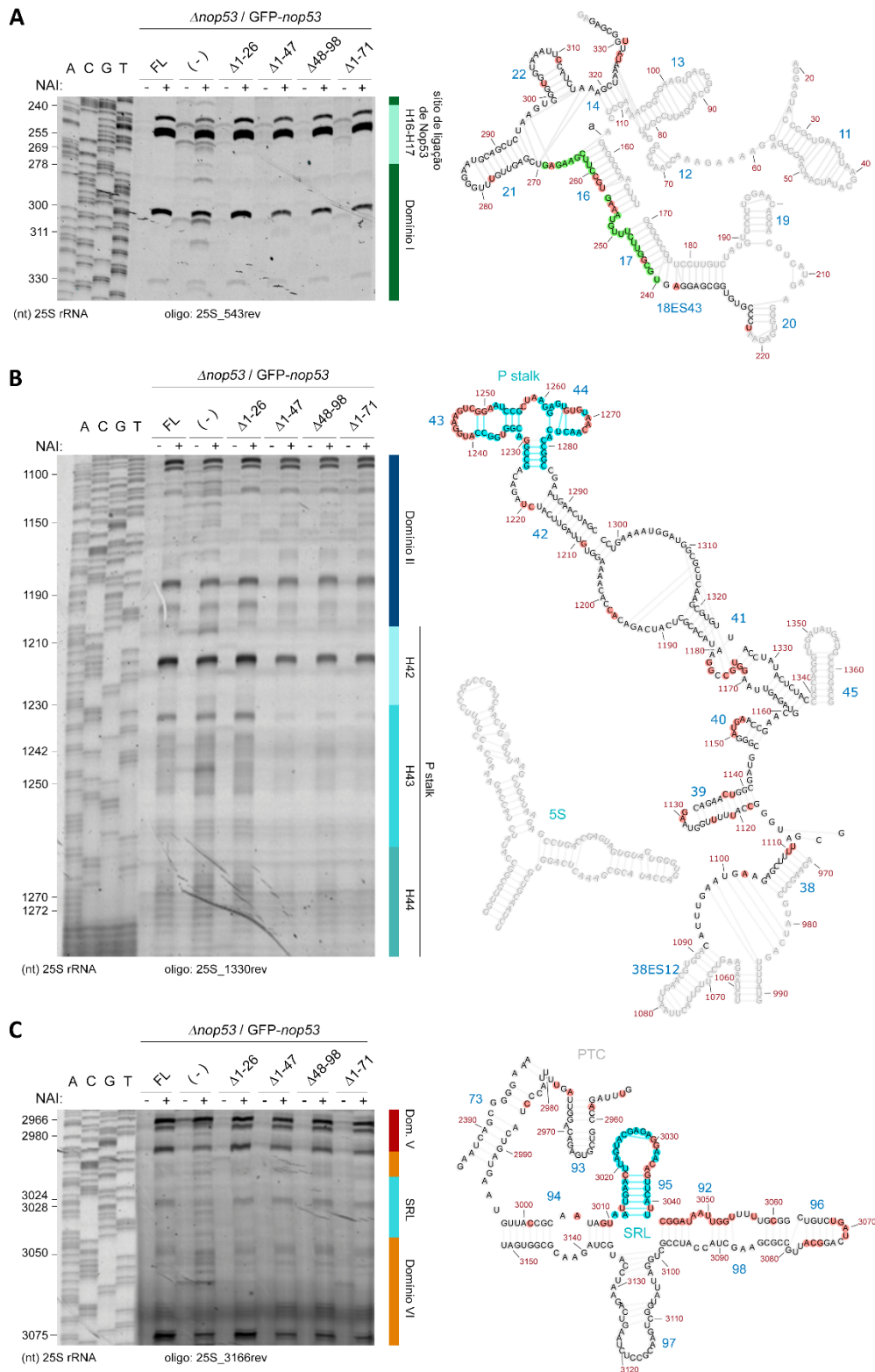


Figura 44. Os sítios de ligação de Nop53 e Yvh1 no rRNA 25S são diferencialmente afetados pela depleção de Nop53 e pelos mutantes de deleção N-terminal *nop53*. Ensaio SHAPE *in vivo* para avaliar o efeito da depleção de Nop53 e da expressão de mutantes de deleção N-terminal de Nop53 na estrutura do rRNA 25S de intermediários pré-60S e subunidades 60S maduras. A cepa condicional $\Delta nop53$ /ptet-OFF GFP-NOP53 expressando GFP-Nop53 *full length* (FL), o controle negativo vetor vazio (-) ou mutantes truncados *nop53* ($\Delta 1-26$, $\Delta 1-47$, $\Delta 1-71$ ou $\Delta 48-98$) fusionados a GFP foi cultivada na presença de doxiciclina (1,5 μ g/ml) e brevemente incubada com o agente acilante NAI 100 mM (+) ou DMSO como controle (-). O RNA total extraído destas cepas foi submetido a *primer extension* com oligonucleotídeos (25S_543rev, 25S_1330rev e 25S_3166rev) complementares a diferentes regiões do rRNA 25S, permitindo a avaliação do (A) sítio de interação de Nop53 - hélices 16-17 no domínio I -, (B) e dos sítios de ligação de

Yvh1 - *P-stalk* no domínio II, bem como (C) *sarcin-ricin-loop* (SRL) no domínio VI. O *DNA ladder* (ACGT) foi obtido a partir do sequenciamento de um plasmídeo com sequência distinta. A posição dos nucleotídeos na sequência do rRNA 25S está indicada à esquerda de cada gel. As imagens do gel foram cortadas e as distorções atenuadas para facilitar a visualização das bandas. Nucleotídeos modificados cuja intensidade da banda aumentou ou diminuiu em comparação ao controle positivo (Nop53 FL) são destacados em vermelho na estrutura secundária do rRNA 25S, à direita de cada gel, editada usando RiboVision v. 1.15.

Os resultados mostraram que acessibilidade dos nucleotídeos do sítio de ligação de Nop53 no pré-60S foi aumentada apenas com a depleção de Nop53 (Fig. 44A). O mutante *nop53* Δ 1-26, que quase não teve efeito na associação de Yvh1 com o pré-60S (Fig. 43C), exibiu um padrão de modificação muito similar ao do controle Nop53 FL com todas as sondas testadas. De modo coerente, os demais mutantes de deleção no N-terminal (*nop53* Δ 1-47, *nop53* Δ 48-98 e *nop53* Δ 1-71) exibiram padrões de modificação muito semelhantes entre si, como observado nas regiões do *P-stalk* e SRL, mas, coletivamente diferentes do observado com a depleção de Nop53 (Figs. 44B-C). Estas mudanças nos padrões de modificação podem estar correlacionadas ao acúmulo de diferentes intermediários pré-60S, ou à formação de partículas 60S pré-ribossomais e maduras defectivas. Independentemente da causa subjacente, as diferenças observadas atestam o envolvimento de diferentes impactos nas subunidades 60S, reforçando a hipótese de que o papel de Nop53 durante a maturação do pré-60S excede o de sua extremidade N-terminal.

4.5.2 A depleção de Nop53 tem impactos diferentes na maturação do pré-60S em comparação com mutantes *nop53* sem o motivo de recrutamento do exossomo

Tendo em vista avaliar em mais detalhes se os mutantes truncados no N-terminal de Nop53 afetam diferencialmente a biogênese da subunidade ribossomal maior em comparação com a depleção de Nop53, pré-ribossomos coimunoprecipitados com Nop7-TAP nestas diferentes condições foram submetidos a uma análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em LC-MS/MS (Figs. 45-46). Uma vez que Nop7 é um fator de montagem que permanece associado ao pré-60S desde o nucléolo (estado A) até a liberação de Nop53, foi escolhido como isca, permitindo-nos avaliar não apenas todos os intermediários pré-ribossomais contendo Nop53, mas também os estágios mais iniciais de maturação. Selecionamos para análise os mutantes *nop53* Δ 48-98 e *nop53* Δ 1-71, ambos desprovidos do motivo de interação com Mtr4 (AIM) e, portanto, incapazes de recrutar o exossomo para clivagem do pré-rRNA 7S e desmontagem do *ITS2-foot*.

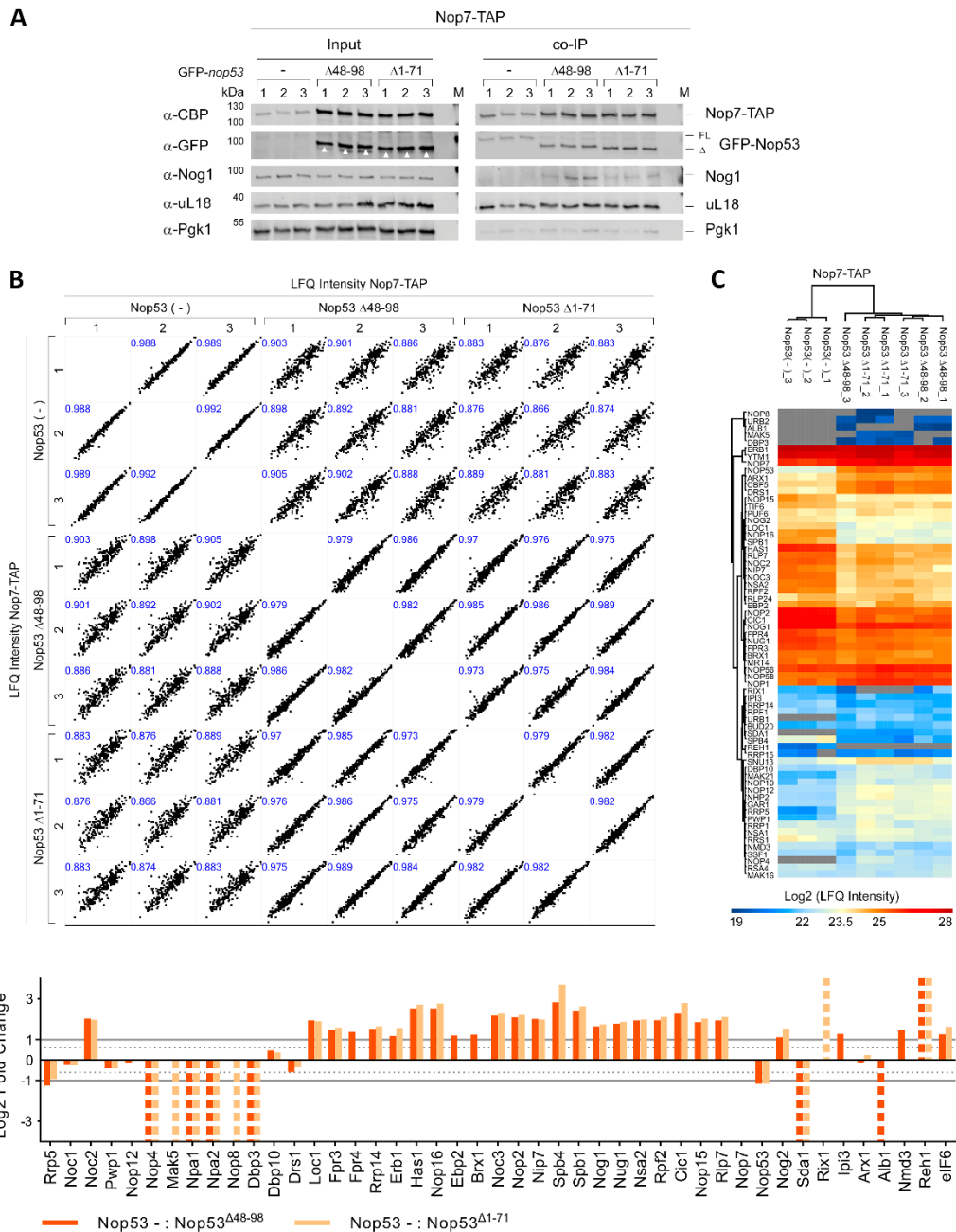


Figura 45. Comparação do efeito da depleção de Nop53 com o de mutantes de deleção N-terminal de Nop53 no interactoma de Nop7. Análise dos resultados dos ensaios de coimunoprecipitação com Nop7-TAP expressa na cepa $\Delta nop53/ptet$ -OFF-GFP-NOP53 portando vetor vazio (-) ou codificando um dos mutantes GFP-nop53 $\Delta 48-98$ ou GFP-nop53 $\Delta 1-71$. As três cepas foram cultivadas nas mesmas condições, na presença de doxiciclina, sob repressão da expressão de GFP-NOP53 FL (full length). (A) Análise por SDS-PAGE e western blot do input (extrato total) e de uma alíquota de cada eluição (co-IP) mostrando todas as replicatas biológicas. Setas brancas indicam as bandas dos mutantes truncados de nop53. (FL: full length, Δ : mutantes truncados, M: marcador de massa molecular de proteína). (B) As eluições foram submetidas a uma análise proteômica quantitativa label-free baseada em espectrometria de massas. A matriz de correlação das replicatas biológicas com base nos valores de LFQ Intensity apresenta os coeficientes de correlação de Pearson em azul. (C) Heatmap obtido com base nos valores de \log_2 (LFQ Intensity) de todos os fatores de montagem do pré-60S identificados em pelos menos duas replicatas biológicas, com clusterização hierárquica dos fatores de montagem (linhas) e das replicatas biológicas (colunas). (D) Valores de \log_2 (Fold Change), normalizados pela isca, de todos fatores de montagem do pré-60S identificados, comparando-se o efeito de ambos os mutantes N-terminal com o da depleção de Nop53. Barras tracejadas indicam fatores de montagem identificados em uma única condição(mutante truncado nop53 ou Nop53 -).

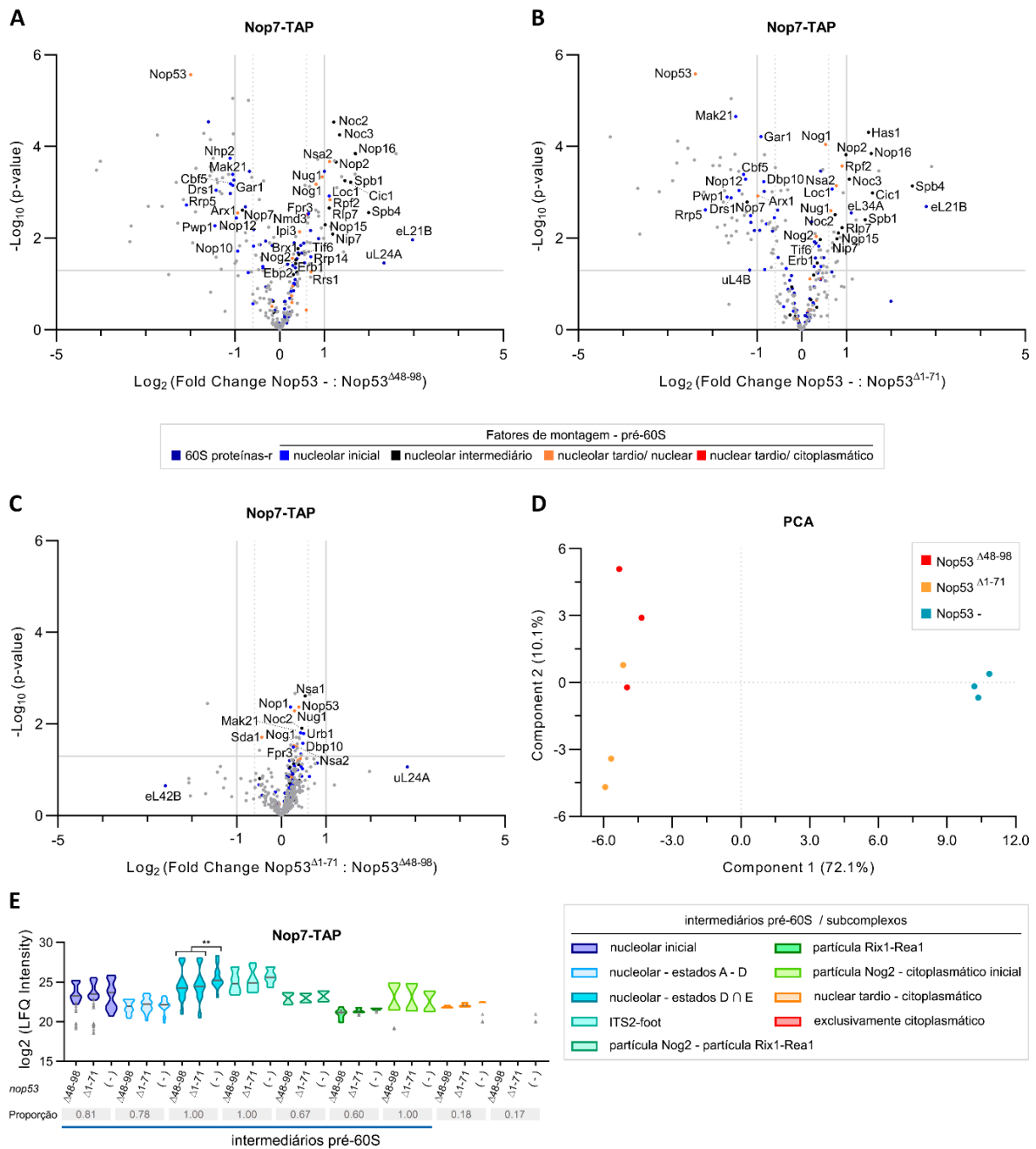


Figura 46. Mutantes *nop53* $\Delta 48-98$ e *nop53* $\Delta 1-71$ afetam diferentemente a montagem da subunidade 60S em comparação com a depleção de Nop53. Pré-ribossomos copurificados com Nop7-TAP em triplicata biológica após depleção de Nop53 ou na presença de mutantes de deleção N-terminal (*nop53* $\Delta 1-71$ e *nop53* $\Delta 48-98$) foram submetidos à análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em espectrometria de massas. *Volcano plots* mostram a comparação da depleção de Nop53 (Nop53⁻) com (A) *nop53* $\Delta 48-98$ e com (B) *nop53* $\Delta 1-71$, bem como (C) entre os mutantes de deleção (*nop53* $\Delta 1-71$ vs. *nop53* $\Delta 48-98$). Linhas cinzas delimitam os valores de *cut-off* (p-value < 0.05; fold change < 0.5 ou > 2.0). Proteínas-r da subunidade 60S são destacadas, assim como fatores de montagem do pré-60S, classificados de acordo com o estágio de maturação de que participam. (D) Análise de componentes principais (PCA – Benjamini-Hochberg *cut-off* FDR < 0.05) compara todas as réplicas biológicas com base no perfil de proteínas identificadas. (E) Análise dos fatores de montagem agrupados em conjuntos representativos de intermediários pré-60S específicos. Cada cor de *violin plot* indica um conjunto definido de fatores que compõem intermediários pré-60S específicos (estados D ∩ E designa fatores comuns entre as partículas do estado D e E). Os *violin plots* mostram a distribuição dos valores de log₂(LFQ Intensity) dos fatores de montagem copurificados que os compõem. Os fatores de montagem identificados em apenas uma condição são representados como triângulos cinza. A mediana é indicada por uma linha cinza escuro. As três condições foram comparadas aos pares e diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05) são destacadas no gráfico (Nop53⁻ vs. *nop53* $\Delta 48-98$ **p = 0.0015; Nop53⁻ vs. *nop53* $\Delta 1-71$ **p = 0.0065). Abaixo de cada trio de *violin plots* (*nop53* $\Delta 48-98$, *nop53* $\Delta 1-71$, Nop53⁻) é indicada a proporção de fatores daquele conjunto que foi copurificada e identificada com Nop7-TAP. Uma barra horizontal indica os intermediários pré-60S aos quais se espera que Nop7 esteja associada.

Os resultados (Fig. 46) mostraram que os intermediários pré-60S copurificados com Nop7 após depleção de Nop53 exibiram diferenças significativas em comparação com *nop53* Δ 48-98 e *nop53* Δ 1-71. Estes mutantes, por sua vez, apresentaram perfis muito similares entre si. Comparativamente a ambos mutantes *nop53*, as partículas pré-ribossomais Nop7 coimunoprecipitadas após depleção de Nop53 exibiram níveis diminuídos de alguns fatores de montagem nucleolares muito iniciais (ex. Rrp5, Pwp1, Mak21), mas enriquecimento estatisticamente significativo de vários componentes dos estados D-E (ex. Noc3, Spb4, Nop2, Nip7, Spb1), sugerindo fortemente um acúmulo destes intermediários pré-60S nucleolares quando Nop53 está ausente (Fig. 46E). Estas observações não estão apenas de acordo com os resultados acima discutidos, mostrando que a depleção de Nop53 afeta a transição do estado E para a partícula Nog2, mas também indicam que este processo depende mais do recrutamento de Nop53 para o pré-60S do que da capacidade de Nop53 recrutar o exossomo. De outro modo, as interações proteína-proteína e proteína-rRNA mediadas por Nop53 no pré-60S são importantes para a progressão da maturação do pré-60S. Consistente com esta interpretação, a clusterização hierárquica das amostras, com base nos valores de Intensidade LFQ de todos os fatores de montagem do pré-60S identificados, agrupou as replicatas dos mutantes do N-terminal de Nop53 separadamente das replicatas de depleção de Nop53 (Fig. 45C), o que também é evidenciado na Análise de Componentes Principais (PCA) (Fig. 46D). Conjuntamente, estes achados corroboram detalhes estruturais recentemente revelados por crio-EM da transição do estado E para a partícula Nog2 (Kater et al., 2020), mostrando que o recrutamento de Nop53 ao *ITS2-foot* contribui para o reposicionamento do *L1-stalk* em uma conformação quase madura, o que é essencial para a montagem subsequente da partícula Nog2.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o papel do conservado fator de montagem ribossomal Nop53 em *S. cerevisiae* visando aprofundar sua caracterização funcional. Por atuar como uma ponte entre o exossomo e a subunidade ribossomal maior ainda em formação, resolvemos avaliar em detalhes o impacto de sua depleção nestes dois grandes complexos essenciais. Isto nos permitiu descobrir não apenas novos aspectos do recrutamento do exossomo, mas também o papel estrutural de Nop53 na maturação do pré-60S. Parte da discussão dos resultados deste trabalho compõe os artigos Cepeda, Bagatelli et al. (2019) e Bagatelli et al. (2021).

5.1 Nop53 no recrutamento e posicionamento do exossomo durante o processamento do ITS2

Os primeiros estudos que caracterizaram o papel de Nop53 em *S. cerevisiae* mostraram que a depleção deste fator de montagem ribossomal essencial leva ao acúmulo dos pré-rRNAs 7S e 27S (Sydorsky et al., 2005; Granato et al., 2005; Thomson e Tollervey, 2005). O mecanismo molecular subjacente, no entanto, só foi recentemente descrito, mostrando que Nop53 recruta o exossomo através de sua interação direta, mediada pelo motivo AIM, com a RNA helicase Mtr4 para o processamento 3'-5' do pré-rRNA 7S. Mutação ou deleção deste motivo da extremidade N-terminal de Nop53 é suficiente para que haja acúmulo do pré-rRNA 7S (Thoms et al., 2015; Fromm et al., 2017; Falk et al., 2017b). Além de Mtr4, no entanto, Nop53 também é capaz de interagir com a própria subunidade catalítica do exossomo Rrp6 (Granato et al., 2008).

Estas observações, conjuntamente, nos levaram à hipótese da existência de pontos adicionais de interação do exossomo com Nop53. Por ensaios de GST *pull down*, mostramos que Nop53 não interage com a subunidade catalítica Rrp44, mas é capaz de interagir com o cofator Mpp6, que atua como um importante ponto de ancoragem de Mtr4 sobre o *cap* do exossomo (Falk et al., 2017a; Schuller et al., 2018). Mpp6 interage diretamente com Rrp40 e com o domínio DExH de Mtr4, estabilizando o túnel a ser percorrido pelo RNA e favorecendo a passagem da extremidade 3' do pré-rRNA de Mtr4 para a subunidade catalítica Rrp44 via *core* do exossomo (Falk et al., 2017a; Wasmuth et al., 2017). De modo geral, é coerente observar que Nop53 seja capaz de interagir com Mtr4, e com dois de seus pontos de apoio sobre o *cap* do exossomo (Rrp6 e Mpp6), mas não com a distante Rrp44 localizada no outro extremo do complexo. Do mesmo modo, é esperado que dentre os componentes do *core* do exossomo, Nop53 interaja com Rrp45 (Cepeda et al., 2019), localizada sob Rrp40 na mesma face que Mpp6, mas não com a

diametralmente oposta Mtr3 (Granato et al., 2008). A topologia estendida com regiões desordenadas predita para a extremidade N-terminal de Nop53 (cuja estrutura ainda não foi resolvida) pode favorecer estes múltiplos contatos, como é o caso de sua região C-terminal cuja estrutura e interações no pré-60S já foram revelados por XL-MS e crio-EM (Wu et al., 2016, 2017).

Estudos futuros deverão avaliar o papel que tais interações desempenham no dinâmico processo de clivagem do ITS2, durante o qual tanto o pré-60S quanto o exossomo sofrem alterações estruturais importantes. No primeiro caso, Mtr4 tende a deslocar o L1-stalk, enquanto que no segundo, Rrp47 e o domínio catalítico de Rrp6 são deslocadas do topo do *cap* (Schuller et al., 2018; Lingaraju et al., 2019). Ao longo deste processo, especulamos que as interações do exossomo com Nop53 possam contribuir para a estabilidade da associação inicial deste complexo com o pré-60S, bem como para seu posicionamento correto, favorecendo o processamento do pré-rRNA 7S.

Estas interações adicionais de Nop53 com o exossomo são transientes e, muitas das quais, pouco estáveis. Isto deve responder pelo fato de nos ensaios de coimunoprecipitação apresentados neste estudo, Nop53 copurificar apenas Mtr4, embora deva-se destacar que Rrp6 tenha copurificado Nop53. O caráter transiente destas interações fez, por exemplo, com que a estrutura por crio-EM do pré-60S acoplado ao exossomo só pudesse ser obtida através de reconstituição *in vitro*, incubando-se o complexo exossomo recombinante com partículas pré-60S coimunoprecipitadas com Nop53 (Schuller et al., 2018).

Apesar dos grandes avanços na compreensão do complexo mecanismo de processamento do ITS2 (Pillon et al., 2019a), muitos aspectos ainda permanecem pouco compreendidos. A estrutura obtida do pré-60S com o exossomo nos fornece um registro estático de apenas uma de suas múltiplas etapas. Nesta estrutura, observamos que Mtr4 contata o rRNA 25S (Domínios I e V) e eL8, enquanto Rrp47 interage com Nop7, mostrando que à medida que os fatores do *ITS2-foot* (Rlp7, Nop15, Cic1) vão sendo removidos, com a progressiva degradação exonucleolítica e atividade helicase, o exossomo se aproxima da superfície do pré-60S podendo aí estabelecer novos pontos de ancoragem. Postulamos, com base em nossos resultados, que Nop53 tenha papel fundamental nas etapas mais iniciais de acoplamento e posicionamento do exossomo no *ITS2-foot*, quando Mtr4 e o exossomo ainda se encontram distantes destes pontos adicionais de interação com o pré-60S.

Sabe-se que Nop53 e Nop7 são os últimos fatores do *ITS2-foot* a se dissociar (Fromm et al., 2017). Especulamos, portanto, que ambos também possam contribuir em uma das etapas menos compreendidas do processamento do pré-rRNA 7S: a transferência da extremidade 3' do 5.8S+30 de Rrp44, saindo do interior do canal hexamérico em direção ao *cap* do exossomo, para

o domínio catalítico de Rrp6. Neste processo, enquanto Nop7 deve contribuir para manter o exossomo acoplado ao pré-60S, Nop53, flexível e sem densidade discernível por crio-EM no pré-60S (Schuller et al., 2018), ao interagir diretamente com Mpp6, Rrp6 e Mtr4, teria condições de auxiliar estas subunidades durante as modificações conformacionais necessárias do exossomo, incluindo o reposicionamento de Rrp6 de volta ao topo do *cap*. Consistente com esta hipótese, mutantes pontuais do AIM de Nop53 acumulam não apenas o pré-rRNA 7S, mas níveis consideráveis de 5.8S+30 (Thoms et al., 2015), indicando que a ausência da interação direta de Nop53 com Mtr4 não bloqueia totalmente o processamento do ITS2, mas impede, quando este iniciado, que haja esta passagem do 5.8S+30 de Rrp44 para Rrp6. Ensaios futuros de reconstituição *in vitro* do processamento do ITS2, como já descrito (Fromm et al., 2017), podem ser uma ferramenta útil na avaliação do impacto destas novas interações de Nop53.

5.2 O exossomo é recrutado a intermediários pré-ribossomais nucleolares mais iniciais, incluindo o 90S

Dado o papel de Nop53 no recrutamento do exossomo para o pré-60S, esperávamos que sua depleção resultasse em uma diminuição da associação do exossomo a fatores de montagem pré-ribossomais. Curiosamente, no entanto, os resultados da análise proteômica quantitativa *label-free* mostraram o oposto. O principal efeito da depleção de Nop53 no interactoma da subunidade catalítica Rrp6 e do componente do *core* Rrp43 foi o aumento da associação, até então não reportada, do complexo a intermediários pré-ribossomais nucleolares mais iniciais. Estes dados foram corroborados pela análise dos pré-rRNAs copurificados com o exossomo, de perfis de sedimentação e localização subcelular. A retenção do exossomo nestes intermediários nucleolares poderia estar associada à degradação de subunidades defectivas ou à estabilização, nesta condição, dos intermediários pré-ribossomais aos quais o exossomo normalmente se associa. A depleção de Nop53, como outros mutantes de fatores de montagem, apesar de afetar um estágio específico da biogênese ribossomal, impacta indiretamente a velocidade do processo global (Zisser et al., 2018), estabilizando intermediários aos quais o exossomo pode se associar estavelmente. Deste modo, apesar do papel insubstituível e não redundante de Nop53 em recrutar e posicionar o exossomo para o processamento do pré-rRNA 7S, sua depleção não diminui a interação do exossomo com outros intermediários de maturação.

Sabe-se que durante a biogênese ribossomal, alguns fatores de montagem e subcomplexos se associam a regiões ainda flexíveis, antes que sua ancoragem à partícula se dê de forma estável. Este é o caso do 5S RNP, que se associa a intermediários pré-60S nucleolares mais iniciais, sendo estavelmente ancorado ao *core* do pré-60S e visível por crio-EM apenas na etapa da formação da partícula Nog2 (Klinge e Woolford, 2019). De modo similar, propusemos um

modelo, segundo o qual o exossomo seria recrutado em estágios de maturação anteriores aos previamente estabelecidos, antecedendo os eventos de clivagem de que participa. Considerando que a biogênese ribossomal é um processo energeticamente dispendioso, e que a montagem adequada das subunidades é essencial para a fidelidade da tradução (Collins et al., 2018; Tye et al., 2019; Huang et al., 2020), essa associação antecipada do exossomo nucleolar poderia estar relacionada a um mecanismo de vigilância que permitiria o rápido *turnover* de partículas defectivas, garantindo a reciclagem dos fatores de montagem. Isto favoreceria também um mais rápido processamento do pré-rRNA 7S e degradação do 5'ETS, bastando para tanto reposicionar e orientar o exossomo já associado em relação ao sítio de clivagem.

Especificamente com relação ao pré-60S, o enriquecimento do pré-rRNA 27SA₂/A₃ e de fatores de montagem nucleolares iniciais (estados A-E) com Rrp6 apontaram para uma associação do exossomo prévia à Nop53. Consistente com esta observação, mostrou-se recentemente que o exossomo é recrutado pelo componente do TRAMP Trf5 para a degradação do fragmento A₂-A₃ de clivagem endonucleolítica do ITS1 (Delan-Forino et al., 2020). Cabe definir se o exossomo continua associado ou é novamente recrutado ao pré-60S para a clivagem do ITS2. Em ambos os casos, a correta formação da partícula Nog2, para que haja a clivagem no sítio C₂, e a presença de Nop53, para posicionar e ancorar o exossomo corretamente, ainda são necessárias para que o ITS2 possa ser processado.

Com relação à subunidade ribossomal menor, a coimunoprecipitação de fatores do 5'ETS, do SSU processomo, dos pré-rRNAs 35S, 23S e do snoRNA U3 com Rrp6 indicaram a existência de uma associação estável do exossomo com o próprio 90S. De acordo com esta interpretação, o exossomo seria recrutado anteriormente à liberação do 5'ETS, que se dá por clivagens endonucleolíticas nos sítios A₀ e A₁, além da atividade da RNA helicase Dhr1. Deve-se notar que se propunha, até então, que a atividade do exossomo na degradação do fragmento 5'-A₀ do 5'ETS e na reciclagem dos fatores de montagem iniciais se desse de modo independente e livre da partícula 90S (Klinge e Woolford, 2019; Barandun et al., 2018; Thoms et al., 2015). De modo coerente com nossos resultados e reforçando nossa hipótese, estudos realizados em paralelo a este trabalho mostraram que subunidades do exossomo haviam sido coimunoprecipitadas com componentes do SSU processomo (Black et al., 2018; Hunziker et al., 2019).

O fator de montagem Utp18, componente do UtpB, possui o motivo AIM de interação com Mtr4 e foi caracterizado como o adaptador responsável pelo recrutamento do exossomo para o 5'ETS, de modo similar que Nop53 o é para o pré-60S (Thoms et al., 2015). Apesar de não copurificar níveis aumentados de Utp18, Rrp6 coimunoprecipitou outros componentes do UtpB. Ademais, outros fatores, como Utp14, Sas10 e Lcp5, também haviam sido considerados candidatos a pontos de recrutamento do exossomo para o 5'ETS (Barandun et al., 2018; Black

et al., 2018; Klinge e Woolford, 2019). Destes, Rrp6 copurificou níveis aumentados, após depleção de Nop53, apenas de Sas10 e Utp14, nos levando a sugerir que novas interações do exossomo com fatores de montagem iniciais do 90S ainda estariam por ser descritas.

Recentemente os resultados e interpretações deste estudo foram corroborados por dois trabalhos independentes revelando por crio-EM (Fig. 47) a estrutura do exossomo acoplado ao 90S (Du et al., 2020; Lau et al., 2021). Como havíamos proposto originalmente, a ligação do exossomo antecede a liberação do 5'ETS e envolve fatores de montagem adicionais a Utp18, como foi demonstrado ser o caso de Utp14 e Utp6. A associação do exossomo ocorre, portanto, antes da clivagem no sítio A₁, sendo mediada pela helicase Mtr4 que é capaz de interagir não apenas com os fatores de montagem mencionados, mas com hélices H9-9' do 5'ETS. Assim como no caso do processamento do pré-rRNA 7S, estas estruturas revelam mudanças conformacionais desencadeadas tanto no exossomo quanto no 90S, indicando que a atividade de processamento dos espaçadores acoplada à atividade helicase de Mtr4 contribuem para o remodelamento da partícula, auxiliando na gradual desmontagem do *scaffold* que abarca o pré-40S em formação (Cheng et al., 2020; Du et al., 2020; Lau et al., 2021).

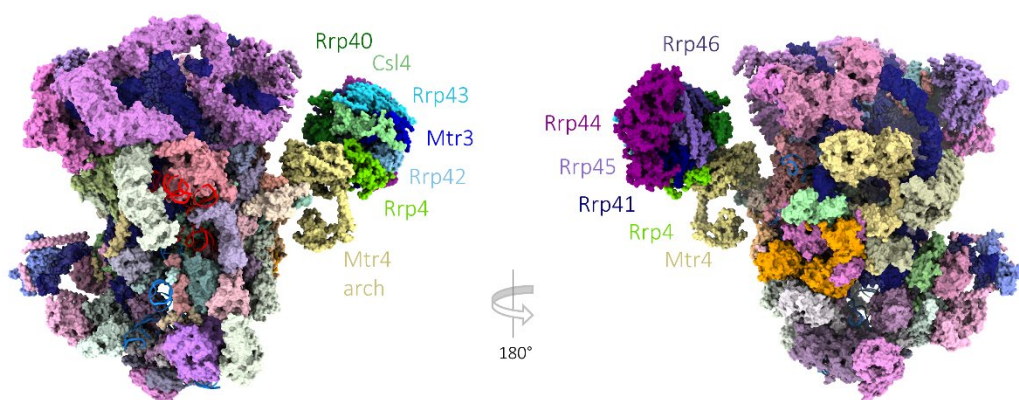


Figura 47. Estrutura do 90S acoplado ao exossomo. Estrutura do 90S associado ao exossomo no estágio anterior à clivagem endonucleolítica do sítio A1 no 5'ETS. Esta estrutura corrobora os dados apresentados neste trabalho, segundo os quais, Rrp6 copurifica o pré-rRNA 23S, o snoRNA U3 e fatores de montagem do 90S, mostrando que o exossomo se associa em etapas anteriores à liberação do 5'ETS. Do mesmo modo que no pré-60S, a RNA helicase Mtr4 participa do recrutamento do exossomo ao 90S e direciona a extremidade 3' ao canal central (não observado nesta estrutura), enquanto contribui para a liberação de fatores de montagem (PDB 7AJT).

5.3 Mecanismos regulatórios que podem modular a localização subcelular e recrutamento de Nop53 ao pré-60S

Do mesmo modo que para a maior parte dos fatores de biogênese ribossomal, os mecanismos de regulação que afetam Nop53, modulando sua estabilidade proteica, localização subcelular e afinidade pelos sítios de ligação no pré-60S ainda permanecem desconhecidos.

Neste trabalho, tendo em vista aprofundar a caracterização molecular de Nop53, analisamos o papel de dois resíduos de serina apontados por ensaios de fosfoproteômica como alvos de fosforilação, e avaliamos o interactoma de Nop53 por análise proteômica quantitativa *label-free* baseada em LC-MS/MS.

Apesar de estudos *high-throughput* apontarem proteínas-r e fatores de montagem como alvos de modificações pós-traducionais, seu papel e o mecanismo enzimático envolvido ainda permanecem, na maior parte dos casos, não elucidado (Strunk e Karbstein, 2009; Martín-Villanueva et al., 2021). Dentre os poucos exemplos, pode-se citar o papel das quinases Rio1, Rio2 e Hrr25 na maturação citoplasmática do pré-40S (Chaker-Margot, 2018; Klinge e Woolford, 2019), a sumoilação e ubiquitinação de Nsa1 (Panse et al., 2006; Kressler et al., 2008), a sumoilação de Ebp2 (Shirai e Mizuta, 2008), a sumoilação do ortólogo humano de Rix1 modulando sua associação ao pré-60S (Finkbeiner et al., 2011), a fosforilação de uL3 que parece afetar seu transporte nuclear (Melnikov et al., 2020; Chi et al., 2007), ou a polifosforilação de lisina de fatores de montagem como Utp14 e Rrp15 (Bentley-DeSousa et al., 2018).

A busca nos bancos de dados SGD e BioGRID por sítios de modificação pós-traducionais de Nop53, revelou a indicação de 6 resíduos de serina como possíveis alvos de fosforilação. Com base na conservação evolutiva do resíduo e da região contígua, bem como no número de evidências experimentais, selecionamos S31 e S403. O fato de S31 encontrar-se na extremidade N-terminal de Nop53, envolvida na interação com Mtr4 e com o exossomo (Thoms et al., 2015; Cepeda et al., 2019), o tornou um interessante candidato com potencial de afetar estas interações. Os dados estruturais disponíveis de Nop53 mostraram ainda que S403 e o sítio de fosforilação vizinho, S405, localizam-se em uma região desordenada próxima a uma alça do fator de montagem Nop7 com o qual Nop53 estabelece múltiplos contatos. A fosforilação destes resíduos teria, portanto, o potencial de afetar a estabilidade da interação de Nop53 com Nop7 ou de reposicionar regiões e domínios proteicos contíguos. É interessante notar que Nop7 possui um domínio BRCT que é capaz de reconhecer fosfoproteínas (Wu et al., 2017; Yu et al., 2003), reforçando a hipótese de que a fosforilação de Nop53 pode ser um mecanismo de regulação da sua afinidade pelo sítio de ligação no pré-60S.

Os resultados das análises dos mutantes *nop53* S31A e *nop53* S403A mostraram que tais mutações não são suficientes para levar ao acúmulo dos pré-rRNAs 27S e 7S. Cabe testar se o duplo mutante S403A/S405A teria algum impacto, considerando uma possível redundância funcional do sítio de fosforilação vizinho. Deve-se notar ainda, que o mutante *nop53* S31A complementou apenas parcialmente o crescimento da cepa $\Delta nop53$, podendo sugerir algum impacto funcional. Estudos futuros deverão complementar estas observações com a análise de

processos biológicos adicionais (transporte nuclear, estabilidade proteica) incluindo duplo mutantes e mutantes fosfomiméticos.

Assim como no caso da maturação do pré-40S, na qual a fosforilação de fatores de montagem (Enp1 e Ltv1) leva à sua liberação no citoplasma (Schäfer et al., 2006), a associação transiente de quinases ao pré-60S também poderia ter um papel importante modulando o recrutamento e a liberação de fatores de montagem. Um estudo recente, por exemplo, apontou que a serina/treonina quinase heterotetramérica CK2 participa de etapas nucleolares iniciais e intermediárias de maturação do pré-60S (Sailer et al., 2021). É interessante notar que subunidades catalíticas de CK2 foram identificadas entre proteínas coimunoprecipitadas na análise do interactoma de Nop53.

As extensões desordenadas e as regiões ricas em aminoácidos positivamente carregados, fazem com que Nop53 (pI:10,04, fonte SGD), de modo similar a proteínas-r e histonas (Pillet et al., 2017; Peña et al., 2017), seja propensa à agregação e à interação inespecífica com ácidos nucleicos. Espera-se, portanto, que Nop53, desde a tradução no citoplasma até o recrutamento nucleolar ao pré-60S, se associe a outras proteínas, como carioferinas ou chaperonas dedicadas, que possam proteger seus sítios de ligação ao pré-60S. Isto nos levou a avaliar em mais detalhes as interações de Nop53 através de uma análise proteômica *label-free* comparando-se ensaios de coimunoprecipitação com TAP-Nop53 realizados com e sem incubação com RNase A.

A análise do interactoma de Nop53 revelou, como esperado, um enriquecimento em relação ao controle negativo de fatores de montagem do pré-60S. Fatores que compõem a partícula Nog2, Rix1-Rea1 e algumas remanescentes do estado E nucleolar foram identificadas com e sem tratamento com RNase (o qual foi insuficiente para desmontar todas subunidades ribossomais e pré-ribossomais). Estes resultados são consistentes com a análise do perfil de sedimentação de TAP-Nop53 em gradiente linear de glicerol e o perfil da cromatografia de exclusão molecular mostrando que a maior parte de Nop53 encontra-se estávelmente associada a intermediários pré-60S. Nestes resultados, Nop53 não foi encontrada compondo subcomplexos menores, como é o caso, por exemplo, de UtpA no 90S ou do 5S RNP no pré-60S (Klinge e Woolford, 2019).

Interações diretas anteriormente descritas, como Nop7 e Mtr4 foram identificadas no interactoma de Nop53, validando a abordagem empregada. Algumas proteínas não diretamente relacionadas à biogênese ribossomal também foram identificadas, como uma importina, subunidades da quinase CK2 e componentes do TRAMP. Curiosamente, a comparação entre os ensaios com e sem tratamento com RNase revelou um enriquecimento das peptidil-prolil cis/trans isomerases Fpr3 e Fpr4, cuja etapa e modo de associação ao pré-60S ainda permanecem pouco compreendidos (Chaker-Margot e Klinge, 2019; Klinge e Woolford, 2019; Strunk e Karbstein, 2009). Deve-se destacar que estudos prévios, utilizando abordagens distintas de

coimunoprecipitação e ensaio de duplo-híbrido também identificaram interação de uma ou ambas peptidil-prolil cis-trans isomerases com Nop53 (Sydorsky et al., 2005; McCann et al., 2015; Kater et al., 2020). Um estudo recente usando XL-MS detectou inclusive *crosslinks* de alta confiança entre Fpr3 e Nop53 (Sailer et al., 2021). Dos 455 aa, Nop53 possui 12 resíduos de prolina (presentes inclusive na região N-terminal), dos quais 6 são altamente conservados. À luz destas observações e dos dados deste estudo, seria possível especular a existência de uma interação estável e independente de RNA estabelecida entre Nop53 e Fpr3 (ou Fpr4), capaz de afetar sua estabilidade, associação ao pré-60S ou ao exossomo. Ensaio complementares fazem-se necessários para responder a estas novas hipóteses.

De modo geral, os resultados obtidos neste trabalho não apenas corroboram observações e estudos anteriores, mostrando a associação de Nop53 a partículas pré-ribossomais de composição definida e conhecida, mas também apontam novos candidatos à validação, cuja interação direta ou indireta contribuirá para a compreensão de mecanismos regulatórios finos que permeiam o recrutamento de Nop53 ao nucléolo e ao pré-60S.

5.4 A depleção de Nop53 afeta estágios de maturação nucleolar e tardio do pré-60S

À exceção de seu papel no processamento do pré-rRNA 7S e na desmontagem do *ITS2-foot* (Fromm et al., 2017; Schuller et al., 2018), pouco se sabe sobre o impacto global que o recrutamento de Nop53 tem para as mudanças de composição que caracterizam a maturação da subunidade ribossomal maior. Visando resolver esta questão, avaliou-se neste estudo como a depleção de Nop53 afeta os diferentes estágios de montagem do 60S, empregando-se, para tanto, 8 diferentes fatores de montagem como iscas para a coimunoprecipitação de intermediários pré-ribossomais.

Nop7-TAP e Erb1-TAP nos permitiram avaliar os primeiros estágios de maturação nucleolar, enquanto os componentes da partícula Nog2, Arx1-TAP e Rsa4-TAP, forneceram dados sobre os estágios nucleoplasmáticos. A análise e comparação proteômica quantitativa das eluições mostrou que após depleção de Nop53, intermediários pré-60S copurificados com Nop7 e Erb1, ambos fatores A_3 , encontravam-se enriquecidos em componentes do estado E, com níveis significativamente reduzido de fatores de montagem de estágios anteriores. A título de exemplo, o módulo Nsa1 (Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16), que é removido pela ação da AAA-ATPase Rix7 na transição do estado D para o estado E (Kressler et al., 2008; Kater et al., 2017; Sanghai et al., 2018; Zhou et al., 2019a), teve seus níveis significativamente diminuídos nas partículas Erb1 após depleção de Nop53. Uma vez que a substituição de Erb1 por Nop53 na base do *ITS2-foot*

coincide com a mudança do pré-60S do estado nucleolar E para a partícula Nog2 nuclear (Kater et al., 2017; Wu et al., 2016; Baßler et al., 2010), estas observações sugeriram fortemente um efeito direto da depleção de Nop53 na formação de partículas Nog2. Consistente com esta interpretação, tanto Rsa4-TAP quanto Arx1-TAP copurificaram níveis significativamente reduzidos dos componentes da partícula de Nog2 com a depleção de Nop53.

Comparando o fenótipo observado com estudos anteriores, descrevendo mutantes de fatores de montagem das partículas de estado E ou Nog2, notamos que a depleção de Nop53 difere de mutantes pontuais *ytm1*, os quais bloqueiam completamente a maturação do pré-60S no estado E, evitando a liberação de Erb1 mediada pela AAA-ATPase Rea1 (Baßler et al., 2010; Thoms et al., 2016; Kater et al., 2017). A depleção de Nop53 também não é comparável à depleção da maioria dos fatores B (necessários para a clivagem do sítio C₂), que bloqueiam estágios nucleolares iniciais, afetando a transição do estado C para o estado D (Biedka et al., 2018; Talkish et al., 2012). A depleção de Nog2, por outro lado, exibiu um perfil similar ao da depleção de Nop53, também afetando o recrutamento de Rsa4 e Arx1 a partículas pré-60S nucleares (Lebreton et al., 2008b; Saveanu et al., 2001). Curiosamente, no entanto, não causou quase nenhum efeito em componentes do estado E nucleolar (Biedka et al., 2018; Talkish et al., 2012; Lebreton et al., 2008b), podendo sugerir um papel do recrutamento de Nop53 específico e anterior a Nog2, capaz de afetar tanto o estado E como a partícula Nog2.

A desmontagem da estrutura do *ITS2-foot*, que é dependente do processamento de ITS2, mostrou-se não ser essencial para a maioria dos eventos subsequentes de remodelamento nuclear tardio, incluindo a exportação nuclear, de modo que subunidades pré-60S tardias ainda retendo o *ITS2-foot* podem escapar para o citoplasma e entrar em um ciclo de tradução defectiva (Rodríguez-Galán et al., 2015; Sarkar et al., 2017; Biedka et al., 2018). Aqui, mostramos que a depleção de Nop53 também causa retenção do *ITS2-foot* em intermediários pré-60S tardios, de modo similar a outras cepas mutantes afetadas no recrutamento ou atividade do exossomo (*nop53* D64R, *nop53* AIM-5xAla, *dob1-1*, *rrp4-1*, *mtr3-1*) ou do complexo Las1 (Δ *las1*, *las1* R129A, *las1* H134A).

No entanto, diferentemente destes mutantes acima mencionados, o efeito da depleção de Nop53 reverbera nas etapas seguintes da via de maturação do 60S. A título de exemplo, ambos Rsa4 e Arx1 exibiram, nesta condição, associação significativamente reduzida a componentes da partícula nuclear Rix1-Rea1, refletindo a formação diminuída de partículas Nog2. Este efeito foi ligeiramente mais pronunciado sobre a associação de Arx1 ao pré-60S. Sendo Arx1 um fator de exportação nuclear não essencial, no entanto, sua menor associação não seria suficiente para interromper a maturação do pré-60S ou causar um defeito significativo de exportação nucleocitoplasmática (Bradatsch et al., 2007). De fato, a análise de partículas pré-ribossomais

copurificadas com os fatores de montagem de associação tardia Nmd3 e Lsg1 mostrou que intermediários nucleares tardios e citoplasmáticos iniciais ainda são formados sob depleção de Nop53, embora em níveis diminuídos. Condizente com esta observação, o fator nucleocitoplasmático Nmd3 exibiu, na análise por microscopia de fluorescência, um enriquecimento nuclear, embora ainda com sinal citoplasmático, após a depleção de Nop53, remanescente do fenótipo de depleção de fatores de exportação (Altvater et al., 2012; Yao et al., 2007). Da mesma forma, o componente do *ITS2-foot* Nop7 não foi significativamente deslocado para o citoplasma, como anteriormente observado na cepa mutante *nop53* AIM-5xAla (Sarkar et al., 2017), mas encontrado principalmente no nucleoplasma, assim como Arx1, cuja localização subcelular permaneceu inalterada.

Notavelmente, o fator de montagem nucleocitoplasmático de ação tardia Yvh1 não foi detectado em pré-ribossomos isolados com todos os fatores de associação tardia ao pré-60S testados (Arx1, Nmd3, Lsg1) após depleção de Nop53. Esta observação foi posteriormente confirmada usando o próprio Yvh1 como isca, mostrando uma diminuição significativa da coimunoprecipitação de fatores de montagem tardios, proteínas-r, bem como de rRNAs precursores e maduros. Na mesma condição, as partículas pré-ribossomais Lsg1 citoplasmáticas não exibiram a mesma mudança de composição, indicando que a depleção de Nop53 afeta mais intensamente certos eventos de maturação tardia, afetando especificamente o recrutamento de Yvh1. A retenção do *ITS2-foot* parece contribuir para este efeito, uma vez que mutantes de deleção no N-terminal de Nop53 desprovidos do motivo de recrutamento de exossomo (AIM) também causaram efeito semelhante no recrutamento de Yvh1. A principal causa, no entanto, deve estar relacionada à formação menos eficiente de intermediários pré-60S tardios aos quais Yvh1 se liga, uma vez que as etapas anteriores encontram-se afetadas após a depleção de Nop53, de modo similar ao que já foi mostrado em partículas pré-ribossomais Arx1 após depleção do fator de montagem Cgr1 (Thoms et al., 2018).

Consistente com uma formação diminuída de intermediários pré-60S tardios, a depleção de Nop53 não tem o mesmo efeito que $\Delta yvh1$ em intermediários pré-60S citoplasmáticos. Com o recrutamento de Yvh1, que possui um domínio de fosfatase e um de ligação a zinco, este último induz alostericamente a dissociação de Mrt4 da base do *P-stalk* em formação (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009; Rodríguez-Mateos et al., 2009a, 2009b; Sarkar et al., 2016; Zhou et al., 2019b). Após a depleção de Nop53, embora o fator de montagem Mrt4 se encontrasse associado a partículas pré-60S contendo *ITS2-foot*, não acumulou nem foi retido no citoplasma como previamente descrito para a cepa $\Delta yvh1$ (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009), evidenciando que a maturação do pré-60S não foi especificamente bloqueada na etapa Yvh1-dependente de liberação de Mrt4, mas sim em uma etapa anterior. As implicações do aumento da fração livre de

Yvh1 ainda precisam ser testadas, considerando os numerosos processos celulares aos quais esta proteína já foi associada (Geng et al., 2017; Sugiyama et al., 2011; Liu e Chang, 2009; Sakumoto et al., 2001).

5.5 Evidências de funções adicionais de Nop53 durante a montagem da subunidade ribossomal 60S

A comparação entre o efeito geral da depleção de Nop53 com estudos anteriores sobre a retenção do ITS2 não-processado no pré-60S mostram diferenças interessantes. Enquanto a depleção de Nop53 causa o enriquecimento nuclear de Nmd3 e manutenção de Nop7 no núcleo, as mutações pontuais no motivo AIM de Nop53 são suficientes para causar um acúmulo citoplasmático perceptível dos componentes do *ITS2-foot* Nop7 e Cic1 (Sarkar et al., 2017). Este acúmulo citoplasmático também é verificado com a depleção ou mutação da endorribonuclease Las1, gerando subunidades 60S contendo o *ITS2-foot* (Biedka et al., 2018; Sarkar et al., 2017). As primeiras etapas de maturação do pré-60S, do mesmo modo, também são diferencialmente afetadas. Em contraste com a depleção de Nop53, partículas pré-ribossomais Nop7 copurificadas de cepas expressando o mutante *las1* H134A (cataliticamente inativo) não exibiram enriquecimento de fatores de montagem nucleolares iniciais, mas sim níveis diminuídos de Erb1, Ytm1 e outros componentes de partículas do estado E (Biedka et al., 2018). Tomadas em conjunto, estas observações ilustram como a depleção de Nop53 tem um efeito diferente na via de montagem do 60S em comparação com outras condições que bloqueiam única e exclusivamente o processamento do ITS2. Isto reforça a hipótese da existência de um papel estrutural adicional e independente do exossomo desempenhado por Nop53, o qual não foi afetado nos estudos anteriores por mutações pontuais no AIM nem após depleção de Las1.

Estas considerações nos levaram a avaliar o efeito de novos mutantes truncados de Nop53. Curiosamente, observamos que a extremidade N-terminal de Nop53 *upstream* ao AIM também é importante para o processamento do ITS2, uma vez que mutantes de Nop53 sem os primeiros 47 aa, embora contendo o AIM e sendo recrutados ao pré-60S, acumularam o pré-rRNA 7S. Testando os mutantes truncados de Nop53 em diferentes condições de crescimento, mostramos que os mutantes de deleção do N-terminal foram comparativamente mais afetados pelo tratamento com rapamicina, exibindo um fenótipo dominante negativo. Com a inibição da quinase TOR por rapamicina, diversos processos celulares são afetados, incluindo a tradução e a biogênese ribossomal, diminuindo-se a atividade das RNA Pol I e Pol III e a expressão de proteínas-r e fatores de montagem (Zencir et al., 2020; Albert et al., 2016; Loewith e Hall, 2011; Jorgensen et al., 2004). Nesta condição, especulamos que os mutantes de deleção do C-terminal

de Nop53, sendo desprovidos de grandes extensões de ancoragem (426-455 aa) envolvidas em interações com Nop7, Rlp7 e uL23 (Fig. 48) (Wu et al., 2016, 2017), podem encontrar-se menos estavelmente associados com o pré-60S, causando um efeito semelhante ao da depleção de Nop53. Os mutantes do N-terminal de Nop53, por outro lado, podem competir com a cópia *full length* durante o recrutamento e causar, uma vez ligados ao pré-60S, a formação de subunidades 60S defectivas contendo o *ITS2-foot* (Biedka et al., 2018; Sarkar et al., 2017), que desencadeiam não apenas estresse traducional, mas também causam a retenção de fatores A₃ (componentes do *ITS2-foot*) no citoplasma sinergicamente afetando a biogênese ribossomal com a inibição de TOR.

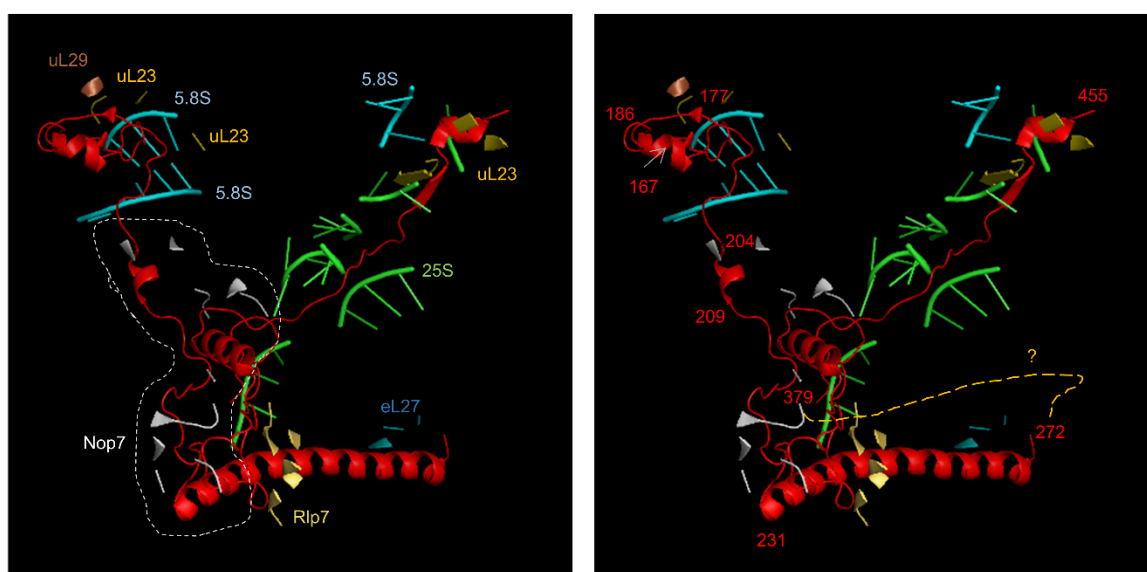


Figura 48. Detalhes das interações intermoleculares de Nop53 no pré-60S. A vizinhança de Nop53 na estrutura do pré-60S (PDB: 3JCT) foi analisada usando o software PyMOL (*action>around >4Å*). Em vermelho, estrutura de Nop53 no *ITS2-foot*. No painel à esquerda são destacados resíduos de aminoácidos de proteínas-r e fatores de montagem, bem como resíduos de nucleotídeos de rRNA que estabelecem contato com/ ou encontram-se próximos a Nop53. Região destacada em pontilhado: pontos de interação com Nop7. No painel à direita, a numeração indica a posição dos resíduos de aminoácidos na estrutura de Nop53. Uma linha pontilhada indica o intervalo de aminoácidos sem estrutura resolvida.

Através de análise proteômica quantitativa *label-free*, observamos que pré-ribossomos coimunoprecipitados com Nop7 após depleção de Nop53 apresentaram mudanças significativas em comparação com aqueles isolados de células expressando mutantes de deleção N-terminal de Nop53 (*nop53* Δ 48-98 e *nop53* Δ 1-71), capazes de se ligarem estavelmente ao pré-60S, mas incapazes de recrutar o exossomo. Estas observações são consistentes com a análise de SHAPE *in vivo* de regiões do rRNA 25S, revelando padrões de modificação notavelmente diferentes entre a deleção de Nop53 e mutantes do N-terminal. Se a única função de Nop53 durante a montagem da subunidade 60S fosse o recrutamento do exossomo, esperaríamos perfis bastante semelhantes. Em vez disso, comparativamente aos mutantes do N-terminal, as partículas Nop7 isoladas após depleção de Nop53 encontraram-se significativamente enriquecidas para

componentes da partícula de estado E, o que não é apenas consistente com os resultados anteriormente apresentados, mas também mostra que uma formação eficiente de partículas Nog2 requer a associação de Nop53 ao pré-60S independentemente de sua capacidade de recrutar o exossomo.

5.6 Base estrutural da função expandida de Nop53 na montagem da subunidade 60S

Tendo em conta estruturas de crio-EM recentemente descritas, podemos explicar a base molecular do papel estrutural desempenhado por Nop53 (Fig. 49A), cujas evidências experimentais discutimos acima. Durante a montagem da subunidade 60S, o *ITS2-foot* desempenha um papel importante como *scaffold* (Baßler e Hurt, 2019) influenciando no processamento do ITS1 nas etapas nucleolares mais iniciais (Sahasranaman et al., 2011; Woolford e Baserga, 2013) e, posteriormente, auxiliando no reposicionamento do *L1-stalk* (H74-79-ES31) (Kater et al., 2017, 2020). No primeiro caso com Erb1, e no segundo caso, após o recrutamento de Nop53. Na transição do estado E para a partícula Nog2, vários fatores de montagem são liberados, incluindo aqueles que estabilizavam *L1-stalk* em uma conformação prematura (Wu et al., 2016; Kater et al., 2017, 2020; Sanghai et al., 2018; Zhou et al., 2019a). Após o recrutamento de Nop53, o Domínio V do rRNA 25S, que inclui o PTC, sofre um remodelamento significativo com a acomodação do *L1-stalk* flexível (H74-H79-ES31) em uma posição similar à madura, havendo associação das proteínas-r uL2 e eL43 (Fig. 49A, partícula Nop53 inicial 2) (Kater et al., 2020). Nop53 desempenha um papel importante durante este processo, permitindo o reposicionamento da extremidade N-terminal de Rlp7, o que possibilita a acomodação de uma hélice e segmento de expansão (H79-ES31) do Domínio V (Kater et al., 2017, 2020). Na Figura 49A, destacamos que Nop53 não apenas interage diretamente com H79-ES31, mas também com vários fatores de montagem e proteínas-r (Rlp7, eL8, uL23 e eL27) que compõem o sítio de acomodação (*docking*) de H79-ES31 (Wu et al., 2016, 2017; Kater et al., 2020). Nesta posição, Nop53 parece desempenhar um papel central na organização e estabilização da interface do *ITS2-foot* com as proteínas-r, impactando na extremidade N-terminal de eL8, abrindo espaço para a acomodação estável de H79-ES31 e auxiliando no reposicionamento de *L1-stalk*. À luz desta interpretação, propomos que a estrutura do *ITS2-foot* na ausência de Nop53 seja mais flexível ou incorretamente orientada para ancorar o remodelamento do Domínio V do 25S. Isto afetaria, mas não impediria completamente o rearranjo do *L1-stalk*, explicando, deste modo, o impacto observado na transição do estado E para a partícula Nog2.

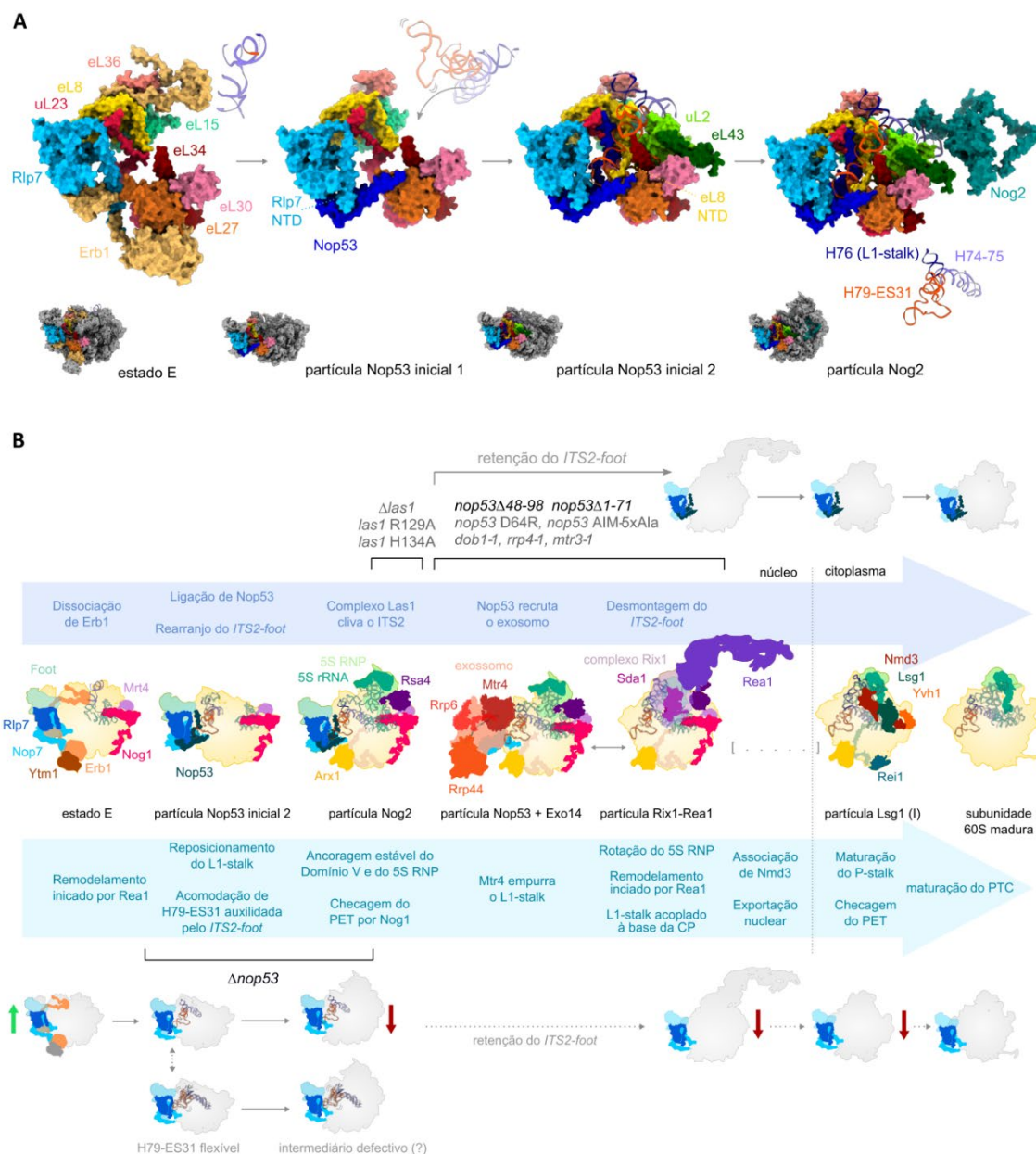


Figura 49. Nop53 desempenha um papel estrutural essencial durante a transição do estado E para a partícula Nog2. (A) Mudanças estruturais e composicionais do *ITS2-foot*, que permitem a acomodação estável de H79-ES31 durante a ancoragem do Domínio V do rRNA 25S ao pré-60S. A transição da partícula de estado E para a partícula Nog2 é representada pelas estruturas PDB 6ELZ, 6YLX, 6YLY e 3JCT, destacando apenas os fatores de montagem e as proteínas-r que interagem diretamente com a base do L1-stalk (H74-H76) e com H79-ES31. Para facilitar a visualização, Nip7 e Nop2 não são mostrados na partícula de estado E. Após a dissociação de Erb1 e recrutamento de Nop53, o domínio N-terminal (NTD) de Rlp7 é deslocado. Nop53 interage diretamente com o H79-ES31 e com 4 (Rlp7, eL8, uL23 e eL27) das 8 proteínas que compõem o sítio de ancoragem de H79-ES31. (B) Representação esquemática da via de montagem da subunidade ribossomal 60S com base nas estruturas PDB 6ELZ, 6YLY, 3JCT, 6FT6, 6FSZ, 6YLH, 6RZZ e 4V88. O Domínio V do rRNA 25S é indicado em verde, enquanto a base do L1-stalk e a H79-ES31 são indicados nas mesmas cores que em (A). Eventos de remodelamento importantes são resumidos abaixo das respectivas estruturas, enquanto os eventos de maturação associados ao *ITS2-foot*, acima. De acordo com o modelo proposto, a depleção de Nop53, em função de seu impacto estrutural no *ITS2-foot*, afeta diretamente a montagem de partículas Nog2, repercutindo nas etapas posteriores de maturação do pré-60S. Este efeito não é observado com a remoção (*nop53\Delta48-98*, *nop53\Delta1-71*) ou mutação (*nop53 D64R*, *nop53 AIM 5xAla*, (Sarkar et al., 2017)) da região de Nop53 de interação com o exossomo, nem após mutação de Las1 (*las1 R129A*, *las1 H134A*, (Sarkar et al., 2017; Biedka et al., 2018)) ou de subunidades e cofatores do exossomo (*dob1-1*, *rrp4-1*, *mtr3-1*, (Rodríguez-Galán et al., 2015)). Estes mutantes afetam especificamente o processamento do ITS2, causando a retenção do *ITS2-foot* em intermediários pré-60S tardios, sem impactos significativos para a exportação nuclear ou eventos de maturação citoplasmática.

Notavelmente, efeito similar já foi apontado com a depleção de uL2 e eL43, que se ligam diretamente a H79-ES31 logo após o reposicionamento do *L1-stalk* (Fig. 49A). A ausência dessas proteínas-r causa aumento do nível de fatores de montagem nucleolares e diminuição dos componentes da partícula Nog2 coimunoprecipitados com Nog1 (Ohmayer et al., 2013). De modo similar, a deleção da extensão N-terminal de eL8, que também interage diretamente com H79-ES31 (Fig. 49A), embora não seja suficiente para impedir a formação da partícula Nog2, afeta a associação de Sda1, bloqueando as etapas de maturação do pré-60S subsequentes (Tutuncuoglu et al., 2016). Isto se dá, concebivelmente, devido ao *folding* incorreto de L1-stalk e das hélices H68-69, que são sítios de ligação de Sda1 à partícula Nog2. Conjuntamente, estas três proteínas-r têm em comum com Nop53 a interação com H79-ES31, ilustrando a importância da acomodação e orientação adequada do Domínio V do rRNA 25S, na ausência das quais partículas Nog2 podem ser incorretamente montadas. Resta ser testado se após depleção de Nop53, parte das partículas Nog2 formadas também são defectivas, impedindo eventos de remodelamento posteriores (Fig. 49B).

A função de *scaffold* do *ITS2-foot* pode ser a razão pela qual o recrutamento de Nop53 no estágio NE1 não seja suficiente para desencadear a remoção de ITS2. A ancoragem estável do Domínio V e a formação adequada da partícula Nog2 devem acontecer antes do início do processamento do ITS2. Curiosamente, foi recentemente demonstrado que falha no recrutamento do fator de montagem Sda1, que interage com *L1-stalk* e o complexo Rix1 (Kater et al., 2020), gera partículas Nog2 defectivas, que são desprovidas do *ITS2-foot*, exibindo H75-H79-ES31 não estruturadas e o L1-stalk deslocado para uma posição incomum (Micic et al., 2020). Como possível interpretação para este intermediário defectivo, propomos que a remoção precoce do *ITS2-foot*, antes da ligação estável de Sda1 ou do complexo Rix1, possa desestabilizar a ancoragem de H79-ES31 e induzir o posicionamento incorreto de L1-stalk. Isto, uma vez que durante o processamento do ITS2 pelo exossomo, a RNA helicase Mtr4 contata diretamente tanto H79-ES31 quanto o L1-stalk, empurrando-o para uma posição próxima à CP (Schuller et al., 2018). Na ausência de Sda1 ou do complexo Rix1, o reposicionamento do L1-stalk induzido pelo exossomo resultaria em uma posição defletida que impediria as etapas posteriores de maturação. Postulamos, portanto, que a remoção do ITS2 pode atuar como um mecanismo de controle de qualidade, garantindo a montagem adequada das partículas Nog2 e Rix1-Rea1, ambas sensíveis à desmontagem prematura do *ITS2-foot*. A interconexão do *ITS2-foot* com outros centros funcionais do 60S, como o PET, por meio de uL23, e o PTC, por meio de H79-ES31, pode fornecer sinais do momento exato de desmontagem (Biedka et al., 2017; Konikkat e Woolford, 2017; Tutuncuoglu et al., 2016), e Nop53 parece desempenhar um papel central como sensor interagindo tanto com uL23 como com H79-ES31. Enquanto a clivagem no

sítio C₂ por Las1 depende do ancoramento do 5S RNP e da ligação de fatores B ao Domínio V (Biedka et al., 2018; Talkish et al., 2012), a atividade do exossomo parece ser afetada por, mas não depender da rotação do 5S RNP e da associação estável de Sda1 e do complexo Rix1, que poderiam fornecer informações mecânicas ao *ITS2-foot* por meio de Nop53. Esta conexão funcional entre o Domínio V e o ITS2 ainda precisa ser investigada.

Em conjunto, os resultados deste trabalho fornecem evidências bioquímicas para um papel expandido de Nop53, revelando que sua depleção afeta eventos nucleolares e de maturação tardia, provocando diferentes defeitos na biogênese da subunidade 60S em comparação com mutantes de deleção da sua extremidade N-terminal. Estes achados são consistentes com um papel estrutural desempenhado por Nop53 durante a transição do estado nucleolar E para a partícula Nog2, remodelando e estabilizando a estrutura do *ITS2-foot* para realizar sua última função de *scaffold*: auxiliar a ancoragem do Domínio V, acomodando H79-ES31 (Fig. 49B). Postulamos que, em contraste com a retenção do *ITS2-foot*, que não afeta a maioria dos eventos subsequentes de maturação do pré-60S, a remoção prematura do *ITS2-foot* na transição do estado E para as partículas Nog2 e Rix1-Rea1 possa resultar em partículas defectivas (Micic et al., 2020; Wilson et al., 2020) com L1-stalk incorretamente posicionado e o Domínio V mal estruturado. É interessante notar ainda que a associação de Nop53 ao pré-60S é flanqueada por dois grandes eventos de remodelamento estrutural e de composição desencadeados pela mesma AAA-ATPase, Rea1. É tentador, portanto, considerar que, ao coordenar o momento exato da remoção do ITS2 e auxiliar na ancoragem do Domínio V, Nop53 desempenhe um papel central no controle de qualidade do primeiro evento de remodelamento antes que o segundo possa ocorrer.

6. CONCLUSÃO

Nop53 é um fator de montagem ribossomal conservado e essencial que estabelece a conexão entre dois grandes complexos (exossomo e pré-60S) durante o dinâmico processo de remoção do espaçador ITS2. Estudando o impacto da depleção de Nop53 em ambos os complexos, em *S. cerevisiae*, foi possível elucidar novos aspectos relativos ao exossomo nucleolar e à biogênese da subunidade ribossomal maior. Identificamos neste trabalho a interação de Nop53 com o cofator do exossomo Mpp6 com potencial de auxiliar no recrutamento e posicionamento do exossomo, modulando sua estável ancoragem inicial ao pré-60S. Por meio de abordagens complementares, detectamos a associação precoce do exossomo aos intermediários nucleolares mais iniciais (90S) da biogênese ribossomal, anteriormente ao previamente descrito, havendo aumento da associação do exossomo a estas subunidades ribossomais em formação após depleção de Nop53. Estas observações foram recentemente corroboradas pela caracterização estrutural destes intermediários pré-ribossomais iniciais. Utilizando uma abordagem proteômica quantitativa *label-free*, caracterizamos o interactoma de Nop53, apresentando possíveis mecanismos regulatórios que devem modular sua localização e recrutamento ao pré-60S. Através da caracterização de partículas pré-ribossomais cobrindo quase todos os estágios de maturação da subunidade 60S, mostramos ainda que o papel de Nop53 durante a biogênese ribossomal não se restringe ao recrutamento do exossomo, como anteriormente proposto. Nossos resultados proveem evidências bioquímicas de que Nop53 tem um papel estrutural e afeta eventos de remodelamento do rRNA essenciais para a formação de partículas pré-60S tardias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C.C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P., and Woolford, J.L. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. *RNA* 8, 150–165.
- Agmon, I., Bashan, A., Zarivach, R., and Yonath, A. (2005). Symmetry at the active site of the ribosome: structural and functional implications. *Biological Chemistry* 386, 833–844.
- Agmon, I., Davidovich, C., Bashan, A., and Yonath, A. (2009). Identification of the prebiotic translation apparatus within the contemporary ribosome. *Nature Precedings* 1–1.
- Ahmed, Y.L., Thoms, M., Mitterer, V., Sinning, I., and Hurt, E. (2019). Crystal structures of Rea1-MIDAS bound to its ribosome assembly factor ligands resembling integrin–ligand-type complexes. *Nature Communications* 10, 3050.
- Albert, B., Knight, B., Merwin, J., Martin, V., Ottoz, D., Gloor, Y., Bruzzone, M.J., Rudner, A., and Shore, D. (2016). A Molecular Titration System Coordinates Ribosomal Protein Gene Transcription with Ribosomal RNA Synthesis. *Molecular Cell* 64, 720–733.
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., and Zhou, H. (2008). A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Mol Cell Proteomics* 7, 1389–1396.
- Allmang, C., and Tollervey, D. (1998). The role of the 3' external transcribed spacer in yeast pre-rRNA processing¹¹Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology* 278, 67–78.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO Journal* 18, 5399–5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148–2158.
- Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res* 28, 1684–1691.
- Altvater, M., Chang, Y., Melnik, A., Occhipinti, L., Schütz, S., Rothenbusch, U., Picotti, P., and Panse, V.G. (2012). Targeted proteomics reveals compositional dynamics of 60S pre-ribosomes after nuclear export. *Mol Syst Biol* 8, 628.
- Ameisemeier, M., Cheng, J., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2018). Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature* 558, 249–253.
- Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 17, 1497–1506.
- Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80–85.
- Aquino, G.R.R., Krogh, N., Hackert, P., Martin, R., Gallesio, J.D., van Nues, R.W., Schneider, C., Watkins, N.J., Nielsen, H., Bohnsack, K.E., et al. (2021). RNA helicase-mediated regulation of snoRNP dynamics on pre-ribosomes and rRNA 2'-O-methylation. *Nucleic Acids Res* 49, 4066–4084.
- Aubert, M., O'Donohue, M.-F., Lebaron, S., and Gleizes, P.-E. (2018). Pre-Ribosomal RNA Processing in Human Cells: From Mechanisms to Congenital Diseases. *Biomolecules* 8, 123.
- Axhemi, A., Wasmuth, E.V., Lima, C.D., and Jankowsky, E. (2020). Substrate selectivity by the exonuclease Rrp6p. *PNAS* 117, 982–992.
- Axt, K., French, S.L., Beyer, A.L., and Tollervey, D. (2014). Kinetic Analysis Demonstrates a Requirement for the Rat1 Exonuclease in Cotranscriptional Pre-rRNA Cleavage. *PLOS ONE* 9, e85703.
- Bagatelli, F.F.M., de Luna Vitorino, F.N., da Cunha, J.P.C., and Oliveira, C.C. (2021). The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events. *Nucleic Acids Research* 49, 7053–7074.
- Bah, A., and Forman-Kay, J.D. (2016). Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications. *J Biol Chem* 291, 6696–6705.
- Baker, K.E., and Parker, R. (2006). Conventional 3' end formation is not required for NMD substrate recognition in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 12, 1441–1445.

- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* 289, 905–920.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 24, 165–169.
- Barandun, J., Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Molloy, K.R., Chait, B.T., and Klinge, S. (2017). The complete structure of the small-subunit processome. *Nat Struct Mol Biol* 24, 944–953.
- Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2018). Assembly and structure of the SSU processome - a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Curr Opin Struct Biol* 49, 85–93.
- Barandun, J., Hunziker, M., Vossbrinck, C.R., and Klinge, S. (2019). Evolutionary compaction and adaptation visualized by the structure of the dormant microsporidian ribosome. *Nat Microbiol* 4, 1798–1804.
- Barrio-Garcia, C., Thoms, M., Flemming, D., Kater, L., Berninghausen, O., Baßler, J., Beckmann, R., and Hurt, E. (2016). Architecture of the Rix1–Rea1 checkpoint machinery during pre-60S-ribosome remodeling. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 37–44.
- Baßler, J., and Hurt, E. (2019). Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 281–306.
- Baßler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M., and Hurt, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 Drives Removal of Biogenesis Factors during Multiple Stages of 60S Ribosome Assembly. *Molecular Cell* 38, 712–721.
- Baßler, J., Klein, I., Schmidt, C., Kallas, M., Thomson, E., Wagner, M.A., Bradatsch, B., Rechberger, G., Strohmaier, H., Hurt, E., et al. (2012). The Conserved Bud20 Zinc Finger Protein Is a New Component of the Ribosomal 60S Subunit Export Machinery. *Molecular and Cellular Biology* 32, 4898–4912.
- Belair, C., Sim, S., Kim, K.-Y., Tanaka, Y., Park, I.-H., and Wolin, S.L. (2019). The RNA exosome nuclease complex regulates human embryonic stem cell differentiation. *Journal of Cell Biology* 218, 2564–2582.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* 330, 1203–1209.
- Ben-Shem, A., Loubresse, N.G. de, Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* 334, 1524–1529.
- Bentley-DeSousa, A., Holinier, C., Moteshareie, H., Tseng, Y.-C., Kajjo, S., Nwosu, C., Amodeo, G.F., Bondy-Chorney, E., Sai, Y., Rudner, A., et al. (2018). A Screen for Candidate Targets of Lysine Polyphosphorylation Uncovers a Conserved Network Implicated in Ribosome Biogenesis. *Cell Reports* 22, 3427–3439.
- Bernier, C.R., Petrov, A.S., Kovacs, N.A., Penev, P.I., and Williams, L.D. (2018). Translation: The Universal Structural Core of Life. *Molecular Biology and Evolution* 35, 2065–2076.
- Biedka, S., Wu, S., LaPeruta, A.J., Gao, N., and Jr, J.L.W. (2017). Insights into remodeling events during eukaryotic large ribosomal subunit assembly provided by high resolution cryo-EM structures. *RNA Biology* 14, 1306–1313.
- Biedka, S., Micic, J., Wilson, D., Brown, H., Diorio-Toth, L., and Woolford, J.L., Jr. (2018). Hierarchical recruitment of ribosomal proteins and assembly factors remodels nucleolar pre-60S ribosomes. *Journal of Cell Biology* 217, 2503–2518.
- Black, J.J., Wang, Z., Goering, L.M., and Johnson, A.W. (2018). Utp14 interaction with the small subunit processome. *RNA* 24, 1214–1228.
- Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and Baserga, S.J. (2006). The PINc domain protein Utp24, a putative nuclease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation. *PNAS* 103, 9464–9469.
- Bodenmiller, B., Wanka, S., Kraft, C., Urban, J., Campbell, D., Pedrioli, P.G., Gerrits, B., Picotti, P., Lam, H., Vitek, O., et al. (2010). Phosphoproteomic Analysis Reveals Interconnected System-Wide Responses to Perturbations of Kinases and Phosphatases in Yeast. *Sci Signal* 3, rs4.
- Bohnsack, K.E., and Bohnsack, M.T. (2019). Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *EMBO J* 38, e100278.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The Yeast Exosome Functions as a Macromolecular Cage to Channel RNA Substrates for Degradation. *Cell* 139, 547–559.
- Borovinskaya, M.A., Shoji, S., Fredrick, K., and Cate, J.H.D. (2008). Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* 14, 1590–1599.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a Regulated Pathway for Nuclear Pre-mRNA Turnover. *Cell* 102, 765–775.

- Bowman, J.C., Petrov, A.S., Frenkel-Pinter, M., Penev, P.I., and Williams, L.D. (2020). Root of the Tree: The Significance, Evolution, and Origins of the Ribosome. *Chem. Rev.* 120, 4848–4878.
- Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgärtel, V., Boese, G., Bassler, J., Wild, K., et al. (2007). Arx1 Functions as an Unorthodox Nuclear Export Receptor for the 60S Preribosomal Subunit. *Molecular Cell* 27, 767–779.
- Bradatsch, B., Leidig, C., Granneman, S., Gnädig, M., Tollervey, D., Böttcher, B., Beckmann, R., and Hurt, E. (2012). Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1234–1241.
- Braun, C.M., Hackert, P., Schmid, C.E., Bohnsack, M.T., Bohnsack, K.E., and Perez-Fernandez, J. (2020). Pol5 is required for recycling of small subunit biogenesis factors and for formation of the peptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* 48, 405–420.
- Bresson, S., Tuck, A., Staneva, D., and Tollervey, D. (2017). Nuclear RNA Decay Pathways Aid Rapid Remodeling of Gene Expression in Yeast. *Molecular Cell* 65, 787–800.e5.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T.D., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the Yeast Homologue of the Human PM-Scf 100-kDa Autoantigen, Is Essential for Efficient 5.8 S rRNA 3' End Formation*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13255–13263.
- Brown, J.T., Bai, X., and Johnson, A.W. (2000). The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA* 6, 449–457.
- Bühler, M., Haas, W., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2007). RNAi-Dependent and -Independent RNA Turnover Mechanisms Contribute to Heterochromatic Gene Silencing. *Cell* 129, 707–721.
- Callahan, K.P., and Butler, J.S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Research* 36, 6645–6655.
- Cao, S.-N., Yuan, Y., Qin, Y. (Haity), Zhang, M.-Z., Figueiredo, P. de, Li, G.-H., and Qin, Q.-M. (2018). The pre-rRNA processing factor Nop53 regulates fungal development and pathogenesis via mediating production of reactive oxygen species. *Environmental Microbiology* 20, 1531–1549.
- Carvalho, P.C., Fischer, J.S.G., Xu, T., Cociorva, D., Balbuena, T.S., Valente, R.H., Perales, J., Yates III, J.R., and Barbosa, V.C. (2012a). Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *PROTEOMICS* 12, 944–949.
- Carvalho, P.C., Yates, J.R., III, and Barbosa, V.C. (2012b). Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28, 1652–1654.
- Carvalho, P.C., Lima, D.B., Leprevost, F.V., Santos, M.D.M., Fischer, J.S.G., Aquino, P.F., Moresco, J.J., Yates, J.R., and Barbosa, V.C. (2016). Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc* 11, 102–117.
- Castelnuovo, M., Rahman, S., Guffanti, E., Infantino, V., Stutz, F., and Zenklusen, D. (2013). Bimodal expression of PHO84 is modulated by early termination of antisense transcription. *Nat Struct Mol Biol* 20, 851–858.
- Castle, C.D., Cassimere, E.K., Lee, J., and Denicourt, C. (2010). Las1L Is a Nucleolar Protein Required for Cell Proliferation and Ribosome Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 30, 4404–4414.
- Castle, C.D., Cassimere, E.K., and Denicourt, C. (2012). LAS1L interacts with the mammalian Rix1 complex to regulate ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 23, 716–728.
- Castle, C.D., Sardana, R., Dandekar, V., Borgianini, V., Johnson, A.W., and Denicourt, C. (2013). Las1 interacts with Grc3 polynucleotide kinase and is required for ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 41, 1135–1150.
- Cepeda, L.P.P., Bagatelli, F.F.M., Santos, R.M., Santos, M.D.M., Nogueira, F.C.S., and Oliveira, C.C. (2019). The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast. *J Biol Chem* 294, 19365–19380.
- Chaker-Margot, M. (2018). Assembly of the small ribosomal subunit in yeast: mechanism and regulation. *RNA* 066985.118.
- Chaker-Margot, M., and Klinge, S. (2019). Assembly and early maturation of large subunit precursors. *RNA* 25, 465–471.
- Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Barandun, J., Dill, B.D., and Klinge, S. (2015). Stage-specific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 22, 920–923.

- Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2017). Architecture of the yeast small subunit processome. *Science* 355, eaal1880.
- Chen, C.-Y., Gherzi, R., Ong, S.-E., Chan, E.L., Rajmakers, R., Pruijn, G.J.M., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464.
- Chen, W., Xie, Z., Yang, F., and Ye, K. (2017). Stepwise assembly of the earliest precursors of large ribosomal subunits in yeast. *Nucleic Acids Research* 45, 6837–6847.
- Cheng, J., Kellner, N., Berninghausen, O., Hurt, E., and Beckmann, R. (2017). 3.2-Å-resolution structure of the 90S preribosome before A1 pre-rRNA cleavage. *Nat Struct Mol Biol* 24, 954–964.
- Cheng, J., Lau, B., La Venuta, G., Ameismeier, M., Berninghausen, O., Hurt, E., and Beckmann, R. (2020). 90S pre-ribosome transformation into the primordial 40S subunit. *Science* 369, 1470–1476.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G., and Hunt, D.F. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2193–2198.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 552–560.
- Collins, J.C., Ghalei, H., Doherty, J.R., Huang, H., Culver, R.N., and Karbstein, K. (2018). Ribosome biogenesis factor Ltv1 chaperones the assembly of the small subunit head. *Journal of Cell Biology* 217, 4141–4154.
- Costello, J.L., Stead, J.A., Feigenbutz, M., Jones, R.M., and 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, 4535–4543.
- Coy, S., Volanakis, A., Shah, S., and Vasiljeva, L. (2013). The Sm Complex Is Required for the Processing of Non-Coding RNAs by the Exosome. *PLoS One* 8, e65606.
- de la Cruz, J., Karbstein, K., and Woolford, J.L. (2015). Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 93–129.
- Darling, A.L., and Uversky, V.N. (2018). Intrinsic Disorder and Posttranslational Modifications: The Darker Side of the Biological Dark Matter. *Front Genet* 9, 158.
- Das, M., Zattas, D., Zinder, J.C., Wasmuth, E.V., Henri, J., and Lima, C.D. (2021). Substrate discrimination and quality control require each catalytic activity of TRAMP and the nuclear RNA exosome. *PNAS* 118.
- Davis, C.A., and Ares, M. (2006). Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 103, 3262–3267.
- Decatur, W.A., and Schnare, M.N. (2008). Different Mechanisms for Pseudouridine Formation in Yeast 5S and 5.8S rRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3089–3100.
- Decker, C.J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* 7, 1632–1643.
- Delan-Forino, C., Schneider, C., and Tollervey, D. (2017). Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex. *PLOS Genetics* 13, e1006699.
- Delan-Forino, C., Spanos, C., Rappsilber, J., and Tollervey, D. (2020). Substrate specificity of the TRAMP nuclear surveillance complexes. *Nat Commun* 11, 3122.
- Delavoie, F., Soldan, V., Rinaldi, D., Dauxois, J.-Y., and Gleizes, P.-E. (2019). The path of pre-ribosomes through the nuclear pore complex revealed by electron tomography. *Nature Communications* 10, 497.
- Dembowski, J.A., Kuo, B., and Woolford, J.L., Jr (2013). Has1 regulates consecutive maturation and processing steps for assembly of 60S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Research* 41, 7889–7904.
- Dever, T.E., Kinzy, T.G., and Pavitt, G.D. (2016). Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 203, 65–107.
- Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2002). Naf1p, an Essential Nucleoplasmic Factor Specifically Required for Accumulation of Box H/ACA Small Nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* 22, 7053–7065.
- Dez, C., Houseley, J., and Tollervey, D. (2006). Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 25, 1534–1546.

- Dragon, F., Gallagher, J.E.G., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., et al. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967–970.
- Drażkowska, K., Tomecki, R., Stoduś, K., Kowalska, K., Czarnocki-Cieciura, M., and Dziembowski, A. (2013). The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* 41, 3845–3858.
- Du, Y., An, W., Zhu, X., Sun, Q., Qi, J., and Ye, K. (2020). Cryo-EM structure of 90S small ribosomal subunit precursors in transition states. *Science* 369, 1477–1481.
- Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradović, Z. (2002). Intrinsic Disorder and Protein Function. *Biochemistry* 41, 6573–6582.
- Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 197–208.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Séraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* 14, 15–22.
- Eberle, A.B., Jordán-Pla, A., Gañez-Zapater, A., Hessle, V., Silberberg, G., Euler, A. von, Silverstein, R.A., and Visa, N. (2015). An Interaction between RRP6 and SU(VAR)3-9 Targets RRP6 to Heterochromatin and Contributes to Heterochromatin Maintenance in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genetics* 11, e1005523.
- Espinar-Marchena, F.J., Babiano, R., and Cruz, J. Placeholder factors in ribosome biogenesis: please, pave my way. *Microb Cell* 4, 144–168.
- Faber, A.W., Dijk, M.V., Raué, H.A., and Vos, J.C. (2002). Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 8, 1095–1101.
- Falahati, H., Pelham-Webb, B., Blythe, S., and Wieschaus, E. (2016). Nucleation by rRNA Dictates the Precision of Nucleolus Assembly. *Current Biology* 26, 277–285.
- Falk, S., Weir, J.R., Hentschel, J., Reichelt, P., Bonneau, F., and Conti, E. (2014). The Molecular Architecture of the TRAMP Complex Reveals the Organization and Interplay of Its Two Catalytic Activities. *Molecular Cell* 55, 856–867.
- Falk, S., Bonneau, F., Ebert, J., Kögel, A., and Conti, E. (2017a). Mpp6 Incorporation in the Nuclear Exosome Contributes to RNA Channeling through the Mtr4 Helicase. *Cell Reports* 20, 2279–2286.
- Falk, S., Tants, J.-N., Basquin, J., Thoms, M., Hurt, E., Sattler, M., and Conti, E. (2017b). Structural insights into the interaction of the nuclear exosome helicase Mtr4 with the preribosomal protein Nop53. *RNA* 23, 1780–1787.
- Fang, F., Phillips, S., and Butler, J.S. (2005). Rat1p and Rai1p function with the nuclear exosome in the processing and degradation of rRNA precursors. *RNA* 11, 1571–1578.
- Fasken, M.B., Larabee, R.N., and Corbett, A.H. (2015). Nab3 Facilitates the Function of the TRAMP Complex in RNA Processing via Recruitment of Rrp6 Independent of Nrd1. *PLOS Genetics* 11, e1005044.
- Fasken, M.B., Losh, J.S., Leung, S.W., Brutus, S., Avin, B., Vaught, J.C., Potter-Birriel, J., Craig, T., Conn, G.L., Mills-Lujan, K., et al. (2017). Insight into the RNA Exosome Complex Through Modeling Pontocerebellar Hypoplasia Type 1b Disease Mutations in Yeast. *Genetics* 205, 221–237.
- Fasken, M.B., Morton, D.J., Kuiper, E.G., Jones, S.K., Leung, S.W., and Corbett, A.H. (2020). The RNA Exosome and Human Disease. *Methods Mol Biol* 2062, 3–33.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervy, D. (2003). Nob1p Is Required for Cleavage of the 3' End of 18S rRNA. *Molecular and Cellular Biology* 23, 1798–1807.
- Faza, M.B., Chang, Y., Occhipinti, L., Kemmler, S., and Panse, V.G. (2012). Role of Mex67-Mtr2 in the Nuclear Export of 40S Pre-Ribosomes. *PLOS Genetics* 8, e1002915.
- Feigenbutz, M., Jones, R., Besong, T.M.D., Harding, S.E., and Mitchell, P. (2013a). Assembly of the Yeast Exoribonuclease Rrp6 with Its Associated Cofactor Rrp47 Occurs in the Nucleus and Is Critical for the Controlled Expression of Rrp47 *. *Journal of Biological Chemistry* 288, 15959–15970.
- Feigenbutz, M., Garland, W., Turner, M., and Mitchell, P. (2013b). The Exosome Cofactor Rrp47 Is Critical for the Stability and Normal Expression of Its Associated Exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8, e80752.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., and Brangwynne, C.P. (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* 165, 1686–1697.

- Fernández-Pevida, A., Kressler, D., and Cruz, J. de la (2015). Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *WIREs RNA* 6, 191–209.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the In Vivo Assembly Pathway of Eukaryotic 40S Ribosomal Proteins. *Molecular Cell* 28, 446–457.
- Ferreira-Cerca, S., Sagar, V., Schäfer, T., Diop, M., Wesseling, A.-M., Lu, H., Chai, E., Hurt, E., and LaRonde-LeBlanc, N. (2012). ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S subunit. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1316–1323.
- Finkbeiner, E., Haindl, M., and Muller, S. (2011). The SUMO system controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex. *EMBO J* 30, 1067–1078.
- Fischer, U., Schäuble, N., Schütz, S., Altvater, M., Chang, Y., Boulos Faza, M., and Panse, V.G. (2015). A non-canonical mechanism for Crm1-export cargo complex assembly. *ELife* 4, e05745.
- Fox, M.J., Gao, H., Smith-Kinnaman, W.R., Liu, Y., and Mosley, A.L. (2015). The Exosome Component Rrp6 Is Required for RNA Polymerase II Termination at Specific Targets of the Nrd1-Nab3 Pathway. *PLOS Genetics* 11, e1004999.
- Fraga de Andrade, I., Mehta, C., and Bresnick, E.H. (2020). Post-transcriptional control of cellular differentiation by the RNA exosome complex. *Nucleic Acids Research* 48, 11913–11928.
- Fromm, L., Falk, S., Flemming, D., Schuller, J.M., Thoms, M., Conti, E., and Hurt, E. (2017). Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome. *Nat Commun* 8, 1787.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervy, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits Depends on Xpo1p and Requires a Nuclear Export Sequence-Containing Factor, Nmd3p, That Associates with the Large Subunit Protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21, 3405–3415.
- Gamalinda, M., Ohmayer, U., Jakovljevic, J., Kumcuoglu, B., Woolford, J., Mbom, B., Lin, L., and Woolford, J.L. (2014). A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes Dev* 28, 198–210.
- Gartmann, M., Blau, M., Armache, J.-P., Mielke, T., Topf, M., and Beckmann, R. (2010). Mechanism of eIF6-mediated Inhibition of Ribosomal Subunit Joining*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 14848–14851.
- Gasse, L., Flemming, D., and Hurt, E. (2015). Coordinated Ribosomal ITS2 RNA Processing by the Las1 Complex Integrating Endonuclease, Polynucleotide Kinase, and Exonuclease Activities. *Molecular Cell* 60, 808–815.
- Geng, Q., Xhabija, B., Knuckle, C., Bonham, C.A., and Vaccratsis, P.O. (2017). The Atypical Dual Specificity Phosphatase hYVH1 Associates with Multiple Ribonucleoprotein Particles. *J Biol Chem* 292, 539–550.
- Gerlach, P., Schuller, J.M., Bonneau, F., Basquin, J., Reichelt, P., Falk, S., and Conti, E. (2018). Distinct and evolutionary conserved structural features of the human nuclear exosome complex. *ELife* 7, e38686.
- Ghalei, H., Trepreau, J., Collins, J.C., Bhaskaran, H., Strunk, B.S., and Karbstein, K. (2017). The ATPase Fap7 Tests the Ability to Carry Out Translocation-like Conformational Changes and Releases Dim1 during 40S Ribosome Maturation. *Molecular Cell* 67, 990-1000.e3.
- Ghulam, M.M., Catala, M., and Abou Elela, S. (2020). Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress. *Nucleic Acids Research* 48, 1954–1968.
- Gillespie, A., Gabunilas, J., Jen, J.C., and Chanfreau, G.F. (2017). Mutations of EXOSC3/Rrp40p associated with neurological diseases impact ribosomal RNA processing functions of the exosome in *S. cerevisiae*. *RNA* 23, 466–472.
- Gnad, F., de Godoy, L.M.F., Cox, J., Neuhauser, N., Ren, S., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). High-accuracy identification and bioinformatic analysis of in vivo protein phosphorylation sites in yeast. *PROTEOMICS* 9, 4642–4652.
- Goldfeder, M.B., and Oliveira, C.C. (2010). Utp25p, a nucleolar *Saccharomyces cerevisiae* protein, interacts with U3 snoRNP subunits and affects processing of the 35S pre-rRNA. *The FEBS Journal* 277, 2838–2852.
- Gonzales, F.A., Zanchin, N.I.T., Luz, J.S., and Oliveira, C.C. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a Novel Nop58p-Interacting Protein that is Involved in Pre-rRNA Processing. *Journal of Molecular Biology* 346, 437–455.
- Gonzales-Zubiate, F.A., Okuda, E.K., Da Cunha, J.P.C., and Oliveira, C.C. (2017). Identification of karyopherins involved in the nuclear import of RNA exosome subunit Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 292, 12267–12284.
- Goodman, M., Cai, W., and Smith, N.D. (2003). The bold legacy of Emil Fischer. *Journal of Peptide Science* 9, 594–603.

- Granato, D.C., Gonzales, F.A., Luz, J.S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G.M., and Oliveira, C.C. (2005). Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS Journal* 272, 4450–4463.
- Granato, D.C., Machado-Santelli, G.M., and Oliveira, C.C. (2008). Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *The FEBS Journal* 275, 4164–4178.
- Grandi, P., Rybin, V., Baßler, J., Petfalski, E., Strauß, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., et al. (2002). 90S Pre-Ribosomes Include the 35S Pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S Subunit Processing Factors but Predominantly Lack 60S Synthesis Factors. *Molecular Cell* 10, 105–115.
- Granneman, S., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2011). A cluster of ribosome synthesis factors regulate pre-rRNA folding and 5.8S rRNA maturation by the Rat1 exonuclease. *EMBO J* 30, 4006–4019.
- Greber, B.J. (2016). Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *RNA* 22, 1643–1662.
- Greber, B.J., Boehringer, D., Montellese, C., and Ban, N. (2012). Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 1228–1233.
- Greber, B.J., Gerhardy, S., Leitner, A., Leibundgut, M., Salem, M., Boehringer, D., Leulliot, N., Aebersold, R., Panse, V.G., and Ban, N. (2016). Insertion of the Biogenesis Factor Rei1 Probes the Ribosomal Tunnel during 60S Maturation. *Cell* 164, 91–102.
- Gudipati, R.K., Xu, Z., Lebreton, A., Séraphin, B., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., and Libri, D. (2012). Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild type cells. *Mol Cell* 48, 409–421.
- Guthrie, C., and Fink, G.R. (2004). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Gulf Professional Publishing).
- Hackmann, A., Gross, T., Baierlein, C., and Krebber, H. (2011). The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. *EMBO Rep* 12, 1024–1031.
- Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., and Conti, E. (2013). The Yeast Ski Complex: Crystal Structure and RNA Channeling to the Exosome Complex. *Cell* 154, 814–826.
- Han, J., and van Hoof, A. (2016). The RNA exosome channeling and direct access conformations have distinct in vivo functions. *Cell Rep* 16, 3348–3358.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557–580.
- Harris, J.K., Kelley, S.T., Spiegelman, G.B., and Pace, N.R. (2003). The Genetic Core of the Universal Ancestor. *Genome Res.* 13, 407–412.
- Hashem, Y., des Georges, A., Fu, J., Buss, S.N., Jossinet, F., Jobe, A., Zhang, Q., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Bajaj, C., et al. (2013). High-resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome. *Nature* 494, 385–389.
- Hedges, J., West, M., and Johnson, A.W. (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO Journal* 24, 567–579.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *WIREs RNA* 6, 225–242.
- Heuer, A., Thomson, E., Schmidt, C., Berninghausen, O., Becker, T., Hurt, E., and Beckmann, R. (2017). Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Elife* 6, e30189.
- Hiermeier, T., Merl, J., Sauert, M., Perez-Fernandez, J., Schultz, P., Bruckmann, A., Hamperl, S., Ohmayer, U., Rachel, R., Jacob, A., et al. (2013). Rrp5p, Noc1p and Noc2p form a protein module which is part of early large ribosomal subunit precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 41, 1191–1210.
- Ho, J.H.-N., Kallstrom, G., and Johnson, A.W. (2000). Nmd3p Is a Crm1p-Dependent Adapter Protein for Nuclear Export of the Large Ribosomal Subunit. *Journal of Cell Biology* 151, 1057–1066.
- Holt, L.J., Tuch, B.B., Villén, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., and Morgan, D.O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325, 1682.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000a). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J* 19, 1357–1365.
- van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E., and Parker, R. (2000b). Function of the Ski4p (Csl4p) and Ski7p Proteins in 3'-to-5' Degradation of mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 8230–8243.

- Horn, D.M., Mason, S.L., and Karbstein, K. (2011). Rcl1 Protein, a Novel Nuclease for 18 S Ribosomal RNA Production*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34082–34087.
- Houseley, J., and Tollervey, D. (2006). Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO Rep* 7, 205–211.
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 529–539.
- Houseley, J., Kotovic, K., El Hage, A., and Tollervey, D. (2007). Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control. *EMBO J* 26, 4996–5006.
- Hu, W., Sweet, T.J., Chamnongpol, S., Baker, K.E., and Collier, J. (2009). Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 461, 225–229.
- Huang, H., Ghalei, H., and Karbstein, K. (2020). Quality control of 40S ribosome head assembly ensures scanning competence. *Journal of Cell Biology* 219.
- Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R., and Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev* 23, 1929–1943.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hensdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., et al. (2016). A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1, 1–6.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O’Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Hung, N.-J., Lo, K.-Y., Patel, S.S., Helmke, K., and Johnson, A.W. (2008). Arx1 Is a Nuclear Export Receptor for the 60S Ribosomal Subunit in Yeast. *Mol Biol Cell* 19, 735–744.
- Hunziker, M., Barandun, J., Buzovetsky, O., Steckler, C., Molina, H., and Klinge, S. (2019). Conformational switches control early maturation of the eukaryotic small ribosomal subunit. *ELife* 8, e45185.
- Iakoucheva, L.M., Radivojac, P., Brown, C.J., O’Connor, T.R., Sikes, J.G., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 32, 1037–1049.
- Ishibashi, M., Kogo, R., Shibata, K., Ueo, H., Uchi, R., Matsumura, T., Takano, Y., Sawada, G., Takahashi, Y., Mima, K., et al. (2013). Clinical significance of PICT1 in patients of hepatocellular carcinoma with wild-type TP53. *Ann Surg Oncol* 20 Suppl 3, S537-544.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010a). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113–127.
- Jackson, R.N., Klauer, A.A., Hintze, B.J., Robinson, H., van Hoof, A., and Johnson, S.J. (2010b). The crystal structure of Mtr4 reveals a novel arch domain required for rRNA processing. *EMBO J* 29, 2205–2216.
- Jäkel, S., Mingot, J.-M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., and Görlich, D. (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J* 21, 377–386.
- Januszzyk, K., and Lima, C.D. (2011). Structural components and architectures of RNA exosomes. *Adv Exp Med Biol* 702, 9–28.
- Januszzyk, K., and Lima, C.D. (2014). The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol* 0, 132–140.
- Januszzyk, K., Liu, Q., and Lima, C.D. (2011). Activities of human RRP6 and structure of the human RRP6 catalytic domain. *RNA* 17, 1566–1577.
- Jia, H., Wang, X., Liu, F., Guenther, U.-P., Srinivasan, S., Anderson, J.T., and Jankowsky, E. (2011). The RNA Helicase Mtr4p Modulates Polyadenylation in the TRAMP Complex. *Cell* 145, 890–901.
- Jobe, A., Liu, Z., Gutierrez-Vargas, C., and Frank, J. (2019). New Insights into Ribosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a032615.
- Joret, C., Capeyrou, R., Belhabich-Baumas, K., Plisson-Chastang, C., Ghandour, R., Humbert, O., Fribourg, S., Leulliot, N., Lebaron, S., Henras, A.K., et al. (2018). The Npa1p complex chaperones the assembly of the earliest eukaryotic large ribosomal subunit precursor. *PLOS Genetics* 14, e1007597.
- Jorgensen, P., Rupeš, I., Sharom, J.R., Schnepfer, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* 18, 2491–2505.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.
- Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 18, 1227–1240.

- Kalt, I., Levy, A., Borodianskiy-Shteinberg, T., and Sarid, R. (2012). Nucleolar Localization of GLTSCR2/PICT-1 Is Mediated by Multiple Unique Nucleolar Localization Sequences. *PLOS ONE* 7, e30825.
- Kampen, K.R., Sulima, S.O., Vereecke, S., and De Keersmaecker, K. (2020). Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Research* 48, 1013–1028.
- Kappel, L., Loibl, M., Zisser, G., Klein, I., Fruhmann, G., Gruber, C., Unterweger, S., Rechberger, G., Pertschy, B., and Bergler, H. (2012). Rlp24 activates the AAA-ATPase Drg1 to initiate cytoplasmic pre-60S maturation. *Journal of Cell Biology* 199, 771–782.
- Kargas, V., Castro-Hartmann, P., Escudero-Urquijo, N., Dent, K., Hilcenko, C., Sailer, C., Zisser, G., Marques-Carvalho, M.J., Pellegrino, S., Wawiorka, L., et al. (2019). Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *ELife* 8, e44904.
- Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Cheng, J., Ismail, S., Ahmed, Y.L., Bange, G., Kressler, D., Berninghausen, O., Sinning, I., et al. (2017). Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell* 171, 1599–1610.e14.
- Kater, L., Mitterer, V., Thoms, M., Cheng, J., Berninghausen, O., Beckmann, R., and Hurt, E. (2020). Construction of the Central Protuberance and L1 Stalk during 60S Subunit Biogenesis. *Molecular Cell* 79, 615–628.e5.
- Kawabe, Y., Mori, K., Yamashita, T., Gotoh, S., and Ikeda, M. (2020). The RNA exosome complex degrades expanded hexanucleotide repeat RNA in C9orf72 FTL/ALS. *EMBO J* 39, e102700.
- Kemmler, S., Occhipinti, L., Veisu, M., and Panse, V.G. (2009). Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *J Cell Biol* 186, 863–880.
- Khoshnevis, S., Liu, X., Dattolo, M.D., and Karbstein, K. (2019). Rrp5 establishes a checkpoint for 60S assembly during 40S maturation. *RNA* 25, 1164–1176.
- Kilchert, C. (2020). RNA Exosomes and Their Cofactors. *Methods Mol Biol* 2062, 215–235.
- Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 227–239.
- Kim, J.-Y., Park, J.-H., and Lee, S. (2012). GLTSCR2 contributes to the death resistance and invasiveness of hypoxia-selected cancer cells. *FEBS Letters* 586, 3435–3440.
- Kim, K., Heo, D., Kim, I., Suh, J.-Y., and Kim, M. (2016). Exosome Cofactors Connect Transcription Termination to RNA Processing by Guiding Terminated Transcripts to the Appropriate Exonuclease within the Nuclear Exosome *. *Journal of Biological Chemistry* 291, 13229–13242.
- Kim, Y.-J., Cho, Y.-E., Kim, Y.-W., Kim, J.-Y., Lee, S., and Park, J.-H. (2008). Suppression of putative tumour suppressor gene GLTSCR2 expression in human glioblastomas. *The Journal of Pathology* 216, 218–224.
- Kiss, D.L., and Andrulevics, E.D. (2010). Genome-wide analysis reveals distinct substrate specificities of Rrp6, Dis3, and core exosome subunits. *RNA* 16, 781–791.
- Klingauf-Nerurkar, P., Gillet, L.C., Portugal-Calisto, D., Oborská-Oplová, M., Jäger, M., Schubert, O.T., Pisano, A., Peña, C., Rao, S., Altvater, M., et al. (2020). The GTPase Nog1 co-ordinates the assembly, maturation and quality control of distant ribosomal functional centers. *ELife* 9, e52474.
- Klinge, S., and Woolford, J.L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 116–131.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6. *Science* 334, 941–948.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., and Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 189–198.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131, 557–571.
- Konikkat, S., and Woolford, John L., Jr (2017). Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochemical Journal* 474, 195–214.
- Konikkat, S., Biedka, S., and Woolford, J.L., Jr (2017). The assembly factor Erb1 functions in multiple remodeling events during 60S ribosomal subunit assembly in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 45, 4853–4865.
- Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koš-Braun, I., Koš, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2016). Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* 166, 380–393.

- Koš, M., and Tollervey, D. (2010). Yeast Pre-rRNA Processing and Modification Occur Cotranscriptionally. *Molecular Cell* 37, 809–820.
- Kos-Braun, I.C., Jung, I., and Koš, M. (2017). Tor1 and CK2 kinases control a switch between alternative ribosome biogenesis pathways in a growth-dependent manner. *PLOS Biology* 15, e2000245.
- Kowalinski, E., Kögel, A., Ebert, J., Reichelt, P., Stegmann, E., Habermann, B., and Conti, E. (2016). Structure of a Cytoplasmic 11-Subunit RNA Exosome Complex. *Molecular Cell* 63, 125–134.
- Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B., and Hurt, E. (2008). The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *Journal of Cell Biology* 181, 935–944.
- Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 640–654.
- Kummer, E., and Ban, N. (2018). Conformational Switching of the Nuclear Exosome during Ribosome Biogenesis. *Biochemistry* 57, 4765–4766.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex. *Cell* 121, 713–724.
- Lafontaine, D.L.J., and Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 514–520.
- Lafontaine, D.L.J., Riback, J.A., Bascetin, R., and Brangwynne, C.P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 165–182.
- Lanz, M.C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E.J., Faça, V.M., Vega, S., Joiner, A.M.N., Fromme, J.C., Yu, H., and Smolka, M.B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Rep* 22, e51121.
- Lapeyre, B., and Purushothaman, S.K. (2004). Spb1p-Directed Formation of Gm2922 in the Ribosome Catalytic Center Occurs at a Late Processing Stage. *Molecular Cell* 16, 663–669.
- Larburu, N., Montellese, C., O'Donohue, M.-F., Kutay, U., Gleizes, P.-E., and Plisson-Chastang, C. (2016). Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 44, 8465–8478.
- Lardenois, A., Liu, Y., Walther, T., Chalmel, F., Evrard, B., Granovskaia, M., Chu, A., Davis, R.W., Steinmetz, L.M., and Primig, M. (2011). Execution of the meiotic noncoding RNA expression program and the onset of gametogenesis in yeast require the conserved exosome subunit Rrp6. *PNAS* 108, 1058–1063.
- Lau, B., Cheng, J., Flemming, D., La Venuta, G., Berninghausen, O., Beckmann, R., and Hurt, E. (2021). Structure of the Maturing 90S Pre-ribosome in Association with the RNA Exosome. *Molecular Cell* 81, 293-303.e4.
- Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., and Tollervey, D. (2012). Proof reading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol* 19, 744–753.
- Lebaron, S., Segerstolpe, Å., French, S.L., Dudnakova, T., de lima Alves, F., Granneman, S., Rappsilber, J., Beyer, A.L., Wieslander, L., and Tollervey, D. (2013). Rrp5 Binding at Multiple Sites Coordinates Pre-rRNA Processing and Assembly. *Mol Cell* 52, 707–719.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2008a). Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456, 993–996.
- Lebreton, A., Rousselle, J.-C., Lenormand, P., Namane, A., Jacquier, A., Fromont-Racine, M., and Saveanu, C. (2008b). 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Research* 36, 4988–4999.
- Lee, Y., and Nazar, R.N. (1997). Ribosomal 5 S rRNA Maturation in *Saccharomyces cerevisiae* *. *Journal of Biological Chemistry* 272, 15206–15212.
- Leidig, C., Thoms, M., Holdermann, I., Bradatsch, B., Berninghausen, O., Bange, G., Sinning, I., Hurt, E., and Beckmann, R. (2014). 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nature Communications* 5, 3491.
- Li, C.-C., Dong, H.-J., Wang, P., Meng, W., Chi, X.-J., Han, S.-C., Ning, S., Wang, C., and Wang, X.-J. (2017). Cellular protein GLTSCR2: A valuable target for the development of broad-spectrum antivirals. *Antiviral Res* 142, 1–11.
- Liang, X., Zuo, M.-Q., Zhang, Y., Li, N., Ma, C., Dong, M.-Q., and Gao, N. (2020). Structural snapshots of human pre-60S ribosomal particles before and after nuclear export. *Nat Commun* 11, 3542.

- Lingaraju, M., Schuller, J.M., Falk, S., Gerlach, P., Bonneau, F., Basquin, J., Benda, C., and Conti, E. (2019). To Process or to Decay: A Mechanistic View of the Nuclear RNA Exosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 84, 155–163.
- Linnemann, J., Pöll, G., Jakob, S., Ferreira-Cerca, S., Griesenbeck, J., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2019). Impact of two neighbouring ribosomal protein clusters on biogenesis factor binding and assembly of yeast late small ribosomal subunit precursors. *PLoS One* 14.
- Liu, Y., and Chang, A. (2009). A Mutant Plasma Membrane Protein Is Stabilized Upon Loss of Yvh1, a Novel Ribosome Assembly Factor. *Genetics* 181, 907–915.
- Liu, J.-J., Bratkowski, M.A., Liu, X., Niu, C.-Y., Ke, A., and Wang, H.-W. (2014). Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by EM. *Nat Struct Mol Biol* 21, 95–102.
- Liu, J.-J., Niu, C.-Y., Wu, Y., Tan, D., Wang, Y., Ye, M.-D., Liu, Y., Zhao, W., Zhou, K., Liu, Q.-S., et al. (2016). CryoEM structure of yeast cytoplasmic exosome complex. *Cell Res* 26, 822–837.
- Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. *Cell* 127, 1223–1237.
- Lo, K.-Y., Li, Z., Wang, F., Marcotte, E.M., and Johnson, A.W. (2009). Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *Journal of Cell Biology* 186, 849–862.
- Lo, K.-Y., Li, Z., Bussiere, C., Bresson, S., Marcotte, E.M., and Johnson, A.W. (2010). Defining the Pathway of Cytoplasmic Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *Molecular Cell* 39, 196–208.
- Loewith, R., and Hall, M.N. (2011). Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *Genetics* 189, 1177–1201.
- Lohr, D., Venkov, P., and Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *The FASEB Journal* 9, 777–787.
- Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Conti, E. (2008). Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Molecular Cell* 29, 717–728.
- Lubas, M., Christensen, M.S., Kristiansen, M.S., Domanski, M., Falkenby, L.G., Lykke-Andersen, S., Andersen, J.S., Dziembowski, A., and Jensen, T.H. (2011). Interaction Profiling Identifies the Human Nuclear Exosome Targeting Complex. *Molecular Cell* 43, 624–637.
- Lubas, M., Damgaard, C.K., Tomecki, R., Cysewski, D., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *EMBO J* 32, 1855–1868.
- Ma, C., Wu, S., Li, N., Chen, Y., Yan, K., Li, Z., Zheng, L., Lei, J., Woolford, J.L., and Gao, N. (2017). Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 214–220.
- Makino, D.L., Baumgärtner, M., and Conti, E. (2013). Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* 495, 70–75.
- Makino, D.L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015). RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* 524, 54–58.
- Malyutin, A.G., Musalgaonkar, S., Patchett, S., Frank, J., and Johnson, A.W. (2017). Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis. *The EMBO Journal* 36, 854–868.
- Marin-Vicente, C., Domingo-Prim, J., Eberle, A.B., and Visa, N. (2015). RRP6/EXOSC10 is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Journal of Cell Science* 128, 1097–1107.
- Martin, R., Hackert, P., Ruprecht, M., Simm, S., Brüning, L., Mirus, O., Sloan, K.E., Kudla, G., Schleiff, E., and Bohnsack, M.T. (2014). A pre-ribosomal RNA interaction network involving snoRNAs and the Rok1 helicase. *RNA* 20, 1173–1182.
- Martín-Villanueva, S., Gutiérrez, G., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2021). Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins and Domains in Ribosome Production and Function: Chance or Necessity? *International Journal of Molecular Sciences* 22, 4359.
- Matsuo, Y., Granneman, S., Thoms, M., Manikas, R.-G., Tollervey, D., and Hurt, E. (2014). Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* 505, 112–116.
- McCann, K.L., Charette, J.M., Vincent, N.G., and Baserga, S.J. (2015). A protein interaction map of the LSU processome. *Genes Dev* 29, 862–875.

- Mehta, C., Fraga de Andrade, I., Matson, D.R., Dewey, C.N., and Bresnick, E.H. (2021). RNA-regulatory exosome complex confers cellular survival to promote erythropoiesis. *Nucleic Acids Research*.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 560–567.
- Melnikov, S., Kwok, H.-S., Manakongtreecheep, K., van den Elzen, A., Thoreen, C.C., and Söll, D. (2020). Archaeal Ribosomal Proteins Possess Nuclear Localization Signal-Type Motifs: Implications for the Origin of the Cell Nucleus. *Mol Biol Evol* 37, 124–133.
- Meola, N., Domanski, M., Karadoulama, E., Chen, Y., Gentil, C., Pultz, D., Vitting-Seerup, K., Lykke-Andersen, S., Andersen, J.S., Sandelin, A., et al. (2016). Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Molecular Cell* 64, 520–533.
- Merwin, J.R., Bogar, L.B., Poggi, S.B., Fitch, R.M., Johnson, A.W., and Lycan, D.E. (2014). Genetic Analysis of the Ribosome Biogenesis Factor *Ltv1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 198, 1071–1085.
- Meyer, A.E., Hoover, L.A., and Craig, E.A. (2010). The Cytosolic J-protein, *Jjj1*, and *Rei1* Function in the Removal of the Pre-60 S Subunit Factor *Arx1*. *J Biol Chem* 285, 961–968.
- Micic, J., Li, Y., Wu, S., Wilson, D., Tutuncuoglu, B., Gao, N., and Woolford, J.L. (2020). Coupling of 5S RNP rotation with maturation of functional centers during large ribosomal subunit assembly. *Nature Communications* 11, 3751.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., and Ponce, M.R. (2020). SMALL ORGAN4 Is a Ribosome Biogenesis Factor Involved in 5.8S Ribosomal RNA Maturation1[OPEN]. *Plant Physiol* 184, 2022–2039.
- Miles, T.D., Jakovljevic, J., Horsey, E.W., Harnpicharnchai, P., Tang, L., and Woolford, J.L. (2005). *Ytm1*, *Nop7*, and *Erb1* Form a Complex Necessary for Maturation of Yeast 66S Preribosomes. *Mol Cell Biol* 25, 10419–10432.
- Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of Nucleolar Genes. *Science* 164, 955–957.
- Milligan, L., Decourty, L., Saveanu, C., Rappsilber, J., Ceulemans, H., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2008). A Yeast Exosome Cofactor, *Mpp6*, Functions in RNA Surveillance and in the Degradation of Noncoding RNA Transcripts. *Molecular and Cellular Biology* 28, 5446–5457.
- Mischo, H.E., Gómez-González, B., Grzechnik, P., Rondón, A.G., Wei, W., Steinmetz, L., Aguilera, A., and Proudfoot, N.J. (2011). Yeast *Sen1* Helicase Protects the Genome from Transcription-Associated Instability. *Mol Cell* 41, 21–32.
- Mitchell, P. (2010). *Rrp47* and the function of the *Sas10/C1D* domain. *Biochemical Society Transactions* 38, 1088–1092.
- Mitchell, P. (2014). Exosome substrate targeting: the long and short of it. *Biochemical Society Transactions* 42, 1129–1134.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2010). Finding the exosome. *Adv Exp Med Biol* 702, 1–8.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases. *Cell* 91, 457–466.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). *Rrp47p* Is an Exosome-Associated Protein Required for the 3' Processing of Stable RNAs. *Mol Cell Biol* 23, 6982–6992.
- Moon, A., Lim, S.-J., Jo, Y.-H., Lee, S., Kim, J.-Y., Lee, J., and Park, J.-H. (2013). Downregulation of *GLTSCR2* expression is correlated with breast cancer progression. *Pathology - Research and Practice* 209, 700–704.
- Morton, D.J., Kuiper, E.G., Jones, S.K., Leung, S.W., Corbett, A.H., and Fasken, M.B. (2018). The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *RNA* 24, 127–142.
- Mougey, E.B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O.L., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev.* 7, 1609–1619.
- Muhrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast *MFA2* gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev* 8, 855–866.
- Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205.
- Neil, H., Malabat, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., and Jacquier, A. (2009). Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* 457, 1038–1042.

- Nerurkar, P., Altvater, M., Gerhardy, S., Schütz, S., Fischer, U., Weirich, C., and Panse, V.G. (2015). Chapter Three - Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 107–140.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science* 289, 920–930.
- Noller, H.F., Hoffarth, V., and Zimniak, L. (1992). Unusual Resistance of Peptidyl Transferase to Protein Extraction Procedures. *Science* 256, 1416–1419.
- Novačić, A., Beauvais, V., Oskomić, M., Štrbac, L., Dantec, A.L., Rahmouni, A.R., and Stuparević, I. (2021). Yeast RNA exosome activity is necessary for maintaining cell wall stability through proper protein glycosylation. *MBoC* 32, 363–375.
- Occhipinti, L., Chang, Y., Altvater, M., Menet, A.M., Kemmler, S., and Panse, V.G. (2013). Non-FG mediated transport of the large pre-ribosomal subunit through the nuclear pore complex by the mRNA export factor Gle2. *Nucleic Acids Res* 41, 8266–8279.
- Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev.* 18, 196–209.
- Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linnemann, J., Hierlmeier, T., Perez-Fernandez, J., Kumcuoglu, B., Leger-Silvestre, I., et al. (2013). Studies on the Assembly Characteristics of Large Subunit Ribosomal Proteins in *S. cerevisiae*. *PLOS ONE* 8, e68412.
- Okahara, F., Ikawa, H., Kanaho, Y., and Maehama, T. (2004). Regulation of PTEN Phosphorylation and Stability by a Tumor Suppressor Candidate Protein*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45300–45303.
- Okahara, F., Itoh, K., Nakagawara, A., Murakami, M., Kanaho, Y., and Maehama, T. (2006). Critical Role of PICT-1, a Tumor Suppressor Candidate, in Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Signals and Tumorigenic Transformation. *Mol Biol Cell* 17, 4888–4895.
- Okamura, K., Takayama, K., Kawahara, K., Harada, T., Nishio, M., Otsubo, K., Ijichi, K., Kohno, M., Iwama, E., Fujii, A., et al. (2014). PICT1 expression is a poor prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncoscience* 1, 375–382.
- Okuda, E.K., Gonzales-Zubiate, F.A., Gadal, O., and Oliveira, C.C. (2020). Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function. *Journal of Biological Chemistry* 295, 11195–11213.
- Oliveira, C.C., Gonzales, F.A., and Zanchin, N.I.T. (2002). Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit Rrp43p show a deficiency in mRNA degradation and no longer interact with the exosome. *Nucleic Acids Res* 30, 4186–4198.
- Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J., and Beyer, A.L. (2004). Pre-18S Ribosomal RNA Is Structurally Compacted into the SSU Processome Prior to Being Cleaved from Nascent Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 16, 943–954.
- Palade, G.E. (1955). A SMALL PARTICULATE COMPONENT OF THE CYTOPLASM. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 59–68.
- Panse, V.G., Kressler, D., Pauli, A., Petfalski, E., Gnädig, M., Tollervey, D., and Hurt, E. (2006). Formation and Nuclear Export of Preribosomes Are Functionally Linked to the Small-Ubiquitin-Related Modifier Pathway. *Traffic* 7, 1311–1321.
- Parenteau, J., Lavoie, M., Catala, M., Malik-Ghulam, M., Gagnon, J., and Abou Elela, S. (2015). Preservation of Gene Duplication Increases the Regulatory Spectrum of Ribosomal Protein Genes and Enhances Growth under Stress. *Cell Reports* 13, 2516–2526.
- Parker, R. (2012). RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 671–702.
- Pefanis, E., Wang, J., Rothschild, G., Lim, J., Kazadi, D., Sun, J., Federation, A., Chao, J., Elliott, O., Liu, Z.-P., et al. (2015). RNA Exosome-Regulated Long Non-Coding RNA Transcription Controls Super-Enhancer Activity. *Cell* 161, 774–789.
- Pelechano, V., Wei, W., and Steinmetz, L.M. (2015). Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics. *Cell* 161, 1400–1412.
- Pelletier, J., Thomas, G., and Volarević, S. (2018). Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* 18, 51–63.
- Peña, C., Hurt, E., and Panse, V.G. (2017). Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat Struct Mol Biol* 24, 689–699.

- Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Tengg, M., Jacquier, A., Liebming, E., Nobis, B., Kappel, L., Klei, I. van der, et al. (2007). Cytoplasmic Recycling of 60S Preribosomal Factors Depends on the AAA Protein Drg1. *Molecular and Cellular Biology* 27, 6581–6592.
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA Helicase Prp43 and Its Co-factor Pfa1 Promote 20 to 18 S rRNA Processing Catalyzed by the Endonuclease Nob1. *J Biol Chem* 284, 35079–35091.
- Pestov, D.G., Stockelman, M.G., Strezoska, Z., and Lau, L.F. (2001). ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 29, 3621–3630.
- Petibon, C., Ghulam, M.M., Catala, M., and Elela, S.A. (2021). Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy. *WIREs RNA* 12, e1632.
- Petrov, A.S., Gulen, B., Norris, A.M., Kovacs, N.A., Bernier, C.R., Lanier, K.A., Fox, G.E., Harvey, S.C., Wartell, R.M., Hud, N.V., et al. (2015). History of the ribosome and the origin of translation. *PNAS* 112, 15396–15401.
- Phipps, K.R., Charette, J.M., and Baserga, S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *WIREs RNA* 2, 1–21.
- Pillet, B., Mitterer, V., Kressler, D., and Pertschy, B. (2017). Hold on to your friends: Dedicated chaperones of ribosomal proteins. *BioEssays* 39, e201600153.
- Pillon, M.C., Sobhany, M., Borgnia, M.J., Williams, J.G., and Stanley, R.E. (2017). Grc3 programs the essential endoribonuclease Las1 for specific RNA cleavage. *PNAS* 114, E5530–E5538.
- Pillon, M.C., Sobhany, M., and Stanley, R.E. (2018). Characterization of the molecular crosstalk within the essential Grc3/Las1 pre-rRNA processing complex. *RNA* 24, 721–738.
- Pillon, M.C., Lo, Y.-H., and Stanley, R.E. (2019a). IT'S 2 for the price of 1: Multifaceted ITS2 processing machines in RNA and DNA maintenance. *DNA Repair* 81, 102653.
- Pillon, M.C., Hsu, A.L., Krahn, J.M., Williams, J.G., Goslen, K.H., Sobhany, M., Borgnia, M.J., and Stanley, R.E. (2019b). Cryo-EM reveals active site coordination within a multienzyme pre-rRNA processing complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 26, 830–839.
- Porrua, O., and Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 190–202.
- Prattes, M., Lo, Y.-H., Bergler, H., and Stanley, R.E. (2019). Shaping the Nascent Ribosome: AAA-ATPases in Eukaryotic Ribosome Biogenesis. *Biomolecules* 9, 715.
- Preker, P., Nielsen, J., Kammler, S., Lykke-Andersen, S., Christensen, M.S., Mapendano, C.K., Schierup, M.H., and Jensen, T.H. (2008). RNA Exosome Depletion Reveals Transcription Upstream of Active Human Promoters. *Science* 322, 1851–1854.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001). The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24, 218–229.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science* 331, 730–736.
- Rai, J., Parker, M.D., Huang, H., Choy, S., Ghalei, H., Johnson, M.C., Karbstein, K., and Stroupe, M.E. (2021). An open interface in the pre-80S ribosome coordinated by ribosome assembly factors Tsr1 and Dim1 enables temporal regulation of Fap7. *RNA* 27, 221–233.
- Ramesh, M., and Woolford, J.L. (2016). Eukaryote-specific rRNA expansion segments function in ribosome biogenesis. *RNA* 22, 1153–1162.
- Ramos-Sáenz, A., González-Álvarez, D., Rodríguez-Galán, O., Rodríguez-Gil, A., Gaspar, S.G., Villalobo, E., Dosil, M., and de la Cruz, J. (2019). Pol5 is an essential ribosome biogenesis factor required for 60S ribosomal subunit maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 25, 1561–1575.
- Rheinberger, H.-J. (2004). A History of Protein Biosynthesis and Ribosome Research. In *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–51.
- Richard, P., Feng, S., and Manley, J.L. (2013). A SUMO-dependent interaction between Senataxin and the exosome, disrupted in the neurodegenerative disease AOA2, targets the exosome to sites of transcription-induced DNA damage. *Genes Dev* 27, 2227–2232.

- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* 17, 1030–1032.
- Rodríguez-Galán, O., García-Gómez, J.J., and de la Cruz, J. (2013). Yeast and human RNA helicases involved in ribosome biogenesis: Current status and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 775–790.
- Rodríguez-Galán, O., García-Gómez, J.J., Kressler, D., and Cruz, J. de la (2015). Immature large ribosomal subunits containing the 7S pre-rRNA can engage in translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biology* 12, 838–846.
- Rodríguez-Mateos, M., Abia, D., García-Gómez, J.J., Morreale, A., de la Cruz, J., Santos, C., Remacha, M., and Ballesta, J.P.G. (2009a). The amino terminal domain from Mrt4 protein can functionally replace the RNA binding domain of the ribosomal P0 protein. *Nucleic Acids Research* 37, 3514–3521.
- Rodríguez-Mateos, M., García-Gómez, J.J., Francisco-Velilla, R., Remacha, M., de la Cruz, J., and Ballesta, J.P.G. (2009b). Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 37, 7519–7532.
- Rössler, I., Embacher, J., Pillet, B., Murat, G., Liesinger, L., Hafner, J., Unterluggauer, J.J., Birner-Gruenberger, R., Kressler, D., and Pertschy, B. (2019). Tsr4 and Nap1, two novel members of the ribosomal protein chaperOME. *Nucleic Acids Research* 47, 6984–7002.
- Ruland, J.A., Krüger, A.M., Dörner, K., Bhatia, R., Wirths, S., Pöetes, D., Kutay, U., Siebrasse, J.P., and Kubitscheck, U. (2021). Nuclear export of the pre-60S ribosomal subunit through single nuclear pores observed in real time. *BioRxiv* 2021.03.30.437662.
- Sahasranaman, A., Dembowski, J., Strahler, J., Andrews, P., Maddock, J., and Woolford Jr, J.L. (2011). Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *The EMBO Journal* 30, 4020–4032.
- Sailer, C., Jansen, J., Erzberger, J.P., and Stengel, F. (2021). A comprehensive landscape of 60S ribosome biogenesis factors. *BioRxiv* 2021.05.11.443624.
- Sakumoto, N., Yamashita, H., Mukai, Y., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2001). Dual-Specificity Protein Phosphatase Yvh1p, Which Is Required for Vegetative Growth and Sporulation, Interacts with Yeast Pescadillo Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 608–615.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (CSHL Press).
- Sanghai, Z.A., Miller, L., Molloy, K.R., Barandun, J., Hunziker, M., Chaker-Margot, M., Wang, J., Chait, B.T., and Klinge, S. (2018). Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature* 556, 126–129.
- Sardana, R., Liu, X., Granneman, S., Zhu, J., Gill, M., Papoulas, O., Marcotte, E.M., Tollervey, D., Correll, C.C., and Johnson, A.W. (2015). The DEAH-box Helicase Dhr1 Dissociates U3 from the Pre-rRNA to Promote Formation of the Central Pseudoknot. *PLOS Biology* 13, e1002083.
- Sarkar, A., Pech, M., Thoms, M., Beckmann, R., and Hurt, E. (2016). Ribosome-stalk biogenesis is coupled with recruitment of nuclear-export factor to the nascent 60S subunit. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 1074–1082.
- Sarkar, A., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Thomson, E., Flemming, D., Beckmann, R., and Hurt, E. (2017). Preribosomes escaping from the nucleus are caught during translation by cytoplasmic quality control. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 1107–1115.
- Sasaki, M., Kawahara, K., Nishio, M., Mimori, K., Kogo, R., Hamada, K., Itoh, B., Wang, J., Komatsu, Y., Yang, Y.R., et al. (2011). Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med* 17, 944–951.
- Saveanu, C., Biennu, D., Namane, A., Gleizes, P.-E., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *The EMBO Journal* 20, 6475–6484.
- Scaiola, A., Peña, C., Weisser, M., Böhringer, D., Leibundgut, M., Klingauf-Nerurkar, P., Gerhardy, S., Panse, V.G., and Ban, N. (2018). Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit. *EMBO J* 37, e98499.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., and van Hoof, A. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* 16, 56–62.
- Schaeffer, D., Clark, A., Klauer, A.A., Tsanova, B., and van Hoof, A. (2011). Functions of the cytoplasmic exosome. *Adv Exp Med Biol* 702, 79–90.

- Schäfer, T., Strauß, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J* 22, 1370–1380.
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* 441, 651–655.
- Schilders, G., van Dijk, E., and Pruijn, G.J.M. (2007). C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/Scf-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 35, 2564–2572.
- Schillewaert, S., Wacheul, L., Lhomme, F., and Lafontaine, D.L.J. (2012). The Evolutionarily Conserved Protein LAS1 Is Required for Pre-rRNA Processing at Both Ends of ITS2. *Molecular and Cellular Biology* 32, 430–444.
- Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., et al. (2000). Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell* 102, 615–623.
- Schmid, M., and Jensen, T.H. (2019). The Nuclear RNA Exosome and Its Cofactors. *Adv Exp Med Biol* 1203, 113–132.
- Schmidt, K., and Butler, J.S. (2013). Nuclear RNA Surveillance: Role of TRAMP in Controlling Exosome Specificity. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 217–231.
- Schmidt, C., Kowalinski, E., Shanmuganathan, V., Defenouillère, Q., Braunger, K., Heuer, A., Pech, M., Namane, A., Berninghausen, O., Fromont-Racine, M., et al. (2016). The cryo-EM structure of a ribosome–Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex. *Science* 354, 1431–1433.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res* 37, 1127–1140.
- Schneider, C., Kudla, G., Wlotzka, W., Tuck, A., and Tollervey, D. (2012). Transcriptome-wide Analysis of Exosome Targets. *Mol Cell* 48, 422–433.
- Schoenberg, D.R., and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13, 246–259.
- Schuch, B., Feigenbutz, M., Makino, D.L., Falk, S., Basquin, C., Mitchell, P., and Conti, E. (2014). The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *The EMBO Journal* 33, 2829–2846.
- Schuller, J.M., Falk, S., Fromm, L., Hurt, E., and Conti, E. (2018). Structure of the nuclear exosome captured on a maturing preribosome. *Science* 360, 219–222.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., and Cate, J.H.D. (2005). Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science* 310, 827–834.
- Sharma, S., and Lafontaine, D.L.J. (2015). ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends in Biochemical Sciences* 40, 560–575.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B. (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Shi, Y., Pellarin, R., Fridy, P.C., Fernandez-Martinez, J., Thompson, M.K., Li, Y., Wang, Q.J., Sali, A., Rout, M.P., and Chait, B.T. (2015). A strategy for dissecting the architectures of native macromolecular assemblies. *Nat Methods* 12, 1135–1138.
- Shirai, C., and Mizuta, K. (2008). SUMO mediates interaction of Ebp2p, the yeast homolog of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-binding protein 2, with a RING finger protein Ris1p. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1881–1886.
- Simms, C.L., Thomas, E.N., and Zaher, H.S. (2017). Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *WIREs RNA* 8, e1366.
- Slavotinek, A., Misceo, D., Htun, S., Mathisen, L., Frengen, E., Foreman, M., Hurtig, J.E., Enyenihi, L., Sterrett, M.C., Leung, S.W., et al. (2020). Biallelic variants in the RNA exosome gene EXOSC5 are associated with developmental delays, short stature, cerebellar hypoplasia and motor weakness. *Hum Mol Genet* 29, 2218–2239.
- Sloan, K.E., Bohnsack, M.T., and Watkins, N.J. (2013). The 5S RNP Couples p53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress. *Cell Reports* 5, 237–247.
- Sloan, K.E., Warda, A.S., Sharma, S., Entian, K.-D., Lafontaine, D.L.J., and Bohnsack, M.T. (2016). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol* 14, 1138–1152.

- Smith, J.S., Tachibana, I., Lee, H.K., Qian, J., Pohl, U., Mohrenweiser, H.W., Borell, T.J., Hosek, S.M., Soderberg, C.L., Deimling, A. von, et al. (2000). Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. *Genes, Chromosomes and Cancer* 29, 16–25.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10364–10369.
- Soltanieh, S., Osheim, Y.N., Spasov, K., Trahan, C., Beyer, A.L., and Dragon, F. (2015). DEAD-Box RNA Helicase Dbp4 Is Required for Small-Subunit Processome Formation and Function. *Mol Cell Biol* 35, 816–830.
- Soufi, B., Kelstrup, C.D., Stoehr, G., Fröhlich, F., Walther, T.C., and Olsen, J.V. (2009). Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics. *Mol. BioSyst.* 5, 1337–1346.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., and Hall, M.N. (2010). The Rapamycin-sensitive Phosphoproteome Reveals That TOR Controls Protein Kinase A Toward Some But Not All Substrates. *Mol Biol Cell* 21, 3475–3486.
- Spitale, R.C., Crisalli, P., Flynn, R.A., Torre, E.A., Kool, E.T., and Chang, H.Y. (2013). RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat Chem Biol* 9, 18–20.
- Staals, R.H.J., Bronkhorst, A.W., Schilders, G., Slomovic, S., Schuster, G., Heck, A.J.R., Rajmakers, R., and Pruijn, G.J.M. (2010). Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *EMBO J* 29, 2358–2367.
- Stead, J.A., Costello, J.L., Livingstone, M.J., and Mitchell, P. (2007). The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic Acids Res* 35, 5556–5567.
- Sterrett, M.C., Enyenihi, L., Leung, S.W., Hess, L., Strassler, S.E., Farchi, D., Lee, R.S., Withers, E.S., Kremisky, I., Baker, R.E., et al. (2021). A Budding Yeast Model for Human Disease Mutations in the EXOSC2 Cap Subunit of the RNA Exosome. *RNA rna.078618.120*.
- Strunk, B.S., and Karbstein, K. (2009). Powering through ribosome assembly. *RNA* 15, 2083–2104.
- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., and Karbstein, K. (2012). Joining of 60S subunits and a translation-like cycle in 40S ribosome maturation. *Cell* 150, 111–121.
- Stuparević, I., Novačić, A., Rahmouni, A.R., Fernandez, A., Lamb, N., and Primig, M. (2021). Regulation of the conserved 3'-5' exoribonuclease EXOSC10/Rrp6 during cell division, development and cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc* 96, 1092–1113.
- Sugiyama, M., Nugroho, S., Iida, N., Sakai, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2011). Genetic interactions of ribosome maturation factors Yvh1 and Mrt4 influence mRNA decay, glycogen accumulation, and the expression of early meiotic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biochemistry* 150, 103–111.
- Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., An, W., Lan, P., Tan, D., Chen, R., Wang, B., Zheng, S., Zhang, C., et al. (2017). Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *ELife* 6, e22086.
- Sung, M.-K., Porras-Yakushi, T.R., Reitsma, J.M., Huber, F.M., Sweredoski, M.J., Hoelz, A., Hess, S., and Deshaies, R.J. (2016a). A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *ELife* 5, e19105.
- Sung, M.-K., Reitsma, J.M., Sweredoski, M.J., Hess, S., and Deshaies, R.J. (2016b). Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin–proteasome system. *Mol Biol Cell* 27, 2642–2652.
- Suzuki, A., Kogo, R., Kawahara, K., Sasaki, M., Nishio, M., Maehama, T., Sasaki, T., Mimori, K., and Mori, M. (2012). A new PICTURE of nucleolar stress. *Cancer Science* 103, 632–637.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation crosstalk in protein degradation. *Nat Methods* 10, 10.1038/nmeth.2519.
- Sydorsky, Y., Dilworth, D.J., Halloran, B., Yi, E.C., Makhnevych, T., Wozniak, R.W., and Aitchison, J.D. (2005). Nop53p is a novel nucleolar 60S ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochem J* 388, 819–826.
- Szczepińska, T., Kalisiak, K., Tomecki, R., Labno, A., Borowski, L.S., Kulinski, T.M., Adamska, D., Kosinska, J., and Dziembowski, A. (2015). DIS3 shapes the RNA polymerase II transcriptome in humans by degrading a variety of unwanted transcripts. *Genome Res* 25, 1622–1633.
- Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.-L., Mullineux, S.-T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., and Lafontaine, D.L.J. (2013). The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors. *Molecular Cell* 51, 539–551.

- Talkish, J., Zhang, J., Jakovljevic, J., Horsey, E.W., and Woolford, J.L., Jr (2012). Hierarchical recruitment into nascent ribosomes of assembly factors required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* *40*, 8646–8661.
- Talkish, J., Biedka, S., Jakovljevic, J., Zhang, J., Tang, L., Strahler, J.R., Andrews, P.C., Maddock, J.R., and Woolford, J.L. (2016). Disruption of ribosome assembly in yeast blocks cotranscriptional pre-rRNA processing and affects the global hierarchy of ribosome biogenesis. *RNA* *22*, 852–866.
- Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E., and Woolford, J.L. (2008). Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 Required for Assembly of the Nop7-Subcomplex in Yeast Preribosomes. *MBoC* *19*, 2844–2856.
- Tartakoff, A.M., Chen, L., Raghavachari, S., Gitiforooz, D., Dhinakaran, A., Ni, C., Pasadyn, C., Mahabeleshwar, G.H., Pasadyn, V., and Woolford, J.L. (2021). The nucleolus as a polarized coaxial cable in which the rDNA axis is surrounded by dynamic subunit-specific phases. *Current Biology* *31*, 2507-2519.e4.
- Thiry, M., and Lafontaine, D.L.J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in Cell Biology* *15*, 194–199.
- Thoms, M., Thomson, E., Baßler, J., Gnädig, M., Griesel, S., and Hurt, E. (2015). The Exosome Is Recruited to RNA Substrates through Specific Adaptor Proteins. *Cell* *162*, 1029–1038.
- Thoms, M., Ahmed, Y.L., Maddi, K., Hurt, E., and Sinning, I. (2016). Concerted removal of the Erb1–Ytm1 complex in ribosome biogenesis relies on an elaborate interface. *Nucleic Acids Research* *44*, 926–939.
- Thoms, M., Mitterer, V., Kater, L., Falquet, L., Beckmann, R., Kressler, D., and Hurt, E. (2018). Suppressor mutations in Rpf2–Rrs1 or Rpl5 bypass the Cgr1 function for pre-ribosomal 5S RNP-rotation. *Nature Communications* *9*, 4094.
- Thomson, E., and Tollervey, D. (2005). Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA* *11*, 1215–1224.
- Thomson, E., and Tollervey, D. (2010). The Final Step in 5.8S rRNA Processing Is Cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *30*, 976–984.
- Timsit, Y., Sergeant-Perthuis, G., and Bennequin, D. (2021). Evolution of ribosomal protein network architectures. *Sci Rep* *11*.
- Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepien, P.P., et al. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J* *29*, 2342–2357.
- Tomecki, R., Drazkowska, K., Kucinski, I., Stodus, K., Szczesny, R.J., Gruchota, J., Owczarek, E.P., Kalisiak, K., and Dziembowski, A. (2014). Multiple myeloma-associated hDIS3 mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target. *Nucleic Acids Res* *42*, 1270–1290.
- Tomecki, R., Sikorski, P.J., and Zakrzewska-Placzek, M. (2017). Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells – focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Letters* *591*, 1801–1850.
- Tuck, A.C., and Tollervey, D. (2013). A Transcriptome-wide Atlas of RNP Composition Reveals Diverse Classes of mRNAs and lncRNAs. *Cell* *154*, 996–1009.
- Tudek, A., Porrua, O., Kabzinski, T., Lidschreiber, M., Kubicek, K., Fortova, A., Lacroute, F., Vanacova, S., Cramer, P., Stefl, R., et al. (2014). Molecular Basis for Coordinating Transcription Termination with Noncoding RNA Degradation. *Mol Cell* *55*, 467–481.
- Tutuncuoglu, B., Jakovljevic, J., Wu, S., Gao, N., and Woolford, J.L. (2016). The N-terminal extension of yeast ribosomal protein L8 is involved in two major remodeling events during late nuclear stages of 60S ribosomal subunit assembly. *RNA* *22*, 1386–1399.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., and Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods* *13*, 731–740.
- Tye, B.W., Commins, N., Ryazanova, L.V., Wühr, M., Springer, M., Pincus, D., and Churchman, L.S. (2019). Proteotoxicity from aberrant ribosome biogenesis compromises cell fitness. *ELife* *8*, e43002.
- Uchi, R., Kogo, R., Kawahara, K., Sudo, T., Yokobori, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Maehama, T., Mori, M., Suzuki, A., et al. (2013). PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression. *Br J Cancer* *109*, 2199–2206.
- Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell* *138*, 911–922.

- Vaňáčová, Š., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A New Yeast Poly(A) Polymerase Complex Involved in RNA Quality Control. *PLOS Biology* 3, e189.
- Vasiljeva, L., and Buratowski, S. (2006). Nrd1 Interacts with the Nuclear Exosome for 3' Processing of RNA Polymerase II Transcripts. *Molecular Cell* 21, 239–248.
- Vasiljeva, L., Kim, M., Terzi, N., Soares, L.M., and Buratowski, S. (2008). Transcription Termination and RNA Degradation Contribute to Silencing of RNA Polymerase II Transcription within Heterochromatin. *Molecular Cell* 29, 313–323.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1996). RRP5 is required for formation of both 18S and 5.8S rRNA in yeast. *EMBO J* 15, 5701–5714.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261–311.
- Villén, J., and Gygi, S.P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature Protocols* 3, 1630–1638.
- Wang, C., Liu, Y., DeMario, S.M., Mandric, I., Gonzalez-Figueroa, C., and Chanfreau, G.F. (2020). Rrp6 Moonlights in an RNA Exosome-Independent Manner to Promote Cell Survival and Gene Expression during Stress. *Cell Reports* 31, 107754.
- Wang, P., Meng, W., Han, S.-C., Li, C.-C., Wang, X.-J., and Wang, X.-J. (2016). The nucleolar protein GLTSCR2 is required for efficient viral replication. *Sci Rep* 6, 36226.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 437–440.
- Warner, J.R., and McIntosh, K.B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* 34, 3–11.
- Wasmuth, E.V., and Lima, C.D. (2012). Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the non-catalytic core and central channel. *Mol Cell* 48, 133–144.
- Wasmuth, E.V., and Lima, C.D. (2017). The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Research* 45, 846–860.
- Wasmuth, E.V., Januszyk, K., and Lima, C.D. (2014). Structure of an Rrp6–RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature* 511, 435–439.
- Wasmuth, E.V., Zinder, J.C., Zattas, D., Das, M., and Lima, C.D. (2017). Structure and reconstitution of yeast Mpp6-nuclear exosome complexes reveals that Mpp6 stimulates RNA decay and recruits the Mtr4 helicase. *ELife* 6, e29062.
- Watkins, N.J., and Bohnsack, M.T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *WIREs RNA* 3, 397–414.
- Wegrecki, M., Rodríguez-Galán, O., de la Cruz, J., and Bravo, J. (2015). The structure of Erb1-Ytm1 complex reveals the functional importance of a high-affinity binding between two β -propellers during the assembly of large ribosomal subunits in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 43, 11017–11030.
- Weick, E.-M., Puno, M.R., Januszyk, K., Zinder, J.C., DiMattia, M.A., and Lima, C.D. (2018). Helicase-Dependent RNA Decay Illuminated by a Cryo-EM Structure of a Human Nuclear RNA Exosome-MTR4 Complex. *Cell* 173, 1663–1677.e21.
- Weick, E.-M., Zinder, J.C., and Lima, C.D. (2020). Strategies for Generating RNA Exosome Complexes from Recombinant Expression Hosts. *Methods Mol Biol* 2062, 417–425.
- Weis, F., Giudice, E., Churcher, M., Jin, L., Hilcenko, C., Wong, C.C., Traynor, D., Kay, R.R., and Warren, A.J. (2015). Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 914–919.
- Wells, G.R., Weichmann, F., Colvin, D., Sloan, K.E., Kudla, G., Tollervey, D., Watkins, N.J., and Schneider, C. (2016). The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans. *Nucleic Acids Res* 44, 5399–5409.
- Wilkinson, K.A., Merino, E.J., and Weeks, K.M. (2006). Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat Protoc* 1, 1610–1616.
- Wilson, D.N., and Doudna Cate, J.H. (2012). The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

- Wilson, D.M., Li, Y., LaPeruta, A., Gamalinda, M., Gao, N., and Woolford, J.L. (2020). Structural insights into assembly of the ribosomal nascent polypeptide exit tunnel. *Nature Communications* 11, 5111.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327–339.
- Wlotzka, W., Kudla, G., Granneman, S., and Tollervey, D. (2011). The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *EMBO J* 30, 1790–1803.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *PNAS* 74, 5088–5090.
- Woolford, J.L., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643–681.
- Wu, S., Tutuncuoglu, B., Yan, K., Brown, H., Zhang, Y., Tan, D., Gamalinda, M., Yuan, Y., Li, Z., Jakovljevic, J., et al. (2016). Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature* 534, 133–137.
- Wu, S., Tan, D., Woolford, J.L., Dong, M.-Q., and Gao, N. (2017). Atomic modeling of the ITS2 ribosome assembly subcomplex from cryo-EM together with mass spectrometry-identified protein–protein crosslinks. *Protein Science* 26, 103–112.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.-C., Dufour, M.-E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., et al. (2005). Cryptic Pol II Transcripts Are Degraded by a Nuclear Quality Control Pathway Involving a New Poly(A) Polymerase. *Cell* 121, 725–737.
- Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X., Kiledjian, M., Manley, J.L., and Tong, L. (2009). Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* 458, 784–788.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Münster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W., and Steinmetz, L.M. (2009). Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* 457, 1033–1037.
- Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 355–369.
- Yao, W., Roser, D., Köhler, A., Bradatsch, B., Baßler, J., and Hurt, E. (2007). Nuclear Export of Ribosomal 60S Subunits by the General mRNA Export Receptor Mex67-Mtr2. *Molecular Cell* 26, 51–62.
- Yao, Y., Demoinet, E., Saveanu, C., Lenormand, P., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2010). Ecm1 is a new pre-ribosomal factor involved in pre-60S particle export. *RNA* 16, 1007–1017.
- Yim, J.-H., Kim, Y.-J., Ko, J.-H., Cho, Y.-E., Kim, S.-M., Kim, J.-Y., Lee, S., and Park, J.-H. (2007). The putative tumor suppressor gene GLTSCR2 induces PTEN-modulated cell death. *Cell Death Differ* 14, 1872–1879.
- Ying, B.-W., Fourmy, D., and Yoshizawa, S. (2007). Substitution of the use of radioactivity by fluorescence for biochemical studies of RNA. *RNA* 13, 2042–2050.
- Yoshimoto, M., Tokuda, A., Nishiwaki, K., Sengoku, K., and Yaginuma, Y. (2018). Abnormal Expression of PICT-1 and Its Codon 389 Polymorphism Is a Risk Factor for Human Endometrial Cancer. *OCL* 95, 43–51.
- Yu, X., Chini, C.C.S., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT Domain Is a Phospho-Protein Binding Domain. *Science* 302, 639–642.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D., and Noller, H.F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* 292, 883–896.
- Zanchin, N.I., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D.S. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 5001–5015.
- Zemp, I., Wild, T., O'Donohue, M.-F., Wandrey, F., Widmann, B., Gleizes, P.-E., and Kutay, U. (2009). Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J Cell Biol* 185, 1167–1180.
- Zencir, S., Dilg, D., Rueda, M.P., Shore, D., and Albert, B. (2020). Mechanisms coordinating ribosomal protein gene transcription in response to stress. *Nucleic Acids Research* 48, 11408–11420.
- Zhang, E., Khanna, V., Dacheux, E., Namane, A., Doyen, A., Gomard, M., Turcotte, B., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2019). A specialised SKI complex assists the cytoplasmic RNA exosome in the absence of direct association with ribosomes. *The EMBO Journal* 38, e100640.
- Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S., and Ye, K. (2016). Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes Dev.* 30, 718–732.

- Zhang, X.-R., Qin, Z., Zhang, X., and Hu, Y. (2015). Arabidopsis SMALL ORGAN 4, a homolog of yeast NOP53, regulates cell proliferation rate during organ growth. *Journal of Integrative Plant Biology* 57, 810–818.
- Zhou, D., Zhu, X., Zheng, S., Tan, D., Dong, M.-Q., and Ye, K. (2019a). Cryo-EM structure of an early precursor of large ribosomal subunit reveals a half-assembled intermediate. *Protein Cell* 10, 120–130.
- Zhou, X., Liao, W.-J., Liao, J.-M., Liao, P., and Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol* 7, 92–104.
- Zhou, Y., Musalgaonkar, S., Johnson, A.W., and Taylor, D.W. (2019b). Tightly-orchestrated rearrangements govern catalytic center assembly of the ribosome. *Nature Communications* 10, 958.
- Zhu, J., Liu, X., Anjos, M., Correll, C.C., and Johnson, A.W. (2016). Utp14 Recruits and Activates the RNA Helicase Dhr1 To Undock U3 snoRNA from the Preribosome. *Mol Cell Biol* 36, 965–978.
- Zinder, J.C., and Lima, C.D. (2017). Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev* 31, 88–100.
- Zinder, J.C., Wasmuth, E.V., and Lima, C.D. (2016). Nuclear RNA Exosome at 3.1 Å Reveals Substrate Specificities, RNA Paths, and Allosteric Inhibition of Rrp44/Dis3. *Molecular Cell* 64, 734–745.
- Zisser, G., Ohmayer, U., Mauerhofer, C., Mitterer, V., Klein, I., Rechberger, G.N., Wolinski, H., Prattes, M., Pertschy, B., Milkereit, P., et al. (2018). Viewing pre-60S maturation at a minute's timescale. *Nucleic Acids Res* 46, 3140–3151.

ANEXO A - SÚMULA CURRICULARFELIPE FRANCO DE MELO BAGATELLI

Domicílio São Paulo, SP, BRASIL
e-mail felipe.bagatelli@usp.br
Nacionalidade Brasileiro
Nascimento São Paulo, 24.11.1990

Formação Acadêmica

2015 - 2021 Doutorado Direto - Bioquímica, IQ-USP, São Paulo, SP, Brasil
Orientadora : Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira
Bolsista FAPESP 2015/05776-2

2012 - 2014 Master Recherche Biosciences M2R (Mention: Bien). École Normale Supérieure de Lyon, França

2009 - 2014 Bacharelado em Farmácia-Bioquímica, FCF-USP, São Paulo, SP, Brasil

Iniciação Científica - Estágios

2014 Laboratório de Controle Pós-transcricional da Expressão Gênica, IQ-USP, SP, Brasil
Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira
Título: *Análise do papel de cofatores do exossomo na expressão e estabilidade da exoribonuclease RRP6 em Saccharomyces cerevisiae*
Bolsista FAPESP 2014/04628-7

Out-Dez 2014 Hospital Universitário – Estágio em Farmacovigilância (180h)
Supervisão: Patricia Sayuri Katayose Takahashi

Ago-Dez 2013 Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias, IB-USP, SP, Brasil
Orientadora: Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira
Título: *Diferenciação hepática de células-tronco embrionárias humanas (BR1 hESC)*

Jan-Jun 2013 Laboratório de Ontogênese e Interações Moleculares, IGFL-Lyon, França
Orientador: Prof. Dr. Samir Merabet
Título: *Detection of Hox-cofactor interactions through Bimolecular Fluorescence Complementation assay*
Bolsista Ciência sem Fronteiras / CNRS

2010 - 2012 Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos, IQ-USP, SP, Brasil
Orientador: Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida
Título: *Estudo da presença de RNAs não-codificadores contendo o motivo ARE de união à proteína HuR em frações de RNA total imunoprecipitadas a partir de células renais normais e tumorais com um anticorpo Anti-HuR*
Bosista FAPESP 2010/18158-1

Monitorias

- Ago -Dez 2017* Bioquímica Experimental (QBQ0316) - Curso de Farmácia-Bioquímica diurno (FCF-USP) Profa. Dra. Ohara Augusto, Profa. Dra. Maria Teresa Machini, Profa. Dra. Graziella Eliza Ronsein
Bolsista do PAE
- Fev - Jun 2017* Biologia Molecular (QBQ1354) – Curso de Química Diurno (IQ-USP)
Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira / Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales

Participação em Eventos Científicos - Conferências, Congressos e Seminários

- Almoço com Ciência -IQ-USP, evento virtual – 2021 (Apresentação Oral)
Estudo da montagem da subunidade ribossomal 60S em S. cerevisiae: caracterização de uma nova função de Nop53
- 26th Annual Meeting of the RNA Society, evento virtual – 2021 (Poster)
- Seminários do Departamento de Bioquímica - IQ-USP, SP, Brasil - 2020 (Apresentação Oral)
The role of Nop53 in ribosome biogenesis: an intricate assembly line extending from the nucleolus to the cytoplasm
- II BioSim - Interfaces Between Cell Biology and Biophysics, IQ-USP – 2020 (Ouvinte)
- 25th Annual Meeting of the RNA Society, evento virtual – 2020 (Ouvinte)
- RiboClub 20th Annual Meeting, Orford, Québec, Canadá – 2019 (Poster)
- 11th International Ribosome Synthesis Meeting, Orford, Québec, Canadá – 2018 (Poster)
- 26^o SIICUSP – IQ-USP, São Paulo, SP, Brasil 2018 (Avaliador)
- 23rd Annual Meeting of the RNA Society, Berkeley, EUA – 2018 (Poster)
- I Workshop in Microbial Molecular Biology – ICB-USP, São Paulo, Brasil - 2017 (Poster)
- 21st Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japão - 2016 (Poster)
- 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) / 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil – 2015 (Poster)
- 60^o Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, 2014 (Poster)
- I Colloque Interdisciplinaire Sciences Coresponsables, ENS Lyon (França), 2013 (Organização)
- XLI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, 2012 (Poster)
- Seminars of the Human Genome Research Center, São Paulo 2012
- USP Conference - Challenge for Integrating Molecular and System Biology, São Paulo. 2011.
- XLVI Pharmaceutical Science and Technology Week, São Paulo 2011.
- V Thematic Symposium on Energy Metabolism (Institute of Biomedical Sciences -USP), São Paulo 2010
- XLV Pharmaceutical Science and Technology Week, São Paulo 2010
- XLIV Pharmaceutical Science and Technology Week. São Paulo 2009

Prêmios

- 2016 Prêmio Paulo Minami - Melhor Aluno do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2009-2014) - Conselho Regional de Farmácia-SP
- 2014 Menção Honrosa - Prêmio Painel de Iniciação Científica com trabalho na área de genética de microorganismos apresentado no 60° Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética.
- 2012 SBBq AWARD for the best poster presented during the XLI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)
- 2008 Medalha de Bronze na Olimpíada de Química do Estado de São Paulo, ABQ-SP (Associação Brasileira de Química)

Línguas

Português (nativo), Inglês fluente, Francês fluente, Alemão intermediário

Resumos publicados em Anais de Congressos

BAGATELLI, F. F. M.; VITORINO, F. N. L.; DA CUNHA, J. P. C.; OLIVEIRA, C. C. The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events. 26th Annual Meeting of the RNA Society, evento virtual – 2021

DE PAIVA, R. E. F.; DA SILVA, B. S. R.; ZABALLA, A. M. L.; **BAGATELLI, F. F. M.;** OLIVEIRA, C. C.; FERREIRA, A. M. C., Imine-, thiosemicarbazone- and pyridine-based ligands for copper(II): consequences on DNA binding and nuclease activity. 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Interlaken, Suíça – 2019

CEPEDA, L. P. P.; **BAGATELLI, F. F. M.;** OLIVEIRA, C. C. Ribosome maturation factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles 24th Annual Meeting of the RNA Society, Cracóvia, Polônia - 2019

BAGATELLI, F. F. M.; SANTOS, R. M.; DA CUNHA, J. P. C.; SANTOS, M. D. M.; NOGUEIRA, F. C.; OLIVEIRA, C.C. Insights into the role of Nop53 during nuclear pre-60S maturation stages. RiboClub 20th Annual Meeting, Orford, Québec, Canadá – 2019

CEPEDA, L. P. P.; **BAGATELLI, F. F. M.;** OLIVEIRA, C. C. Insights into the interaction of Nop53 with the RNA exosome. 23rd Annual Meeting of the RNA Society, Berkeley, EUA - 2018

ADACHI, F. M. M; **BAGATELLI, F. F. M.;** OLIVEIRA, C. C. Caracterização da interação entre a proteína nucleolar Nop53 com a subunidade catalítica do exossomo Rrp6 e outros cofatores em *Saccharomyces cerevisiae*. In: 26° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP (SIICUSP), IQ-USP, São Paulo, SP, Brasil – 2018

BAGATELLI, F. F. M.; CEPEDA, L. P. P.; OLIVEIRA, C. C. Analysis of the interactions between Nop53 and other processing factors within eukaryotic pre-60S ribosomal subunit. 11th International Ribosome Synthesis Meeting, Orford, Québec, Canadá - 2018

BAGATELLI, F. F. M.; CEPEDA, L. P. P.; ADACHI, F. M. M.; OLIVEIRA, C. C. Insights into the effect of Nop53 in 7S pre-rRNA processing through its interaction with the Nuclear Exosome. I Workshop in Microbial Molecular Biology – ICB-USP, São Paulo, Brasil - 2017

BAGATELLI, F. F. M.; CEPEDA, L. P. P.; OLIVEIRA, C. C., Nop53 regulates pre-rRNA processing by interacting with the nuclear exosome subunit Rrp6. 21st Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japão - 2016

BAGATELLI, F. F. M.; OLIVEIRA, C. C. Regulation of the expression of the exosome catalytic subunit Rrp6 by a nucleolar protein. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) / 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil - 2015

BAGATELLI, F. F. M.; OLIVEIRA, C. C. Effect of NOP53 and NOP8 on the nuclear exoribonuclease RRP6 in yeast. In: 60° Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, SP, Brasil - 2014

PARREIRA, K. S.; FACHEL, A. A.; **BAGATELLI, F. F. M.**; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. HuR Binds to Long Noncoding RNAs in Renal Cancer Cells. In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil - 2012.

Artigos publicados em periódicos

CEPEDA, L.P.P.*; **BAGATELLI, F.F.M.***, SANTOS, R.M., SANTOS, M.D.M., NOGUEIRA, F.C.S., AND OLIVEIRA, C.C. (2019). The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast. *J Biol Chem* 294, 19365–19380. (** Both authors contributed equally to this work*)

BAGATELLI, F.F.M., DE LUNA VITORINO, F.N., DA CUNHA, J.P.C., AND OLIVEIRA, C.C. (2021). The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events. *Nucleic Acids Research* 49, 7053–7074.

Colaborações – Publicações em preparação/submetidas

SANTOS, R. M., BASTOS, V. A., GOMES-NETO, F., **BAGATELLI, F.F.M.**, VALENTE, R., KURT, L. U., LIMA, D. B., OLIVEIRA, C.C., NOGUEIRA, F.C.S., ELEUTHERIO, E. C. A., CARVALHO, P. C., (submetido) Topological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthesis complex by crosslinking mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*

DA SILVA, B. S. R., MARTINS, D. T., **BAGATELLI, F.F.M.**, OLIVEIRA, C.C., DE PAIVA, R. E. F., FERREIRA, A. M. C., (em preparação) DNA as target for mono- and dinuclear imine- and polypyridine-containing copper(II) complexes

BAGATELLI, F.F.M., FARIA, R. L., SILVA D. R., VIEIRA, E. G., DE LUNA VITORINO, F.N., DA CUNHA, J.P.C., OLIVEIRA, C.C., MIYAMOTO, S., FERREIRA, A. M. C., DE PAIVA, R. E. F., (em preparação) Copper(II) complexes with imidazole-containing ligands lead to cell death by affecting the proteome and causing lipid peroxidation in mammalian cancer cells

SILVA D. R., VIEIRA, E. G., **BAGATELLI, F.F.M.**, FARIA, R. L., OLIVEIRA, C.C., MIYAMOTO, S., FERREIRA, A. M. C., DE PAIVA, R. E. F. (em preparação) Copper(II) complexes of imidazole-2-carboxaldehyde condensation products with o-substituted anilines

ANEXO B

Cepeda, L.P.P., Bagatelli, F.F.M., Santos, R.M., Santos, M.D.M., Nogueira, F.C.S., and Oliveira, C.C. (2019). The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast. *J Biol Chem* 294, 19365–19380.



The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast

Received for publication, July 17, 2019, and in revised form, October 22, 2019. Published, Papers in Press, October 29, 2019, DOI 10.1074/jbc.RA119.010193

Leidy Paola P. Cepeda^{†1}, Felipe F. M. Bagatelli^{†1}, Renata M. Santos[§], Marlon D. M. Santos[¶], Fabio C. S. Nogueira[§], and Carla C. Oliveira^{‡2}

From the [†]Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, the [§]Proteomics Unit and Laboratory of Proteomics/LADETEC, Federal University of Rio de Janeiro, 22410-001 Rio de Janeiro (RJ), and the [¶]Laboratory for Structural and Computational Proteomics, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Curitiba, PR, CEP 81350-010, Brazil

Edited by Karin Musier-Forsyth

Eukaryotic ribosomal biogenesis is a high-energy-demanding and complex process that requires hundreds of *trans*-acting factors to dynamically build the highly-organized 40S and 60S subunits. Each ribonucleoprotein complex comprises specific rRNAs and ribosomal proteins that are organized into functional domains. The RNA exosome complex plays a crucial role as one of the pre-60S-processing factors, because it is the RNase responsible for processing the 7S pre-rRNA to the mature 5.8S rRNA. The yeast pre-60S assembly factor Nop53 has previously been shown to associate with the nucleoplasmic pre-60S in a region containing the “foot” structure assembled around the 3′ end of the 7S pre-rRNA. Nop53 interacts with 25S rRNA and with several 60S assembly factors, including the RNA exosome, specifically, with its catalytic subunit Rrp6 and with the exosome-associated RNA helicase Mtr4. Nop53 is therefore considered the adaptor responsible for recruiting the exosome complex for 7S processing. Here, using proteomics-based approaches in budding yeast to analyze the effects of Nop53 on the exosome interactome, we found that the exosome binds pre-ribosomal complexes early during the ribosome maturation pathway. We also identified interactions through which Nop53 modulates exosome activity in the context of 60S maturation and provide evidence that in addition to recruiting the exosome, Nop53 may also be important for positioning the exosome during 7S processing. On the basis of these findings, we propose that the exosome is recruited much earlier during ribosome assembly than previously thought, suggesting the existence of additional interactions that remain to be described.

The assembly of eukaryotic ribosomal subunits is a complex process that requires, in addition to the ribosomal proteins, more than 200 biogenesis factors (1). Synthesis of ribosomal

subunits starts in the nucleolus, where the precursors rRNAs pre-35S and pre-5S are transcribed and bound by early processing and assembly factors (2). Early endonucleolytic cleavage reactions separate the pre-20S that is going to be part of the pre-40S subunit, from the pre-27SA₂, which will give rise to the pre-rRNAs 7S and 26S, and subsequently to the mature rRNAs 5.8S and 25S (3).

In the pre-rRNA maturation pathway, the RNA exosome complex is responsible for the degradation of the spacer sequence 5′-external transcribed spacer (5′-ETS)³ after cleavage at A₀ and for the 3′-5′-end processing of 7S pre-rRNA to the mature 5.8S rRNA (4, 5). In *Saccharomyces cerevisiae*, the exosome is composed of a nine-subunit core (Exo9) arranged as a heterohexameric ring (Rrp41, Rrp42, Rrp45, Rrp43, Mtr3, and Rrp46) capped by a heterotrimeric “cap” (Rrp40, Csl4, and Rrp4) that lacks catalytic activity. In the nucleus and cytoplasm, Exo9 interacts with Rrp44/Dis3 to form a 10-subunit complex (Exo10). Rrp44 is an RNase II family member and catalyzes both endoribonucleolytic and processive 3′-to-5′-exoribonucleolytic reactions (6–8). The yeast nuclear exosome (Exo11) contains an extra catalytic subunit, Rrp6, which is a distributive 3′-to-5′-exoribonuclease homolog of *Escherichia coli* RNase D (9), that binds to the trimeric cap and upper portion of the hexameric ring, opposite to the Rrp44-binding site. Although *RRP6* is not essential, its deletion causes a slow-growth phenotype, temperature sensitivity, and RNA-processing defects (4, 10).

Nuclear and cytoplasmic forms of the exosome interact with distinct cofactors in these subcellular compartments (11). In the nucleus, Rrp47, Mpp6, and the RNA helicase Mtr4 associate with the exosome (Exo11) to form a 14-subunit complex (12). The exosome cofactor Mpp6 can associate with the Exo9 core through interactions with the “cap” subunit Rrp40 to recruit the other cofactor Mtr4 and to stimulate the activities of the exosome catalyzed by Rrp6 (13). Rrp47 is a nuclear exosome cofactor important for Rrp6 stability and activity (14). The N-terminal domains of Rrp6 and Rrp47 interact in an intertwined set of α -helices that form an interface for interaction

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 15/06477-9 (to C. C. O.), by FAPESP fellowship 2015/05776-2 (to F. F. M. B.), and by fellowships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (to L. P. C.).

This article contains Figs. S1–S8 and Tables S1–S4.

The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier accession no. PXD014187.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-11-3091-9197; E-mail: ccoliv@iq.usp.br.

This is an open access article under the CC BY license.

³ The abbreviations used are: 5′-ETS, 5′-external transcribed spacer; FDR, false-discovery rate; PDB, Protein Data Bank; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; HRP, horseradish peroxidase; PSM, peptide spectrum match; LTQ, linear trap quadrupole orbitrap mass spectrometer; TAP, tandem affinity purification.

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

with the N terminus of the RNA helicase Mtr4 (15, 16), a subunit of the TRAMP complex that bridges the exosome and the TRAMP (Trf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylation complex) (17, 18) and that is also essential for the 7S pre-rRNA processing (19). The determination of Mtr4 structure revealed that it interacts with the other two subunits of the TRAMP complex through its DEXH domain (20), whereas its KOW domain is involved in the interaction with the pre-60S trans-acting factor Nop53 (17).

Nop53 is a pre-60S assembly factor (21, 22) that recently had its structure determined in the Nog2 intermediate (23–25). In that particle, Nop53 binds 25S rRNA and interacts with Nop7, Rpl7, and L27 in a region comprising the pre-60S foot structure assembled around the ITS2 (internal transcribed spacer 2) and 5.8S 3' end (25, 26). Additionally, Nop53 has also been shown to interact with the exosome catalytic subunit Rrp6 and with the TRAMP subunits Trf4 and Mtr4 (27–30). Interestingly, depletion of Nop53 leads to the accumulation of 7S pre-rRNA (29), in agreement with its role as an adaptor protein that recruits the exosome associated with Mtr4 (23).

Endonucleolytic cleavage at the C₂ site in ITS2 of pre-rRNA 27S separates pre-rRNAs 7S (5.8S+5' region of ITS2) and 26S (3' region of ITS2 plus 25S) (31), which undergo exonucleolytic processing by the exosome and Rat1/Rai1, respectively, to generate mature rRNAs 5.8S and 25S (31, 32).

Altogether, in the current model Nop53, Mtr4, and the RNA exosome are essential for the ITS2 processing of 7S after the cleavage at C₂ (32), when the exosome subunit Rrp44 shortens 7S to the intermediate 5.8S+30, which is then handed over to Rrp6 that trims it to 6S pre-rRNA, which gives rise to the mature 5.8S rRNA after further processing in the cytoplasm (33).

Despite the available information on Nop53 interactions and structure, a complete understanding of its interplay with the exosome during pre-rRNA 7S processing is lacking. The elongated topology of Nop53 establishing several protein–protein interactions with pre-60S components (24) raised the possibility that it could also interact with other exosome subunits. In this work, we show evidence that Nop53 may be involved not only in the recruitment but also in positioning of the nuclear exosome on the pre-60S particle for processing of 7S pre-rRNA, based on the observation that, in addition to its direct interaction with Rrp6 and Mtr4, Nop53 also interacts with the core subunit Rrp45 and the exosome cofactor Mpp6. Furthermore, we show that Nop53 depletion affects the exosome interactome, particularly enriching components of early pre-ribosomal subunits.

Results

Nop53 can interact with the exosome core subunit Rrp45 and the cofactor Mpp6

To investigate in more detail the role played by Nop53 in exosome recruitment to pre-60S for processing of the pre-rRNA 7S, we tested its interaction with core exosome subunits and with the exosome cofactor Mpp6. In addition to its interaction with Rrp6 (30), we show by pulldown assays that Nop53 also interacts with the exosome core subunit Rrp45 and with

Mpp6, but not with Rrp44 (Fig. 1, A–C). Based on the available structure of the nuclear exosome (12) showing that Rrp45 and Mpp6 are exposed on the same side of the complex, it is conceivable to hypothesize that Nop53 could not only recruit the 14-subunit exosome but also be important for the positioning of the exosome on the pre-60S particle during 7S pre-rRNA processing. This hypothesis takes into account that although Nop53 interacts with Rrp6, Rrp45, Mtr4, and Mpp6, the complex subunit that process the 7S substrate is Rrp44 (4), positioned on the opposite side of the exosome (34).

Because of its simultaneous interaction with many pre-60S proteins (25), we set out to determine the portions of Nop53 involved in the interaction with Rrp6. With this aim, deletion mutants of Nop53 were constructed, fused to GST, and used in pulldown experiments with His–Rrp6. His–Rrp6 interacted with mutants corresponding to the N-terminal portion of Nop53, namely Nop53_{1–80}, Nop53_{81–157}, and Nop53_{161–230} (Fig. 1, D and E). The C-terminal half of Nop53 has been shown to be involved in anchoring this protein to pre-60S (25), and consistently, the corresponding mutants did not interact with Rrp6. Importantly, Nop53 interacts with Mtr4 through its N-terminal AIM motif (residues 59–64) (23). Because the mutant Nop53_{161–230}, which does not contain the AIM motif, interacts with Rrp6, these results suggest that Nop53 may interact with Rrp6 and Mtr4 at the same time during pre-rRNA 7S processing.

Nop53 affects the exosome interactome but not the exosome complex stability

Considering the Nop53 direct interaction with the exosome, we set out to analyze in more detail the effects of Nop53 on the Rrp6 interactome. For this purpose, coimmunoprecipitation experiments were performed with Rrp6-TAP expressed in the conditional strain $\Delta nop53/tetOff-GFP-NOP53$ carrying the endogenously tagged Rrp6–TAP. In this strain, Nop53 expression was repressed by the addition of doxycycline to the medium. Proteins coimmunoprecipitated with Rrp6–TAP, in the presence or absence of Nop53, were identified by MS-based proteomics. Coimmunoprecipitation assays were also performed using the same conditional strain expressing only the TAP tag, used as control for unspecific binding to the resin. Biological triplicates (Fig. S1) of Rrp6–TAP and TAP tag coimmunoprecipitations were subjected to MS-based label-free quantitative proteomics. Interestingly, Nop53 depletion led to higher levels of ribosomal assembly factors being copurified with the exosome (Fig. 2), indicating that in addition to its recruitment function, Nop53 may also be required for the release of the exosome from pre-ribosomal particles.

Using PatternLab for proteomics 4.1.1.4 software, the identified proteins in at least two biological replicates for each condition (presence and depletion of Nop53) were grouped and depicted in a Venn diagram (Fig. 2A; Table S1) along with the negative control. From the total 403 proteins, 47 were exclusively identified upon depletion of Nop53, and two were uniquely detected in the presence of Nop53. Two independent TFold analyses were performed (Rrp6–TAP against the *Negative Control*, Fig. 2A; Table S1) to classify the proteins that were also identified in the negative control. Only those with a statis-

Importantly, Nop53 was identified among the exclusively coimmunoprecipitated proteins with Rrp6–TAP (Fig. 2A; Table S1), corroborating the pulldown assays (Fig. 1). The most striking result to emerge from these data, however, was that upon depletion of Nop53, several early nucleolar pre-60S transacting factors (e.g. Mak21, Loc1, and Mak16) as well as small subunit processome (SSU) processome factors (e.g. Utp7, Utp9, and Imp3) (35) appeared to become stably associated with the Rrp6 complex (Fig. 2A).

For the coimmunoprecipitated proteins identified in both conditions (in at least two biological replicates), a TFold analysis was performed, in which the more negative the fold change, the more enriched the protein is upon depletion of Nop53 (Fig. 2B; Fig. S2; Table S2). Similarly, the higher a positive fold change is, the more reduced the level of this protein is found upon depletion of Nop53. Altogether, the *volcano plot* shows that among the 244 commonly identified proteins, 104 satisfy neither the fold change cutoff nor the FDR cutoff α (red dots), 74 satisfy the fold change cutoff but not α (green dots), 43 satisfy both the fold change cutoff and α but are proteins of low abundance in the samples (orange dots), and 23 proteins satisfy all statistical filters (blue dots), being significantly enriched or reduced upon Nop53 depletion (Fig. 2B).

In Fig. 3, only the statistically significant differences (orange and blue dots) are depicted in a *pie chart* divided according to biological function. It is quite evident that the coimmunoprecipitated proteins whose levels were significantly affected by the Nop53 depletion are mainly related to ribosome biogenesis and the exosome complex. To evaluate in detail how these groups varied, each protein comprising each pie chart sector is shown with the respective fold change (Fig. 3B). (Positive fold change: increase upon Nop53 depletion; Negative fold change: decrease upon Nop53 depletion.) Surprisingly, one of the most significant increases of proteins associated with Rrp6–TAP was that of the RNA helicase Mtr4 (Fig. 3), with which Rrp6 directly interacts during 7S pre-rRNA processing. These results suggest that in the absence of Nop53, Rrp6 and Mtr4 are more tightly associated.

When comparing both conditions, the statistically valid results with high fold changes were found mainly related to ribosomal maturation factors (Figs. 2 and 3). Considering the role of Nop53 in recruiting the exosome to the pre-60S (23), we expected that upon its depletion the exosome would be associated with pre-ribosomal assembly factors to a lesser extent. Intriguingly, however, the results indicate that the major effect of Nop53 depletion on the exosome interactome is its stronger

association with early pre-60S particles, as well as with 90S and pre-40S particles. Among the possible interpretations, the exosome could be retained with earlier pre-ribosome intermediates or there could be an increased recruitment of the exosome to degrade defective pre-ribosomal subunits. In the first case, the exosome could already be associated with pre-60S even before the recruitment of Nop53 to the Nog2 pre-60S particle.

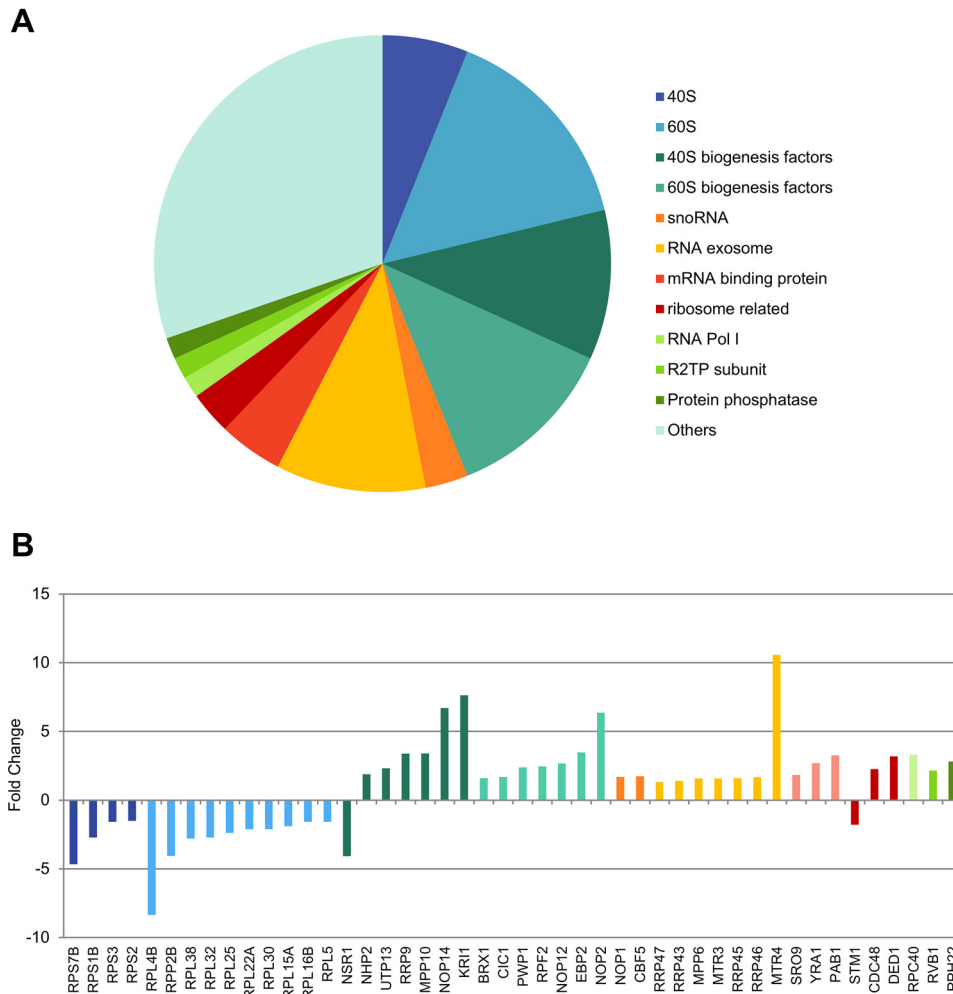
To verify whether Nop53 was affecting the association of only Rrp6 with pre-ribosomes or whether the whole exosome was being retained in pre-ribosomal complexes, similar experiments were performed with $\Delta nop53/tetOff-GFP-NOP53$ expressing Rrp43–TAP. The results show that the exosome core subunit Rrp43 also copurified more pre-60S, 90S, and pre-40S factors upon depletion of Nop53 (Fig. 4; Table S3), further indicating that the whole exosome could be retained in earlier pre-ribosomal particles.

Analysis of the protein components of pre-ribosomal particles 90S, 40S, and 60S that had their levels increased in association with the exosome upon depletion of Nop53 allowed us to pinpoint the specific stages of ribosome maturation that were more enriched (Fig. 5). Most of the identified 90S/pre-40S components corresponded to early cotranscriptional (e.g. Pol5, Kri1, and Nop6) and 5'ETS factors (e.g. Utp9, Mpp10, and Sas10), in agreement with the exosome role in the degradation of that upstream spacer. Interestingly, several SSU processome factors (e.g. Nop14, Krr1, Kre33, Pno1, and Emg1) were also found enriched in the samples, which could suggest an earlier association of the exosome, prior to the endonucleolytic cleavage that releases 5'ETS. The identification of two late 40S maturation factors (Ltv1 and Rio2), however, could be related to an increased recruitment of the exosome to degrade misassembled intermediates (Fig. 5B).

The most interesting observation, however, came from the analysis of the enriched pre-60S assembly factors coimmunoprecipitated with both Rrp6 and Rrp43 upon depletion of Nop53 (Fig. 5B). Not only were several late nucleolar factors constituents of the already described exosome-bound pre-60S particle detected (namely Cic1, Nog1, Nug1, Nog2, Rpf2, and Rlp24) (12, 25), but also earlier factors. Notably, along with several components of very early particles, one of the most enriched maturation stages was the state E, whose identified assembly factors Noc3, Brx1, Nop2, Ebp2, Has1, and Nop2 have to be released to allow the binding of Nog2, Rsa4, and Nop53 (25, 26, 36). This compositional remodeling coincides with the exit of the pre-60S from the nucleolus to the nucleoplasm (35).

Figure 2. Depletion of Nop53 affects the Rrp6 interactome. To evaluate how Nop53 modulates the interaction of Rrp6 with other factors, a coimmunoprecipitation assay was performed both in the presence (–doxycycline) and upon depletion (+doxycycline) of Nop53 using the conditional strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53$ carrying the endogenous Rrp6–TAP fusion. As a negative control, the same strain carrying only the TAP tag was employed. For each condition, the elution of biological triplicates was subjected to label-free quantitative analysis. Using the PatternLab software, the identified proteins in at least two biological replicates were grouped in a *Venn diagram* (A), showing that among a total of 403 proteins, two were exclusively identified in the presence of Nop53, and 47 uniquely upon depletion of Nop53. Three additional proteins were included in this latter group because, despite being present in the negative control, they were significantly enriched upon depletion of Nop53 (Fig. S3). Separately, the exclusively identified proteins in each condition are listed in boxes, highlighting the over-representation of pre-60S (red) and pre-90S/pre-40S (blue) assembly factors. B, proteins that were coimmunoprecipitated with Rrp6 both in the presence and absence of Nop53 (identified in at least two replicates per group) were compared through TFold analysis (benjamini-hochberg *q*-value; F-stringency (fold change stringency parameter); L-stringency (stringency parameter for lowly-abundant proteins)) using PatternLab software (52). The top and bottom of the *volcano plot* display proteins, respectively, depleted and enriched upon depletion of Nop53. Among the 244 commonly identified proteins, 104 did not show a statistically significant change upon depletion of Nop53 (red dots), 74 met the fold change criteria but were not statistically significant (green dots), 43 are low abundance proteins that met both the fold change and statistical criteria (orange dots), and 23 proteins met both the fold change and statistical criteria (blue dots).

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S



Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

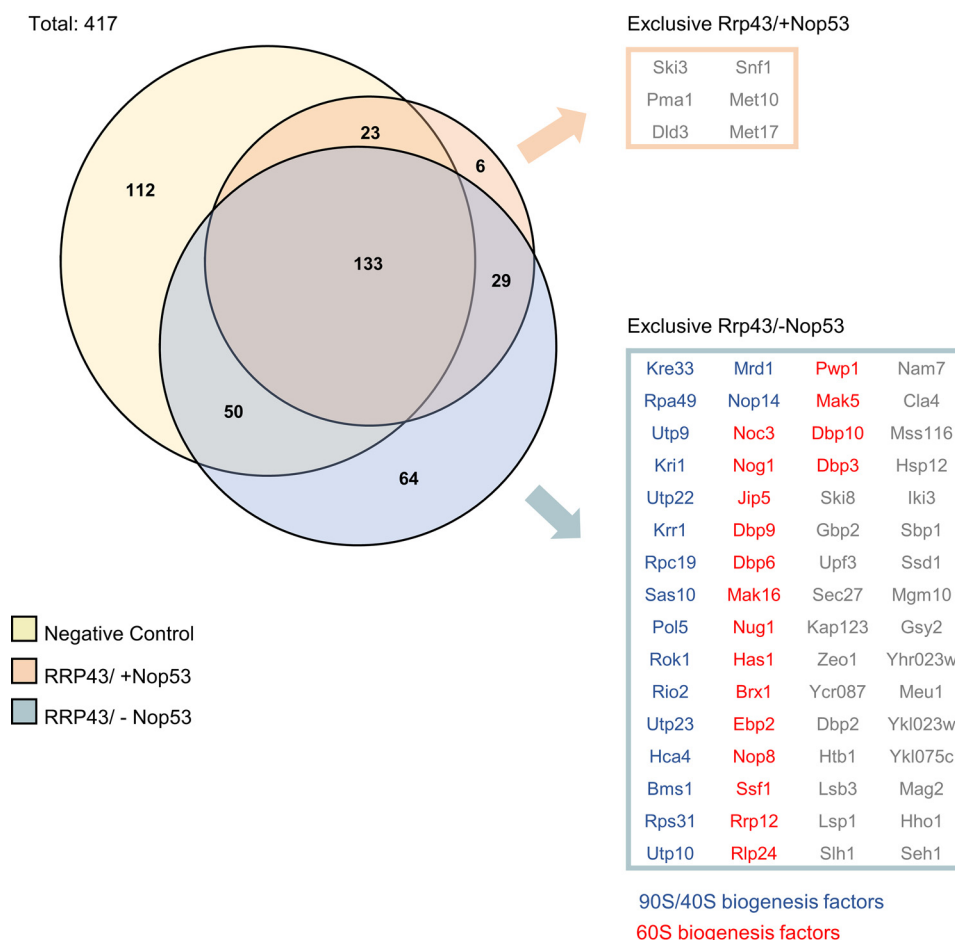


Figure 4. Depletion of Nop53 also affects the Rrp43 interactome. To analyze how Nop53 modulates the interaction of Rrp43 with other factors, a coimmunoprecipitation assay was performed both in the presence (–doxycycline) and upon depletion (+doxycycline) of Nop53 using the conditional strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53$ containing *RRP43-TAP* fusion in a plasmid. As a negative control, the same strain carrying only the TAP tag was used. For each condition, the elution of biological triplicates was subjected to label-free quantitative analysis. Using the PatternLab software, the identified proteins in at least two biological replicates were grouped in a Venn diagram, showing that among a total of 417 proteins, six were exclusively identified in the presence of Nop53, and 64 uniquely upon depletion of Nop53. The exclusively identified proteins in each condition are listed in boxes, highlighting the over-representation of pre-60S (red) and pre-90S/pre-40S (blue) assembly factors.

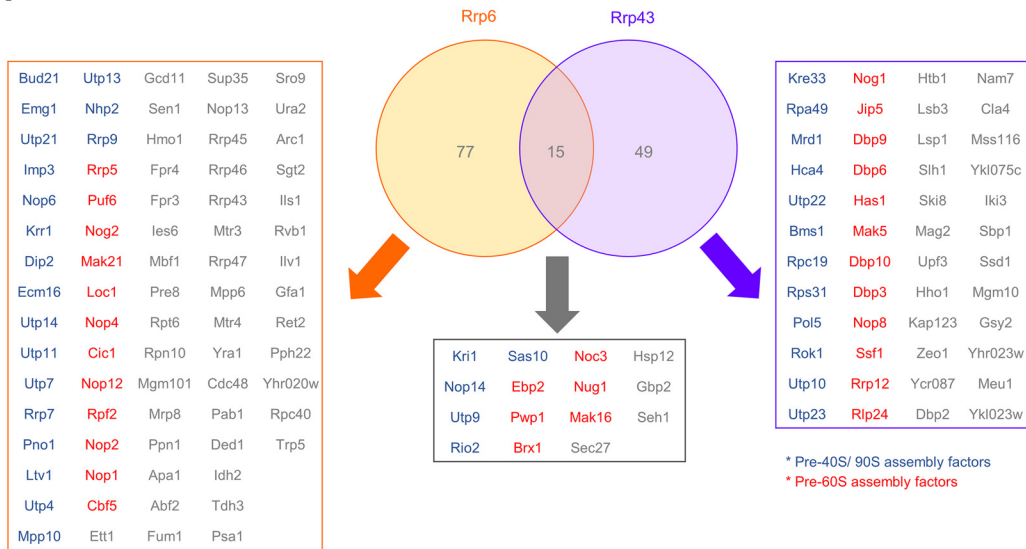
ent in fractions 13–17 but was more concentrated in fractions 15–19, denoting a larger complex (Fig. 7B; Fig. S6B). Interestingly, the TRAMP subunit Trf4 cosedimented with the exosome in the lower part of the gradient, and it was more concentrated in the same fractions as Rrp6 but was also present in upper fractions, probably corresponding to free TRAMP complex (Fig. 7B; Fig. S6B). Consistent with the results of protein coimmunoprecipitation described above, the sedimentation of the exosome subunits changed upon depletion of Nop53 (Glu), becoming more concentrated in the lower fractions of the gradient, where Rpl5 was also present (Fig. 7B, right panel; Fig. S6B). These results indicate that in the absence of Nop53, the exosome remains bound to pre-60S, suggesting a role for Nop53 in the release of the exosome from the nucleolar pre-ribosomes. Curiously, the peak of Trf4 was also shifted to lower fractions of the gradient upon depletion of Nop53, but unlike the exosome subunits, Trf4 was also present in higher fractions of the gradient, probably as part of free TRAMP complex (Fig. 7B; Fig. S6B). Control experiments for the analysis of RNAs extracted from the glycerol gradient fractions show that the bottom fractions contain early precursor rRNAs, whereas 7S

and 6S intermediates sediment in the middle fractions (Fig. S5B). The sedimentation of the ribosomal protein Rpl5 did not change upon depletion of Nop53 (Fig. 7; Fig. S6B).

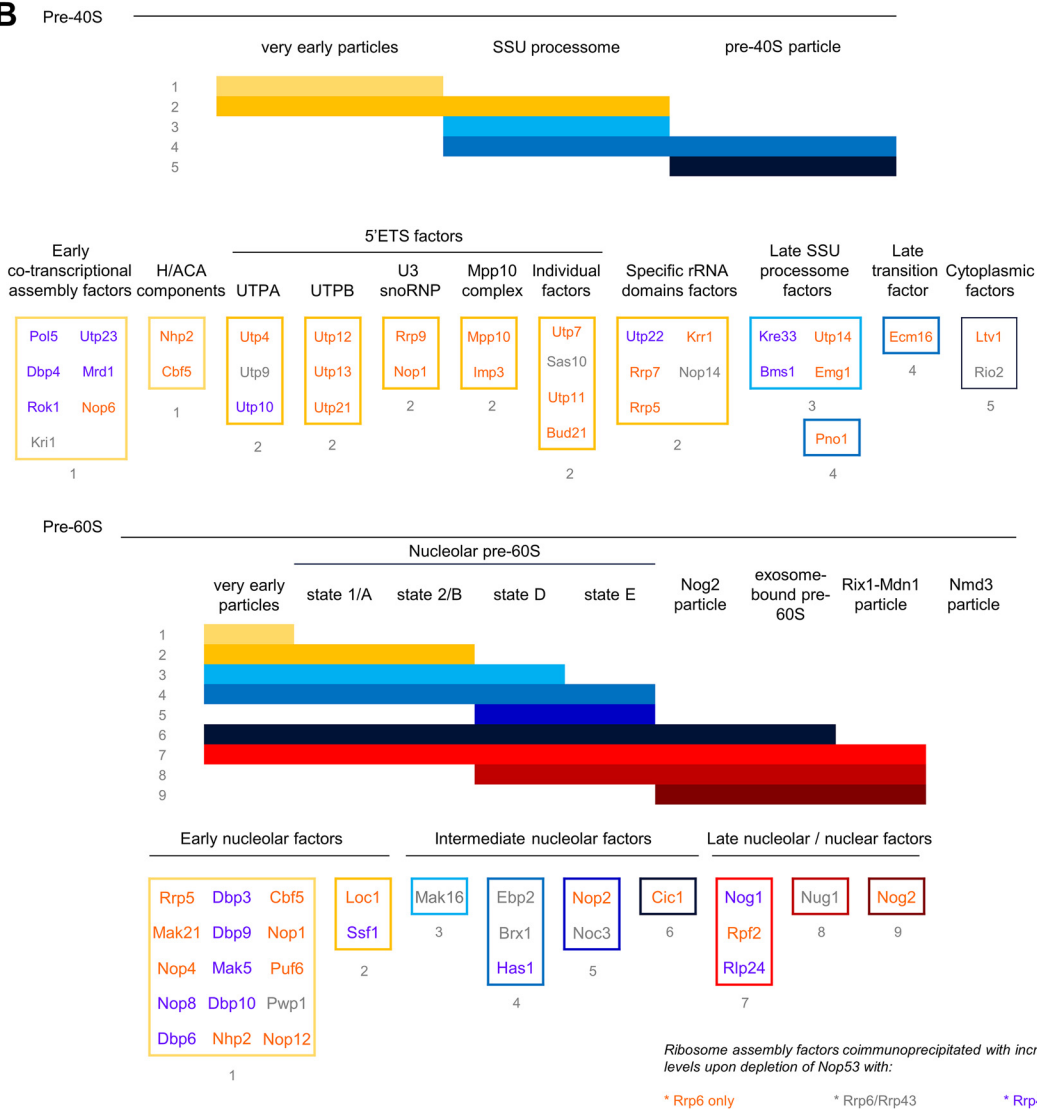
To exclude the possibility that carbon source in the culture could influence the association of the exosome with other complexes in the cell, similar experiments were performed with strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53/GFP-Rrp6$. In the presence of Nop53 (–doxycycline), Rrp6 was mainly present in the middle fractions of the gradient. After repression of Nop53 expression by the addition of doxycycline, Rrp6 sedimentation was shifted to the bottom of the gradient, cofractionating with Rpl5 (Fig. 7C, upper panels; Fig. S6C). These results strongly indicate that Nop53 plays a role in exosome release from pre-60S after processing of 7S pre-rRNA. The results of the coimmunoprecipitation of proteins with Rrp6–TAP shown above, however, indicate that Nop53 may influence the exosome release from even earlier pre-ribosome complexes. To determine whether the effect on the exosome sedimentation was due to the depletion of Nop53 or to a general inhibition of 60S maturation, Nip7, which is a pre-60S maturation factor and has been shown to interact with the exosome subunit Rrp43 (39),

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

A



B



was also analyzed. The results show that depletion of Nip7 does not cause the retention of the exosome in larger complexes (Fig. 7D; Fig. S6D).

Rrp6–TAP copurifies early pre-rRNA intermediates

To further confirm the hypothesis that the depletion of Nop53 affects the exosome association with pre-ribosomes, RNA coimmunoprecipitation was performed using the strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53/RRP6-TAP$. Corroborating the data presented above, Rrp6 copurified more pre-rRNA under depletion of Nop53 (Fig. 8, + *dox*). Interestingly, despite not leading to 23S accumulation in the cells, the absence of Nop53 led to more 23S coprecipitation with Rrp6 (Fig. 8A, probes P1 and P2). This dead-end processing intermediate is a substrate for degradation by the exosome (40–42), and its more efficient copurification with Rrp6 may suggest that absence of Nop53 affects earlier pre-rRNA processing steps. These results further confirm the more efficient copurification of pre-40S factors with Rrp6 upon depletion of Nop53. It remains to be defined whether the exosome found enriched in association with the 23S pre-rRNA targets it for degradation or waits for 5'ETS release. Further strengthening the hypothesis that Nop53 affects earlier pre-rRNA processing steps, 35S pre-rRNA was also more efficiently copurified with Rrp6 in the absence of Nop53 (Fig. 8A, probes P1–P5). Northern hybridization with different probes showed that Rrp6 not only co-purified more 35S and 23S pre-rRNAs upon depletion of Nop53, but also 32S (Fig. 8A, P2–P5), 27S (P3–P5) and 7S (P4) intermediates. More strikingly, Rrp6 copurified U3 small nuclear RNA and more efficiently in the absence of Nop53 (Fig. 8A, probe U3). 5S rRNA and scR1, which were nonspecifically copurified, did not show any enrichment in the absence of Nop53 (Fig. 8A; Fig. S7). Confirming the specificity of the RNAs being co-purified with Rrp6–TAP, mature 5.8S rRNAs was not enriched in the coimmunoprecipitated samples. These results strongly indicate that Nop53 affects the exosome release from pre-ribosomes and show that recruitment of the exosome may occur as early as the SSU processome is formed by the binding of U3 snoRNP.

In agreement with these observations, the analysis of Rrp6 subcellular localization, both in the presence and absence of Nop53, shows it is present in the nucleus, but particularly concentrated in the nucleolus (Fig. S8; supporting Experimental Procedure), further confirming its early binding to nucleolar pre-ribosome intermediates.

Discussion

The maturation factors involved in 60S ribosomal subunit formation, as well as the steps during which they bind and are released from the pre-60S, have been extensively studied in recent years (24, 33, 43), and Nop53 has been shown to bind pre-60S at the late nucleolar steps of maturation, at the same time as Rsa4 and Nog2, and to be released before the particle is

transported to the cytoplasm (44). The binding and release of Nop53 coincide with the cleavage at site C₂ in ITS2 and subsequent processing of 7S pre-rRNA by the exosome that will generate the intermediate 6S pre-rRNA (23). Depletion of Nop53 leads to the accumulation of the pre-rRNAs 27S and 7S (27–29), in agreement with its role in recruitment of the exosome. Nop53 has been shown to interact directly with the exosome catalytic subunit Rrp6 (30), and as shown here, this interaction is mediated by the N-terminal portion of Nop53, which includes a region encompassing the AIM motif required for the interaction with Mtr4 (45). The observation that partial deletions of the Nop53 AIM sequence cause the accumulation of 7S (a substrate for Rrp44) and of 5.8S + 30 (a substrate for Rrp6) (23) strongly suggests that the interaction of Nop53 with Rrp6 could be important during the 3' end handover from Rrp44 to Rrp6. Accordingly, it has recently been shown that during 7S pre-rRNA processing, Mtr4 directly binds the exosome subunit Rrp4, displacing the RNase domain of Rrp6, which becomes more exposed and available for other interactions (12). These observations, together with the results shown here, allow us to propose that Nop53 would be able to interact with Rrp6 concomitantly with the processing of 7S by Rrp44.

The recently resolved structure of the exosome-bound pre-60S particle containing 5.8S+30 pre-rRNA intermediate did not show clear cryo-EM density for Nop53 (12), indicating that Nop53 could be flexibly bound to pre-60S after processing by Rrp44 and formation of 5.8S+30. This observation is coherent with our postulation that Nop53 would be able to directly interact with different exosome subunits (Rrp6, Rrp45, Mtr4, and Mpp6) during 7S processing. Based on the position of the core exosome subunit Rrp45 and the cofactor Mpp6 on the same side of the complex (12), we can hypothesize that these interactions could play a role not only in the exosome recruitment to the pre-60S, but also in the proper positioning of the exosome during 7S processing by Rrp44 and even the hand over process to Rrp6 for trimming the remaining 5.8S+30.

In addition to recruiting and positioning the exosome, we show here that Nop53 also influences the release of the exosome from pre-ribosomal intermediates, because depletion of Nop53 causes the cosedimentation of the exosome with large mass complexes corresponding to pre-ribosomal particles. In the absence of Nop53, the exosome subunits Rrp43 and Rrp6, as well as the TRAMP subunit Trf4, were retained at the bottom of glycerol gradients as part of larger complexes. Confirming these results, we show that exosome subunits copurify more pre-ribosomal assembly factors upon depletion of Nop53 and, interestingly, earlier pre-rRNA processing factors than previously described.

The association of the exosome with pre-60S upon depletion of its recruiting factor Nop53 could be explained by the observation that Mtr4 binds pre-60S at an earlier stage than Nop53

Figure 5. Comparison of the proteins copurified with Rrp6 and Rrp43 that showed increased levels upon depletion of Nop53. A, Venn diagram depicting the identified proteins in at least two replicates coimmunoprecipitated with Rrp6 and Rrp43, whose levels were increased upon depletion of Nop53. B, schematics of pre-40S and pre-60S maturation pathways, depicting stages at which the identified proteins copurified with Rrp6 or Rrp43 associate with pre-ribosomes. Classification was based on Ref. 29. Proteins not classified are as follows: pre-40S proteins Rpa49 and Rpc19; pre-60S proteins Jip5 and Rrp12. No common proteins had their levels reduced upon depletion of Nop53.

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

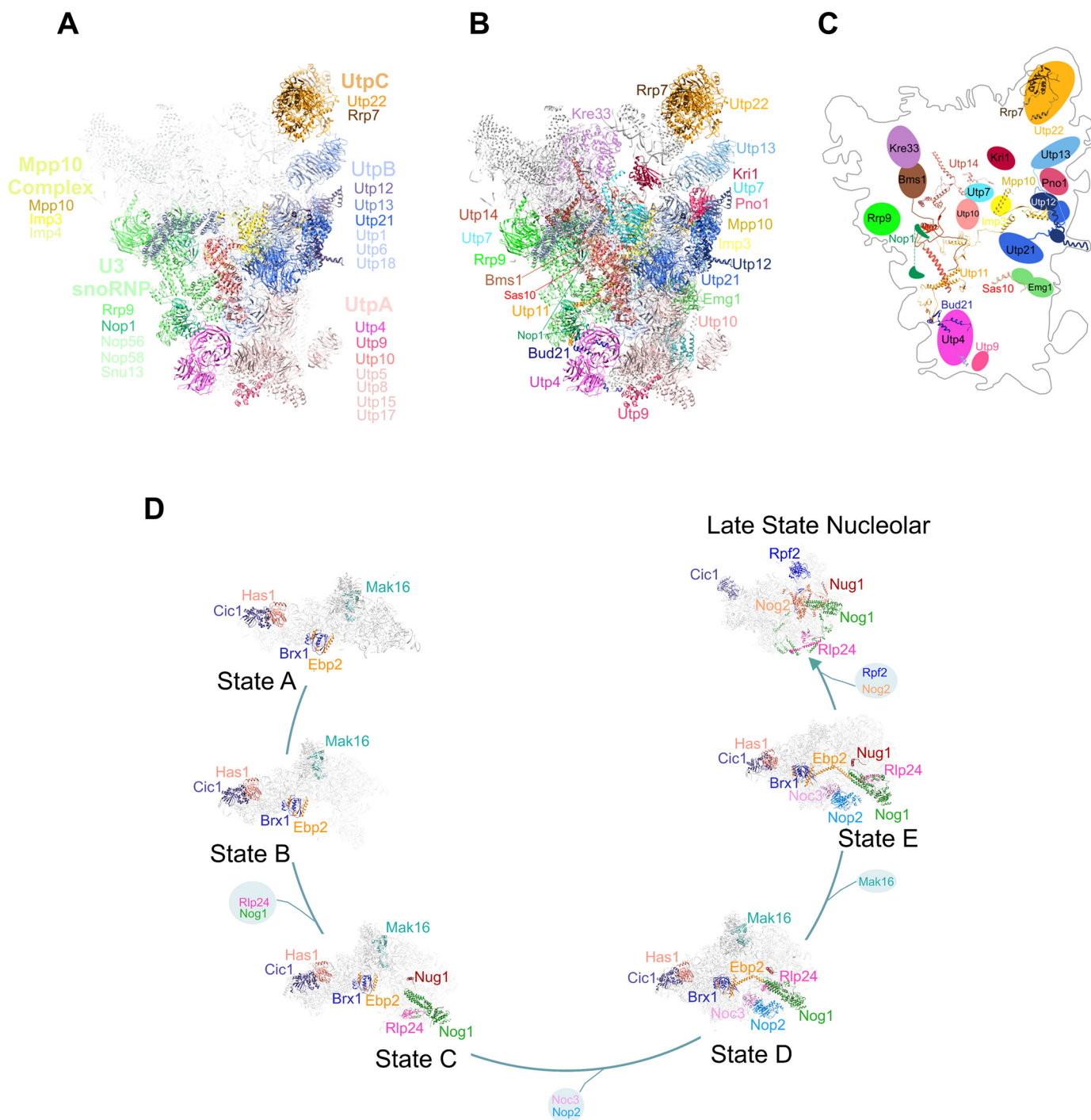


Figure 6. Proteins coimmunoprecipitated with the exosome in higher levels in the absence of Nop53 participate in different phases of ribosomal maturation. *A*, structural representation of 90S pre-ribosomes with the identified protein complexes are depicted in different colors as follows: pink, UTP-A; blue, UTP-B; orange, UTP-C; green, U3 snoRNP; yellow, Mpp10 complex. Proteins in *bold letters* are those indicated in Fig. 5B. The remaining parts of the particle are represented in *light gray*. *B*, individual proteins from the subcomplexes indicated in (*A*) are highlighted in different colors. *C*, schematics of the positions of the proteins in the 90S particle and their interactions within the particle. Note that all proteins interacting more efficiently with the exosome in the absence of Nop53 are exposed on the same face of 90S. Structure of the 90S particle was based on Ref. 37 (PDB 5WLC). *D*, representation of pre-60S maturation pathway, with the factors identified here *highlighted in different colors*. The exosome associates with various pre-60S intermediates in the absence of Nop53. Schematics show the interactions between the proteins identified here within the pre-60S. Structures of pre-60S particles were based on Refs. 25, 36. State A (PDB 6EM3), state B (PDB 6EM4), state C (PDB 6EM1), state D (PDB 6EM5), state E (PDB 6ELZ), and late nucleolar states (PDB 3JCT) are shown.

(26), and it could recruit the exosome by its interaction with Rrp6. Importantly, Mtr4 binds ITS2 sequence on pre-60S (23), allowing this protein to recruit the exosome, despite not correctly positioning it for processing of the 7S pre-rRNA. The interaction of early precursor rRNAs with the exosome identi-

fied by RNA coimmunoprecipitation experiments further suggests that the exosome may be recruited by other factors in addition to Nop53. This early nucleolar exosome association could be related to a surveillance mechanism allowing rapid degradation of misassembled particles to ensure the recycling

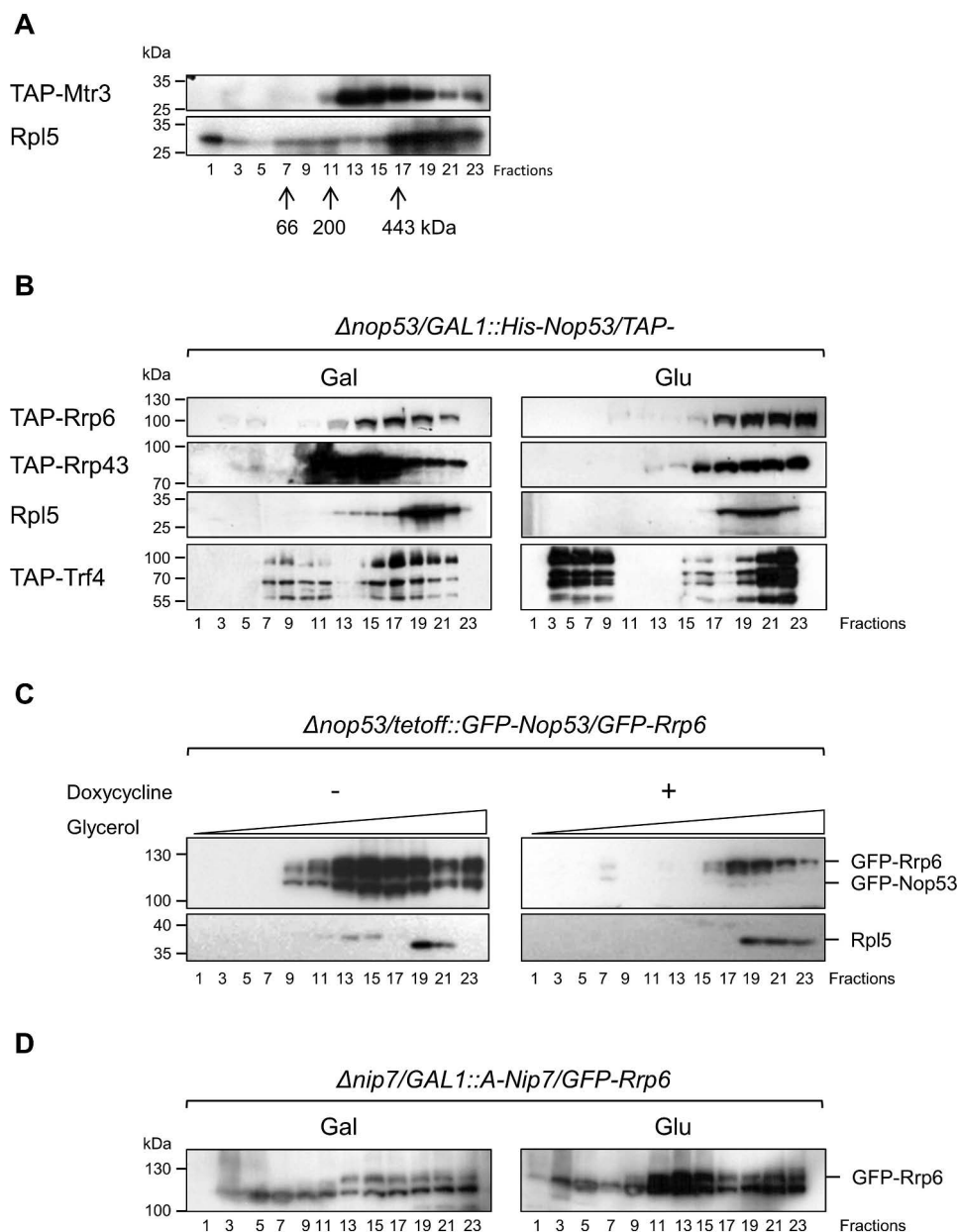


Figure 7. Nop53 affects exosome association with pre-60S. The conditional strain $\Delta nop53/GAL::NOP53$ was transformed with plasmids expressing either the exosome subunits Rrp43 and Rrp6 or the TRAMP subunit Trf4 fused to the TAP tag to monitor the association of these complexes to the pre-60S particle in the presence or absence of Nop53. *A*, cell extract from a strain expressing TAP-Mtr3 was subjected to centrifugation through the glycerol gradient for separation of soluble proteins from ribosomal particles. Rpl5 was used as a control for the 60S and pre-60S ribosomal subunit. Molecular mass markers were centrifuged in parallel, and their fractionation is indicated by *arrows*. *B*, fractionation of Rrp43, Rrp6, and Trf4 in the presence (*Gal*) or absence (*Glu*) of Nop53 shows their concentration in lower fractions of the gradient after depletion of Nop53. *C*, similar experiments with the conditional strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53$ -expressing GFP-Rrp6 show the same concentration of this exosome subunit in lower fractions after depletion of Nop53 (+ *doxycycline*). Numbers of fractions from the gradient are indicated. *D*, conditional strain $\Delta nip7/GAL::A-NIP7$ expressing GFP-Rrp6 was used as a control for a pre-60S maturation factor and shows that its depletion (*Glu*) does not affect Rrp6 fractionation.

of assembly factors (46). It would also allow a rapid recruitment for 7S trimming and 5' ETS degradation.

Utp18, a 90S pre-ribosomal particles subunit, has also been shown to interact with Mtr4 through an AIM domain (23), being important for the exosome recruitment to 90S particles. Although Rrp6 co-purifies more pre-rRNAs 35S and 23S upon depletion of Nop53, we did not find any significant change in the levels of Utp18 copurifying with Rrp6 in the presence or absence of Nop53. However, in addition to Utp18, other 90S subunits such as Sas10 and Lcp5 interact with the exosome (35)

and could recruit the exosome to these particles. Interestingly, Sas10 and other UTP-B subunits were found enriched among the proteins copurified with Rrp6 and Rrp43 in the absence of Nop53. Together with the increased copurification of 23S pre-rRNA, these observations strengthen the hypothesis that upon depletion of Nop53 the exosome could be found associated with the SSU processome, being recruited by Sas10 and other factors.

The retention of the exosome on nucleolar pre-60S particles upon depletion of Nop53 complements previous *in vitro* results

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

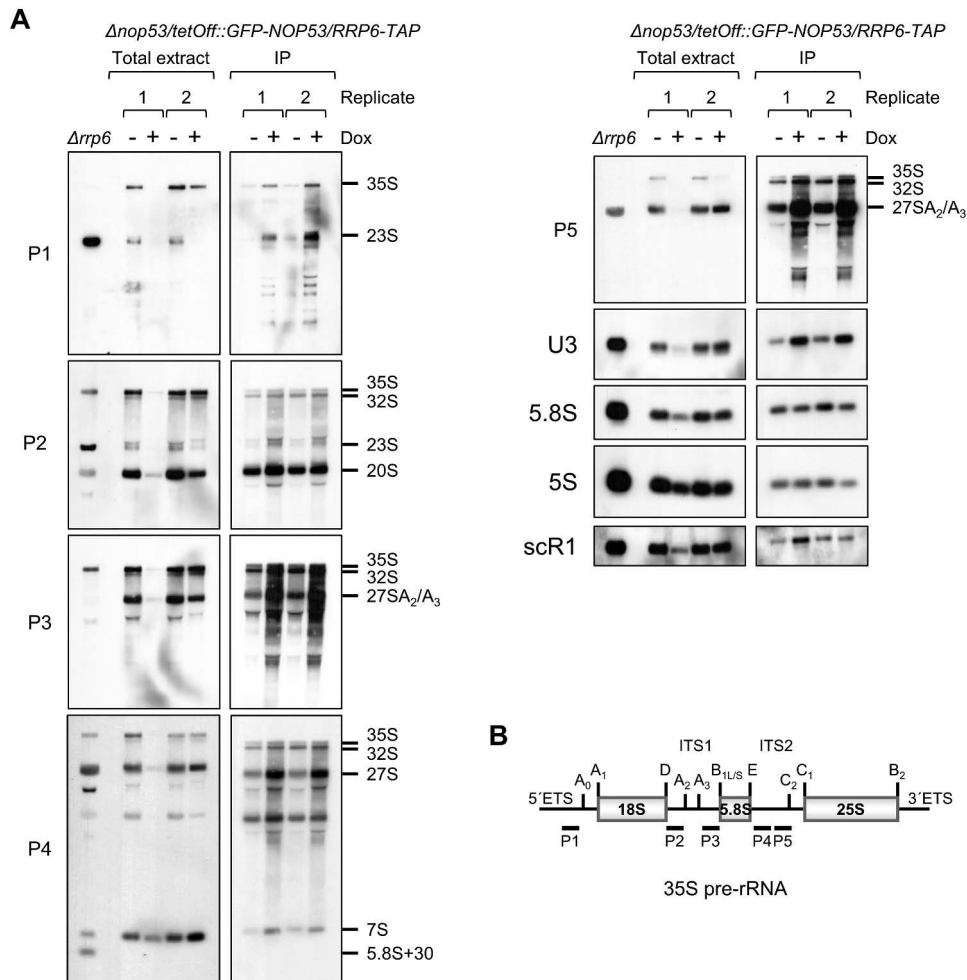


Figure 8. Rrp6-TAP co-purifies early precursor rRNAs. A, $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53/RRP6-TAP$ strain was used for RNA coimmunoprecipitation with Rrp6-TAP in the presence ($-Dox$ (doxycycline)), or absence ($+Dox$) of Nop53. Total RNA extracted from $\Delta rrp6$ strain was used as a control of precursor rRNAs accumulating in the absence of Rrp6. *Left panels* show two biological replicates of RNAs extracted from aliquots of total cell extracts in the indicated conditions used in the coimmunoprecipitations as shown on the *right panels*. Precursor rRNAs are indicated on the *right*. 5S rRNA and scR1 were used as controls for nonspecific binding to the resin. Total RNA extracted from replicate 1 in the absence of Nop53 ($+Dox$) was lost during loading on the gel, but it was maintained in the figure because it clearly shows the accumulation of 7S pre-rRNA under this condition. B, schematic representation of the yeast 35S pre-rRNA indicating the hybridizing positions of the different probes.

showing that when ITS2 processing is blocked, assembly factors comprising the foot structure of the pre-60S remain bound to these particles (33). Based on the results presented here, we propose a model in which the exosome may be correctly positioned on the pre-60S by the Nop53 interactions with Rrp6, Rrp45, and Mpp6. Furthermore, the identification of 90S, pre-40S, and early pre-60S assembly factors enriched with two of the exosome subunits, led us also to propose that the exosome is recruited in much earlier stages than previously predicted, opening the possibility for new interactors among the early assembly factors yet to be described.

Experimental procedures

Yeast strains manipulation

The maintenance and growth of yeast strains were carried out in minimal media (YNB) supplemented with required amino acids and were performed according to Ref. 47. The lithium acetate method was employed for yeast transformation (48). To deplete Nop53 expression, carbon source conditional-strains were shifted from galactose to glucose-containing

medium for 18 h, whereas conditional-strains regulated by the Tet-Off system (49) were grown in glucose-containing media and transferred to the same media supplemented with doxycycline (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 18 h. The full list of yeast strains used in this study is described in Table 1.

Plasmids

Plasmids constructed in this work were obtained either by restriction cloning or by using InFusion HD (Clontech) recombination cloning system. The full list of plasmids used in this study is described in Table 2.

Heterologous protein expression and GST-pulldown assay

GST and His₆-tag fusion proteins respectively encoded by pGEX4T1(GE Healthcare) and pET28(Novagen) vectors were expressed in BL21 CodonPlus(DE3)-RIL *E. coli* strain (Agilent Technologies), as described previously (30). 500 ml of induced culture were harvested, suspended in lysis buffer (A: 20 mM HEPES, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF; or B: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.8%

Table 1
Yeast strains used in this work

Strain	Genotype	Refs.
Δ nop53	<i>n MET15 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 NOP53::kanMX4</i>	29
Δ nop53/GAL::His-NOP53	Δ nop53, YCp111GAL::His-NOP53	29
Δ nop53/tetOff-GFP-NOP53	Δ nop53, ptetOff-GFP-NOP53	This study
Δ nop53/tetOff-GFP-NOP53/ RRP6-TAP	Δ nop53/tetOff-GFP-NOP53/YCp111-RRP6::TAP (<i>HIS3</i>)	This study
Δ nop53/tetOff-GFP-NOP53/ RRP43-TAP	Δ nop53/tetOff-GFP-NOP53/YCp111-RRP43::TAP (<i>HIS3</i>)	This study
Δ nop53/GAL::His-NOP53/TAP-RRP6	Δ nop53, YCp111GAL::His-NOP53, pMET-TAP-RRP6	This study
Δ nop53/GAL::His-NOP53/TAP-RRP43	Δ nop53, YCp111GAL::His-NOP53, pMET-TAP-RRP43	This study
Δ nop53/GAL::His-NOP53/TAP-TRF4	Δ nop53, YCp111GAL::His-NOP53, pMET-TAP-TRF4	This study
Δ nop53/TAP-NOP53	Δ nop53, pMET-TAP-NOP53	This study
Δ nop53/tetOff-GFP-NOP53/GFP-Rrp6	Δ nop53, ptetOff-GFP-NOP53, pUG34-Rrp6	This study
Mtr3-TAP	MATa; ura3-52; leu2-3,112; YGR158c::TAP-KIURA3	Euroscarf [®]
Δ nip7/GAL::A-NIP7	MATa; <i>ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 nip7::HIS3 p[LEU2 ARS1 GAL1::NIP7]</i>	59

Table 2
List of plasmids used in this work

Plasmid	Description	Refs.
YCp111GAL::His-NOP53	<i>GAL1::His-NOP53, LEU2, CEN4</i>	29
yCp111 tetoff-GFP-NOP53	<i>tetO-CYC1::GFP-NOP53, LEU2, CEN4</i>	This study
ptetOff-GFP-NOP53	<i>tetO-CYC1::GFP-NOP53, URA3, CEN4</i>	This study
pMET-TAP-Rrp43	<i>MET25::TAP-RRP43, HIS3, CEN6</i>	50
pMET-TAP-Rrp6	<i>MET25::TAP-RRP6, HIS3, CEN6</i>	This study
pMET-TAP-Nop53	<i>MET25::TAP-NOP53, HIS3, CEN6</i>	This study
pMET-TAP-Trf4	<i>MET25::TAP-TRF4, HIS3, CEN6</i>	This study
pUG34-Rrp6	<i>MET25::GFP-RRP6, HIS3, CEN6</i>	60
pUG34-Rrp44	<i>MET25::GFP-RRP44, HIS3, CEN6</i>	This study
pET28a-Nop53	<i>6xHis::NOP53, Kan^R</i>	30
pET-Rrp45	<i>6xHis::RRP45, Kan^R</i>	61
pET-Rrp40	<i>6xHis::RRP40, Kan^R</i>	61
pET-Rrp6	<i>6xHis::RRP6, Kan^R</i>	This study
pGEX4T1	<i>GST, Amp^R</i>	GE Healthcare
pGEX4T1-Nop53	<i>GST::Nop53, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Nop53(1-80)	<i>GST::Nop53 1-80, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Nop53(81-157)	<i>GST::Nop53 81-157, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Nop53(161-230)	<i>GST::Nop53 161-230, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Nop53(1-300)	<i>GST::Nop53 1-300, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Nop53(301-380)	<i>GST::Nop53 301-380, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Nop53(382-455)	<i>GST::Nop53 382-455, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Mpp6	<i>GST::Mpp6, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Rrp44	<i>GST::Rrp44, Amp^R</i>	This study
pGEX4T1-Rrp6	<i>GST::Rrp6, Amp^R</i>	30

Nonidet, 1 mM PMSE, 1 mM DTT), and lysed using a French press. Buffer A was used in the interaction assay between GST-Nop53 and His-tagged exosome subunits, and buffer B was employed both in the interaction assay between His-Rrp6 and GST-Nop53 truncation mutants and in the pulldown assay between His-Nop53 and GST-fused exosome subunits. Total cellular extract was cleared by 17,000 rpm centrifugation for 30 min at 4 °C. GST-Nop53 truncation mutants were purified through affinity, followed by size-exclusion chromatography in buffer B. GST fusion proteins were incubated with 50 μ l of pre-equilibrated GSH-Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h at 4 °C. After extensive washing with lysis buffer, the cleared total extract containing the His₆-tag fusion protein was added to the beads and incubated for 1 h at 4 °C. Extensive washing of the bound proteins with lysis buffer with higher ionic strength (250 mM NaCl) was performed before elution with 10 mM reduced GSH, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. As a negative control for unspecific interaction, GST-covered beads were incubated with the extract of His-tagged protein of study. Fractions of flow-through and wash were collected after incubation with both cellular extracts, and together with total extract and elution were resolved through SDS-PAGE separation and analyzed by Western blotting with anti-GST (Sigma) and anti-His (Sigma).

Protein coimmunoprecipitation

Rrp6-TAP, Rrp43-TAP, and TAP (tandem affinity purification) tag separately expressed in the carbon-source conditional strain Δ nop53/tetOff::GFP-NOP53 grown in glucose-containing medium in the absence or presence of doxycycline (expression or depletion of Nop53, respectively) were used in coimmunoprecipitation experiments. The affinity purification procedure was carried out as described previously (50). For both conditions, 5 liters of cells grown to an OD₆₀₀ of 1.0 were harvested by centrifugation, resuspended in resuspension buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5% glycerol, 1 mM PMSF) and flash-frozen in liquid N₂. The total cellular extract that was obtained by grinding in a Ball Mill device (Retsch, Mixer Mill MM 200) was cleared by centrifugation at 40,000 rpm for 1 h at 4 °C. The cleared supernatant was then incubated for 2 h at 4 °C with IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) previously equilibrated with resuspension buffer. After extensive washing with the same buffer, elution of the bound proteins was performed by incubation with 500 mM ammonium hydroxide for 20 min (51).

Sample preparation

The protein content was quantified by Bradford assay. 75 μ g of protein were reduced with 5 mM of DTT at 56 °C for 25 min. All samples were cooled to room temperature and incubated in the dark with 14 mM of iodoacetamide for 30 min. Afterward, the samples were digested for 16 h with sequence grade modified trypsin at a 1:50 (E:S) ratio at 37 °C. Following digestion, all reactions were acidified with 10% (v/v) TFA (0.4% v/v final concentration) to stop proteolysis. Desalting was carried out using SepPak C18 cartridges (Waters).

MS/MS analysis

Peptide samples were suspended in 0.1% formic acid and analyzed two times. The setup used a Proxeon EASY-nLC II coupled online with an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). The peptide mixture was loaded in a 100- μ m inner diameter \times 2-cm trap column (Dr. Maish-ReproSil-Pur C18-AQ, 5- μ m beads) and was separated using a New Objective PicoFrit[®] column (25 cm length \times 75- μ m inner diameter) packed in-house with ReproSil-Pur C18-AQ 3 μ m resin (Dr. Maisch GmbH HPLC). The flow rate was 200 nl/min, and we applied a 90-min gradient using the steps 95% of mobile phase A (5% acetonitrile in 0.1% formic acid) to 40% of mobile phase B (95% acetonitrile in 0.1% formic acid) for 75 min, 40-95% of B for 5 min, and 95% of B for 10 min. After each run,

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

the trap column and column were equilibrated with mobile phase A. The LTQ-Orbitrap Velos instrument was set to data-dependent acquisition to automatically switch between full-scan MS and MS/MS acquisition with a dynamic exclusion of 90 s. Survey scans (375–2,000 m/z) were acquired in the Orbitrap system with a resolution of 60,000 at m/z 400. The 10 most intense ions, excluding unassigned and 1+ charge state, were sequentially isolated and fragmented using collision-induced dissociation with a normalized collision energy of 30. The fragment ions were analyzed in the LTQ.

Peptide spectrum matching (PSM)

The data analysis was performed with the PatternLab for proteomics 4.1.1.4 software that is freely available at <http://www.patternlabforproteomics.org> (52). The sequences from *S. cerevisiae* were downloaded on May 7th, 2019, from the UniProtKB/Swiss-Prot, and then a target-decoy database was generated to include a reversed version of each sequence plus those from 127 common MS contaminants. The number of entries in the database was 12,344 (6049 forward sequences, 6172 decoys, and 123 contaminant sequences). The Comet 2016.01 revision 3 search engine was used for identifying the mass spectra (53). The following search parameters were considered: fully and semi-tryptic peptide candidates with masses between 550 and 5500 Da, up to two missed cleavages, 40 ppm for precursor mass, and bins of 1.0005 m/z for MS/MS. The modifications were carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine as fixed and variable, respectively. Mass spectrometry raw data is shown in Table S4.

Validation of PSMs

The validity of the peptide spectrum matches was assessed using Search Engine Processor (SEPro) (54, 55). The identifications were grouped by charge state (2+ and $\geq 3+$), and then by tryptic status, resulting in four distinct subgroups. For each group, the XCorr, DeltaCN, DeltaPPM, and Peaks Matches values were used to generate a Bayesian discriminator. The identifications were sorted in nondecreasing order according to the discriminator score. A cutoff score was accepting an FDR of 1% at the peptide level based on the number of decoys. This procedure was independently performed on each data subset, resulting in an FDR that was independent of charge state or tryptic status. Additionally, a minimum sequence length of five amino acid residues and a protein score greater than 3 were imposed. Finally, identifications deviating by more than 10 ppm from the theoretical mass were discarded. This last filter led to FDRs, now at the protein level, to be lower than 1% for all search results (56).

Relative quantitation of proteins

A label-free protein quantitative analysis was performed with PatternLab's XIC (57) module allowing up to 20 ppm deviation from the precursor. Differentially abundant proteins were pinpointed using PatternLab's TFold module (58). The differential proteomic comparison only considered proteins identified with two or more unique peptides. Only proteins present in at least two technical replicates were considered for the TFold analysis. The PatternLab's Venn diagram module was used to pinpoint

proteins uniquely identified to a condition; likewise, only proteins identified in two replicates were considered.

Immunoblot

Protein samples resuspended in loading buffer were resolved by SDS-PAGE (in Tris-Glycine Buffer) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare). Western blotting assays were carried out using as primary antibodies anti-GST (Sigma), anti-GFP (Sigma), anti-CBP (Millipore), anti-polyHis (Sigma), and anti-Rpl5 (gift from Dr. C. F. Zanelli). The secondary antibodies employed, anti-rabbit IgG (GE Healthcare®) and anti-mouse IgG (GE Healthcare), were both conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Protein detection was carried out using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

Glycerol gradient sedimentation

Cleared total yeast extracts obtained from 2-liter cultures by grinding with a Ball Mill device (Retsch, Mixer Mill MM 200) were quantified for protein content with bicinchoninic acid (BCA, Sigma) method. Approximately 10 mg of total protein were loaded on the top of a 12-ml linear glycerol gradient 10–30% (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM PMSF) previously obtained using a Gradient Master device (Biocomp®). The samples were subjected to a 40,000 rpm centrifugation for 16 h at 4 °C in a Hitachi ultracentrifuge. Using an EconoSystem (Bio-Rad), each gradient was aliquoted in 24,500- μ l fractions, whereas the sedimentation profile was monitored by an A_{260} measurement. The gradient fractions were then either precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) before SDS-PAGE separation for protein detection by immunoblot or subjected to RNA extraction for Northern blot analysis.

Coimmunoprecipitation of RNAs

Total cellular extracts were prepared from strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53/RRP6-TAP$ growing in the presence or absence of doxycycline (depletion or expression of Nop53, respectively) and added to IgG-Sepharose beads (Amersham Biosciences). Immunoprecipitation was performed at 4 °C for 2 h. IgG-Sepharose beads were washed with buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 5% glycerol, 1 mM PMSF), and RNA was isolated from bound fractions by adding phenol directly to the beads. After precipitation, the recovered RNA was denatured and separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels and transferred to nylon membranes. For comparison, 20 μ g of RNA from total extract was loaded on the gel. Hybridization was performed using biotin-labeled probes specific to rRNAs. 5S rRNA and scR1 were used as controls for nonspecific binding to the resin. Quantification of bands from Northern hybridizations were performed with ImageJ software.

Author contributions—L. P. P. C., F. F. B., and C. C. O. conceptualization; L. P. P. C., F. F. B., R. M. S., M. D. S., F. C. N., and C. C. O. formal analysis; F. C. N. and C. C. O. supervision; C. C. O. funding acquisition; L. P. P. C., F. F. B., and R. M. S. validation; L. P. P. C., F. F. B., and R. M. S. investigation; L. P. P. C., F. F. B., R. M. S., M. D. S., F. C. N., and C. C. O. writing-original draft; C. C. O. project administration; M. D. S. software; L. P. P. C., F. F. B., and C. C. O. visualization.

Acknowledgments—We thank Dr. Clelei F. Zanelli (UNESP, Araraquara, SP, Brazil) for the kind gift of antibodies and Frederico Gueiros Filho for the use of the fluorescence microscope.

References

- de la Cruz, J., Karbstein, K., and Woolford, J. L., Jr. (2015) Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes *in vivo*. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 93–129 [CrossRef Medline](#)
- Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2017) A puzzle of life: crafting ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 640–654 [CrossRef Medline](#)
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002) Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 313–318 [CrossRef Medline](#)
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**, 5399–5410 [CrossRef Medline](#)
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' → 5' exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466 [CrossRef Medline](#)
- Liu, Q., Greimann, J. C., and Lima, C. D. (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**, 1223–1237 [CrossRef Medline](#)
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Séraphin, B. (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 15–22 [CrossRef Medline](#)
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**, 993–996 [CrossRef Medline](#)
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**, 2148–2158 [CrossRef Medline](#)
- Briggs, M. W., Burkard, K. T., and Butler, J. S. (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 13255–13263 [CrossRef Medline](#)
- Zinder, J. C., and Lima, C. D. (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev.* **31**, 88–100 [CrossRef Medline](#)
- Schuller, J. M., Falk, S., Fromm, L., Hurt, E., and Conti, E. (2018) Structure of the nuclear exosome captured on a maturing pre-ribosome. *Science* **360**, 219–222 [CrossRef Medline](#)
- Wasmuth, E. V., Zinder, J. C., Zattas, D., Das, M., and Lima, C. D. (2017) Structure and reconstitution of yeast Mpp6–nuclear exosome complexes reveals that Mpp6 stimulates RNA decay and recruits the Mtr4 helicase. *Elife* **6**, e29062 [CrossRef Medline](#)
- Feigenbutz, M., Garland, W., Turner, M., and Mitchell, P. (2013) The exosome cofactor Rrp47 is critical for the stability and normal expression of its associated exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **8**, e80752 [CrossRef Medline](#)
- Makino, D. L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **524**, 54–58 [CrossRef Medline](#)
- Schuch, B., Feigenbutz, M., Makino, D. L., Falk, S., Basquin, C., Mitchell, P., and Conti, E. (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J.* **33**, 2829–2846 [CrossRef Medline](#)
- Falk, S., Weir, J. R., Hentschel, J., Reichelt, P., Bonneau, F., and Conti, E. (2014) The molecular architecture of the TRAMP complex reveals the organization and interplay of its two catalytic activities. *Mol. Cell* **55**, 856–867 [CrossRef Medline](#)
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**, 713–724 [CrossRef Medline](#)
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998) Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**, 1128–1140 [CrossRef Medline](#)
- Weir, J. R., Bonneau, F., Hentschel, J., and Conti, E. (2010) Structural analysis reveals the characteristic features of Mtr4, a DExH helicase involved in nuclear RNA processing and surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12139–12144 [CrossRef Medline](#)
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* **21**, 5539–5547 [CrossRef Medline](#)
- Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linneemann, J., Hierlmeier, T., Perez-Fernandez, J., Kumcuoglu, B., Leger-Silvestre, I., Faubladier, M., Griesenbeck, J., Woolford, J., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2013) Studies on the assembly characteristics of large subunit ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **8**, e68412 [CrossRef Medline](#)
- Thoms, M., Thomson, E., Bassler, J., Gnädig, M., Griesel, S., and Hurt, E. (2015) The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell* **162**, 1029–1038 [CrossRef Medline](#)
- Wu, S., Tan, D., Woolford, J. L., Jr, Dong, M. Q., and Gao, N. (2017) Atomic modeling of the ITS2 ribosome assembly subcomplex from cryo-EM together with mass spectrometry-identified protein–protein crosslinks. *Protein Sci.* **26**, 103–112 [CrossRef Medline](#)
- Wu, S., Tutuncuoglu, B., Yan, K., Brown, H., Zhang, Y., Tan, D., Gamalinda, M., Yuan, Y., Li, Z., Jakovljevic, J., Ma, C., Lei, J., Dong, M. Q., Woolford, J. L., Jr., and Gao, N. (2016) Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature* **534**, 133–137 [CrossRef Medline](#)
- Biedka, S., Micic, J., Wilson, D., Brown, H., Diorio-Toth, L., and Woolford, J. L., Jr. (2018) Hierarchical recruitment of ribosomal proteins and assembly factors remodels nucleolar pre-60S ribosomes. *J. Cell Biol.* **217**, 2503–2518 [CrossRef Medline](#)
- Sydorsky, Y., Dilworth, D. J., Halloran, B., Yi, E. C., Makhnevych, T., Wozniak, R. W., and Aitchison, J. D. (2005) Nop53p is a novel nucleolar 60S ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochem. J.* **388**, 819–826 [CrossRef Medline](#)
- Thomson, E., and Tollervey, D. (2005) Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA* **11**, 1215–1224 [CrossRef Medline](#)
- Granato, D. C., Gonzales, F. A., Luz, J. S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G. M., and Oliveira, C. C. (2005) Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* **272**, 4450–4463 [CrossRef Medline](#)
- Granato, D. C., Machado-Santelli, G. M., and Oliveira, C. C. (2008) Nop53p interacts with 5.8S rRNA cotranscriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS J.* **275**, 4164–4178 [CrossRef Medline](#)
- Gasse, L., Flemming, D., and Hurt, E. (2015) Coordinated ribosomal ITS2 RNA processing by the Las1 complex integrating endonuclease, polynucleotide kinase, and exonuclease activities. *Mol. Cell* **60**, 808–815 [CrossRef Medline](#)
- Konikkat, S., and Woolford, J. L., Jr. (2017) Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem. J.* **474**, 195–214 [CrossRef Medline](#)
- Fromm, L., Falk, S., Flemming, D., Schuller, J. M., Thoms, M., Conti, E., and Hurt, E. (2017) Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome. *Nat. Commun.* **8**, 1787 [CrossRef Medline](#)
- Januszky, K., and Lima, C. D. (2014) The eukaryotic RNA exosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 132–140 [CrossRef Medline](#)
- Klinge, S., and Woolford, J. L., Jr. (2019) Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 116–131 [CrossRef Medline](#)
- Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Cheng, J., Ismail, S., Ahmed, Y. L., Bange, G., Kressler, D., Berninghausen, O., Sinning, I., Hurt, E., and Beckmann, R. (2017) Visualizing the assembly pathway of nucleolar pre-60S ribosomes. *Cell* **171**, 1599–1610.e14 [CrossRef Medline](#)

Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S

37. Barandun, J., Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Molloy, K. R., Chait, B. T., and Klinge, S. (2017) The complete structure of the small-subunit processome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 944–953 [CrossRef Medline](#)
38. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., and Mering, C. V. (2019) STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 [CrossRef Medline](#)
39. Zanchin, N. I., and Goldfarb, D. S. (1999) The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1283–1288 [CrossRef Medline](#)
40. Callahan, K. P., and Butler, J. S. (2008) Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6645–6655 [CrossRef Medline](#)
41. Oliveira, C. C., Gonzales, F. A., and Zanchin, N. I. (2002) Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit Rrp43p show a deficiency in mRNA degradation and no longer interact with the exosome. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4186–4198 [CrossRef Medline](#)
42. Choque, E., Schneider, C., Gadal, O., and Dez, C. (2018) Turnover of aberrant pre-40S pre-ribosomal particles is initiated by a novel endonucleolytic decay pathway. *Nucleic Acids Res.* **46**, 4699–4714 [CrossRef Medline](#)
43. Sanghai, Z. A., Miller, L., Molloy, K. R., Barandun, J., Hunziker, M., Chaker-Margot, M., Wang, J., Chait, B. T., and Klinge, S. (2018) Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature* **556**, 126–129 [CrossRef Medline](#)
44. Biedka, S., Wu, S., LaPeruta, A. J., Gao, N., and Woolford, J. L., Jr. (2017) Insights into remodeling events during eukaryotic large ribosomal subunit assembly provided by high resolution cryo-EM structures. *RNA Biol.* **14**, 1306–1313 [CrossRef Medline](#)
45. Falk, S., Tants, J. N., Basquin, J., Thoms, M., Hurt, E., Sattler, M., and Conti, E. (2017) Structural insights into the interaction of the nuclear exosome helicase Mtr4 with the pre-ribosomal protein Nop53. *RNA* **23**, 1780–1787 [CrossRef Medline](#)
46. Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koš-Braun, I., Koš, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R., and Hurt, E. (2016) Architecture of the 90S pre-ribosome: a structural view on the birth of the eukaryotic ribosome. *Cell* **166**, 380–393 [CrossRef Medline](#)
47. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* **194**, 1–863 [Medline](#)
48. Chen, D. C., Yang, B. C., and Kuo, T. T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet* **21**, 83–84 [CrossRef Medline](#)
49. Gossen, M., and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5547–5551 [CrossRef Medline](#)
50. Lourenço, R. F., Leme, A. F., and Oliveira, C. C. (2013) Proteomic analysis of yeast mutant RNA exosome complexes. *J. Proteome Res.* **12**, 5912–5922 [CrossRef Medline](#)
51. Ohmayer, U., Gil-Hernández, Á., Sauert, M., Martín-Marcos, P., Tamame, M., Tschochner, H., Griesenbeck, J., and Milkereit, P. (2015) Studies on the coordination of ribosomal Protein assembly events involved in processing and stabilization of yeast early large ribosomal subunit precursors. *PLoS ONE* **10**, e0143768 [CrossRef Medline](#)
52. Carvalho, P. C., Lima, D. B., Leprevost, F. V., Santos, M. D., Fischer, J. S., Aquino, P. F., Moresco, J. J., Yates, J. R., 3rd., and Barbosa, V. C. (2016) Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* **11**, 102–117 [CrossRef Medline](#)
53. Eng, J. K., Hoopmann, M. R., Jahan, T. A., Egerton, J. D., Noble, W. S., and MacCoss, M. J. (2015) A deeper look into Comet—implementation and features. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **26**, 1865–1874 [CrossRef Medline](#)
54. Carvalho, P. C., Fischer, J. S., Xu, T., Cociorva, D., Balbuena, T. S., Valente, R. H., Perales, J., Yates, J. R., 3rd., and Barbosa, V. C. (2012) Search engine processor: filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics* **12**, 944–949 [CrossRef Medline](#)
55. Yates, J. R., 3rd., Park, S. K., Delahunty, C. M., Xu, T., Savas, J. N., Cociorva, D., and Carvalho, P. C. (2012) Toward objective evaluation of proteomic algorithms. *Nat. Methods* **9**, 455–456 [CrossRef Medline](#)
56. Barboza, R., Cociorva, D., Xu, T., Barbosa, V. C., Perales, J., Valente, R. H., França, F. M., Yates, J. R., 3rd., and Carvalho, P. C. (2011) Can the false-discovery rate be misleading? *Proteomics* **11**, 4105–4108 [CrossRef Medline](#)
57. Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S. C., and Haynes, P. A. (2011) Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* **11**, 535–553 [CrossRef Medline](#)
58. Carvalho, P. C., Yates, J. R., 3rd., and Barbosa, V. C. (2012) Improving the TFC test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* **28**, 1652–1654 [CrossRef Medline](#)
59. Zanchin, N. I., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D. S. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5001–5015 [CrossRef Medline](#)
60. Gonzales-Zubiate, F. A., Okuda, E. K., Da Cunha, J. P. C., and Oliveira, C. C. (2017) Identification of karyopherins involved in the nuclear import of RNA exosome subunit Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **292**, 12267–12284 [CrossRef Medline](#)
61. Luz, J. S., Tavares, J. R., Gonzales, F. A., Santos, M. C., and Oliveira, C. C. (2007) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie* **89**, 686–691 [CrossRef Medline](#)

Ribosome maturation factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles

Cepeda et al.

Supporting information

Figure S1. Rrp6 coimmunoprecipitates GFP-Nop53

Figure S2. Different proteins were co-purified with Rrp6 upon Nop53 depletion

Figure S3. Interaction network of the proteins copurified with Rrp6 or Rrp43 upon depletion of Nop53

Figure S4. Nop53 does not affect the exosome assembly/stability

Figure S5. Separation of markers through glycerol gradient centrifugation

Figure S6. Exosome sediments with large complexes in the absence of Nop53

Figure S7. Rrp6-TAP copurifies early pre-rRNAs

Figure S8. Depletion of Nop53 does not affect Rrp6 subcellular localization

Table S1. List of the proteins grouped in a Venn diagram (Fig. 2A)

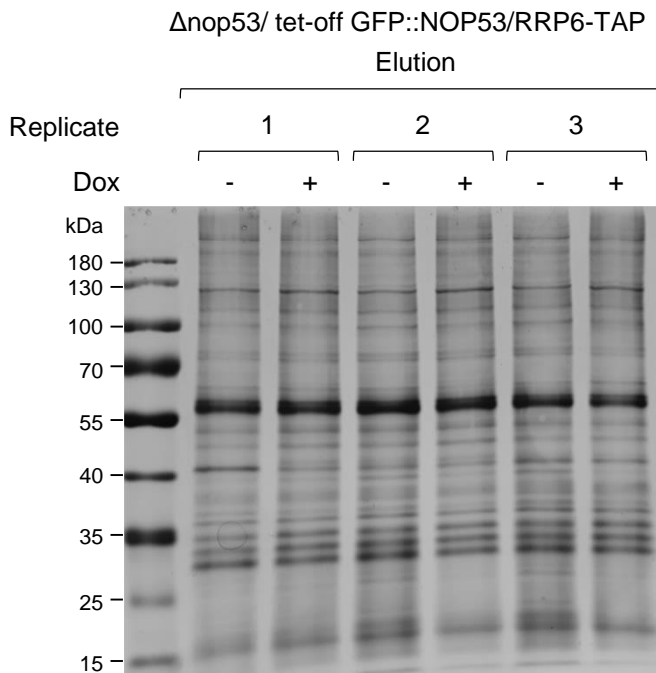
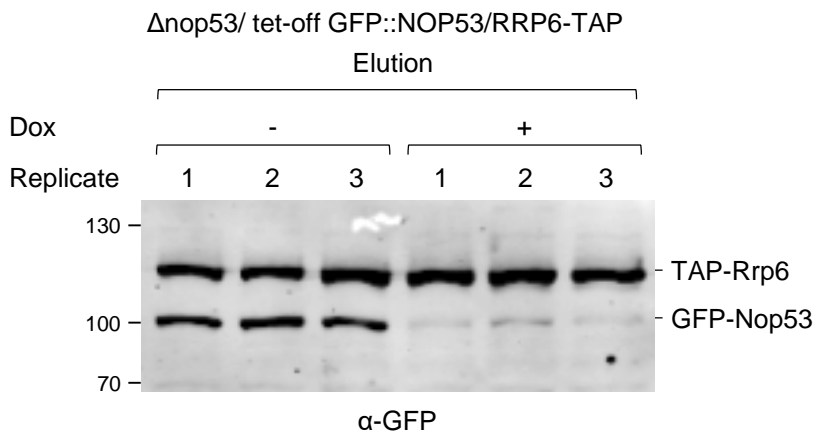
Table S2. List of the proteins shown in a volcano plot (Fig. 2B)

Table S3. List of the proteins grouped in a Venn diagram (Fig. 4)

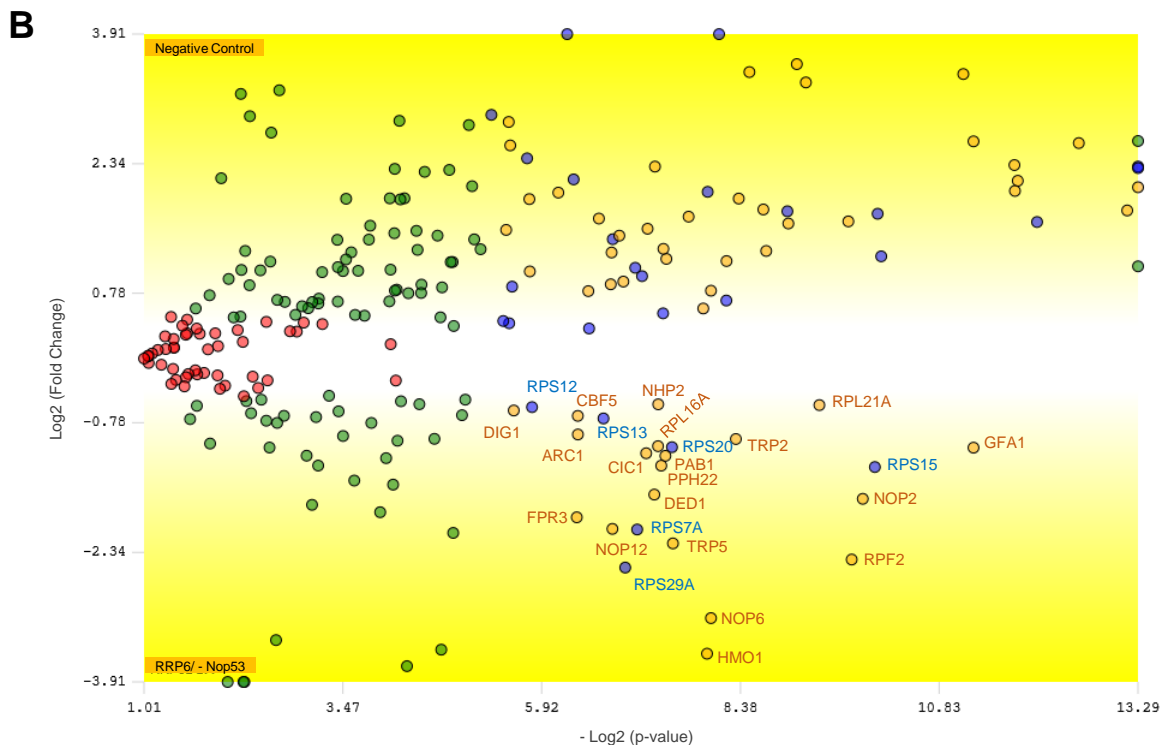
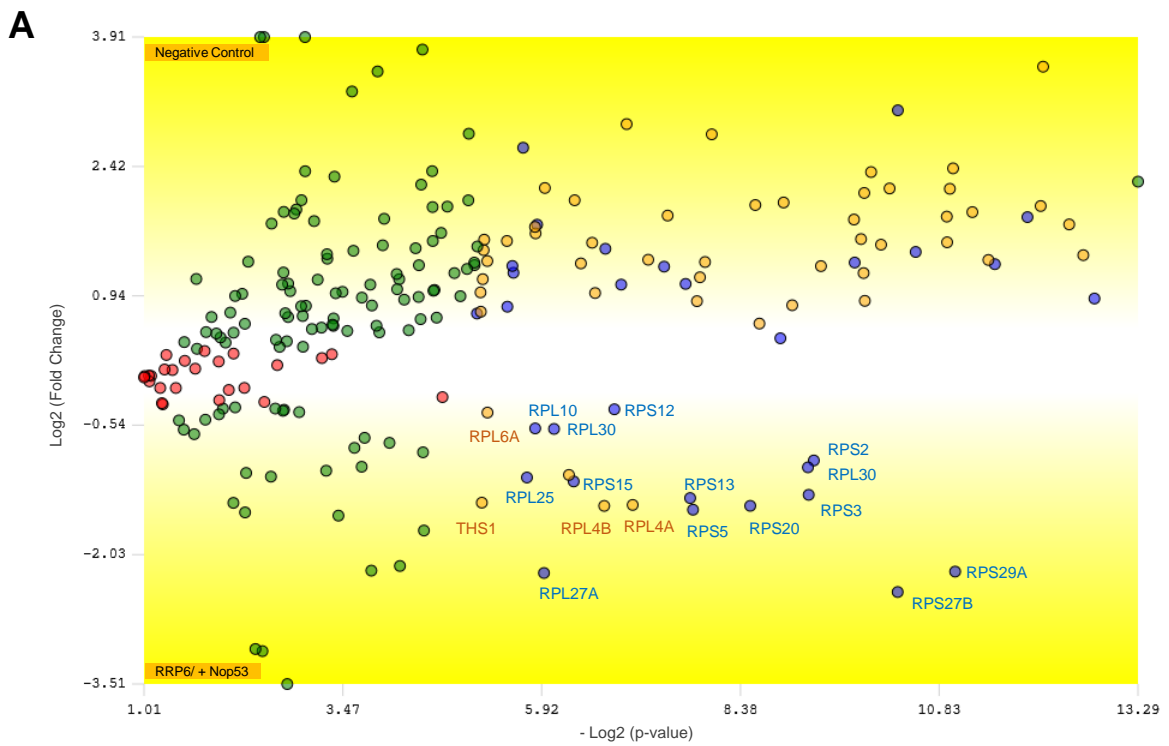
Experimental Procedure

Fluorescence microscopy

Cells were fixed in 70% methanol for 15 minutes, rinsed with cold phosphate-buffered saline (PBS). Cells were observed using a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with filters for green fluorescence (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) and red fluorescence (Texas Red BrightLine set; TXRED4040-B, Semrock). The exposure times varied from 1 to 3 seconds. Images were processed and analyzed using the programs Nis Elements (version 3.07; Nikon) and ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

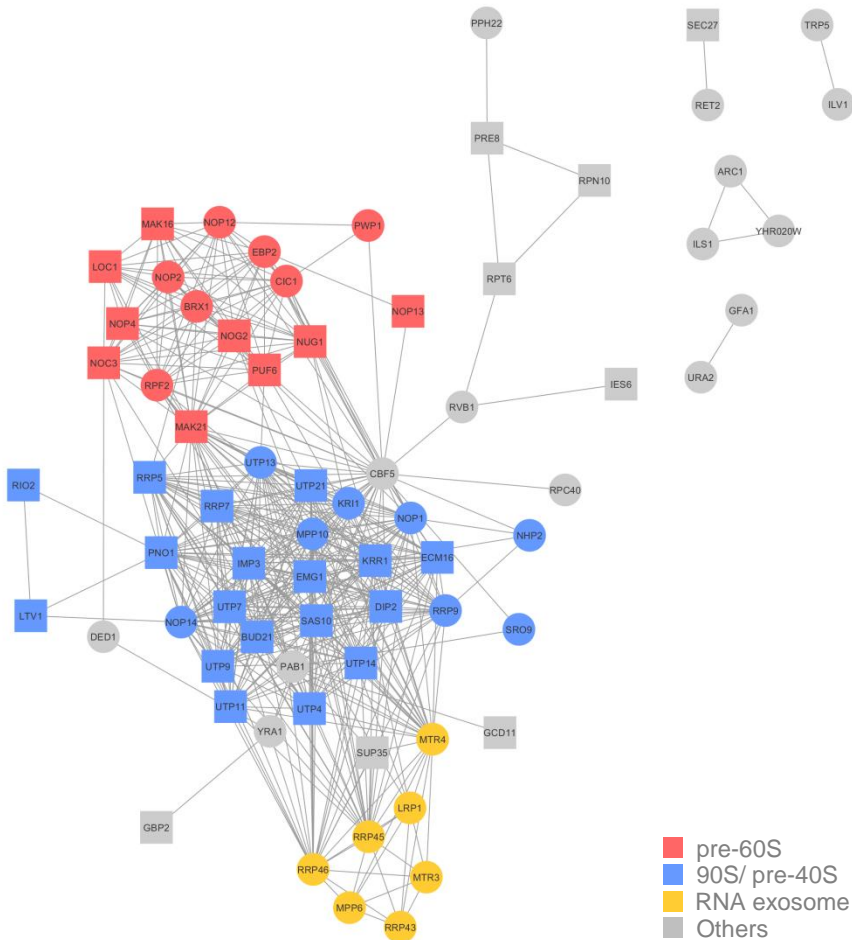
A**B**

Supp. Figure S1. Rrp6 coimmunoprecipitates GFP-Nop53. To evaluate the effect of Nop53 on the Rrp6 interactome, coimmunoprecipitation assays were performed using the conditional strain $\Delta nop53/tetOff::GFP-NOP53$ carrying the endogenous Rrp6-TAP fusion grown both in the presence (- doxycycline) and absence (+ doxycycline) of Nop53. Both conditions were analyzed in biological triplicates. An aliquot of each elution was resolved by SDS-PAGE and both analyzed by silver staining (**A**) and by western blotting against GFP (**B**), showing that GFP-Nop53 was co-purified with Rrp6, and that the treatment with doxycycline was sufficient to deplete GFP-Nop53.

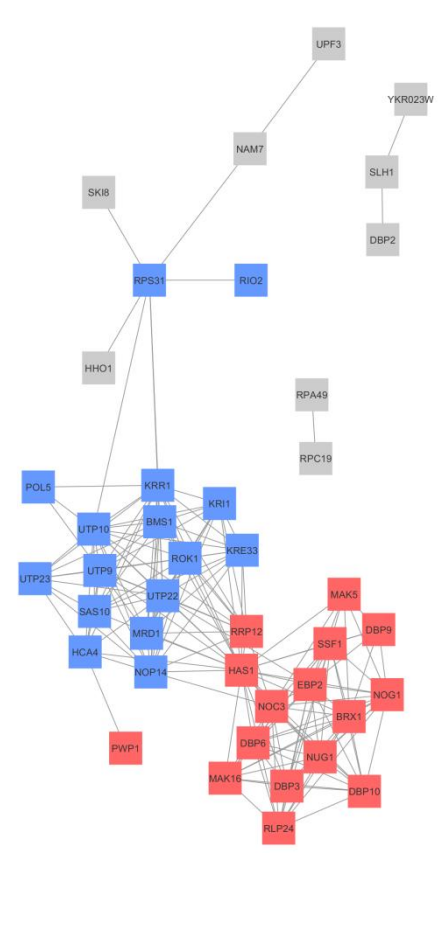


Supp. Figure S2. Different proteins were co-purified with Rrp6 upon Nop53 depletion. As shown in Fig. 3A, 21 and 30 proteins were detected both in the negative control and respectively copurified with Rrp6 in the presence and absence of Nop53. Moreover, 199 proteins were detected in all the three groups. To evaluate which of these proteins (in at least two replicates per group) were significantly enriched with Rrp6 in the presence and absence of Nop53, two independent TFold analyses (BH q-value 0.05; F-Stringency 0.030; L-Stringency 0.400) were performed. The quantitative comparison of proteins copurified with Rrp6 (bottom) and the negative control (top), in the presence (**A**) and upon depletion (**B**) of Nop53, shows in red proteins that did not show a statistically significant change, in green, those that met the fold change criteria, but were not statistically significant, in orange, those proteins of low abundance that met both the fold change and statistical criteria, and in blue, those that met both the fold change and statistical criteria. Listed in blue and orange are only the proteins copurified with Rrp6 significantly enriched relative to the negative control.

Rrp6



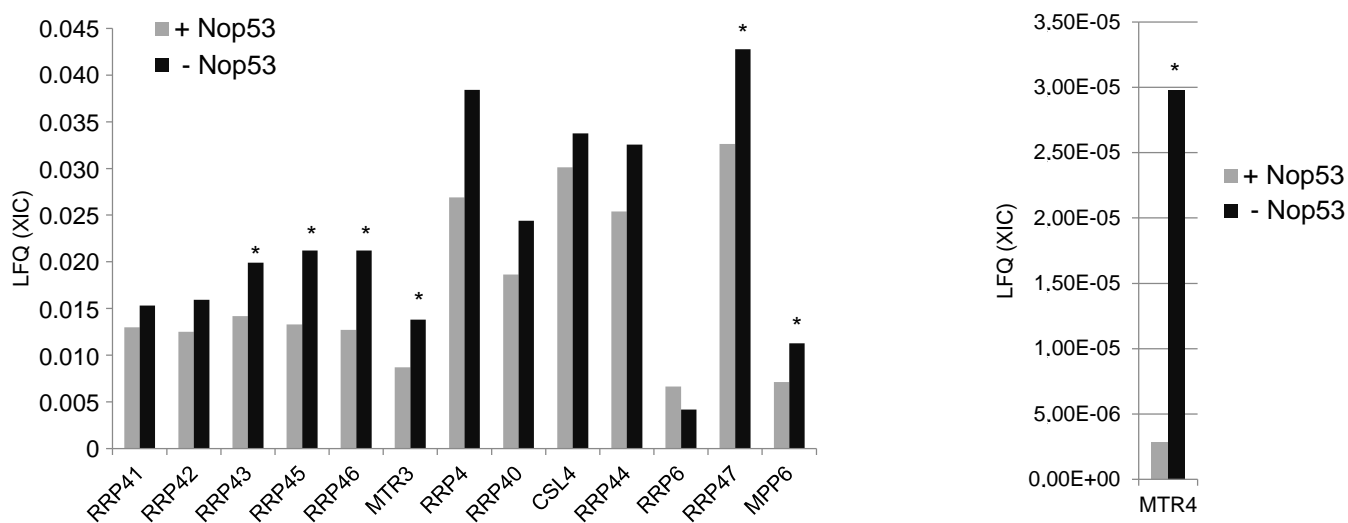
Rrp43



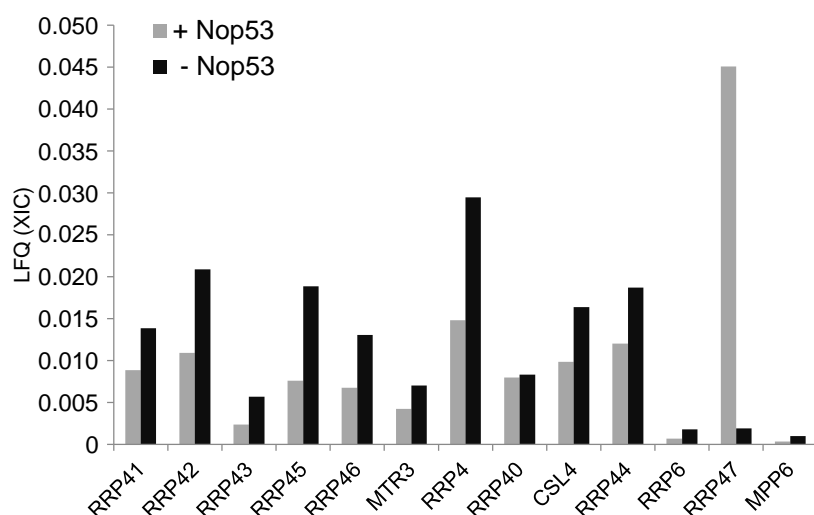
■ pre-60S
■ 90S/ pre-40S
■ RNA exosome
■ Others

Supp. Fig. S3. Interaction network analysis of the proteins copurified at increased levels with Rrp6 or Rrp43 upon depletion of Nop53. (A) Two independent protein interaction networks were created using the STRING database 11.0 (37) with the lists of proteins identified in at least two replicates coimmunoprecipitated with Rrp6 and Rrp43, whose levels were increased upon depletion of Nop53. Coimmunoprecipitated proteins whose levels were significantly increased are depicted as circles, while proteins exclusively identified upon depletion of Nop53 are depicted as squares. The nodes were colored using the software Cytoscape to highlight the most enriched groups: pre-60S (red), 90S/pre-40S (blue), RNA exosome (yellow), others (gray). We have selected the following basic settings for the networks building: Meaning of network edges: Evidence; Active interaction sources: Experiments and Databases; Minimum required interaction score: High confidence (0.700); Max number of proteins to show: query proteins only. The edges connect functionally related nodes based on the evidence (Experiments and Databases) curated by STRING database.

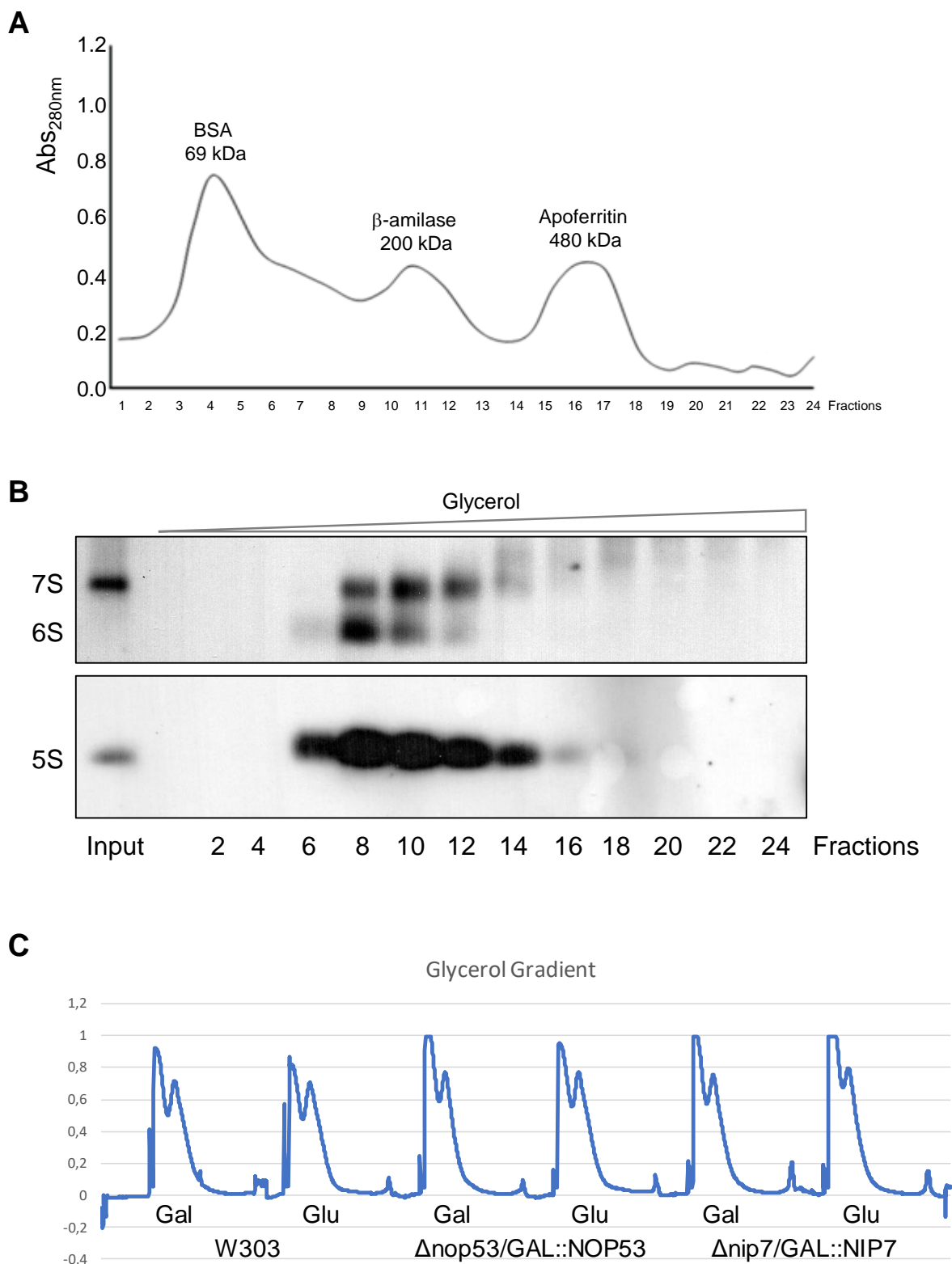
Rrp6 -TAP



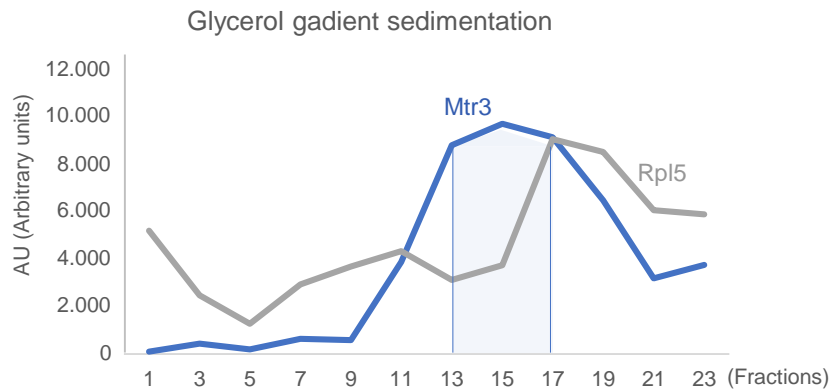
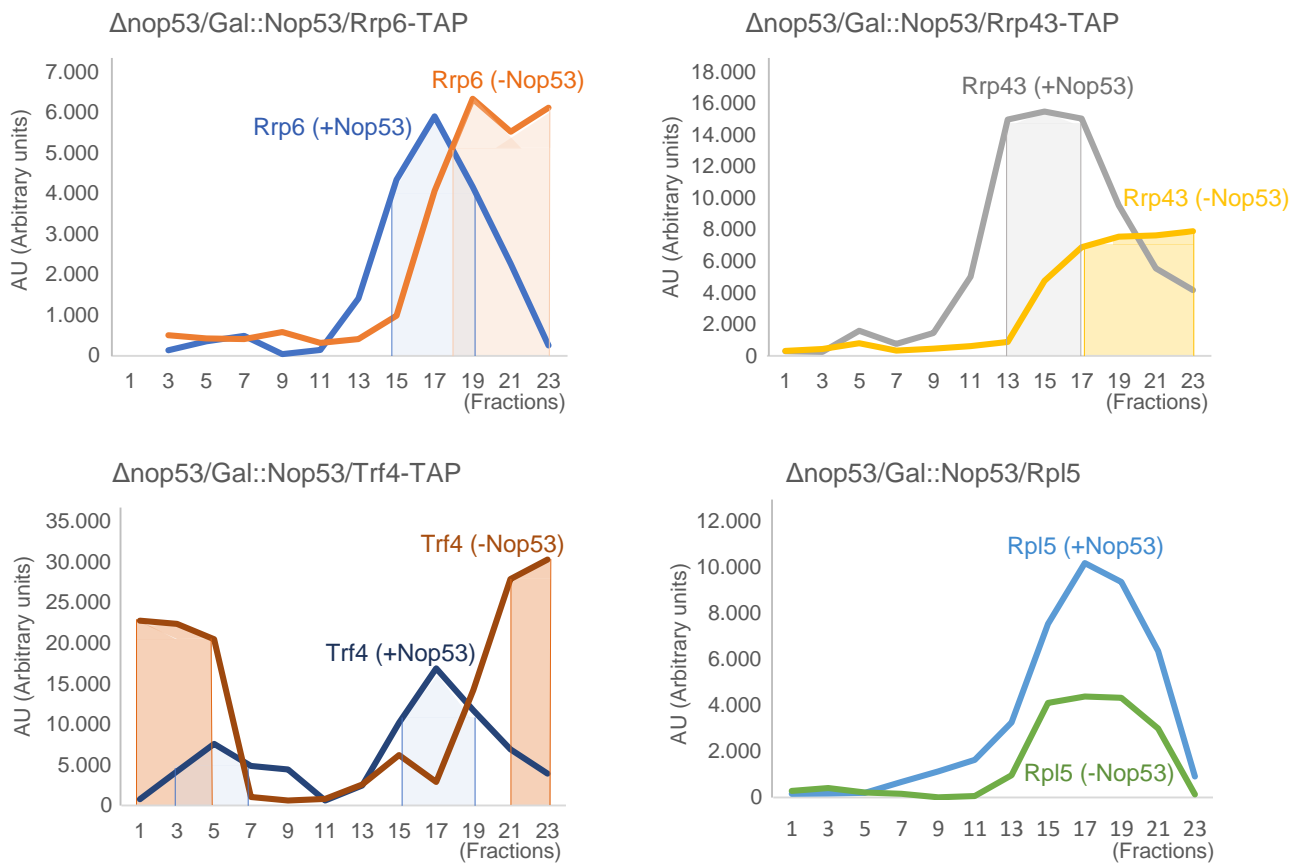
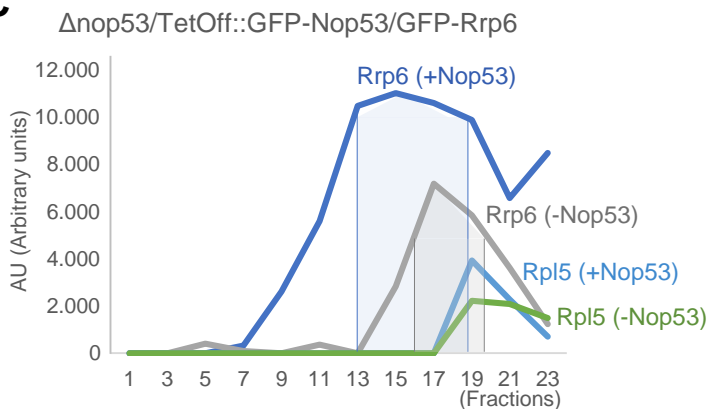
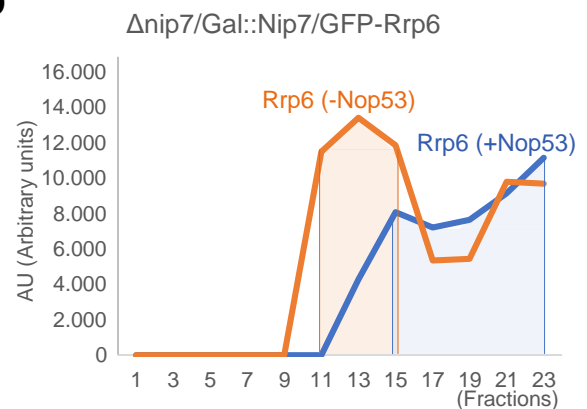
Rrp43 -TAP



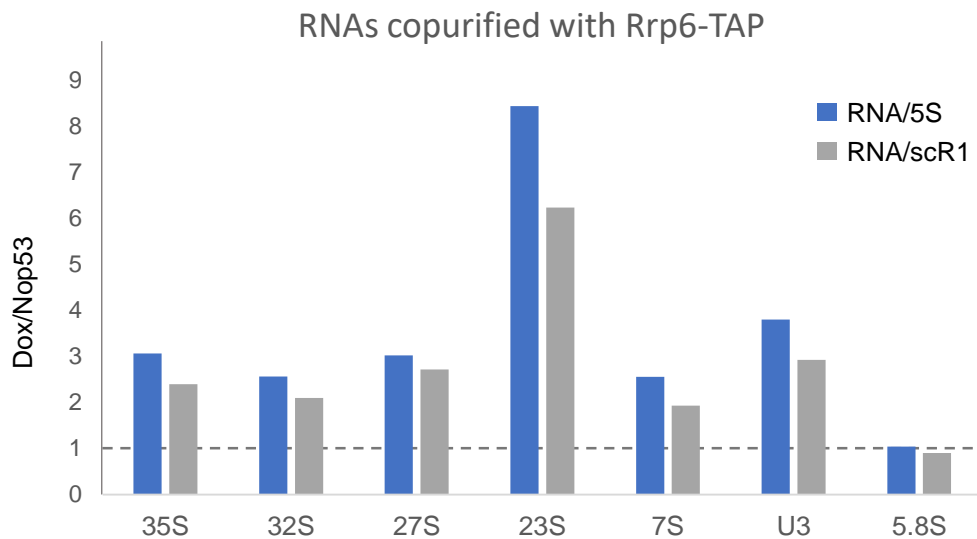
Supp. Figure S4. Nop53 does not affect the exosome assembly/stability. The exosome complex was isolated either with the core subunit Rrp43, or with the nuclear subunit Rrp6, both fused to the TAP tag, in the conditional strain $\Delta nop53/tet-Off::GFP-NOP53$. Yeast total extracts obtained from cultures grown in SD medium without or supplemented with doxycycline were subjected to coimmunoprecipitation with IgG sepharose beads. Label free quantitative (LFQ) mass spectrometry analysis based on XIC was carried out. The LFQ values are compared for all exosome subunits and cofactors coimmunoprecipitated with either Rrp6 or Rrp43 in both conditions. All exosome subunits were detected in both conditions in at least 2 replicates both with Rrp43 and Rrp6, indicating that Nop53 depletion does not affect the exosome assembly. (* indicates statistically significant differences (p-value < 0.05))



Supp. Figure S5. Separation of markers through glycerol gradient centrifugation. (A) Profile of markers separated through glycerol gradient. (B) Northern blot of yeast extracts run through similar glycerol gradients to show precursor rRNAs (7S - nuclear and 6S - cytoplasmic), and mature 5S rRNA. (C) Examples of separation of total cell extracts through glycerol gradients, which results in similar profiles, independently of the sample.

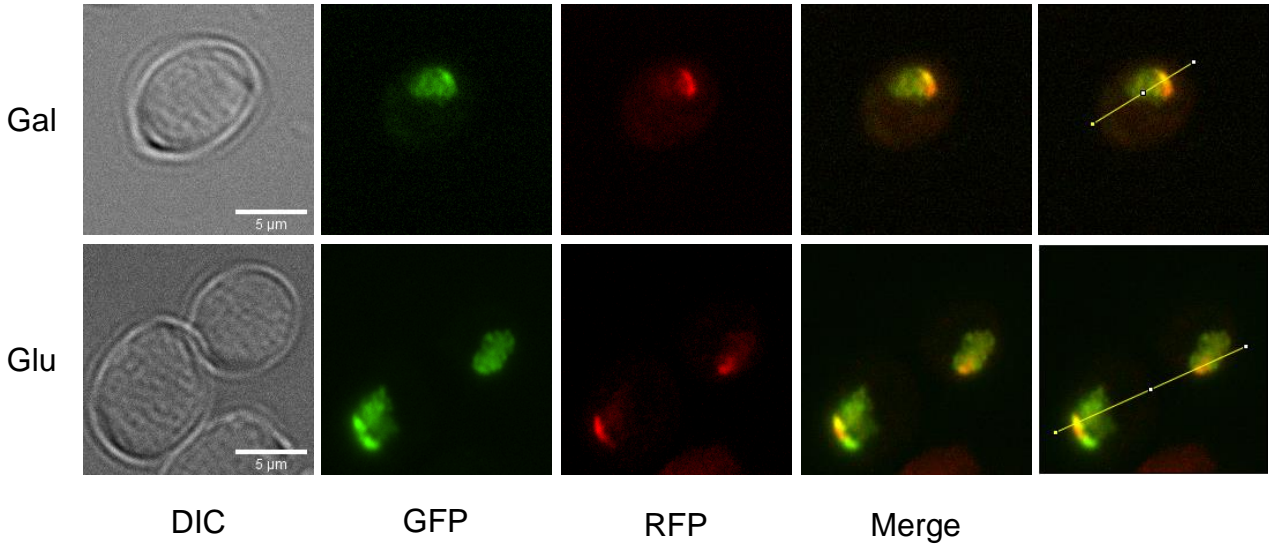
A**B****C****D**

Supp. Figure S6. Exosome sediments with large complexes in the absence of Nop53. Quantification of bands from western blots shown in Fig. 7. Bands from the glycerol gradient fractions of the different samples were quantified using Image J. Plots represent the variation of the intensity of each band along the fractions, and show the concentration of the exosome in lower fractions of the gradient in the absence of Nop53. Panels A, B, C, D correspond to those of Fig. 7. Colored regions highlight the peaks of concentration of the respective proteins.

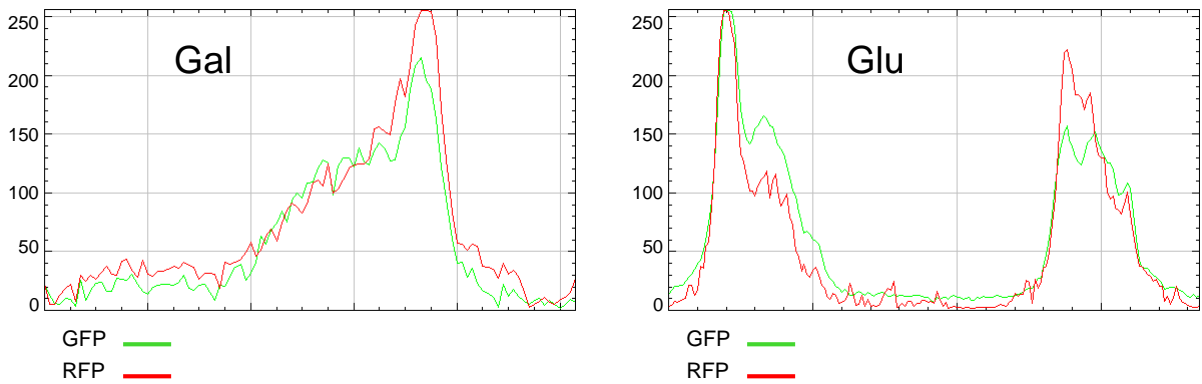


Supp. Figure S7. Rrp6-TAP copurifies early pre-rRNAs. Quantification of bands from northern hybridizations shown in Fig. 8. Bands from the elution fractions of both replicates were quantified using Image J and corrected by the levels of co-eluted 5S rRNA or scR1. Graph represents average of ratios of RNAs in the absence of Nop53 relative to its presence (Dox/Nop53), and shows the higher levels of the pre-rRNAs being copurified with Rrp6-TAP upon depletion of Nop53. Because 5S is part of pre-60S particles, its copurification may not only be due its high abundance and might be the reason for the different ratios obtained when comparing 5S and scR1. Note that many pre-rRNAs, such as 35S, could be detected with different probes.

Δnop53/Gal::NOP53/GFP-RRP6/RFP-NOP1



RGB Profile Measurement



Supp. Figure S8. Depletion of Nop53 does not affect Rrp6 subcellular localization. Expression of both GFP-Rrp6 and RFP-Nop1 in *Δnop53/GAL::NOP53* strain, grown in glucose or galactose and analyzed by fluorescence microscopy (at 100x magnification). The RGB profile was obtained with ImageJ®. Rrp6 shows a nuclear localization, but also co-localizes with Nop1 in the nucleolus.

ANEXO C

Bagatelli, F.F.M., de Luna Vitorino, F.N., da Cunha, J.P.C., and Oliveira, C.C. (2021). The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events. *Nucleic Acids Research* 49, 7053–7074.

The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events

Felipe F.M. Bagatelli¹, Francisca N. de Luna Vitorino^{2,3}, Julia P.C. da Cunha^{2,3} and Carla C. Oliveira^{1,*}

¹Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil,

²Laboratory of Cell Cycle, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil and ³Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

Received April 20, 2021; Revised May 18, 2021; Editorial Decision May 19, 2021; Accepted May 24, 2021

ABSTRACT

Eukaryotic ribosome biogenesis is an elaborate process during which ribosomal proteins assemble with the pre-rRNA while it is being processed and folded. Hundreds of assembly factors (AF) are required and transiently recruited to assist the sequential remodeling events. One of the most intricate ones is the stepwise removal of the internal transcribed spacer 2 (ITS2), between the 5.8S and 25S rRNAs, that constitutes together with five AFs the pre-60S ‘foot’. In the transition from nucleolus to nucleoplasm, Nop53 replaces Erb1 at the basis of the foot and recruits the RNA exosome for the ITS2 cleavage and foot disassembly. Here we comprehensively analyze the impact of Nop53 recruitment on the pre-60S compositional changes. We show that depletion of Nop53, different from *nop53* mutants lacking the exosome-interacting motif, not only causes retention of the unprocessed foot in late pre-60S intermediates but also affects the transition from nucleolar state E particle to subsequent nuclear stages. Additionally, we reveal that Nop53 depletion causes the impairment of late maturation events such as Yvh1 recruitment. In light of recently described pre-60S cryo-EM structures, our results provide biochemical evidence for the structural role of Nop53 rearranging and stabilizing the foot interface to assist the Nog2 particle formation.

INTRODUCTION

Ribosomes are the ribonucleoprotein complexes selected through evolution to translate the nucleotide-based genetic code into polypeptide chains in the three Domains of life (1,2). To this end, the eukaryotic small (40S) ribosomal subunit harbors the decoding site, whereas the large (60S)

subunit accounts for several prominent architectural features including the peptidyl transferase center (PTC), the polypeptide exit tunnel (PET), the L1 stalk, the 5S RNP-containing central protuberance (CP) and the GTPase-associated center between the sarcin-ricin loop (SRL) and the P-stalk (3–5). Both translation fidelity and proteostasis are highly dependent on the accurate ribosome synthesis to ensure the correct assembly of these functional centers out of 79 ribosomal proteins (r-proteins) and four non-coding ribosomal RNAs (rRNAs) (6–8).

The eukaryotic ribosome biogenesis is energetically demanding, hierarchically organized, and a highly regulated multi-step process that takes place across different subcellular compartments (9–11). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, it starts in the nucleolus with the independent transcription of the preribosomal RNAs (pre-rRNAs) 5S and 35S, which is a polycistronic transcript, comprising the 40S component 18S rRNA, and the 60S components 5.8S and 25S rRNAs. In the 35S pre-rRNA, these rRNAs are separated by internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and flanked by external spacers (5’ETS and 3’ETS) (11), which are removed through an ordered sequence of site-specific endo- and exonucleolytic cleavages. The pre-rRNAs undergo progressive structural compaction, as they are co- and post-transcriptionally processed, covalently modified, and folded (10–14).

During this process, not only r-proteins are hierarchically recruited, becoming stably bound (15,16), but also more than 200 assembly factors (AF) transiently participate, spatiotemporally coordinating the conformational and compositional changes of the preribosomal intermediates. Several preribosomal particles have been characterized (Supplementary Table S1), and their specific pre-rRNA and AF compositions provided the basis for our understanding of the sequence of maturation events (9–11).

The small and large ribosomal subunits follow independent maturation routes after the endonucleolytic cleavage at

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 11 3091 9197; Email: ccoliv@iq.usp.br

the A₂ site within ITS1, separating the 20S and 27SA₂ pre-rRNAs (13,14). Although the very first nucleolar pre-60S intermediates remain poorly characterized, the 5S rRNA in association with the r-proteins uL18 and uL5 (5S RNP) appears to be already flexibly bound to early pre-60S particles (17–20). At this stage, 12 AFs, called A₃-factors, are required for the removal of the remaining ITS1 sequence at the 5'-end of the 27S pre-rRNA (11,21).

Remarkably, five of the A₃-factors (Cic1, Nop15, Rlp7, Nop7 and Erb1) assemble around the ITS2, forming one of the first regions to stably fold into the pre-60S core particle (17–19), a structural hallmark called pre-60S 'foot'. Cic1, Nop15 and Rlp7 directly interact with the ITS2 (22,23) and assemble in a mutually interdependent manner together with Nop7 and the Erb1 N-terminus, chaperoning and stabilizing the foot structure (17,21,24). The protein composition of the foot remains mostly unchanged in nucleolar pre-60S intermediates from state A up to state E. During the transition from the nucleolar state E particle to the nucleoplasmic Nog2 particle, the dissociation of Erb1 (25–27) enables the recruitment of Nop53 to the basis of the foot. It happens with the nearly concurrent release of 11 AFs (17,22,23,28).

Important pre-60S remodeling events take place when the foot is still present, including the L1 stalk repositioning, the recruitment of 5 AFs (Bud20, Arx1, Nog2, Rsa4, Cgr1), and 3 r-proteins (uL2, eL43, eL39), the Nog1-assisted PET maturation, the folding of the 25S rRNA Domains IV and V, and the 5S RNP stable docking to form the CP of the Nog2 particle (22,28–30). After that, the foot disassembles as the ITS2 is removed in a complex multistep process, during which Nop53 plays a fundamental role. The underlying mechanism of the ITS2 processing has recently been unveiled (31,32), showing that it starts with an endonucleolytic cleavage by the Las1-Gcr3 complex at the C₂ site within ITS2, that generates the 7S and 26S pre-rRNAs (33–35). This cleavage requires the recruitment in previous steps of 14 AFs and 11 r-proteins, called B-factors (36,37). The 5'-end of the 26S pre-rRNA is then trimmed by Rat1-Rai1, whereas the 3'-end of the 7S pre-rRNA is targeted to the RNA exosome complex (Exo14). Nop53 is the 60S AF responsible for recruiting and positioning the exosome on the pre-60S by directly interacting, through its conserved N-terminal arch-interacting motif (AIM), with the exosome-associated DExH RNA helicase Mtr4 (38–41). As the 7S pre-rRNA is threaded through Mtr4 into the exosome hexameric channel up to the catalytic subunit Rrp44, the foot AFs dissociate (40,42). Nop53 and Nop7 are the last foot AFs to disassemble as the remaining 5.8S+30 pre-rRNA is handed over to be trimmed by Rrp6, the other exosome catalytic subunit (32,43,44).

In the nucleoplasm, the pre-60S intermediates acquire nuclear export competence through several remodeling events, including Rea1-driven removal of Rsa4, 5S RNP 180° rotation, and multiple compositional changes, such as the eviction of Nog2, allowing the binding of the export factor Nmd3 (22,28,45–47). Interestingly, the removal of the foot was shown not to be a pre-requisite for the pre-60S nuclear export, as *las1*, *mtr4* and *nop53* point mutants concentrate foot AFs, 7S and 27S pre-rRNAs in the cytoplasm (37,48,49). Considering that foot-containing 60S subunits have been captured engaged in translation, it has been pro-

posed that the foot removal does not strongly affect late 60S maturation events (37,48).

In the cytoplasm, the last r-proteins assemble into the pre-60S, whilst the remaining AFs dissociate in a process dependent on some exclusively cytoplasmic AFs (e.g. Lsg1, Drg1, Rei1, Reh1) (50–52). The AAA-ATPase Drg1 starts a compositional remodeling that enables Nog1 release (52–54). In parallel, PET and P-stalk undergo independent final maturation (55). In the first case, as Arx1 dissociates, the tunnel is sequentially probed by Rei1 and Reh1 (50,51,56,57). In the second case, also observed in late nuclear stages, Yvh1 triggers Mrt4 eviction, licensing the P-stalk r-proteins to assemble, (50,58–62). The PTC acquires its mature conformation only in the last maturation steps as Nmd3 is released with Lsg1, enabling the dissociation of the last AF - eIF6 (50,51,63).

Important contributions have been made to detail the mechanisms by which the 60S is assembled, mostly on account of the increasing number of high-resolution cryo-EM structures of pre-60S particles (9,10,64–66). More than answers, these structures have provided a source of new biological questions. The cryo-EM structure of Nog2-particles, for instance, revealed that Nop53 is positioned close to the ITS2, exhibiting a tetrahedral architecture embedded at the basis of the pre-60S foot with multiple points of interaction. Indeed, among all the foot AFs present in the Nog2-particle, Nop53 interacts with the largest number of different proteins (Nop7, Rlp7, eL8, uL29 and uL23) (22,23). This observation raised the hypothesis that Nop53 could also have a structural role, acting as a scaffold capable of connecting different regions of the pre-60S (23). To further address this possibility, we evaluated the impact of Nop53 depletion on several pre-60S intermediates.

Using MS/MS-based quantitative proteomics, we reveal the importance of Nop53 for an efficient transition from the state E particle to the Nog2 particle. Our results show that upon depletion of Nop53, not only the unprocessed ITS2-foot is retained, but specific late maturation events such as the recruitment of Yvh1 to the pre-60S are impaired. By comparing Nop53 depletion with *nop53* truncation mutants incapable of recruiting the exosome, we demonstrate that the 60S assembly is differentially affected, strongly supporting an expanded role of Nop53 in this process, in addition to the exosome-driven ITS2 processing. Taking into account recently described pre-60S intermediates (28), we propose that our findings reflect the structural role of Nop53 in organizing and stabilizing the docking site of the H79-ES31. We postulate that in the absence of Nop53 the pre-60S foot structure is not an efficient scaffold to assist the remodeling of the 25S rRNA Domain V, impairing the L1 stalk accommodation, and thereby affecting the Nog2 particle assembly.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and plasmids

Maintenance, growth and genetic manipulation of yeast cultures were performed according to standard procedures. The full list of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study is described in Supplementary Table S2. They were grown at 30°C in minimal medium (YNB) supplemented with 2% glucose or galactose as indicated, in addition to the

essential amino acids and nitrogenous bases. To evaluate the effect of Nop53 depletion, the conditional strain $\Delta nop53$ expressing either the plasmid-borne *tet-Off-GFP-NOP53* or *pGALI-ProtA-NOP53* was employed as previously described (41,67). The transcriptional repression of NOP53 expression was achieved by shifting cells to doxycycline-supplemented (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) medium or from galactose to glucose-containing medium, respectively, for 18h before harvesting. The strains used for fluorescence microscopy (FBY2138, FBY2139 FBY2141 and FBY2142) derive from $\Delta nop53/GALI-ProtA-NOP53$ and were obtained by homologous recombination using PCR cassettes, containing *HIS3* selectable marker, amplified from genomic DNA extracted from specific strains of the yeast GFP Clone Collection (68). Plasmids used in this study were constructed by restriction cloning or with the InFusion HD (Clontech) recombination cloning system using either competent *E. coli* DH5 α or Stellar (Clontech) cells. All the plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S3.

Growth complementation assay

Precultures of the conditional strain $\Delta nop53/tet-Off-GFP-NOP53$ expressing the plasmid-borne *nop53* truncation mutants (FBY2086-2091; FBY2130-2133) were shifted to fresh DOX-free or DOX-containing (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) minimal medium and grown to an $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.0$. Aliquots of each yeast culture were harvested for analysis by SDS-PAGE and western blot. 10-fold serial dilutions, starting from the same $\text{OD}_{600\text{nm}}$, were spotted onto glucose-containing solid minimal medium and incubated at different growth conditions [temperature: 16°C or 30°C; doxycycline (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rapamycin (400 nM) or hygromycin B (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)] for a period from 2 to 9 days. Growth curve measurements were performed in microplates incubated over 24h at 30°C using a SpectraMax ie3 Microplate Detection Platform (Molecular Devices) set to read $\text{OD}_{600\text{nm}}$ every 60 min.

SDS-PAGE and immunoblot

Yeast whole-cell lysates, the fractions from the glycerol gradient sedimentation, and the coimmunoprecipitated proteins were resuspended in SDS sample buffer, resolved on 8 or 10% SDS-PAGE (Tris-glycine running buffer), transferred to nitrocellulose membranes (Ambion) and incubated with anti-CBP (Millipore), anti-GFP (Sigma-Aldrich), anti-uL18 (gift from Dr Cleslei F. Zanelli, UNESP), anti-Nog1 (gift from Dr John L. Woolford Jr., Carnegie Mellon University) and anti-Pgk1 (Abcam). Secondary antibodies conjugated to IR700dye (anti-rabbit IgG, LI-COR) or IR800dye (anti-mouse IgG, LI-COR) were employed, and near-infrared Western blot detection was carried out using ChemiDoc MP Imaging System (BioRad) or Odyssey equipment (LI-COR). Images were processed using Image Studio™ Lite (ver. 5.2) software (LI-COR).

Fluorescence microscopy

The strains $\Delta nop53/GALI-ProtA-NOP53$ carrying GFP C-terminal fusions chromosomally integrated and expressing the plasmid-borne Nop1-RFP as a nucleolar control

were used to survey the subcellular localization of different 60S AFs upon depletion of Nop53. Exponentially growing cells cultured for 18 h in glucose or galactose-containing minimal media were evaluated by fluorescence microscopy. An aliquot of each yeast culture was also analyzed by SDS-PAGE and western blot to confirm Nop53 depletion and evaluate the expression levels of the GFP fusions. Live yeast cells were mounted on agarose pads and imaged using a Nikon Eclipse Ti microscope fitted with a Plan Apo VC 100 \times Oil DIC N2 objective and an EM-CCD camera (DU-885, Andor) controlled with NIS Elements AR software (version 4.11, Nikon). Images were captured at exposure times ranging from 1 to 3 s, at 13 MHz readout speed, using filters for green (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) and red fluorescence (Texas Red BrightLine set, TXRED4040-B, Semrock) as previously described (69). Images were processed and analyzed using FIJI (Fiji Is Just ImageJ) 2.0.0-rc-69/1.53c software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). More than 150 cells were analyzed in both conditions, in replicate experiments (Supplementary Table S4). The RGB profile plots were analyzed using the open-source RGB_Profiler plugin.

Coimmunoprecipitation of pre-60S intermediates

Preribosomes were affinity-purified from the conditional strain $\Delta nop53/tet-Off-GFP-NOP53$ expressing plasmid-borne TAP-tagged 60S AFs (Nop7, Rsa4, Arx1, Nmd3, Erb1, Yvh1, Lsg1, and Mrt4). These yeast strains were cultured in 2L glucose containing-medium both with and without supplementation with doxycycline at a final concentration of 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Biological triplicates were harvested at mid-log phase by centrifugation. The cell pellets were resuspended in R buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM KCl, 5 mM MgOAc, 5% glycerol, 1 mM PMSF, 1:50 cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)) and flash-frozen in liquid N₂. The coimmunoprecipitation assays were carried out as previously described (41,70), with minor modifications. Briefly, the whole-cell lysates were obtained by cryogenic milling on a Ball Mill device (Retsch PM 100) and cleared by centrifugation at 17 000 rpm (F12-6 \times 500 LEX Rotor, Sorvall R6 C Plus) for 30 min at 4°C. The lysates were incubated for 2 h at 4°C with 200 μl IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) previously equilibrated with R buffer. For RNA analysis, after washing six times with 1 ml of buffer R supplemented with 0.04 U/ml RNasin (Promega), RNA was directly extracted from the beads. For proteomic analyses, beads were washed four times with 1mL of R buffer and twice with 100 mM NH₄OAc pH 7.4, 0.1 mM MgCl₂, before elution under denaturing conditions (500 mM NH₄OH). Eluates were lyophilized and further processed before LC-MS/MS analysis. Both input and eluate fractions were separated for analysis by SDS-PAGE and western blot.

Sample preparation for LC-MS/MS

The lyophilized eluates were subjected to in-solution digestion for LC-MS/MS analysis as previously described (41,71). Briefly, proteins were resuspended in 50 mM NH₄HCO₃, 8 M urea and reduced with DTT at a final concentration of 5 mM at 56°C for 25 min. Samples were then alkylated with 14 mM iodoacetamide for

30 min at RT under protection from light. After dilution with 50 mM NH_4HCO_3 , samples were digested for 16 h with sequencing-grade modified trypsin (Promega) at a 1:50 (E:S) ratio at 37°C. The proteolysis was stopped by adding TFA to a final concentration of 0.4% (v/v) and the resultant peptides were desalted using SepPak tC18 cartridges (Waters).

LC-MS/MS data acquisition

Digested peptides were resuspended in 0.1% formic acid and fractionated on an in-house reversed-phase capillary emitter column (10 cm \times 75 μm , filled with 5 μm particle diameter C18 Aqua resins-Phenomenex) coupled to a nano-HPLC (Thermo). The fractionation was carried out through a 60 min gradient of 2–80% acetonitrile in 0.1% formic acid (buffer B) (0–28% of buffer B for 45 min, 28–80% for 13 min; 80–5% for 2 min) at a flow rate of 300 nl min^{-1} . The eluted peptides were analyzed by an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) (source voltage of 1.9 kV, capillary temperature of 200°C). The mass spectrometer was operated in DDA mode with dynamic exclusion enabled (exclusion duration of 45 seconds), MS1 resolution of 30 000, and MS2 normalized collision energy of 30. For each cycle, one full MS1 scan range of 200–2000 m/z was followed by ten MS2 scans (for the most intense ions) using an isolation window size of 1.0 m/z and collision-induced dissociation (CID). The 10 most intense ions were selected for fragmentation by CID in DDA. Data from the LTQ Velos-Orbitrap were analyzed with the MaxQuant (version 1.5.3.12) software using the UniProt database (taxonomy *Saccharomyces cerevisiae*—strain ATCC 204508 / S288c), setting tolerance for the MS of 20 ppm and the MS/MS of 0.5 Da; carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification; oxidation of methionine and acetylation of protein N-termini as variable modifications; and 1% False Discovery Rate (FDR). The match between runs option was used to increase the number of trusted IDs. The normalized LFQ Intensity values of the proteingroups.txt output were used for the quantitative analysis.

Label-free quantitative proteomics - data analysis

Proteomic data analysis was performed using Perseus software (version 1.6.10.50, Max Planck Institute of Biochemistry) as previously described (72), with minor changes. The affinity purification assays using different baits were analyzed separately. The MaxQuant output data was initially filtered removing contaminants, hits to the reverse database, and proteins identified only by a modification site. The label-free quantification (LFQ) intensities were \log_2 -transformed and the biological triplicates were grouped by categorical annotation in the two conditions assessed: depletion [Nop53-] and non-depletion [Nop53+] of Nop53. A list of all 60S r-proteins and AFs classified according to the 60S maturation stage (10) was added as an annotation column. The identified proteins were filtered for at least two valid LFQ intensity values in at least one replicate group. From this list, proteins that were identified in only one replicate group were considered uniquely identified in one condition (either [Nop53-] or [Nop53+]). LFQ-

Intensity correlation multi-scatterplots were used to evaluate reproducibility among replicates, showing the Pearson correlation coefficient for each comparison. Heatmaps of the \log_2 -transformed LFQ-Intensities of all the 60S AFs identified in at least one group and at least two biological replicates were generated hierarchically clustering the replicates and the 60S AFs (Euclidian distance; average-linkage; preprocess with k-means; number of clusters set at 300; number of iterations set at 10). Before the statistical analysis, missing LFQ-Intensity values were imputed from normal distribution around the detection limit (width set at 0.3, downshift of 2.0 standard deviations) and the LFQ-Intensities histogram was verified to confirm that the distribution of these imputed values fitted the normal distribution. A two-tailed Student's *t*-test ($S_0 = 0$, threshold P -value = 0.05) was performed comparing [Nop53-] with [Nop53+]. Using the GraphPad 8 (Prism) software the $-\log_{10}$ -transformed P -values were plotted against the \log_2 -transformed fold change ([Nop53-]/[Nop53+]) in a volcano plot. Statistically significant differences are above the horizontal cut-off line (P -value < 0.05) either on the left of the cut-off line $x = -1$ (fold change < 0.5) or on the right of the cut-off line $x = 1$ (fold change > 2). These fold change values were also depicted in a bar graph against the corresponding 60S AFs orderly plotted according to their stepwise association with the pre-60S from early nucleolar to late cytoplasmic stages. The 60S AFs exclusively identified in one condition (either [Nop53-] or [Nop53+]) were depicted as dashed columns. For additional analysis, nine clusters of 60S AFs, representative of specific pre-60S intermediates, were unambiguously defined based on a state-of-the-art model of the 60S assembly pathway (Supplementary Table S1), excluding components present in almost all maturation stages. Violin plots were created using the GraphPad 8 (Prism) software, showing for each cluster the distribution of \log_2 -transformed LFQ Intensity values of the identified 60S AFs in both conditions. For each violin plot: the height is delimited by the highest (upper bound) and the lowest (lower bound) LFQ Intensity values found in the cluster; the median is depicted as a dark gray line; and the shape stems from a rotated and smoothed kernel density plot reflecting the frequency distribution of the \log_2 -transformed LFQ Intensity values observed in the cluster. The 60S AFs exclusively identified in one condition were depicted as gray triangles. The non-parametric two-tailed Mann-Whitney *U*-test (confidence level: 95%) was performed to compare the 60S AFs distributions in both conditions ([Nop53-] and [Nop53+]). To compare *nop53* truncated mutants with Nop53 depletion, an untargeted principal component analysis (PCA) was performed using Perseus software with Benjamini-Hochberg corrected FDR = 0.05 and number of components set at 5.

RNA extraction and Northern blotting

A modified hot phenol RNA extraction method was used to extract total RNA from exponentially growing yeast cells, and affinity-purified RNAs from the beads as previously described (41,73). After quantification using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific), equal amounts of RNA were denatured and resolved either on

a 1.5% agarose gel or on a denaturing TBE-urea (7.5 M) 8% polyacrylamide gel. RNA was transferred to Hybond N+ membranes (GE Healthcare) and Northern blotting analyses were carried out using oligonucleotides listed in Supplementary Table S5, previously 3'-biotinylated using Biotin 3'End DNA Labeling Kit according to manufacturer's protocol (Thermo Scientific). Detection of biotin-labeled probes was performed using Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific).

In vivo RNA structure analysis by SHAPE

In vivo rRNA structure was probed by selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE) as previously described (37,74,75), with minor changes. In brief, after a gentle wash with PBS, yeast cells at mid-log phase were incubated with the acylating reagent 2-methylnicotinic acid imidazolide (NAI) at a final concentration of 100 mM for 20 min at 30°C. As a control, the same protocol was performed for each yeast culture replacing NAI by DMSO. Cells were harvested and total RNA was immediately extracted by a modified hot phenol method (67). Aliquots of each yeast culture were separated for further analysis by SDS-PAGE and western blot. To detect the 2'-*O*-adducts formed, 5 µg of total RNA were subjected to primer extensions with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). The IR700dye-labelled oligonucleotides (Alpha DNA, Quebec), which were used to probe specific regions of the 25S rRNA, are listed in Supplementary Table S5. The nucleotide position of each modification site was identified using a DNA sequencing ladder obtained with the plasmid pMS2-ITS2 as a template. The sequencing reactions were performed with the IR700dye-labeled UC2 probe and the Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (Affymetrix). The IR700dye-labelled cDNAs and the four ddNTP termination reactions were resolved in parallel on a denaturing TBE-urea (7 M) 6% polyacrylamide gel under protection from light (76). Near-infrared detection was carried out using Odyssey Imaging System (LI-COR) and images were processed using Image Studio™ Lite (ver. 5.2) software (LI-COR).

Structure visualization with UCSF ChimeraX

The UCSF ChimeraX (1.0-rc-2020.05.22) software was employed for molecular visualization of pre-60S particles, highlighting the position and the protein-protein interactions of the 60S AFs affinity-purified or used as baits in our proteomic analyses. The following Protein Data Bank (PDB) files were used: 4V88 (5), 3JCT (22), 6ELZ (17), 6C0F (18), 6FT6, 6FSZ (40), 6N8K, 6N8O (50), 6RZZ, 6RI5 (51), 6YLX, 6YLY and 6YLH (28).

Glycerol density gradient sedimentation

Whole yeast cell extracts obtained by cryogenic milling on a Ball Mill device (Retsch PM 100) from the same strains used in the affinity purification assays were fractionated after density gradient sedimentation as previously described (41,77). Briefly, pre-cleared lysates – obtained from Nop53 depleted (–) or non-depleted (+) cells – corresponding to

5 mg of total protein were loaded on the top of a 12 ml linear 10–30% glycerol gradient (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM KCl, 5 mM MgOAc, 5% glycerol, 1 mM PMSF), previously obtained using a Gradient Master device (Bio-Comp), and were centrifuged at 23 000 rpm for 12.5 h at 4°C in a P40ST rotor (Hitachi). Each gradient was fractionated from the top in 24 aliquots (500 µl) using an EconoSystem (Bio-Rad) fitted with a UV monitor plotting the protein/nucleic acid sedimentation profile. All the gradient fractions were flash-frozen in liquid N₂ and later precipitated with ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA) before analysis by SDS-PAGE and western blot. The 48 gradient fractions (24 Nop53+ and 24 Nop53–) of each strain were processed and analyzed together. The same amount of Input was loaded in each gel. All the western blot membranes (Nop53+ and Nop53–) of the same strain were scanned together under the same parameters using the Odyssey Imaging System (LI-COR) with near-infrared fluorescence detection.

RESULTS

Nop53 depletion impairs the transition from the nucleolar state E to the nuclear Nog2 particle, affecting late pre-60S intermediates

To evaluate how the recruitment of Nop53 to the pre-60S affects the compositional changes during the large ribosomal subunit assembly, four specific 60S AFs representative of different maturation stages (Figure 1A) were selected to be TAP-tagged. Three of them, namely Nop7, Rsa4 and Arx1, are present in Nop53-containing particles, whereas Nmd3 is recruited after Nop53 release (Supplementary Figures S1A, E and S2A, E). Nop7 is an early-binding AF, component of the pre-60S foot, that directly interacts with both Erb1 and Nop53 in a mutually exclusive manner. The replacement of Erb1 by Nop53 takes place in the transition from the nucleolar state E particle to the nucleoplasmic Nog2 particle and is essential for Nop7 release, as it requires the exosome-driven ITS2 removal (17,22,32,40,78,79). Following Nop53 recruitment, Rsa4 and Arx1 are incorporated to form the Nog2 particle (28). Whereas Rsa4 is released in the nucleoplasm by the action of the Rix1–Rea1 complex (22,28,46,80,81), Arx1 remains bound to the pre-60S even after the nuclear export (22,28,81–83). At late nuclear stages, after the foot disassembly, Nmd3 is recruited to the pre-60S, binding on top of the maturing intersubunit surface, where it contributes to the PTC maturation (50,51,84,85). Both Arx1 and Nmd3 are nuclear export AFs that assist the pre-60S nucleocytoplasmic shuttling (86,87) and dissociate from it only in the cytoplasm (50,51,55–57,88).

These TAP-tagged 60S AFs were independently expressed in the conditional strain $\Delta nop53$ with *GFP-NOP53* under control of a tetracycline repressible promoter (*tet-OFF*). Upon doxycycline treatment, *GFP-NOP53* was downregulated (Supplementary Figures S1B,F, S2B,F) partially and sufficiently depleting Nop53 to affect both cell growth and pre-rRNA processing as previously described (41,89–91). Preribosomes affinity-purified in biological triplicates both in the presence and upon repression

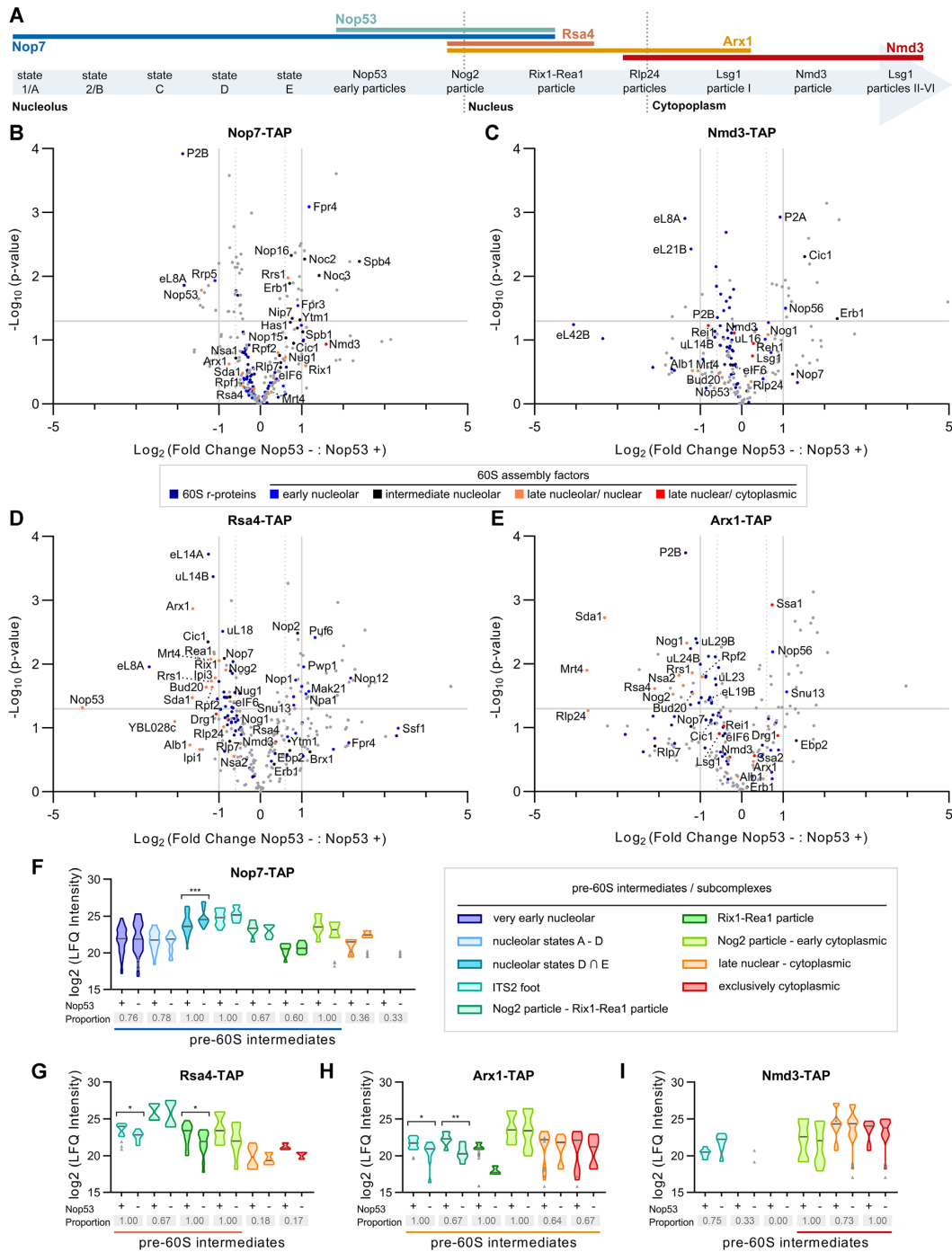


Figure 1. Pre-60S protein compositional changes caused by Nop53 depletion. The 60S AFs Nop7, Nmd3, Rsa4 and Arx1 were selected to probe the effect of Nop53 depletion on the 60S biogenesis. (A) The hierarchical order of their recruitment and release is depicted on top of a schematic representation of the 60S assembly pathway listing pre-60S intermediates, whose cryo-EM structures have already been described. (B–I) Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of pre-60S intermediates affinity-purified in biological triplicates with the indicated TAP-tagged particles. Volcano plots show the comparison between Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions for (B) Nop7-TAP, (C) Nmd3-TAP, (D) Rsa4-TAP and (E) Arx1-TAP particles. –Log₁₀-transformed *P*-values were plotted against log₂-transformed fold change values. 60S r-proteins and AFs are highlighted in different colors, the latter being classified according to the 60S maturation stage they participate in. (F–I) Analysis of clusters of 60S AFs representative of specific pre-60S intermediates. Violin plots show the distribution of the copurified 60S AFs based on their log₂-transformed LFQ Intensity values (states D ∩ E designates intersection—common AFs between these particles); height: delimited by the highest and lowest LFQ Intensity values of the cluster; width: frequency (high: wide; low: narrow) of the LFQ Intensity values observed in the cluster. The 60S AFs identified in only one condition (Nop53+ or Nop53–) are depicted as gray triangles. The median is indicated by a dark gray line. Increased (higher median) or decreased (lower median) association with components of the indicated pre-60S intermediates is revealed by comparing Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions. Statistically significant (*P* < 0.05) differences are highlighted in the graph (Nop7-TAP, ****P* = 0.0007; Rsa4-TAP, **P* = 0.0188, ***P* = 0.0186; Arx1-TAP, **P* = 0.0315, ***P* = 0.0087). Gray boxes show the proportion of each cluster that was affinity-purified (number of affinity-purified 60S AFs components of the cluster/ total number of 60S AFs in the cluster). A horizontal bar indicates the pre-60S intermediates with which the bait is expected to be associated.

of Nop53 expression were analyzed by mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics (Figure 1 and Supplementary Figures S1 and S2). Upon Nop53 depletion, the copurified preribosomes exhibited significant and specific changes in composition (Figure 1B-I and Supplementary Figures S1C-D, G-I and S2C-D, G-I). To circumvent any possible contamination with mature ribosomal particles, we focused our analysis only on the 60S AFs, inferring the precise maturation steps that were affected by comparing the distribution of their log₂-transformed LFQ Intensity values. The identified 60S AFs were assigned and analyzed in clusters representative of different pre-60S intermediates (Figure 1F-I), which were unambiguously defined based on a state-of-the-art model of the 60S assembly pathway (Supplementary Table S1). Changes in the shape and height of the violin plots upon Nop53 depletion directly reflect the increase (higher median) or decrease (lower median) in the levels of copurified components of specific pre-60S intermediates. Statistically significant differences were determined using the Mann-Whitney *U*-test.

Given the role of Nop53 in recruiting the RNA exosome to trim the 7S pre-rRNA (38,41), we first asked what would be the effect of Nop53 depletion on the ITS2-foot structure. We observed in this condition that whereas the foot AF Nop7 copurified few late-binding AFs (Reh1 and Lsg1), the late Nmd3 particles coenriched some foot AFs (Cic1 and Rlp7) (Figure 1C, F, I and Supplementary Figure S1I), indicating that, upon Nop53 depletion, the foot structure, whose disassembly was blocked, could be found in late nuclear and cytoplasmic pre-60S intermediates. Previous studies have shown that *nop53*, *mtr4* and *las1* point mutants impair the ITS2 processing and cause the misplacement of foot AFs to cytoplasmic particles (37,48,49). We would have expected, therefore, under repression of Nop53 expression, a strong and significant enrichment of several late-binding AFs copurified with Nop7. Instead, Nop7 particles coenriched mostly nucleolar 60S AFs (Figure 1B,F), suggesting an effect of Nop53 depletion on early 60S maturation stages, which might indirectly affect the formation of late pre-60S intermediates.

Among the nucleolar 60S AFs identified upon Nop53 depletion, Nop7 significantly and highly coenriched constituents of the states D and E particles (e.g. Spb4, Noc3, Nip7) (Figure 1B,F and Supplementary Figure S1I), which correspond to the pre-60S intermediates preceding Nop53 recruitment (Figure 1A and Supplementary Table S1). It was, therefore, conceivable to hypothesize that in this condition the transition from nucleolar stages to the Nop53-containing Nog2 particle was impaired. This observation was confirmed when we analyzed the effect of Nop53 depletion on the Nog2 particle AFs Rsa4 and Arx1, which are incorporated only after Nop53 (Figure 1D-E,G-H and Supplementary Figure S2I). In both cases, the level of several Nog2 particle components (Bud20, Nog2, Rsa4, Arx1) are significantly reduced upon Nop53 depletion, including foot AFs and those (Rrs1, Rpf2, Nog1, eIF6, Nug1, Nsa2, Mrt4, YBL028c) remaining from earlier particles (22,28). Similarly, the Rix1-Real particle AFs (Sda1, Rix1, Ipi1, Ipi3, Real1) that are subsequently recruited to the Nog2-particle to trigger the removal of Rsa4 and the CP remodeling (22,28,46), were also found at decreased levels. All these

findings strongly indicate that depletion of Nop53 causes an accumulation of nucleolar pre-60S intermediates, which is in agreement with the previously reported accumulation of 27S pre-rRNA in this condition (41,89-91).

Analysis of preribosomes copurified with Nmd3 and Arx1 allowed us to evaluate late nuclear and cytoplasmic particles, revealing an effect of Nop53 depletion on late-binding AFs (Figure 1H-I and Supplementary Figures S1H-I and S2H-I). Of note, under repression of Nop53 expression, both Arx1 and Nmd3 particles were depleted of the late-binding AF Yvh1, which is involved in the P-stalk maturation (58,59,62). From these results, we observe that late nuclear and cytoplasmic pre-60S intermediates are still formed upon Nop53 depletion, although to a lesser extent and with specific late 60S maturation events affected.

To further characterize the effect of Nop53 depletion on late pre-60S intermediates, complementing the proteomic analyses, the pre-rRNA content of Arx1 and Nmd3 preribosomes was assessed in biological triplicates by Northern blot (Figure 2). As expected, depletion of Nop53 caused a significant accumulation of both 7S and 27S pre-rRNAs, visible in the total extract lanes (Figure 2B). The negative control (Figure 2B, left panels) was important to reveal background amounts of 35S and 27SA pre-rRNAs, which are not part of Arx1 or Nmd3 particles. Importantly, the results confirmed the proteomic analysis, showing lower levels of 7S pre-rRNA, 5.8S, and 25S rRNAs copurified with Arx1 upon depletion of Nop53, even though 7S pre-rRNA accumulated in this condition (Figure 2B, middle panels). Comparatively, Rsa4 showed a profile similar to Arx1, whereas Nop7 coenriched 27S and 7S pre-rRNAs (Supplementary Figure S3A), consonant with the proteomic data and evidencing less efficient recruitment of both Arx1 and Rsa4 to nucleoplasmic pre-60S intermediates. Of note, this effect seemed slightly more pronounced on Arx1. As the formation of Nog2 particles was impaired, but not blocked when Nop53 is lacking, we show by glycerol density gradient analysis, that both Arx1 and Rsa4, which exhibit similar sedimentation profiles, are, as Nmd3, still associated with pre-60S intermediates upon Nop53 depletion (Supplementary Figure S3B-D). Consistent with this result and with the above-mentioned retention of the foot structure, Nmd3, which normally copurifies only mature rRNAs, coenriched the 7S pre-rRNA with a slight decrease in the levels of 25S rRNA upon Nop53 depletion (Figure 2B, right panel).

We then wondered if the observed effects of Nop53 would also extend to an altered subcellular localization of nucleocytoplasmic or foot AFs. For this purpose, we analyzed GFP-tagged Nmd3, Arx1 and Nop7 both in the presence and upon repression of Nop53 expression (Supplementary Figure S4 and Supplementary Table S4). Consistent with the findings described above, Nmd3 subcellular localization was affected by Nop53 depletion (Supplementary Figure S4A). Although still present in the cytoplasm, Nmd3 was found highly concentrated in the nucleus upon Nop53 depletion, indicating partial retention of Nmd3 in association with nuclear intermediates. Interestingly, the foot AF Nop7, which has been shown to mislocalize to the cytoplasm in mutant backgrounds that block ITS2 processing, such as *nop53* AIM mutants (48), was still mostly retained in the nucleus under Nop53-depleted condition (Supplementary

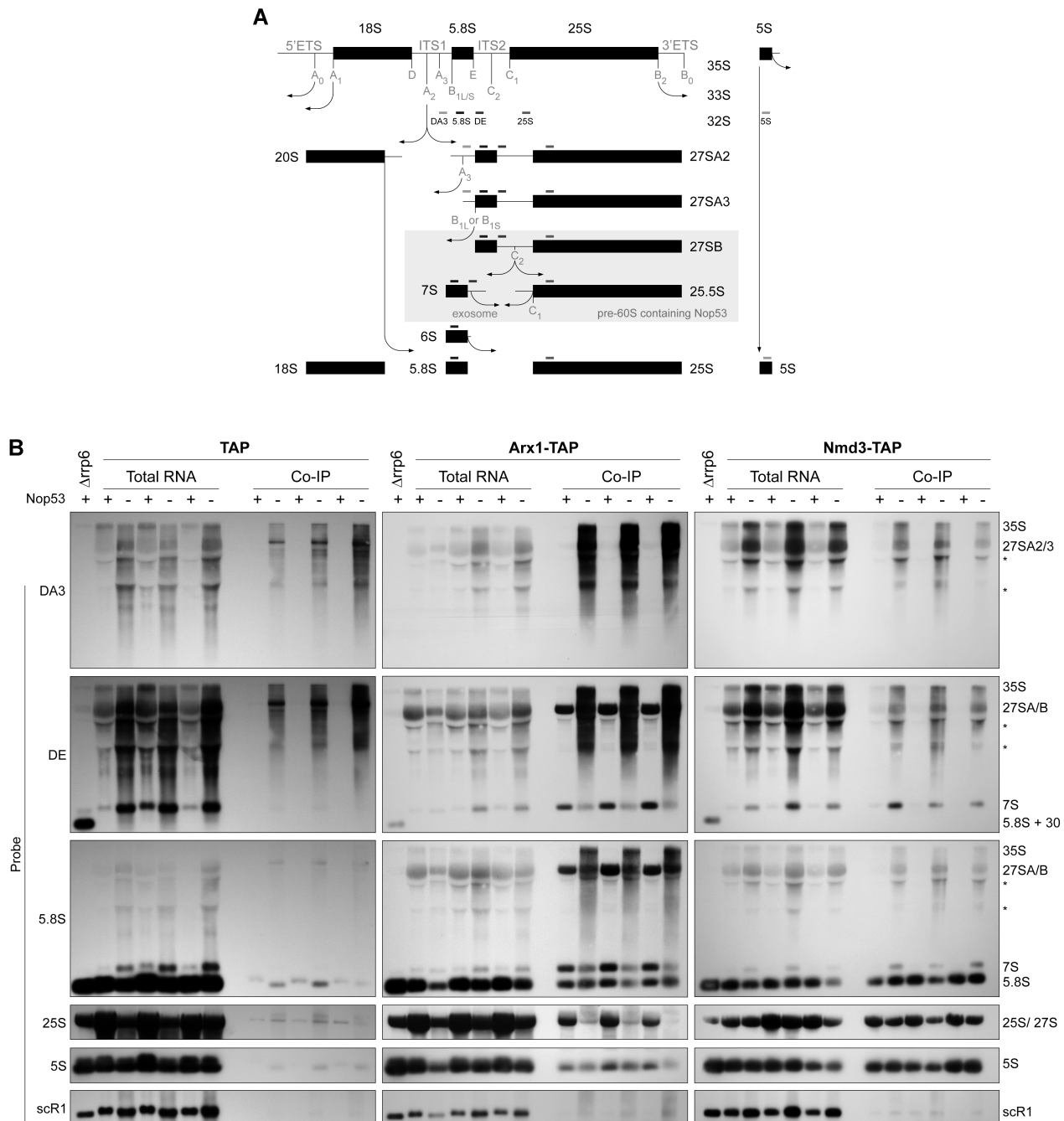


Figure 2. Nop53 depletion differentially affects the association of the nucleocytoplasmic AFs Arx1 and Nmd3 with pre-60S intermediates. **(A)** Schematic representation of the pre-rRNA processing in *S. cerevisiae*, highlighting the stages during which Nop53 is associated with the pre-60S and the hybridization position of the Northern blot probes. **(B)** The pre-rRNAs copurified (IP) with Arx1-TAP and Nmd3-TAP in biological triplicates both in Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions were assayed along with the Input (total RNA) by Northern blot using the indicated probes. The empty TAP tag was used as a negative control and the $\Delta rrp6$ strain as a control for the accumulation of 5.8S+30 pre-rRNA. *non-specific band.

Figure S4B). As expected, in agreement with the above-mentioned analyses, the subcellular localization of Arx1 was not affected by Nop53 depletion, remaining mainly nuclear (Supplementary Figure S4C). Taken together, these observations indicate that Nop53 depletion, in addition to the effect on nucleolar intermediates, also causes partial retention of nucleocytoplasmic AFs in the nucleus, reducing the formation of cytoplasmic pre-60S intermediates.

Nop53 depletion leads to the accumulation of state E particles and the association of Erb1 with late 60S assembly intermediates

To better characterize the impact of Nop53 depletion on early nucleolar 60S maturation stages, and particularly on the state E particle, we set out to analyze the protein and pre-rRNA content of preribosomes affinity-purified with the TAP-tagged nucleolar AF Erb1 both in the presence

and upon repression of Nop53 expression (Figure 3 and Supplementary Figure S5). Erb1 associates very early with nascent pre-60S intermediates (17–19,21,92,93) interacting with several AFs (Supplementary Figure S5A), including foot components such as Nop7 (17). However, different from Nop7, which dissociates only after the recruitment of Nop53 and the Nog2-particle formation, Erb1 remains uniquely bound to nucleolar intermediates up to the state E particle (Figure 3A and Supplementary Table S1) (17,22). It was, therefore, chosen as an adequate bait to probe nucleolar maturation stages that precede Nop53 binding. In fact, the dissociation of Erb1 is necessary for the recruitment of Nop53 to the pre-60S (17,22,28).

Upon Nop53 depletion, Erb1 copurified higher levels of state E AFs (e.g. Spb4, Has1, Nop16, Ebp2), some of which remaining from earlier particles. Its association with AFs specific to nucleolar state A to D particles (e.g. Nsa1, Rrp1, Mak16, Rrp15 and Ssf1), however, significantly decreased (Figure 3B–D), suggesting a reduced association of Erb1 with these early nucleolar particles. In line with this, nucleolar AFs that constitute the earliest pre-60S intermediates (Rrp5, Drs1, Dbp10) were also copurified with Erb1 at decreased levels upon Nop53 depletion, strongly indicating that in this condition most of the nucleolar Erb1 particles correspond to state E intermediates. This is coherent with the observation that under Nop53-depleted condition, Erb1 affinity-purifies less 27SA₂/A₃ pre-rRNAs, but is still associated with 27SB pre-rRNA, which constitutes state E particles (Supplementary Figure S5F). Furthermore, no significant changes were observed in the Erb1 sedimentation profile after Nop53 depletion (Supplementary Figure S5B), confirming that it was still bound to preribosomal subunits.

Interestingly, Nog2 particle components (e.g. Rsa4, Bud20) and particularly late nuclear/ cytoplasmic AFs (e.g. Nmd3, Lsg1, Reh1) were also coenriched with Erb1 upon Nop53 depletion, in agreement with the higher levels of 7S pre-rRNA copurified with Erb1 in this condition (Supplementary Figure S5F). On the other hand, upon Nop53 depletion, the late AF Nmd3 affinity-purified higher levels of Erb1 (Figure 1C), which, congruently, has also been reported upon depletion of the ITS2 endonuclease Las1 (37). Altogether, these findings indicate that ITS2-foot-containing late pre-60S particles prompt the otherwise unusual Erb1 binding to late assembly intermediates, which is particularly favored in this condition given that the Erb1 binding site on the foot is vacant when Nop53 is lacking.

Nop53 depletion affects late maturation events impairing the Yvh1 recruitment to the pre-60S

As described above, both Nmd3 and Arx1 particles were depleted of the late-binding nucleocytoplasmic AF Yvh1 upon Nop53 depletion (Supplementary Figures S1H–I and S2H–I). This prompted us to further evaluate the interplay between Nop53 recruitment and Yvh1, which is required for the late nuclear/cytoplasmic maturation of the P-stalk (Figure 4A) (58,59,62). To verify in more detail whether Nop53 depletion could affect the recruitment of Yvh1 to late pre-60S particles, we analyzed pre-60S intermediates copurified with Yvh1-TAP both in the presence and upon repression of Nop53 expression by mass-spectrometry based

label-free quantitative proteomics (Figure 4, and Supplementary Figure S6A–D). As a control, the exclusively cytoplasmic AF Lsg1-TAP was used as bait (Figure 4, and Supplementary Figure S6E–H). Upon Nop53 depletion, both Yvh1 and Lsg1, copurified some nucleolar AFs and early pre-rRNAs, reflecting their accumulation already shown in this condition (Figure 2B, left panels). Focusing our analysis on late-binding AFs, our data revealed a striking effect of Nop53 depletion on the Yvh1 interactome (Figure 4B, D, and Supplementary Figure S6D). Both nucleocytoplasmic (e.g. Arx1, Alb1, Nmd3) and cytoplasmic AFs (e.g. Lsg1, Rei1, Jjj1, Reh1), components of late nuclear and cytoplasmic particles, were significantly less affinity-purified with Yvh1-TAP under Nop53-depleted condition, as well as several r-proteins including the late-associating ones incorporated only at cytoplasmic stages (eL29, eL42, eL24, uL16). Consistent with this observation, the levels of 7S pre-rRNA and the mature 5.8S, 25S and 5S rRNAs copurified with Yvh1 were all significantly decreased (Figure 5A, left panels). Indeed, compared to all the baits used in this study, Yvh1 was the only one for which the association with all mature rRNAs was drastically reduced upon Nop53 depletion.

In the same condition, Lsg1 exhibited a decrease of only 25S rRNA levels (Figure 5A, right panels), and copurified lower levels of some late-binding AFs (e.g. Arx1, Rei1, Reh1), including Yvh1 (Figure 4C, E–F and Supplementary Figure S6H), indicating a reduced formation of cytoplasmic pre-60S intermediates upon Nop53 depletion. However, Lsg1 did not show a significant decrease in the levels of most r-proteins, co-enriched 7S pre-rRNA, and exhibited almost no effect on the levels of 5S rRNA under Nop53-depleted condition (Figure 5A, right panels). Taken together, these observations strongly suggest a higher impact of Nop53 depletion on Yvh1 recruitment than on Lsg1 association with pre-60S intermediates. This hypothesis was further substantiated by the analysis of the sedimentation profiles of Yvh1 and Lsg1 (Figure 5B, C). Whereas Lsg1 still co-sediments, with the r-protein uL18 (fractions 18–24) upon Nop53 depletion, Yvh1 becomes mostly concentrated in the top fractions [1–10] of the gradient, with almost no signal detected in the bottom fractions corresponding to pre-60S intermediates. The depletion of Nop53, therefore, affects not only nucleolar steps of the 60S maturation, as shown above, but also impairs the late nuclear/cytoplasmic recruitment of Yvh1.

As Yvh1 is required for Mrt4 release (Figure 4A) (58,59), we wondered if Nop53 depletion would also affect the association of this latter AF with pre-60S intermediates. Mrt4 is an early-binding AF recruited in the nucleolus (state C – Figure 4A and Supplementary Table S1) (17–19), which dissociates from the pre-60S only in late nuclear/cytoplasmic stages upon recruitment of Yvh1 (50,52,58–62). The results show that upon Nop53 depletion, Mrt4 is still associated with pre-60S intermediates in bottom fractions [18–24] of the density gradient, but also considerably enriched in the free fractions [1–10] (Supplementary Figure S7A), indicating that in this condition Mrt4 is not trapped in cytoplasmic pre-60S intermediates, as previously reported in $\Delta yvh1$ cells (58,59). Consistent with this interpretation, Nop53 depletion led to an increased association of Mrt4 with 7S and 27SA/B pre-rRNAs containing particles, and decreased as-

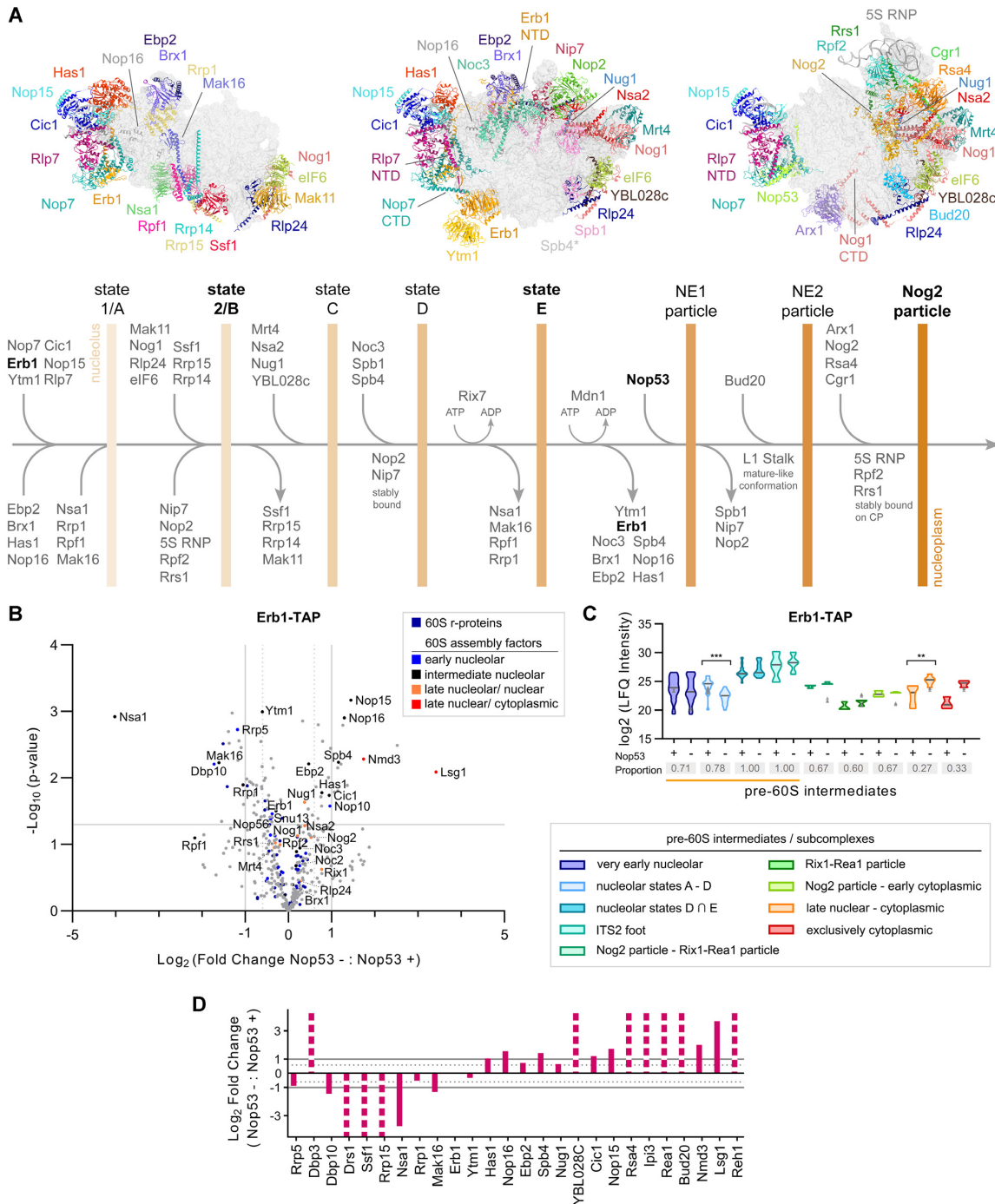


Figure 3. Erb1 is mostly associated with state E and late pre-60S particles upon depletion of Nop53. (A) Schematic representation of early nucleolar and nuclear 60S maturation steps showing the sequential changes in protein composition that leads to the pre-60S intermediates, indicated by vertical bars. Structures correspond to PDB IDs: 6C0F, 6ELZ and 3JCT. *Spb4 is present in state E but not shown. NE: Nop53 early particle, NTD: N-terminal domain, CTD: C-terminal domain. (B–D) Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of preribosomes affinity-purified in biological triplicates with Erb1-TAP. (B) Comparison between Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions highlighting the identified 60S r-proteins and AFs. The latter were classified according to the 60S maturation stage they participate in. (C) Analysis of clusters of 60S AFs representative of specific pre-60S intermediates. Violin plots show the distribution of the copurified 60S AFs based on their log₂-transformed LFQ Intensity values (states D ∩ E designates intersection—common AFs between these particles); height: delimited by the highest and lowest LFQ Intensity values of the cluster; width: frequency (high: wide; low: narrow) of the LFQ Intensity values observed in the cluster. The 60S AFs identified in only one condition (Nop53+ or Nop53–) are depicted as gray triangles. The median is indicated by a dark gray line. Increased (higher median) or decreased (lower median) association with components of the indicated pre-60S intermediates is revealed by comparing Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions. Statistically significant ($P < 0.05$) differences are highlighted in the graph (*** $P = 0.0001$; ** $P = 0.0043$). Gray boxes show the proportion of each cluster that was affinity-purified (number of affinity-purified 60S AFs components of the cluster/ total number of 60S AFs in the cluster). A horizontal bar indicates the pre-60S intermediates with which Erb1 is expected to be associated. (D) The log₂-transformed fold change value of each identified 60S AF was normalized to the bait and orderly plotted according to their sequential engagement in the 60S assembly. Dashed columns indicate the 60S AFs exclusively identified in one condition.

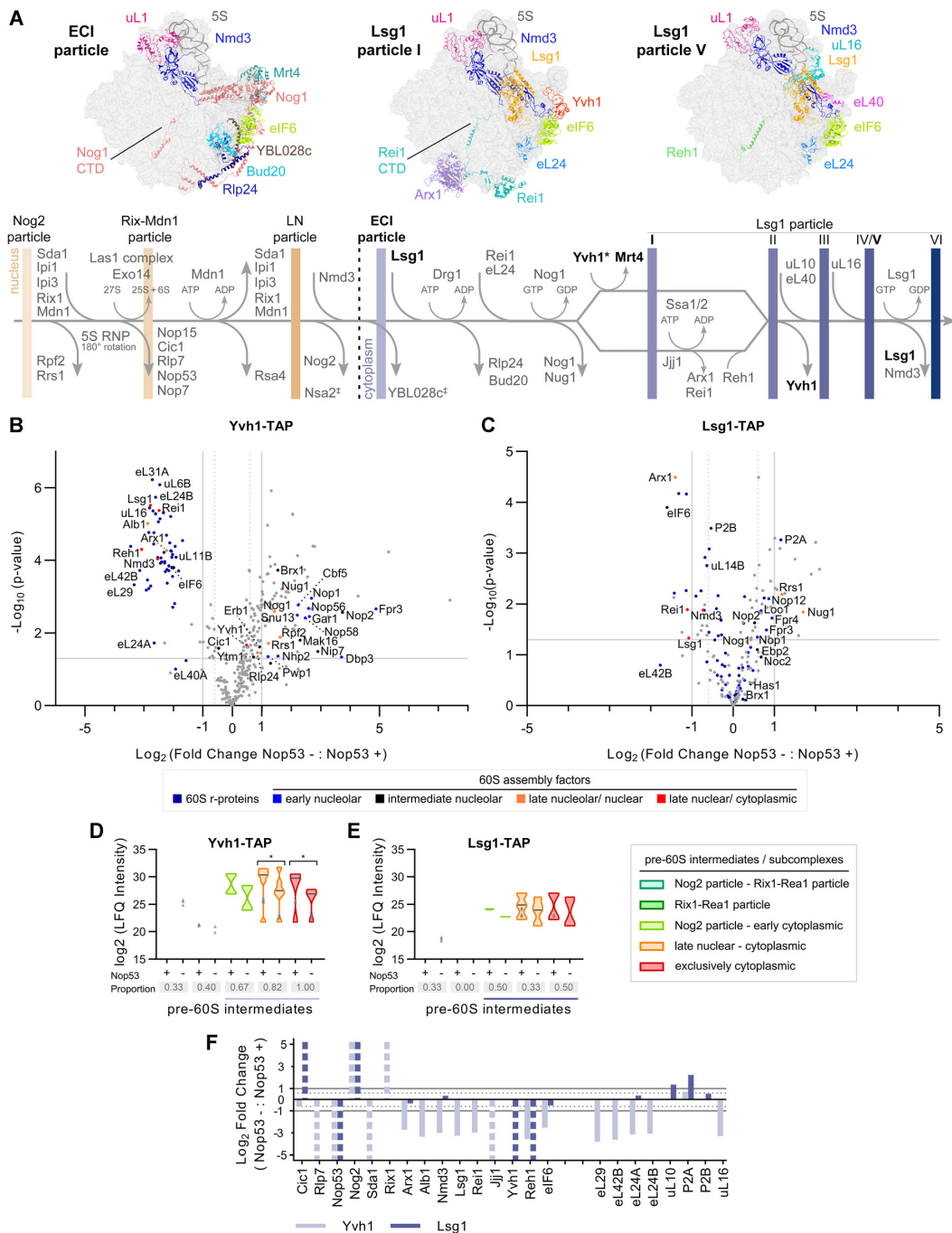


Figure 4. Nop53 depletion has different impacts on the interactome of the late-binding 60S AFs Yvh1 and Lsg1. (A) Schematic representation of late nuclear and cytoplasmic 60S maturation events highlighting the protein compositional changes and the resulting pre-60S intermediates, indicated by vertical bars (Structures correspond to PDB IDs: 6N8K, 6RZZ and 6R15). LN: late nuclear Rlp24 particle; ECI: early cytoplasmic-immediate Rlp24 particle; CTD: C-terminal domain; ‡ uncertain dissociation stage; * late nuclear/cytoplasmic recruitment. (B–F) Effect of Nop53 depletion on late 60S maturation stages. Preribosomes affinity-purified in biological triplicates with the late-binding AFs (B) Yvh1 and (C) Lsg1 were analyzed by mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. Volcano plots show the comparison between Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions. The identified 60S r-proteins and AFs are highlighted in colors according to the 60S maturation stages they participate in. (D, E) Analysis of clusters of 60S AFs representative of specific pre-60S intermediates. Violin plots show the distribution of the copurified 60S AFs based on their log_2 -transformed LFQ Intensity values; height: delimited by the highest and lowest LFQ Intensity values of the cluster; width: frequency (high: wide; low: narrow) of the LFQ Intensity values observed in the cluster. The 60S AFs identified in only one condition (Nop53+ or Nop53–) are depicted as gray triangles. The median is indicated by a dark gray line. Increased (higher median) or decreased (lower median) association with components of the indicated pre-60S intermediates is revealed by comparing Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions. Statistically significant ($P < 0.05$) differences are highlighted in the graph (Yvh1-TAP * $P = 0.03150$; * $P = 0.00205$). Gray boxes show the proportion of each cluster that was affinity-purified (number of affinity-purified 60S AFs components of the cluster/ total number of 60S AFs in the cluster). A horizontal bar indicates the pre-60S intermediates with which Yvh1 or Lsg1 are expected to be associated. (F) log_2 -transformed fold change values of intermediate/late 60S AFs and cytoplasmic 60S r-proteins, normalized to the bait, were plotted following their order of association with the pre-60S. Dashed columns indicate the 60S AFs exclusively identified in one condition.

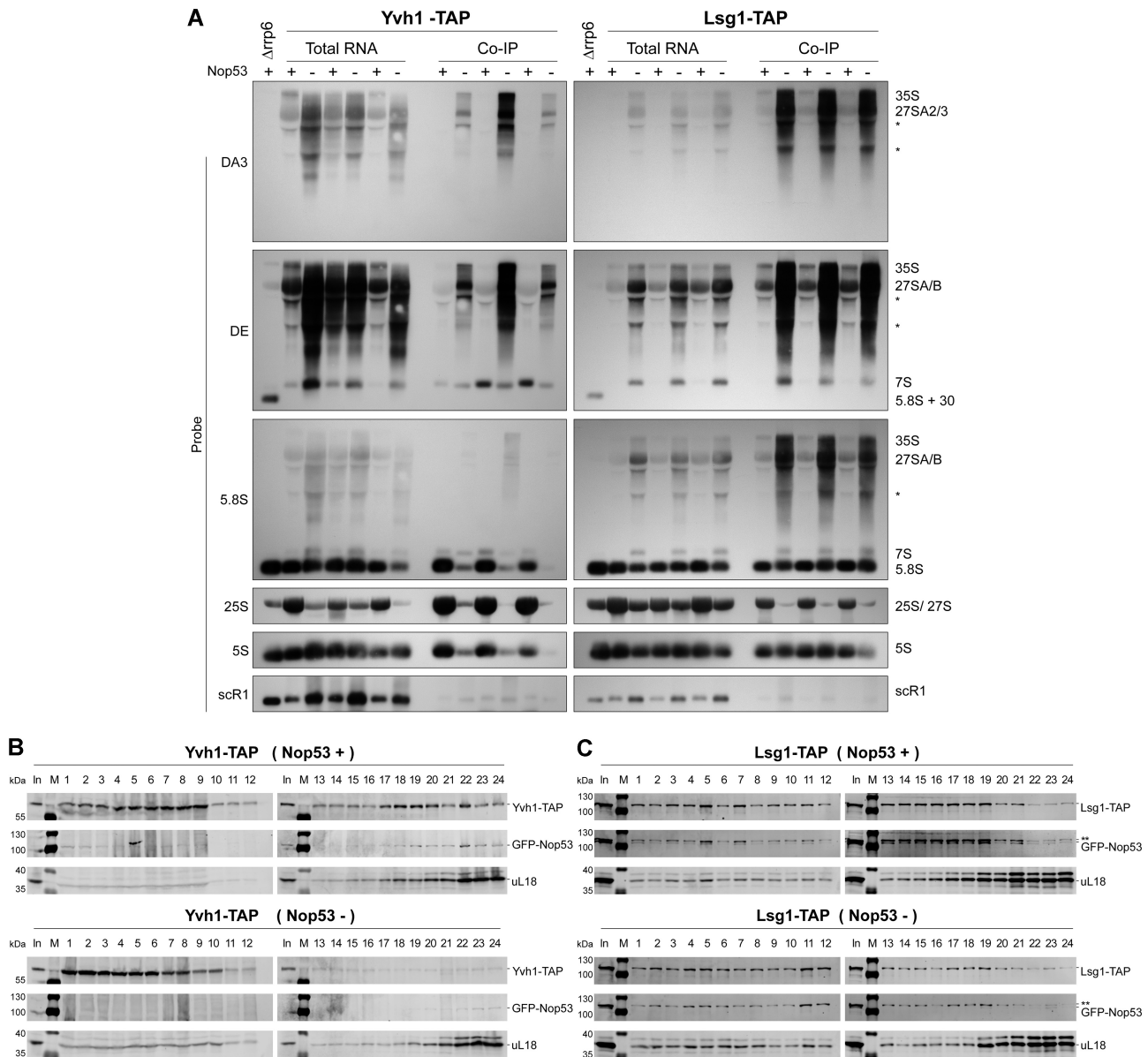


Figure 5. Yvh1 recruitment to the pre-60S is impaired upon depletion of Nop53. (A) Northern blot analysis of the pre-rRNAs affinity-purified (IP) in biological triplicates with Yvh1-TAP and Lsg1-TAP both in Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions, together with the Input (total RNA), using the indicated probes. The $\Delta rrp6$ strain is a control for the accumulation of 5.8S+30 pre-rRNA. *non-specific band. (B, C) Glycerol density gradient sedimentation of the TAP-tagged AFs (B) Yvh1 and (C) Lsg1 in Nop53 depleted (–) and non-depleted (+) conditions. Whole-cell lysates were loaded on a 10–30% linear glycerol gradient. The 24 fractions collected were analyzed by western blot with anti-CBP, anti-GFP and anti-uL18. ** indicates the Lsg1-TAP band close to GFP-Nop53 (In: input - whole cell lysate; M: protein MW marker).

sociation with mature rRNAs (Supplementary Figure S7B). In this condition, most of the Mrt4 particles might correspond to nucleolar and nuclear intermediates. Accordingly, the subcellular localization of Mrt4 was not significantly affected upon depletion of Nop53, remaining mostly nucleolar (Supplementary Figure S7C, D).

Effect of *nop53* truncated mutants on cellular growth and late 60S maturation events

To further characterize the role of different regions of Nop53 during ribosome assembly, we constructed N- and

C-terminally truncated mutants of Nop53 fused to GFP (Figure 6A). Nop53 N-terminal half covers a highly conserved region, which harbors between the amino acid residues 60 and 64 the motif (AIM) of interaction with the RNA helicase Mtr4, that interacting with the RNA exosome complex, assists the 3'-5' processing of the 7S pre-rRNA (38,39,94). Four different N-terminal mutants were created to assess the role of the region surrounding the AIM: *nop53* $\Delta 1-26$ and *nop53* $\Delta 1-47$, which still contain the AIM, as well as *nop53* $\Delta 48-98$ and *nop53* $\Delta 1-71$, which are both devoid of the AIM. In parallel, four *nop53* C-terminal mutants were constructed by progressively remov-

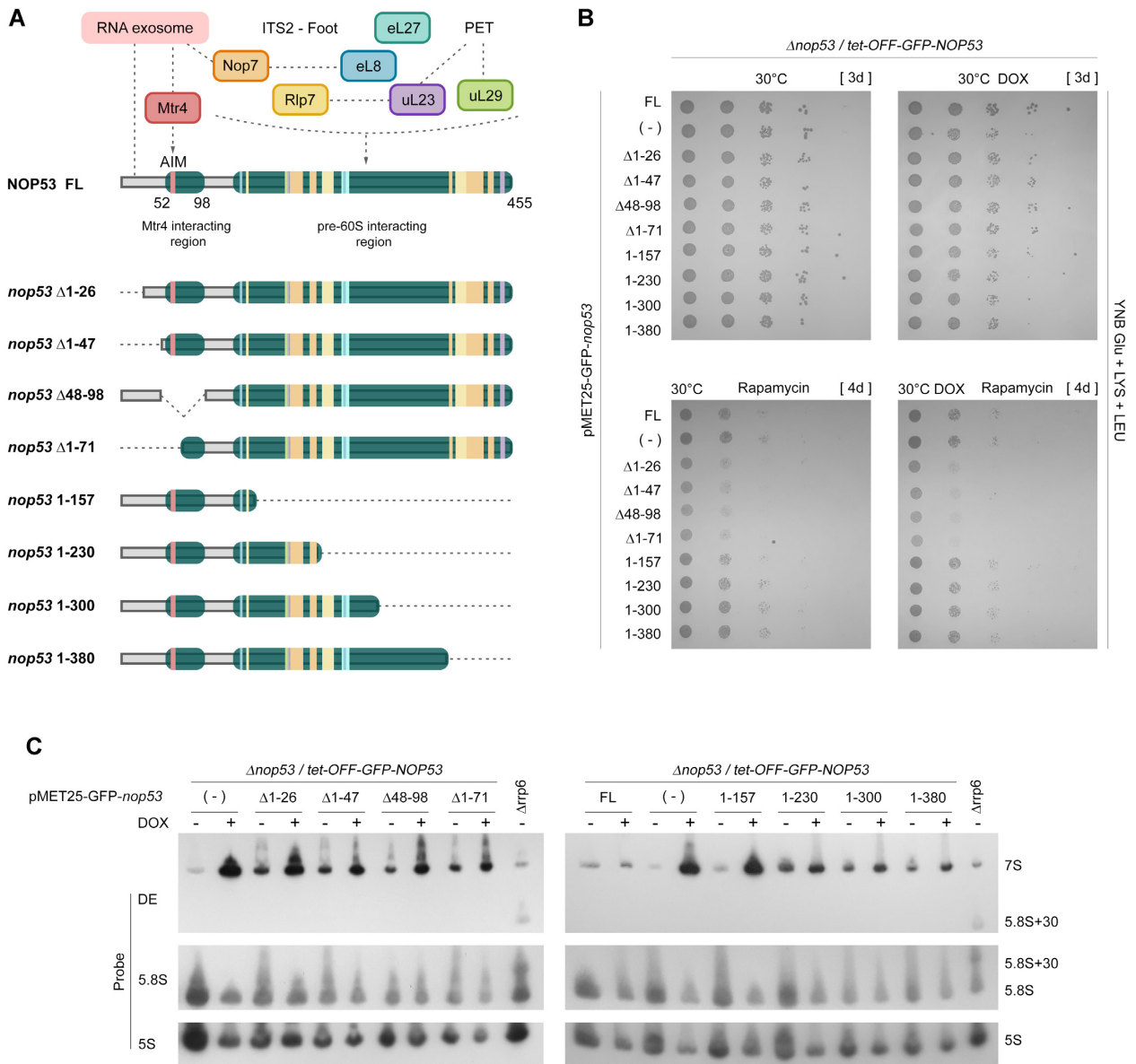


Figure 6. Effect of *nop53* truncation mutants on cell growth and pre-rRNA processing. (A) Schematic representation of the *nop53* N- and C-terminal truncated mutants (Δ 1–26, Δ 1–47, Δ 48–98, Δ 1–71, 1–157, 1–230, 1–300, 1–380) indicating the regions involved in protein-protein interactions. The exosome and the RNA helicase Mtr4 interact with Nop53 N-terminus where the conserved AIM is found. 60S AFs (Rlp7, Nop7) and r-proteins (eL8, uL23, eL27, and uL29) which are associated with the ITS2-containing foot or PET directly interact with Nop53 at different points along the middle region and the C-terminus. (B) Spot growth assays performed with the conditional strain Δ *nop53*/*tet-OFF-GFP-NOP53*, expressing the positive control GFP-Nop53 full length (FL), the negative control empty vector (–), or the indicated GFP-tagged *nop53* N- and C-terminal truncated mutants. These strains were spotted in 10-fold serial dilution on to YNB Glu + LYS+LEU solid medium supplemented or not with doxycycline (DOX – 1.5 μ g/ml) and rapamycin (400 nM). They were incubated at 30°C for the period indicated in square brackets. (C) Northern blot analysis of total RNA extracted from the same strains grown at 30°C with or without doxycycline (DOX – 1.5 μ g/ml) to evaluate the effect of the *nop53* truncated mutants on the pre-rRNA processing. The RNA resolved through 8% polyacrylamide denaturing gel electrophoresis was analyzed using the indicated probes. The Δ *rrp6* strain was employed as a control for the accumulation of 5.8S + 30 pre-rRNA. All tested *nop53* truncated mutants accumulated 7S pre-rRNA, although at different levels. The quantification of the bands is shown in Supplementary Figure S8D.

ing 50–80 amino acids from this end (*nop53* 1–157, *nop53* 1–230, *nop53* 1–300 and *nop53* 1–380). Nop53 C-terminus is mostly engaged in interactions with r-proteins, 25S rRNA, and AFs such as Rlp7 and Nop7. Plasmids expressing the mutants were transformed into the strain Δ *nop53*/*tet-GFP-NOP53*, allowing the exclusive transcriptional repression of the full-length *NOP53* upon treatment with doxycycline

(DOX), but not that of the tested mutant. GFP was used as a negative control (–), and the full-length GFP-Nop53 (FL) as a positive control (Supplementary Fig S8A).

The growth complementation assay shows that the tested truncation mutants partially complemented the growth of Δ *nop53* at 30°C (Figure 6B and Supplementary Figure S8B-C). Consistent with this phenotype, all the truncation mu-

tants accumulated 7S pre-rRNA although at different levels (Figure 6C and Supplementary Figure S8D). The N-terminal deletions and the mutant *nop53* 1–157 exhibited the highest increases of 7S pre-rRNA levels, similar but inferior to Nop53 depletion. These observations not only confirm the essential role of the AIM, and the important function of the central region of Nop53 (amino acids 157–300) stabilizing its association with the pre-60S, but also indicate that the region immediately preceding the AIM, comprising the first 47 amino acid residues, is important to ensure adequate 7S pre-rRNA processing.

To better differentiate the effect of the *nop53* deletion mutants, we performed the complementation assay at different growth conditions. The C-terminally truncated mutants seemed slightly more cold-sensitive than the N-terminal deletion mutants (Supplementary Figure S8C). Both N- and C-terminal mutants exhibited, as previously shown for *nop53* AIM mutants (48), comparable sensitivity to hygromycin B, a translation inhibitor that affects the decoding fidelity (95) (Supplementary Figure S8C). However, upon treatment with the TOR inhibitor, rapamycin, which triggers a decrease of protein synthesis and ribosome biogenesis (96–99), the N-terminal truncated mutants were significantly more sensitive than the C-terminal deletion mutants, and remarkably impaired the cellular growth more than the depletion of Nop53 (Figure 6B). This effect was also detected without doxycycline treatment (in the presence of full-length Nop53), characterizing a dominant-negative phenotype.

As the *nop53* N-terminal truncated mutants mostly affect the interaction of Nop53 with the exosome, without impairing the association of Nop53 with the pre-60S, we compared their effect to the depletion of Nop53. Although in both cases the 7S pre-rRNA accumulates with consequent retention of the foot in late pre-60S intermediates, in the first case the *nop53*-truncated mutants would be found embedded at the basis of the foot, whereas in the second case Nop53 binding sites would be vacant. To assess whether the recruitment of Yvh1 to the pre-60S could be affected by the different *nop53* N-terminal mutants, we performed density gradient fractionation (Figure 7). Importantly, all tested *nop53* N-terminal truncated mutants co-sedimented with uL18 in bottom fractions of the gradient, confirming that the N-terminus is not necessary for the stable association of Nop53 with the pre-60S (Figure 7C–F). As expected, and shown above, depletion of Nop53 decreased the association of Yvh1 with pre-60S intermediates, displacing it from fractions 13–19 to the free fractions 1–5 (Figure 7A, B). Interestingly, the N-terminal mutants exhibited different impacts on the Yvh1 sedimentation profile. Yvh1 was still mainly associated with pre-60S in the *nop53*Δ1–26 mutant, which caused only a slight increase of the free fractions. On the contrary, the mutants *nop53*Δ1–47, *nop53*Δ48–98, and *nop53*Δ1–71 significantly affected the association of Yvh1 with the pre-60S, similar to Nop53 depletion. Together, these results pointed to the importance of the Nop53 N-terminus and the ITS2-foot disassembly for the Yvh1 recruitment.

Complementary to these observations, we compared the global effect of Nop53 depletion and its N-terminal mutants on the preribosomal and mature 60S subunits by chemically probing the RNA structure of the 25S rRNA us-

ing *in vivo* SHAPE assay (Supplementary Figure S9) (75). We focused on pre-60 binding sites of Nop53 (H16–17 in Domain I (38)) and Yvh1 (P stalk and SRL in Domains II and VI, respectively (50)). If the effect of Nop53 depletion and the N-terminal mutations on the 60S subunits were the same, we would have observed a very similar chemical modification pattern. Instead, the chemical reactivity of several regions of the 25S rRNA were differentially affected. Interestingly, the nucleotide accessibility of the Nop53 interacting site was increased only upon depletion of Nop53 (Supplementary Figure S9A). The mutant *nop53* Δ1–26, which had almost no effect on the Yvh1 recruitment (Figure 7C), exhibited a modification pattern very similar to Nop53 full-length with all tested probes. Coherently, the other N-terminal mutants (*nop53*Δ1–47, *nop53*Δ48–98 and *nop53*Δ1–71) exhibited very similar modification patterns among them, as observed in the P-stalk and SRL regions, but different from Nop53 depletion (Supplementary Figure S9B, C). These changes in the modification patterns might correlate with the accumulation of different pre-60S intermediates, as well as of defective preribosomal and mature 60S particles. Regardless of the underlying cause, the observed differences attest to the involvement of different impacts on the 60S subunits, strengthening the hypothesis that the role of Nop53 during the pre-60S maturation exceeds that of its N-terminus.

Nop53 depletion has different impacts on the pre-60S maturation compared to truncation mutants lacking the exosome recruiting motif

To more thoroughly evaluate whether the *nop53* N-terminal truncation mutants differentially affect the 60S biogenesis pathway in comparison to Nop53 depletion, we set out to analyze the preribosomal intermediates affinity-purified with Nop7-TAP in these different conditions by mass-spectrometry based label-free quantitative proteomics (Figure 8 and Supplementary Figure S10). Since Nop7 remains associated with the pre-60S from an early nucleolar stage up to Nop53 release, this AF was chosen for probing not only all Nop53-containing intermediates but also earlier maturation stages. We focused our analysis on the *nop53*Δ48–98 and *nop53*Δ1–71 mutants, both devoid of the Mtr4 interacting motif (AIM), and therefore incapable of recruiting the exosome for the 7S pre-rRNA trimming and the foot disassembly. Interestingly, the pre-60S intermediates co-purified with Nop7 upon Nop53 depletion showed significant differences compared to both *nop53*Δ48–98 and *nop53*Δ1–71, whereas these mutants showed similar profiles between them (Figure 8). Upon depletion of Nop53, Nop7 particles exhibited decreased levels of some very early nucleolar AFs (e.g. Rrp5, Pwpl, Mak21), when comparing with both *nop53* mutant strains, but statistically significant enrichment of several state D-E particle components (e.g. Noc3, Spb4, Nop2, Nip7, Spb1), strongly suggesting a predominant association of Nop7 with these nucleolar pre-60S intermediates when Nop53 is lacking (Figure 8E). These observations are not only in agreement with the above-mentioned results showing that Nop53 depletion impairs the transition from state E to Nog2 particle, but also indicate that this process is more dependent on the recruitment of Nop53 to the pre-60S than on the ability of Nop53 to recruit the RNA ex-

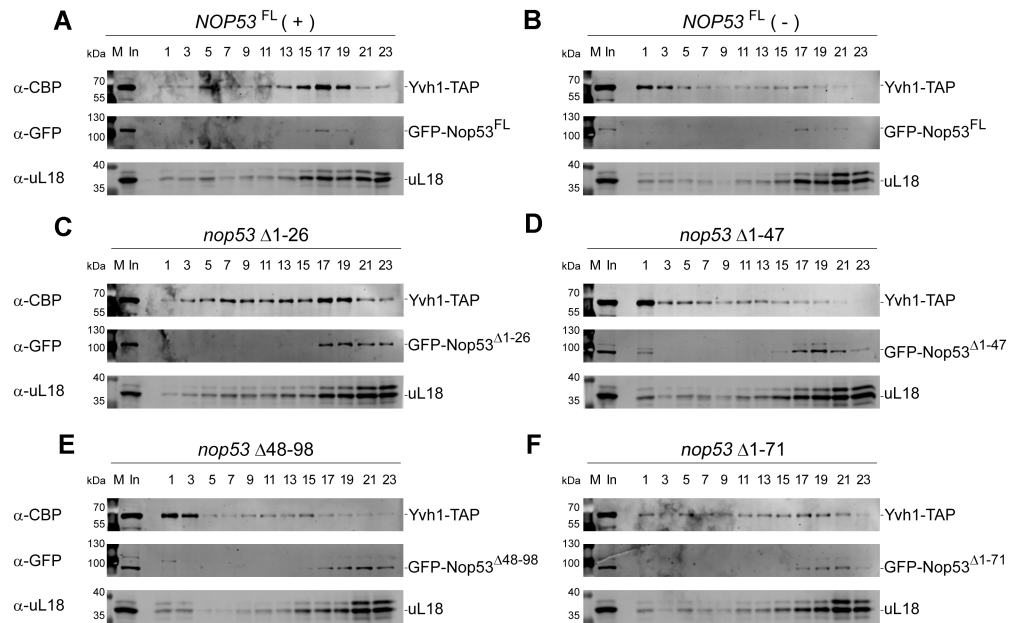


Figure 7. *nop53* N-terminal truncated mutants impair the recruitment of Yvh1 to the pre-60S. Sedimentation profile analysis of Yvh1-TAP expressed in the conditional strain $\Delta nop53$ carrying (A) the positive control *GFP-NOP53^{FL}* full length (+), (B) the negative control empty vector (–), or the GFP-tagged N-terminal truncated mutants (C) *nop53* $\Delta 1-26$, (D) *nop53* $\Delta 1-47$, (E) *nop53* $\Delta 48-98$ and (F) *nop53* $\Delta 1-71$. Whole-cell lysates were subjected to 10–30% glycerol density gradient sedimentation followed by top to bottom fractionation. All the odd fractions collected were analyzed by western blot with anti-CBP, anti-GFP, and anti-uL18. (In: input – whole cell lysate; M: protein MW marker).

osome. Consistent with this interpretation, the hierarchical clustering of samples, based on the LFQ intensity values of all identified 60S AFs, clustered the *nop53* N-terminal mutants together, separated from the Nop53 depletion replicates (Supplementary Figure S10C), which is also shown in the Principal Component Analysis (PCA) (Figure 8D). Collectively, these findings corroborate recently revealed structural details of the transition from state E to Nog2 particle (Figure 9A) (28), showing that the recruitment of Nop53 to the foot helps to reposition the L1 stalk at a near mature conformation, which is essential for the subsequent formation of the Nog2 particle.

DISCUSSION

Nop53 depletion affects nucleolar and late 60S maturation stages

The first studies characterizing the role of Nop53 in yeast *S. cerevisiae* showed that the depletion of this essential 60S AF caused accumulation of 7S and 27S pre-rRNAs (89–91). The underlying molecular mechanism, however, has only recently been described, revealing that Nop53 directly recruits the Mtr4-associated exosome complex for the 7S pre-rRNA 3′-5′ processing (32,38,39,41). Excepting its role in the ITS2 removal and foot disassembly (32,40), little is known about the global impact of Nop53 recruitment on the compositional changes of the maturing large ribosomal subunit. To address this question, this study has evaluated how Nop53 depletion affects different stages of 60S assembly, probing it with 8 different AFs used as baits to affinity-purify preribosomal intermediates.

Nop7-TAP and Erb1-TAP allowed us to evaluate the earliest nucleolar 60S maturation stages, whereas the Nog2 particle components, Arx1-TAP and Rsa4-TAP, provided a window spanning the nucleoplasmic stages. Our quantitative proteomic analyses showed that upon depletion of Nop53, pre-60S subunits copurified with both A₃-factors Nop7 and Erb1 coenriched components of the nucleolar state E particle and decreased association with earlier AFs. Of note, the Nsa1 module, which is removed by the AAA-ATPase Rix7 in the transition from nucleolar state D to E (17–20), was significantly decreased in Erb1 particles upon Nop53 depletion. As the transition from the nucleolar state E to the nuclear Nog2 particle coincides with the replacement of Erb1 by Nop53 at the basis of the foot (17,22,25), these observations strongly suggested an impaired formation of Nog2 particles. Consistent with this hypothesis, both Rsa4-TAP and Arx1-TAP copurified significantly reduced levels of Nog2 particle components in the Nop53-depleted condition.

Comparing the observed phenotype with already described mutants of AFs that constitute the state E or Nog2 particles, we noticed that depletion of Nop53 differs from *ytm1* point mutants, which completely blocks the pre-60S maturation at state E particles, avoiding the Real-driven Erb1 release (17,25,27). Nop53 depletion is also not comparable to the depletion of most of the B-factors (required for the C₂ cleavage), that block early nucleolar stages, impairing the transition from state C to D particles (36,37). Nog2 depletion, on the contrary, exhibited a similar profile to the Nop53-depleted condition, disrupting Rsa4 and Arx1 association with pre-60S particles (100,101). Interestingly, however, it caused almost no effect on state E compo-

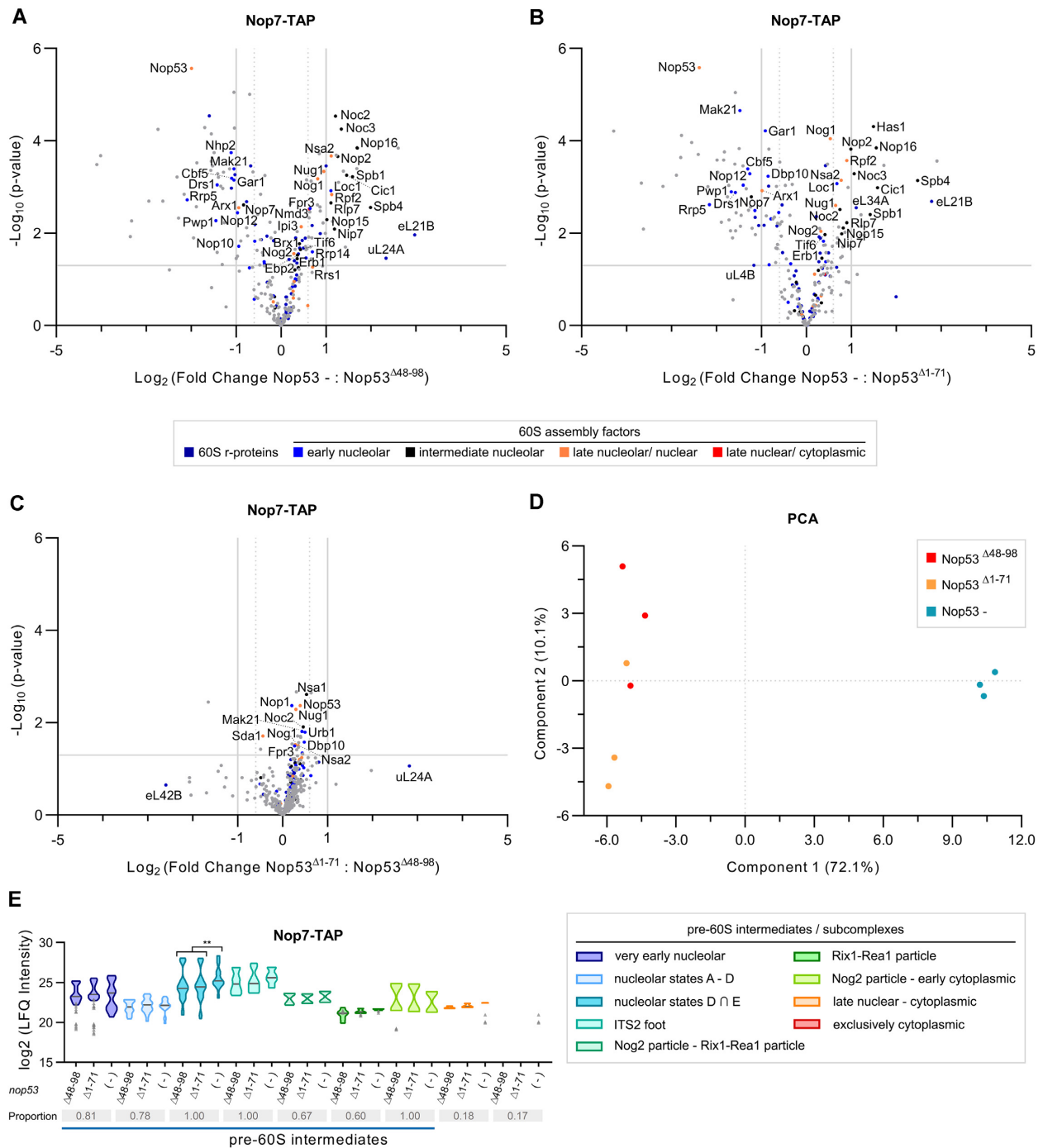


Figure 8. Impact of *nop53* N-terminal truncated mutants on the 60S subunit assembly compared to depletion of Nop53. Nop7-TAP was expressed in the conditional strain $\Delta nop53/p1et-Off-GFP-NOP53$ carrying the empty vector, or expressing one of the mutants $GFP-nop53\Delta 48-98$ and $GFP-nop53\Delta 1-71$. Strains were grown at the same conditions, under repression of *NOP53* full-length expression. Preribosomes copurified with Nop7-TAP in biological triplicates upon depletion of Nop53 or in the presence of *nop53* N-terminal mutants were analyzed by mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. Volcano plots show the comparison of Nop53 depletion (Nop53⁻) with (A) *nop53*^{Δ48-98} and with (B) *nop53*^{Δ1-71}, as well as between the (C) *nop53* mutants (*nop53*^{Δ1-71} versus *nop53*^{Δ48-98}). 60S r-proteins and AFs are highlighted in colors, the latter being classified according to the 60S maturation stage they participate in. (D) PCA plot (Benjamini-Hochberg cut-off FDR 0.05) compares the proteomic profiles of the biological replicates. (E) Analysis of clusters of 60S AFs representative of specific pre-60S intermediates. Violin plots show the distribution of the copurified 60S AFs based on their log₂-transformed LFQ Intensity values (states D ∩ E designates intersection – common AFs between these particles); height: delimited by the highest and lowest LFQ Intensity values of the cluster; width: frequency (high: wide; low: narrow) of the LFQ Intensity values observed in the cluster. The 60S AFs identified in only one or two conditions are depicted as gray triangles. The median is indicated by a dark gray line. The three conditions were pairwise compared and statistically significant ($P < 0.05$) differences are highlighted in the graph (Nop53⁻ versus *nop53*^{Δ48-98} ** $P = 0.0015$; Nop53⁻ versus *nop53*^{Δ1-71} *** $P = 0.0065$). Gray boxes show the proportion of each cluster that was affinity-purified (number of affinity-purified 60S AFs components of the cluster/ total number of 60S AFs in the cluster). A horizontal bar indicates the pre-60S intermediates with which Nop7 is expected to be associated.

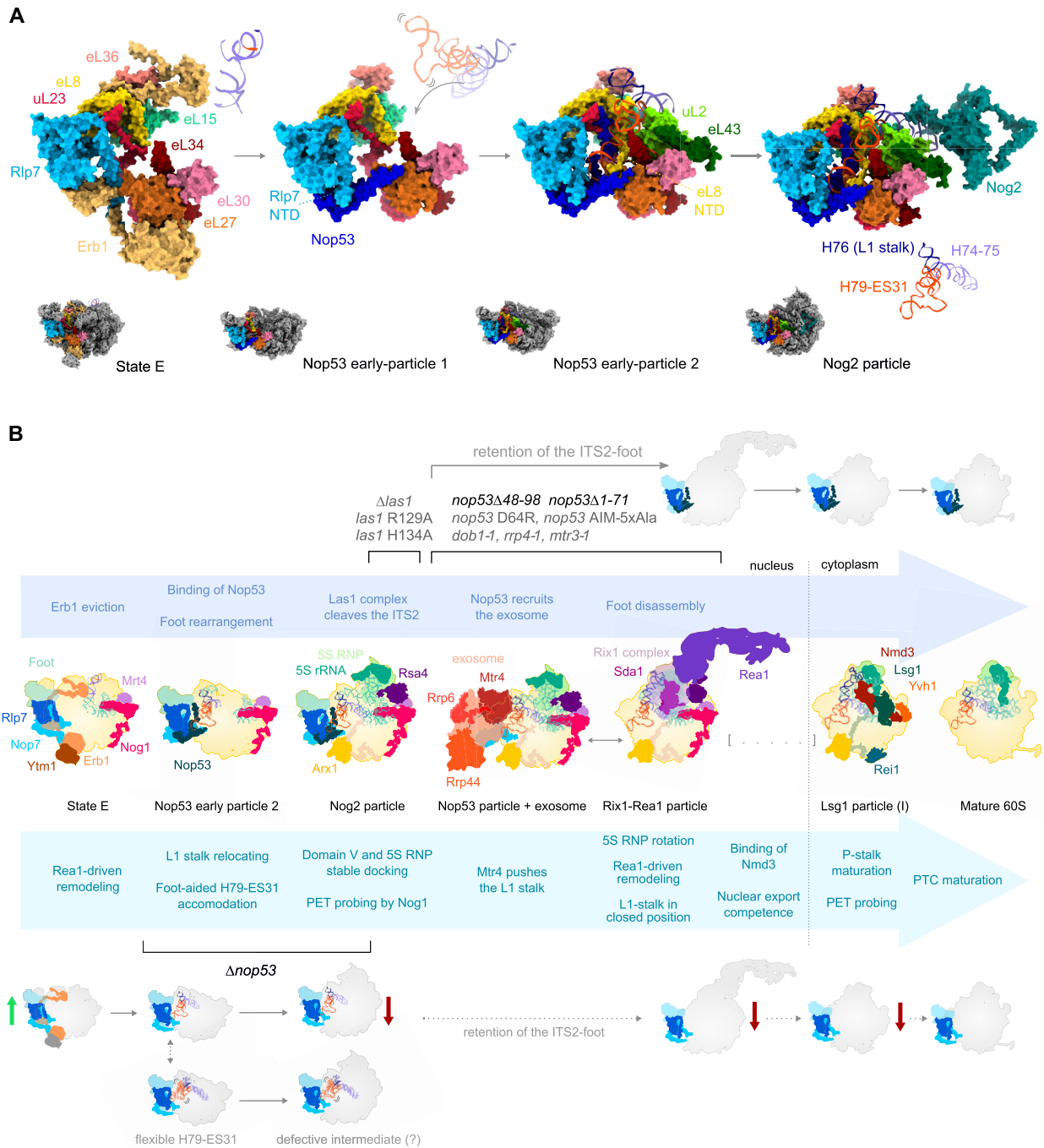


Figure 9. Nop53 plays an essential structural role during the transition from nucleolar state E to the Nog2 particle. (A) Structural and compositional changes undergone by the ITS2-foot, which allow the stable accommodation of the H79-ES31 during the 25S rRNA Domain V anchoring to the pre-60S. The transition from the state E particle to the Nog2 particle is depicted by the cryo-EM structures PDB IDs 6ELZ, 6YLX, 6YLY and 3JCT, highlighting only the 60S AFs and r-proteins that interact directly with the L1-stalk basis (H74-H76) and the H79-ES31. For simplicity, Nip7 and Nop2 are not shown in the state E particle. Upon Erb1 eviction and Nop53 binding, Rlp7 N-terminus (NTD) is displaced. Nop53 extensions interact directly with the H79-ES31 and with 4 (Rlp7, eL8, uL23, and eL27) out of the 8 proteins that comprise the H79-ES31 docking site. (B) Schematic representation of the 60S assembly pathway based on the PDB IDs 6ELZ, 6YLY, 3JCT, 6FT6, 6FSZ, 6YLH, 6RZZ and 4V88. The 25S rRNA Domain V is depicted in green, whereas the L1-stalk basis and the H79-ES31 are colored as in (A). Important remodeling events are summarized below the structures, whereas foot-associated events above. Our proposed model indicates that due to its structural role, Nop53 depletion directly affects the formation of Nog2 particles impairing later steps of pre-60S maturation. This effect was neither observed upon removal (*nop53* Δ 48–98, *nop53* Δ 1–71) or mutation (*nop53* D64R, *nop53* AIM 5xAla, (48)) of Nop53 exosome-interacting region, nor upon mutation of Las1 (*las1* R129A, *las1* H134A, (37,48)) or of the exosome subunits and cofactors (*dob1-1*, *rrp4-1*, *mtr3-1*, (49)). These mutants, by impairing ITS2 processing, cause the retention of the foot in late pre-60S intermediates, without significant impacts on the export competence or cytoplasmic maturation events.

nents (36,37,100), suggesting a critical role for Nop53 binding on the transition from state E to Nog2 particle.

The disassembly of the foot structure, which is dependent on the ITS2 processing, has been shown nonessential for most of the late nuclear remodeling events, including nuclear export, so that late pre-60S subunits still carrying the foot can escape to the cytoplasm and engage in translation (37,48,49). Here we show that depletion of Nop53 also causes retention of the foot structure in late pre-60S intermediates, similar to mutant strains impaired in the recruitment or activity of the exosome (*nop53* D64R, *nop53* AIM-5xAla, *dob1-1*, *rrp4-1*, *mtr3-1*) or the Las1-complex (*las1* Δ , *las1* R129A, *las1* H134A).

However, different from the above-mentioned ITS2-processing mutants, the effect of Nop53 depletion reverberates in the following steps of the 60S maturation pathway. Both Rsa4 and Arx1 exhibited reduced association with components of the nucleoplasmic Rix1-Rea1 particle, reflecting the delayed formation of Nog2 particles. This effect was slightly more pronounced on the interaction of Arx1 with pre-60S intermediates. As a non-essential nuclear export AF, however, it would not be sufficient to halt the pre-60S maturation or cause a significant nuclear export defect (86). Indeed, the analysis of preribosomal particles affinity purified with the late-binding AFs Nmd3 and Lsg1 showed that late nuclear and early cytoplasmic intermediates were still formed under Nop53-depleted condition, although at decreased levels. In line with that, the nucleocytoplasmic AF Nmd3 exhibited a partial nuclear enrichment upon Nop53 depletion, reminiscent of the phenotype of depletion of export factors (102,103). Likewise, the nucleolar foot AF Nop7 was not significantly misplaced to the cytoplasm, as previously reported for *nop53* AIM-5xAla (48), but found mostly in the nucleoplasm, similar to Arx1, whose subcellular localization remained unaltered.

Remarkably, the late-acting nucleocytoplasmic AF Yvh1 was absent on preribosomes isolated with all tested late-binding AFs (Arx1, Nmd3, Lsg1) upon depletion of Nop53. This observation was further confirmed using Yvh1 itself as a bait, showing a prominent decrease of copurified late AFs, r-proteins, as well as precursor and mature rRNAs. In the same condition, cytoplasmic Lsg1 particles did not exhibit the same compositional change, suggesting that Nop53 depletion affects more intensely particular late maturation events, specifically impairing the Yvh1 recruitment. The retention of the ITS2-foot seems to contribute to this effect, as *nop53* N-terminal truncation mutants lacking the exosome-interaction motif (AIM) also caused a similar effect on the Yvh1 recruitment. The main cause, however, seems to be related to the less efficient formation of late pre-60S intermediates to which Yvh1 binds, given that earlier steps are affected upon Nop53 depletion, similar to what has been reported in Arx1 particles upon Cgr1 depletion (104).

Consistent with a delayed formation of late pre-60S intermediates, depletion of Nop53 did not phenocopy the $\Delta yvh1$ effect on cytoplasmic pre-60S intermediates. The binding of Yvh1, which is a dual-specificity phosphatase and zinc-binding protein, allosterically induces the dissociation of Mrt4 from the P-stalk (50,58–62). Upon depletion of Nop53, Mrt4 was still associated with foot-containing pre-60S particles but did not accumulate in the cytoplasm as in $\Delta yvh1$ (58,59), evidencing that the pre-60S maturation

was not specifically blocked at the Yvh1-dependent release of Mrt4, but at an earlier step. The implications of the increased free pool of Yvh1 remain to be tested, considering the numerous cellular processes to which it has been linked (105–108).

Evidence of additional roles of Nop53 during the 60S subunit assembly

Comparing the overall effect of Nop53 depletion with previous reports on the retention of the ITS2-foot in late pre-60S subunits, interesting differences arise. Whereas depletion of Nop53 causes nuclear enrichment of Nmd3, point mutations in *nop53* N-terminal AIM are sufficient to cause noticeable cytoplasmic mislocalization of Nop7 and Cic1 (48), so as depletion or mutation of the endoribonuclease Las1, generating translation competent foot-containing 60S subunits (37,48). The early pre-60S maturation steps are likewise differentially affected. In contrast to Nop53 depletion, Nop7 particles affinity-purified from cells expressing the catalytic-dead mutant *las1* H134A did not exhibit enrichment of early-binding AFs, but instead, decreased levels of Erb1, Ytm1, and other components of state E particles (37). Taken together, these observations illustrate how Nop53 depletion has a different effect on the 60S assembly pathway compared to other conditions that exclusively block the ITS2 processing, strengthening the hypothesis of an additional exosome-independent structural role played by Nop53, which was not hindered through AIM point mutations nor upon Las1 depletion.

This prompted us to evaluate the effect of new *nop53* truncation mutants. Interestingly, we observed that the Nop53 N-terminal region upstream the AIM is also important for the ITS2 processing, as *nop53* N-terminal mutants lacking the first 47 aa, although still carrying the AIM, accumulated 7S pre-rRNA. Testing both *nop53* N- and C-terminal mutants in different growth conditions, we showed that only the N-terminal mutants were strongly affected upon treatment with the TOR-inhibitor rapamycin, yielding a dominant-negative phenotype. Upon TOR inhibition, several cellular processes are affected including translation and ribosome biogenesis, decreasing RNA Pol I and Pol III activities, and downregulating the expression of r-proteins and AFs (96–99). In this condition, we speculate that the *nop53* C-terminal mutants, being devoid of large anchoring extensions (426–455 aa) involved in interactions with Nop7, Rlp7, and uL23 (22,23), might be less stably associated with the pre-60S, causing a similar or milder effect than depletion of Nop53. The *nop53* N-terminal mutants, on the other hand, may compete with the full-length copy and cause, once bound to the pre-60S, the formation of foot-containing 60S subunits, which trigger not only translational stress, but retention of A₃ AFs in the cytoplasm synergistically affecting the ribosome biogenesis with TOR inhibition (37,48).

Preribosomes affinity-purified with Nop7 upon depletion of Nop53 exhibited significant compositional changes in comparison to those isolated from cells expressing *nop53* N-terminal mutants (*nop53* $\Delta 48$ –98 and *nop53* $\Delta 1$ –71), that bind to the pre-60S but cannot recruit the exosome. These observations are consistent with the *in vivo* SHAPE analysis of the 25S rRNA, revealing strikingly different modi-

fication patterns between Nop53 deletion and N-terminal mutants. If the only function of Nop53 during the 60S assembly were associated with the recruitment of the exosome, we would expect rather similar profiles. Instead, compared to both N-terminal mutants, Nop7 particles isolated upon Nop53 depletion were highly enriched for components of the state E particle, which is not only consistent with the other results but also shows that an efficient formation of Nog2 particles requires the association of Nop53 with the pre-60S regardless of its capacity of recruiting the exosome.

Structural basis of the expanded role of Nop53 in the 60S subunit assembly

Taking into account recently described cryo-EM structures, we can explain the molecular basis of the structural role played by Nop53 (Figure 9A), whose implications we have here discussed. During the assembly of the 60S subunit, the ITS2-containing foot plays an important role as a scaffold (9) in early nucleolar steps affecting the ITS1 processing (11,21), and later, assisting the L1 stalk (H74-79-ES31) repositioning (17,28). In the first case with Erb1, and in the second, after the recruitment of Nop53. In the transition from state E to Nog2 particle, several AFs are released, including those that stabilize L1 stalk in a premature conformation (17–19,22,28). After the recruitment of Nop53, the 25S rRNA Domain V, which contains the PTC, undergoes a significant remodeling with accommodation of the flexible L1 stalk (H74-H79-ES31) in a mature-like position and binding of the r-proteins uL2 and eL43 (Figure 9A) (28). Nop53 plays an important role during this process, allowing the repositioning of the N-terminus of Rlp7, which enables the accommodation of the H79-ES31 (Figure 9A) (17,28). In Figure 9A we highlight that Nop53 not only directly interacts with the H79-ES31, but also with AFs and r-proteins (Rlp7, eL8, uL23 and eL27) that comprise the H79-ES31 docking site (22,23,28). At this position, Nop53 seems to play a central role in organizing and stabilizing the interface of the foot with the r-proteins, impacting on eL8 NTD (Figure 9A, Nop53 early-particle 2), making room for the stable accommodation of H79-ES31 and assisting the L1 stalk repositioning. In light of this interpretation, we propose that in the absence of Nop53, the foot structure is likely more flexible or not properly oriented to scaffold the 25S rRNA Domain V remodeling, which would affect but not completely hinder L1 stalk rearrangement, explaining the observed delay in the transition from state E particle to Nog2 particle.

Remarkably, a similar effect has been reported upon depletion of uL2 and eL43, which bind to H79-ES31 just after the L1 stalk repositioning (Figure 9A). The absence of these r-proteins causes enrichment of early-binding AFs and decrease of Nog2-particle components affinity-purified with Nog1 (70). Likewise, truncation of the eL8 N-terminal extension, which directly interacts with H79-ES31 (Figure 9A), although not sufficient to avoid the formation of the Nog2 particle, impairs the recruitment of Sda1 and blocks the following 60S maturation steps (109), conceivably due to misfolding of the L1-stalk and H68-69, which are Sda1 binding sites on the pre-60S. These r-proteins share with Nop53 the interaction with the H79-ES31, highlighting the importance of an adequate 25S rRNA Domain V docking,

in the absence of which Nog2 particles might not be properly assembled. It remains to be tested if upon Nop53 depletion part of the Nog2 particles formed are also defective, impairing later remodeling events (Figure 9B).

The scaffolding role of the foot may be the reason why Nop53 recruitment at NE1 stage is not sufficient to trigger the ITS2 removal. Stable anchoring of Domain V and proper formation of the Nog2 particle must happen before the ITS2 processing starts. Interestingly, it has been recently shown that failure to recruit the AF Sda1, which interacts with the L1 stalk and the Rix1 complex (28), generates defective Nog2 particles, which are devoid of the ITS2-foot, with unstructured H75-H79-ES31, and exhibiting L1 stalk in an inward unusual position (29). As a possible interpretation, we propose that removal of the foot before stable binding of Sda1 or the Rix1 complex may destabilize the anchoring of H79-ES31 and induce the incorrect positioning of the L1 stalk, since during the ITS2 trimming by the exosome, the RNA helicase Mtr4 directly contacts both the H79-ES31 and the L1-stalk, pushing it towards a closed position (40). In the absence of Sda1 or the Rix1 complex, the exosome-induced L1 stalk repositioning would yield a deflected position halting later maturation steps. We postulate, therefore, that the ITS2 removal may act as a quality-control mechanism ensuring the proper assembly of Nog2 and Rix1-Real particles, both sensitive to a premature foot disassembly. The interconnection of the foot with other functional centers such as PET, through uL23, and PTC, through H79-ES31, may provide cues for the exact timing of disassembly (64,65,109) and Nop53 seems to play a central role as sensor interacting with both uL23 and H79-ES31. Whereas Las1 cleavage depends on 5S RNP docking and binding of B-factors to Domain V (36,37), the activity of the exosome seems to be affected by, but not to depend on the 5S RNP rotation and association of Sda1 and Rix1 complex, which might provide mechanical information to the foot through Nop53. This functional connection between Domain V and the ITS2 remains to be further investigated.

Altogether, our results provide biochemical evidence to an expanded role of Nop53, revealing that its depletion affects both nucleolar and late maturation events, provoking different defects in the 60S biogenesis compared to N-terminal deletion mutants. These findings support the important structural role played by Nop53 during the transition from nucleolar state E to Nog2 particle, remodeling and stabilizing the foot structure to perform its last scaffolding function: to assist the Domain V anchoring by accommodating the H79-ES31 (Figure 9B). It is interesting to note that Nop53 association with the pre-60S is flanked by two major remodeling events triggered by the same AAA-ATPase, Real. It is tempting therefore to consider that by coordinating the exact moment of ITS2 removal and assisting Domain V anchoring, Nop53 plays a central role in the quality control of the first remodeling event before the second can take place. We postulate that in contrast to the retention of the foot, which does not impair most of the following pre-60S maturation events, the premature removal of the foot in the transition from state E to Rix1-Real particle may lead to defective particles with L1 stalk incorrectly positioned and unstructured Domain V (29,30). The role of Nop53 during the 60S biogenesis is, therefore, not restricted to the recruitment of the RNA exosome, affecting essential

rRNA remodeling events for the formation of late pre-60S particles.

DATA AVAILABILITY

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD023383.

SUPPLEMENTARY DATA

[Supplementary Data](#) are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr John L. Woolford Jr. (Carnegie Mellon University) and Dr Clelei F. Zanelli (UNESP, Araraquara, SP, Brazil) for the kind gifts of anti-Nog1 and anti-uL18 sera, respectively, and GFP Clone Collection strains. We also thank the members of our Department Dr Frederico Gueiros Filho for the use of the fluorescence microscope, Dr Mauricio S. Baptista for the use of the SpectraMax iē3 Microplate Detection Platform, and Dr Fabio L. Forti for the gift of hygromycin B. We thank all the members of the Oliveira lab for their support and critical discussions.

FUNDING

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [15/06477-9 to C.C.O., 13/07467-1 to J.P.C.C. - CeTICS]; CAPES and FAPESP fellowships [2015/05776-2 to F.F.M.B., 2017-18344-9 to F.N.L.V.]. Funding for open access charge: FAPESP [15/06477-9 to C.C.O.].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Timsit, Y., Sergeant-Perthuis, G. and Bennequin, D. (2021) Evolution of ribosomal protein network architectures. *Sci. Rep.*, **11**, 625.
- Petrov, A.S., Gulen, B., Norris, A.M., Kovacs, N.A., Bernier, C.R., Lanier, K.A., Fox, G.E., Harvey, S.C., Wartell, R.M., Hud, N.V. *et al.* (2015) History of the ribosome and the origin of translation. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 15396–15401.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M. and Ban, N. (2012) Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 189–198.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560–567.
- Ben-Shem, A., Loubresse, N.G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, **334**, 1524–1529.
- Tye, B.W., Commins, N., Ryazanova, L.V., Wühr, M., Springer, M., Pincus, D. and Churchman, L.S. (2019) Proteotoxicity from aberrant ribosome biogenesis compromises cell fitness. *eLife*, **8**, e43002.
- Huang, H., Ghalei, H. and Karbstein, K. (2020) Quality control of 40S ribosome head assembly ensures scanning competence. *J. Cell Biol.*, **219**, e202004161.
- Collins, J.C., Ghalei, H., Doherty, J.R., Huang, H., Culver, R.N. and Karbstein, K. (2018) Ribosome biogenesis factor Ltv1 chaperones the assembly of the small subunit head. *J. Cell Biol.*, **217**, 4141–4154.
- Baßler, J. and Hurt, E. (2019) Eukaryotic ribosome assembly. *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 281–306.
- Klinge, S. and Woolford, J.L. (2019) Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 116–131.
- Woolford, J.L. and Baserga, S.J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **195**, 643–681.
- Koš, M. and Tollervey, D. (2010) Yeast Pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol. Cell*, **37**, 809–820.
- Tomecki, R., Sikorski, P.J. and Zakrzewska-Placzek, M. (2017) Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells – focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Lett.*, **591**, 1801–1850.
- Fernández-Pevida, A., Kressler, D. and de la Cruz, J. (2015) Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *WIREs RNA*, **6**, 191–209.
- de la Cruz, J., Karbstein, K. and Woolford, J.L. (2015) Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes In Vivo. *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 93–129.
- Gamalinda, M., Ohmayer, U., Jakovljevic, J., Kumcuoglu, B., Woolford, J., Mbom, B., Lin, L. and Woolford, J.L. (2014) A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes Dev.*, **28**, 198–210.
- Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Cheng, J., Ismail, S., Ahmed, Y.L., Bange, G., Kressler, D., Berninghausen, O., Sinning, I. *et al.* (2017) Visualizing the assembly pathway of nucleolar Pre-60S ribosomes. *Cell*, **171**, 1599–1610.
- Sanghai, Z.A., Miller, L., Molloy, K.R., Barandun, J., Hunziker, M., Chaker-Margot, M., Wang, J., Chait, B.T. and Klinge, S. (2018) Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature*, **556**, 126–129.
- Zhou, D., Zhu, X., Zheng, S., Tan, D., Dong, M.-Q. and Ye, K. (2019) Cryo-EM structure of an early precursor of large ribosomal subunit reveals a half-assembled intermediate. *Protein Cell*, **10**, 120–130.
- Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B. and Hurt, E. (2008) The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J. Cell Biol.*, **181**, 935–944.
- Sahasranaman, A., Dembowski, J., Strahler, J., Andrews, P., Maddock, J. and Woolford, J.L. Jr (2011) Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *EMBO J.*, **30**, 4020–4032.
- Wu, S., Tutuncuoglu, B., Yan, K., Brown, H., Zhang, Y., Tan, D., Gamalinda, M., Yuan, Y., Li, Z., Jakovljevic, J. *et al.* (2016) Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature*, **534**, 133–137.
- Wu, S., Tan, D., Woolford, J.L., Dong, M.-Q. and Gao, N. (2017) Atomic modeling of the ITS2 ribosome assembly subcomplex from cryo-EM together with mass spectrometry-identified protein–protein crosslinks. *Protein Sci.*, **26**, 103–112.
- Granneman, S., Petfalski, E. and Tollervey, D. (2011) A cluster of ribosome synthesis factors regulate pre-rRNA folding and 5.8S rRNA maturation by the Rat1 exonuclease. *EMBO J.*, **30**, 4006–4019.
- Baßler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M. and Hurt, E. (2010) The AAA-ATPase real drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. *Mol. Cell*, **38**, 712–721.
- Wegrecki, M., Rodríguez-Galán, O., de la Cruz, J. and Bravo, J. (2015) The structure of Erb1-Ytm1 complex reveals the functional importance of a high-affinity binding between two β-propellers during the assembly of large ribosomal subunits in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 11017–11030.
- Thoms, M., Ahmed, Y.L., Maddi, K., Hurt, E. and Sinning, I. (2016) Concerted removal of the Erb1–Ytm1 complex in ribosome biogenesis relies on an elaborate interface. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 926–939.
- Kater, L., Mitterer, V., Thoms, M., Cheng, J., Berninghausen, O., Beckmann, R. and Hurt, E. (2020) Construction of the central protuberance and L1 stalk during 60S subunit biogenesis. *Mol. Cell*, **79**, 615–628.
- Micic, J., Li, Y., Wu, S., Wilson, D., Tutuncuoglu, B., Gao, N. and Woolford, J.L. (2020) Coupling of 5S RNP rotation with maturation of functional centers during large ribosomal subunit assembly. *Nat. Commun.*, **11**, 3751.
- Wilson, D.M., Li, Y., LaPeruta, A., Gamalinda, M., Gao, N. and Woolford, J.L. (2020) Structural insights into assembly of the ribosomal nascent polypeptide exit tunnel. *Nat. Commun.*, **11**, 5111.
- Pillon, M.C., Lo, Y.-H. and Stanley, R.E. (2019) IT'S 2 for the price of 1: multifaceted ITS2 processing machines in RNA and DNA maintenance. *DNA Repair (Amst.)*, **81**, 102653.

32. Fromm, L., Falk, S., Flemming, D., Schuller, J.M., Thoms, M., Conti, E. and Hurt, E. (2017) Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome. *Nat. Commun.*, **8**, 1787.
33. Gasse, L., Flemming, D. and Hurt, E. (2015) Coordinated ribosomal ITS2 RNA processing by the Las1 complex integrating endonuclease, polynucleotide kinase, and exonuclease activities. *Mol. Cell*, **60**, 808–815.
34. Pillon, M.C., Sobhany, M., Borgnia, M.J., Williams, J.G. and Stanley, R.E. (2017) Grc3 programs the essential endoribonuclease Las1 for specific RNA cleavage. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, E5530–E5538.
35. Pillon, M.C., Hsu, A.L., Krahn, J.M., Williams, J.G., Goslen, K.H., Sobhany, M., Borgnia, M.J. and Stanley, R.E. (2019) Cryo-EM reveals active site coordination within a multienzyme pre-rRNA processing complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 830–839.
36. Talkish, J., Zhang, J., Jakovljevic, J., Horsey, E.W. and Woolford, J.L. Jr (2012) Hierarchical recruitment into nascent ribosomes of assembly factors required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8646–8661.
37. Biedka, S., Micic, J., Wilson, D., Brown, H., Diorio-Toth, L. and Woolford, J.L. Jr (2018) Hierarchical recruitment of ribosomal proteins and assembly factors remodels nucleolar pre-60S ribosomes. *J. Cell Biol.*, **217**, 2503–2518.
38. Thoms, M., Thomson, E., Baßler, J., Gnädig, M., Griesel, S. and Hurt, E. (2015) The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell*, **162**, 1029–1038.
39. Falk, S., Tants, J.-N., Basquin, J., Thoms, M., Hurt, E., Sattler, M. and Conti, E. (2017) Structural insights into the interaction of the nuclear exosome helicase Mtr4 with the preribosomal protein Nop53. *RNA*, **23**, 1780–1787.
40. Schuller, J.M., Falk, S., Fromm, L., Hurt, E. and Conti, E. (2018) Structure of the nuclear exosome captured on a maturing preribosome. *Science*, **360**, 219–222.
41. Cepeda, L.P.P., Bagatelli, F.F.M., Santos, R.M., Santos, M.D.M., Nogueira, F.C.S. and Oliveira, C.C. (2019) The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast. *J. Biol. Chem.*, **294**, 19365–19380.
42. Lingaraju, M., Schuller, J.M., Falk, S., Gerlach, P., Bonneau, F., Basquin, J., Benda, C. and Conti, E. (2019) To process or to decay: A mechanistic view of the nuclear RNA exosome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **84**, 155–163.
43. Briggs, M.W., Burkard, K.T.D. and Butler, J.S. (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' End Formation*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13255–13263.
44. Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. and Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.*, **18**, 5399–5410.
45. Barrio-Garcia, C., Thoms, M., Flemming, D., Kater, L., Berninghausen, O., Baßler, J., Beckmann, R. and Hurt, E. (2016) Architecture of the Rix1–Rea1 checkpoint machinery during pre-60S-ribosome remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 37–44.
46. Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B. and Hurt, E. (2009) Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell*, **138**, 911–922.
47. Matsuo, Y., Granneman, S., Thoms, M., Manikas, R.-G., Tollervey, D. and Hurt, E. (2014) Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature*, **505**, 112–116.
48. Sarkar, A., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Thomson, E., Flemming, D., Beckmann, R. and Hurt, E. (2017) Preribosomes escaping from the nucleus are caught during translation by cytoplasmic quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 1107–1115.
49. Rodríguez-Galán, O., García-Gómez, J.J., Kressler, D. and de la Cruz, J. (2015) Immature large ribosomal subunits containing the 7S pre-rRNA can engage in translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biology*, **12**, 838–846.
50. Zhou, Y., Musalgaonkar, S., Johnson, A.W. and Taylor, D.W. (2019) Tightly-orchestrated rearrangements govern catalytic center assembly of the ribosome. *Nat. Commun.*, **10**, 958.
51. Kargas, V., Castro-Hartmann, P., Escudero-Urquijo, N., Dent, K., Hilcenko, C., Sailer, C., Zisser, G., Marques-Carvalho, M.J., Pellegrino, S., Wawiórka, L. et al. (2019) Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *eLife*, **8**, e44904.
52. Klingauf-Nerurkar, P., Gillet, L.C., Portugal-Calisto, D., Oborská-Oplová, M., Jäger, M., Schubert, O.T., Pisano, A., Peña, C., Rao, S., Altvater, M. et al. (2020) The GTPase Nog1 co-ordinates the assembly, maturation and quality control of distant ribosomal functional centers. *eLife*, **9**, e52474.
53. Kappel, L., Loibl, M., Zisser, G., Klein, I., Fruhmann, G., Gruber, C., Unterwiesing, S., Rechberger, G., Pertschy, B. and Bergler, H. (2012) Rlp24 activates the AAA-ATPase Drg1 to initiate cytoplasmic pre-60S maturation. *J. Cell Biol.*, **199**, 771–782.
54. Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Tengg, M., Jacquier, A., Liebming, E., Nobis, B., Kappel, L., van der Klei, I. et al. (2007) Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 6581–6592.
55. Lo, K.-Y., Li, Z., Bussiere, C., Bresson, S., Marcotte, E.M. and Johnson, A.W. (2010) Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol. Cell*, **39**, 196–208.
56. Meyer, A.E., Hoover, L.A. and Craig, E.A. (2010) The cytosolic J-protein, Jj1, and Re1 function in the removal of the Pre-60 S subunit factor Arx1. *J. Biol. Chem.*, **285**, 961–968.
57. Reuber, B.J., Gerhardy, S., Leitner, A., Leibundgut, M., Salem, M., Boehringer, D., Leulliot, N., Aebbersold, R., Panse, V.G. and Ban, N. (2016) Insertion of the biogenesis factor Re1 probes the ribosomal tunnel during 60S maturation. *Cell*, **164**, 91–102.
58. Lo, K.-Y., Li, Z., Wang, F., Marcotte, E.M. and Johnson, A.W. (2009) Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *J. Cell Biol.*, **186**, 849–862.
59. Kemmler, S., Occhipinti, L., Veisu, M. and Panse, V.G. (2009) Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *J. Cell Biol.*, **186**, 863–880.
60. Rodríguez-Mateos, M., Abia, D., García-Gómez, J.J., Morreale, A., de la Cruz, J., Santos, C., Remacha, M. and Ballesta, J.P.G. (2009) The amino terminal domain from Mrt4 protein can functionally replace the RNA binding domain of the ribosomal P0 protein. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3514–3521.
61. Rodríguez-Mateos, M., García-Gómez, J.J., Francisco-Velilla, R., Remacha, M., de la Cruz, J. and Ballesta, J.P.G. (2009) Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7519–7532.
62. Sarkar, A., Pech, M., Thoms, M., Beckmann, R. and Hurt, E. (2016) Ribosome-stalk biogenesis is coupled with recruitment of nuclear-export factor to the nascent 60S subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 1074–1082.
63. Weis, F., Giudice, E., Churcher, M., Jin, L., Hilcenko, C., Wong, C.C., Traynor, D., Kay, R.R. and Warren, A.J. (2015) Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 914–919.
64. Konikkat, S. and Woolford, J.L. Jr (2017) Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem. J.*, **474**, 195–214.
65. Biedka, S., Wu, S., LaPeruta, A.J., Gao, N. and Woolford, J.L. Jr (2017) Insights into remodeling events during eukaryotic large ribosomal subunit assembly provided by high resolution cryo-EM structures. *RNA Biology*, **14**, 1306–1313.
66. Greber, B.J. (2016) Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *RNA*, **22**, 1643–1662.
67. Granato, D.C., Machado-Santelli, G.M. and Oliveira, C.C. (2008) Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS J.*, **275**, 4164–4178.
68. Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. and O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686–691.
69. Okuda, E.K., Gonzales-Zubieta, F.A., Gadal, O. and Oliveira, C.C. (2020) Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function. *J. Biol. Chem.*, **295**, 11195–11213.
70. Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linnemann, J., Hierlmeier, T., Perez-Fernandez, J., Kumcuoglu, B., Leger-Silvestre, I. et al. (2013) Studies on the assembly

- characteristics of large subunit ribosomal proteins in *S. cerevisiae*. *PLoS One*, **8**, e68412.
71. Villén, J. and Gygi, S.P. (2008) The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.*, **3**, 1630–1638.
 72. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M. and Cox, J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods*, **13**, 731–740.
 73. Linnemann, J., Pöll, G., Jakob, S., Ferreira-Cerca, S., Griesenbeck, J., Tschochner, H. and Milkereit, P. (2019) Impact of two neighbouring ribosomal protein clusters on biogenesis factor binding and assembly of yeast late small ribosomal subunit precursors. *PLoS One*, **14**, e0203415.
 74. Konikkat, S., Biedka, S. and Woolford, J.L. Jr (2017) The assembly factor Erb1 functions in multiple remodeling events during 60S ribosomal subunit assembly in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 4853–4865.
 75. Spitale, R.C., Crisalli, P., Flynn, R.A., Torre, E.A., Kool, E.T. and Chang, H.Y. (2013) RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 18–20.
 76. Ying, B.-W., Fourmy, D. and Yoshizawa, S. (2007) Substitution of the use of radioactivity by fluorescence for biochemical studies of RNA. *RNA*, **13**, 2042–2050.
 77. Dez, C., Houseley, J. and Tollervey, D. (2006) Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **25**, 1534–1546.
 78. Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E. and Woolford, J.L. (2008) Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-Subcomplex in yeast preribosomes. *MBoC*, **19**, 2844–2856.
 79. Adams, C.C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P. and Woolford, J.L. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. *RNA*, **8**, 150–165.
 80. Ahmed, Y.L., Thoms, M., Mitterer, V., Sinning, I. and Hurt, E. (2019) Crystal structures of Rea1-MIDAS bound to its ribosome assembly factor ligands resembling integrin–ligand-type complexes. *Nat. Commun.*, **10**, 3050.
 81. Leidig, C., Thoms, M., Holdermann, I., Bradatsch, B., Berninghausen, O., Bange, G., Sinning, I., Hurt, E. and Beckmann, R. (2014) 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nat. Commun.*, **5**, 3491.
 82. Bradatsch, B., Leidig, C., Granneman, S., Gnädig, M., Tollervey, D., Böttcher, B., Beckmann, R. and Hurt, E. (2012) Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1234–1241.
 83. Greber, B.J., Boehringer, D., Montellese, C. and Ban, N. (2012) Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jji1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1228–1233.
 84. Ma, C., Wu, S., Li, N., Chen, Y., Yan, K., Li, Z., Zheng, L., Lei, J., Woolford, J.L. and Gao, N. (2017) Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 214–220.
 85. Malyutin, A.G., Musalgaonkar, S., Patchett, S., Frank, J. and Johnson, A.W. (2017) Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis. *EMBO J.*, **36**, 854–868.
 86. Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgärtel, V., Boese, G., Bassler, J., Wild, K. *et al.* (2007) Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Mol. Cell*, **27**, 767–779.
 87. Ho, J.H.-N., Kallstrom, G. and Johnson, A.W. (2000) Nmd3p is a Crm1p-Dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell Biol.*, **151**, 1057–1066.
 88. Hedges, J., West, M. and Johnson, A.W. (2005) Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J.*, **24**, 567–579.
 89. Granato, D.C., Gonzales, F.A., Luz, J.S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G.M. and Oliveira, C.C. (2005) Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.*, **272**, 4450–4463.
 90. Thomson, E. and Tollervey, D. (2005) Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA*, **11**, 1215–1224.
 91. Sydorsky, Y., Dilworth, D.J., Halloran, B., Yi, E.C., Makhnevych, T., Wozniak, R.W. and Aitchison, J.D. (2005) Nop53p is a novel nucleolar 60S ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochem. J.*, **388**, 819–826.
 92. Chaker-Margot, M. and Klinge, S. (2019) Assembly and early maturation of large subunit precursors. *RNA*, **25**, 465–471.
 93. Chen, W., Xie, Z., Yang, F. and Ye, K. (2017) Stepwise assembly of the earliest precursors of large ribosomal subunits in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6837–6847.
 94. Schuch, B., Feigenbutz, M., Makino, D.L., Falk, S., Basquin, C., Mitchell, P. and Conti, E. (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J.*, **33**, 2829–2846.
 95. Borovinskaya, M.A., Shoji, S., Fredrick, K. and Cate, J.H.D. (2008) Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA*, **14**, 1590–1599.
 96. Zencir, S., Dilg, D., Rueda, M.P., Shore, D. and Albert, B. (2020) Mechanisms coordinating ribosomal protein gene transcription in response to stress. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 11408–11420.
 97. Albert, B., Knight, B., Merwin, J., Martin, V., Ottoz, D., Gloor, Y., Bruzzone, M.J., Rudner, A. and Shore, D. (2016) A molecular titration system coordinates ribosomal protein gene transcription with ribosomal RNA synthesis. *Mol. Cell*, **64**, 720–733.
 98. Loewith, R. and Hall, M.N. (2011) Target of Rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, **189**, 1177–1201.
 99. Jorgensen, P., Rupeš, I., Sharom, J.R., Schnepfer, L., Broach, J.R. and Tyers, M. (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.*, **18**, 2491–2505.
 100. Lebreton, A., Rousselle, J.-C., Lenormand, P., Namane, A., Jacquier, A., Fromont-Racine, M. and Saveanu, C. (2008) 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4988–4999.
 101. Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P.-E., Gas, N., Jacquier, A. and Fromont-Racine, M. (2001) Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J.*, **20**, 6475–6484.
 102. Yao, W., Roser, D., Köhler, A., Bradatsch, B., Baßler, J. and Hurt, E. (2007) Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol. Cell*, **26**, 51–62.
 103. Altvater, M., Chang, Y., Melnik, A., Occhipinti, L., Schütz, S., Rothenbusch, U., Picotti, P. and Panse, V.G. (2012) Targeted proteomics reveals compositional dynamics of 60S pre-ribosomes after nuclear export. *Mol. Syst. Biol.*, **8**, 628.
 104. Thoms, M., Mitterer, V., Kater, L., Falquet, L., Beckmann, R., Kressler, D. and Hurt, E. (2018) Suppressor mutations in Rpf2–Rrs1 or Rpl5 bypass the Cgr1 function for pre-ribosomal 5S RNP-rotation. *Nat. Commun.*, **9**, 4094.
 105. Geng, Q., Xhabija, B., Knuckle, C., Bonham, C.A. and Vaccratsis, P.O. (2017) The atypical dual specificity phosphatase hYVH1 associates with multiple ribonucleoprotein particles. *J. Biol. Chem.*, **292**, 539–550.
 106. Sugiyama, M., Nugroho, S., Iida, N., Sakai, T., Kaneko, Y. and Harashima, S. (2011) Genetic interactions of ribosome maturation factors Yvh1 and Mrt4 influence mRNA decay, glycogen accumulation, and the expression of early meiotic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*, **150**, 103–111.
 107. Liu, Y. and Chang, A. (2009) A mutant plasma membrane protein is stabilized upon loss of Yvh1, a novel ribosome assembly factor. *Genetics*, **181**, 907–915.
 108. Sakamoto, N., Yamashita, H., Mukai, Y., Kaneko, Y. and Harashima, S. (2001) Dual-Specificity protein phosphatase Yvh1p, which is required for vegetative growth and sporulation, interacts with yeast pescadillo homolog in *saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 608–615.
 109. Tutuncoglu, B., Jakovljevic, J., Wu, S., Gao, N. and Woolford, J.L. (2016) The N-terminal extension of yeast ribosomal protein L8 is involved in two major remodeling events during late nuclear stages of 60S ribosomal subunit assembly. *RNA*, **22**, 1386–1399.

SUPPLEMENTARY DATA

The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events

Felipe F. M. Bagatelli¹, Francisca N. de Luna Vitorino^{2,3}, Julia P. C. da Cunha^{2,3}, Carla C. Oliveira^{1*}

¹Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Laboratory of Cell Cycle, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

³Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

*To whom correspondence should be addressed – email: ccoliv@iq.usp.br

SUPPLEMENTARY FIGURES

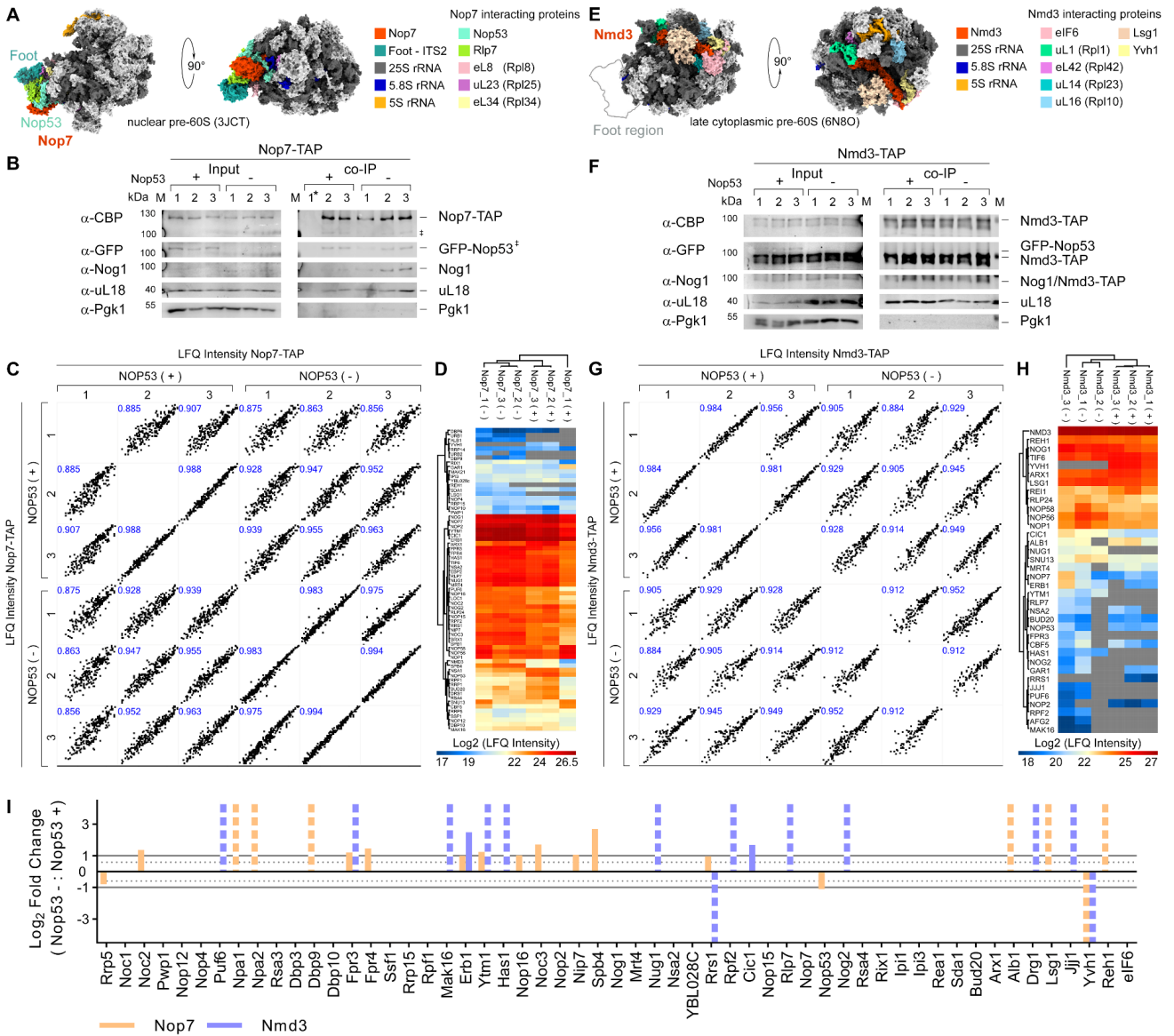
Figure S1. Co-IP assays with Nop7-TAP and Nmd3-TAP

Figure S2. Co-IP assays with Rsa4-TAP and Arx1-TAP

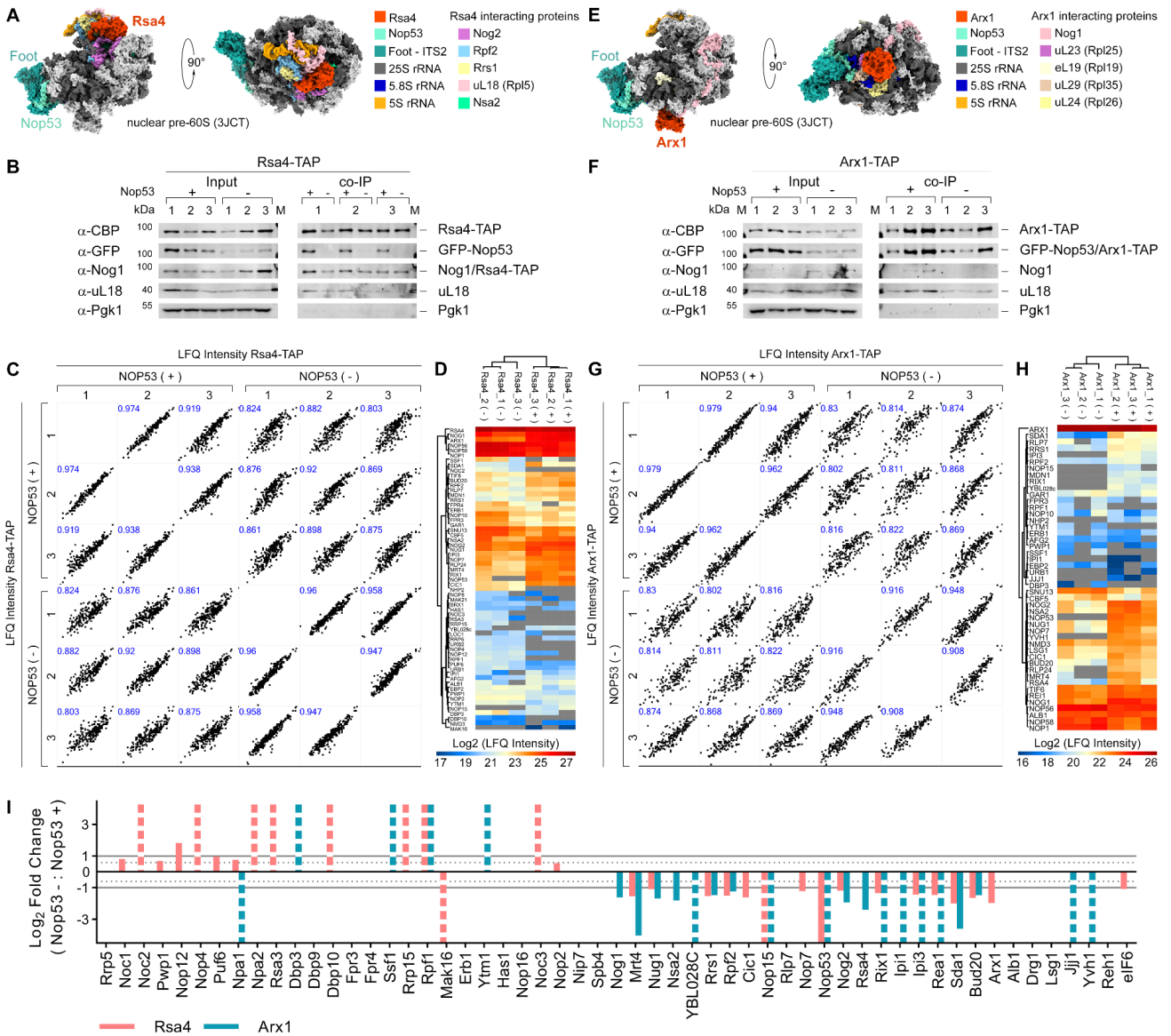
Figure S3. Intermediate and late nuclear pre-60S particles are still formed upon Nop53 depletion

Figure S4. The subcellular localization of Nmd3 and Nop7 was affected by Nop53 depletion

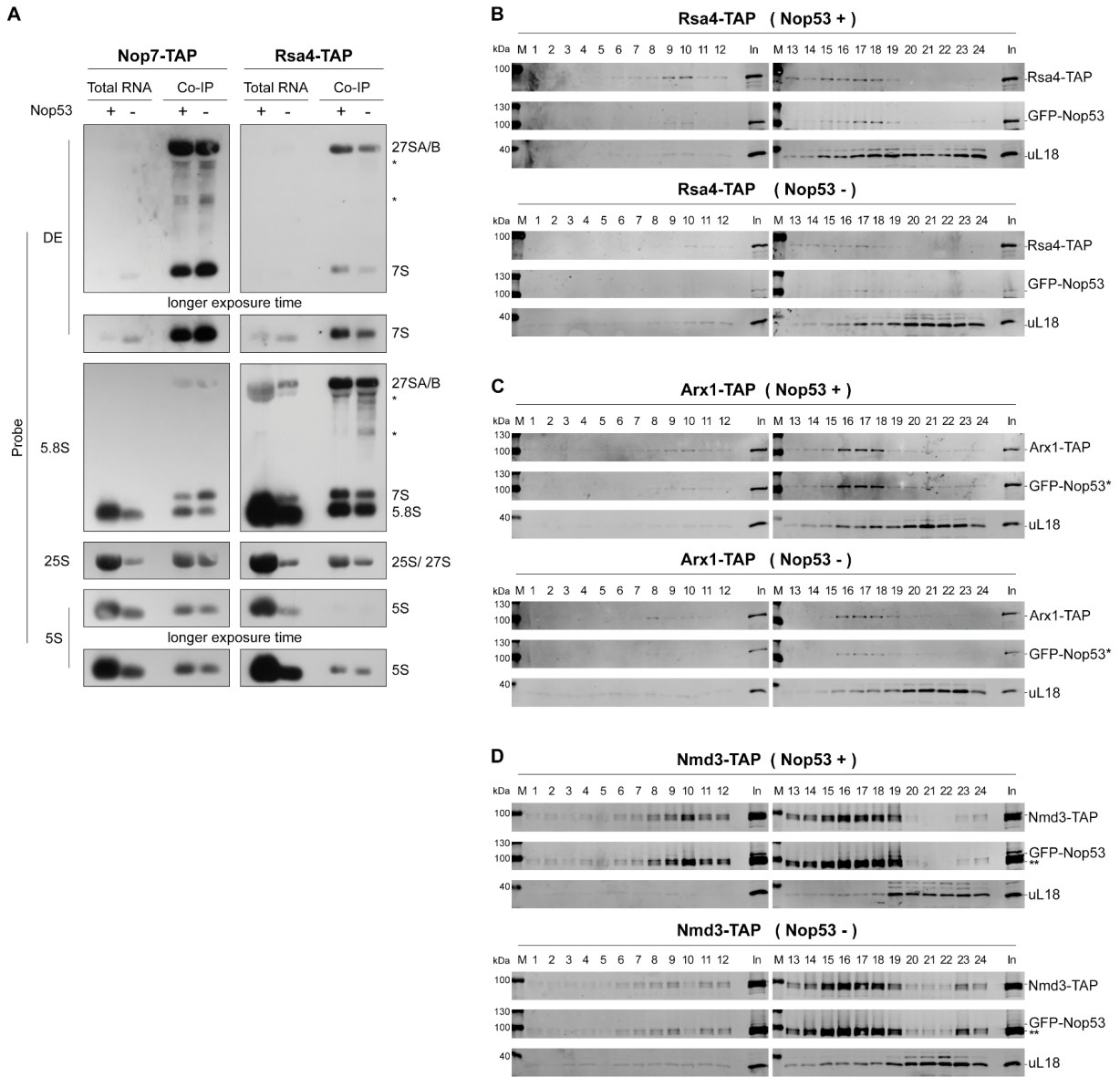
Figure S5. Sedimentation profile and Co-IP assays with Erb1-TAP



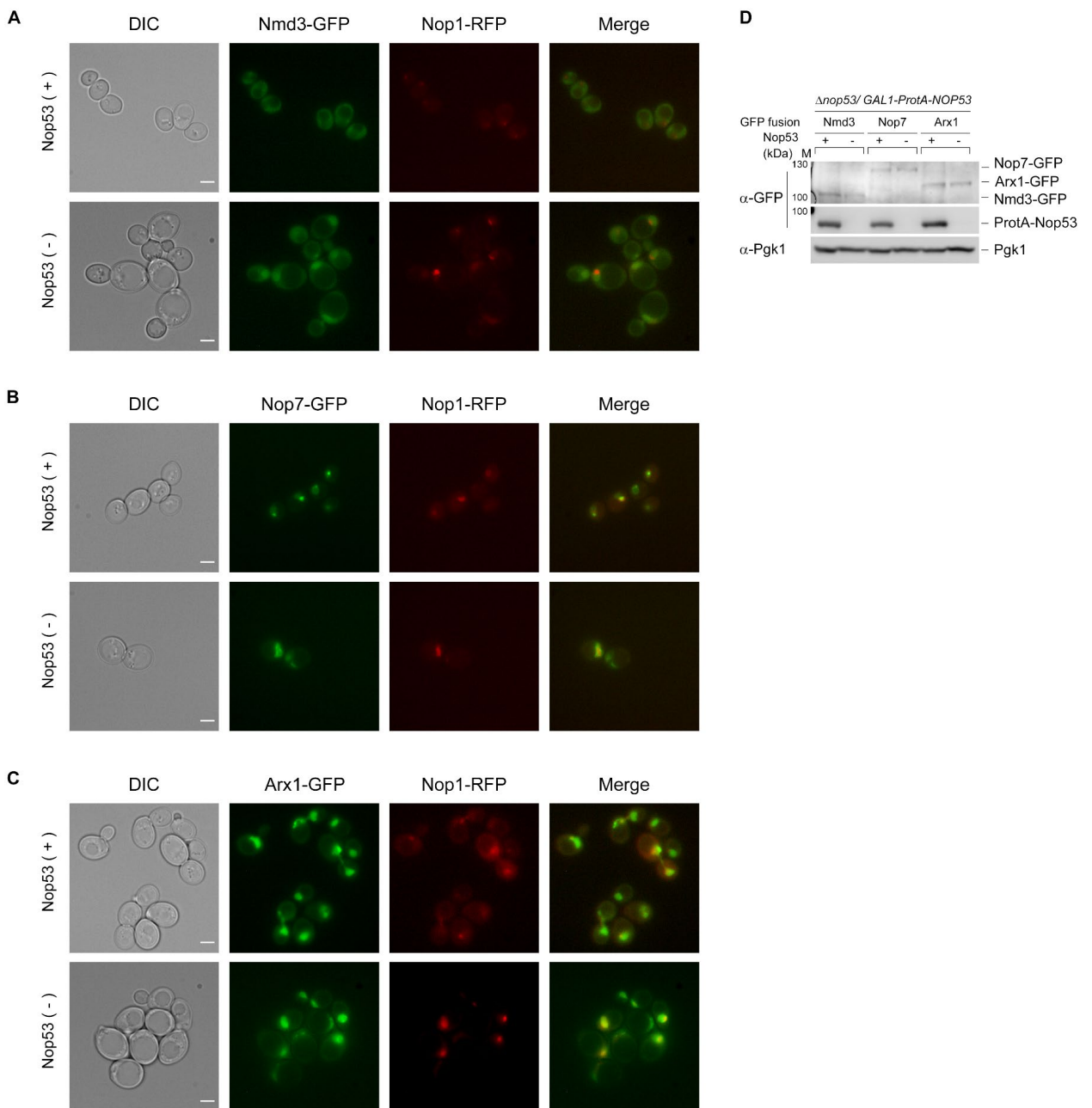
Supplementary Figure S1. Co-IP assays with Nop7-TAP and Nmd3-TAP. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of preribosomes affinity-purified with the 60S AFs (**A-D**) Nop7-TAP and (**E-H**) Nmd3-TAP under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions. (**A**) Nop7, a foot AF that interacts directly with Nop53, is highlighted in the nuclear Nog2 particle (PDB ID: 3JCT). (**E**) Nmd3, a nucleocytoplasmic AF that binds to the pre-60S after the foot disassembly (shown as “foot region”), is highlighted on top of the maturing peptidyl-transferase center (PTC) in the cytoplasmic Nmd3 particle (PDB ID: 6N80). (**B, F**) Western blot analysis of input and elution fractions (co-IP) showing all biological replicates. Overlapping bands are indicated with a slash symbol. * loss of material during gel loading. ‡ overlapping Nop7-TAP fragments. M: Protein MW marker. (**C, G**) Correlation matrix of biological replicates based on label-free quantitative (LFQ) intensities showing the Pearson correlation coefficients in blue. (**D, H**) Heatmap of log₂-transformed LFQ intensities showing the affinity-purified 60S AFs. (**I**) log₂-transformed fold change values, normalized to the bait, of the 60S AFs orderly plotted from early nucleolar to late cytoplasmic maturation stage. Dashed columns indicate the 60S AFs exclusively identified in one condition.



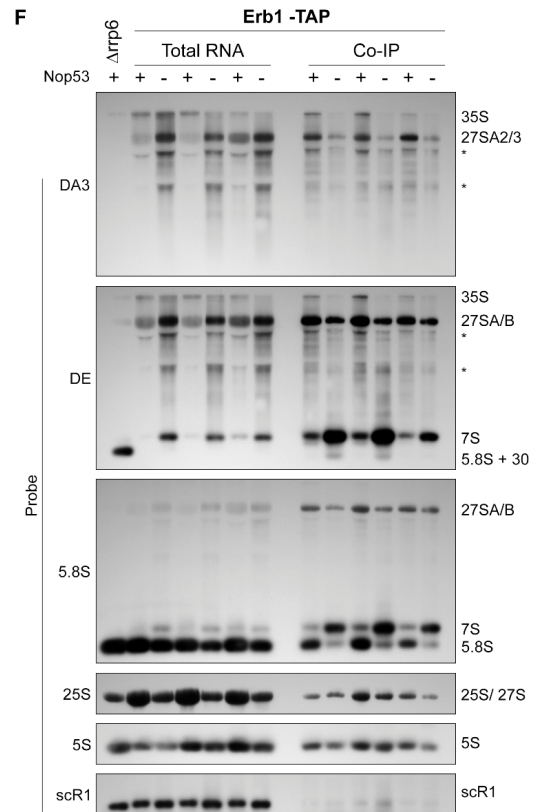
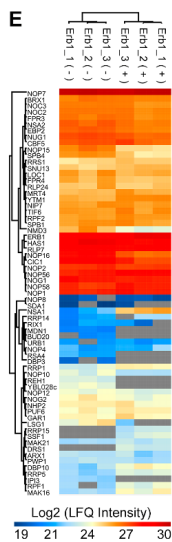
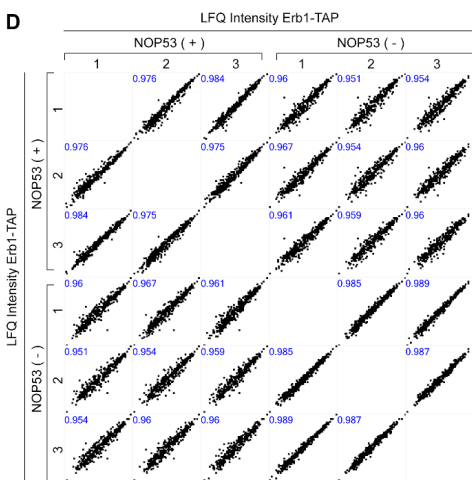
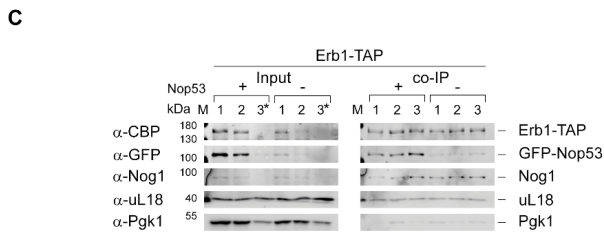
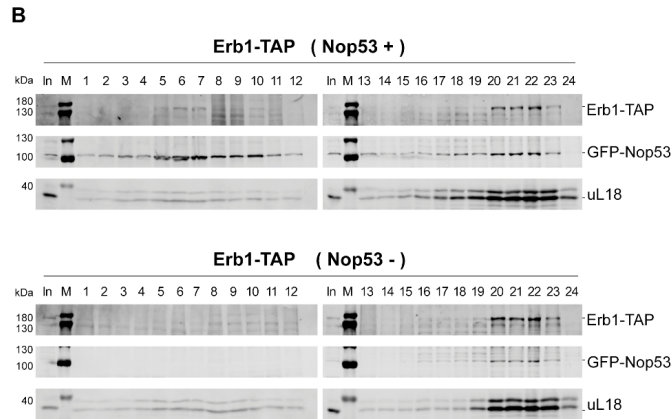
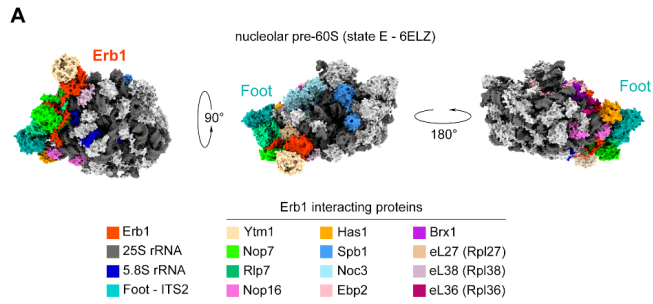
Supplementary Figure S2. Co-IP assays with Rsa4-TAP and Arx1-TAP. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of preribosomes affinity-purified with the 60S AFs (**A-D**) Rsa4-TAP and (**E-H**) Arx1-TAP under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions. (**A, E**) Rsa4 and Arx1 are together with Nop53, components of the Nog2 particle (PDB ID: 3JCT). (**A**) Rsa4 binds near the 5S RNP-containing central protuberance (CP). (**E**) Arx1 is located on top of the polypeptide exit tunnel (PET). (**B, F**) Western blot analysis of input and elution fractions (co-IP) showing all biological replicates. Overlapping bands are indicated with a slash symbol. M: Protein MW marker. (**C, G**) Correlation matrix of biological replicates based on label-free quantitative (LFQ) intensities showing the Pearson correlation coefficients in blue. (**D, H**) Heatmap of log₂-transformed LFQ intensities showing the affinity-purified 60S AFs. (**I**) log₂-transformed fold change values, normalized to the bait, of the 60S AFs orderly plotted from early nucleolar to late cytoplasmic maturation stage. Dashed columns indicate the 60S AFs exclusively identified in one condition.



Supplementary Figure S3. Intermediate and late nuclear pre-60S particles are still formed upon Nop53 depletion. **(A)** Northern blot analysis of the pre-rRNAs copurified (IP) with Nop7-TAP and Rsa4-TAP under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions, together with the Input (total RNA), using the indicated probes. *non-specific band. **(B-D)** Sedimentation profile analysis of the TAP-tagged AFs Rsa4, Arx1, and Nmd3. Whole-cell lysates, upon Nop53-depleted (-) and non-depleted (+) conditions, were subjected to 10-30% glycerol density gradient sedimentation followed by top to bottom fractionation. The 24 fractions were analyzed by Western blot with anti-CBP, anti-GFP, and anti-uL18. *Arx1-TAP completely overlaps GFP-Nop53. **Nmd3-TAP detected below GFP-Nop53. In: Input - whole cell lysate; M: Protein MW marker.



Supplementary Figure S4. The subcellular localization of Nmd3 and Nop7 was affected by Nop53 depletion. The 60S AFs **(A)** Nmd3, **(B)** Nop7, and **(C)** Arx1 were fused to GFP in the conditional strain $\Delta nop53 / GAL1-ProtA-NOP53$ expressing RFP-Nop1 as a nucleolar marker. The subcellular localization was analyzed by fluorescence microscopy in live yeast cells grown either in galactose (Nop53+) or shifted to glucose (Nop53-) containing medium. Upon Nop53 depletion, Nmd3 and Nop7 exhibit an increased nucleoplasmic signal. Scale bar, 2 μ m. Frequency of the phenotypes observed in over 150 cells in replicate experiments is shown in Suppl. Table S4. **(D)** Whole-cell lysates of the yeast cultures used for fluorescence microscopy were analyzed by Western blot with the indicated antibodies.



Supplementary Figure S5

Supplementary Figure S5. Sedimentation profile and Co-IP assays with Erb1-TAP. **(A)** Erb1, an early-binding nucleolar AF, is highlighted in the state E particle (PDB ID: 6ELZ), where its long N-terminus interacts with several AFs and r-proteins, precluding Nop53 binding site on the basis of the foot. **(B)** Sedimentation profile analysis of Erb1-TAP. Whole-cell lysates under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions were subjected to 10-30% glycerol density gradient sedimentation. The 24 fractions were analyzed by Western blot with anti-CBP, anti-GFP, and anti-uL18. (In: Input – whole cell lysate; M: Protein MW marker). **(C-E)** Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of preribosomes affinity-purified with Erb1-TAP under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions. **(C)** Western blot analysis of Input and elution (co-IP) fractions of all biological replicates with the indicated antibodies. M: Protein MW marker. * loss of material during gel loading. **(D)** Correlation matrix of biological replicates based on label-free quantitative (LFQ) intensities exhibiting the Pearson correlation coefficients in blue. **(E)** Heatmap of log₂-transformed LFQ intensities showing the affinity-purified 60S AFs. **(F)** Northern blot analysis of the pre-rRNAs copurified (IP) with Erb1-TAP under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions, together with the Input (total RNA), using the indicated probes. *non-specific band. The probe used for the 25S rRNA also recognizes the 27S pre-rRNA, as indicated on the right by 25S/27S. Although we cannot rule out a possible contaminant level of 25S rRNA copurified with Erb1, the band visualized with this probe most probably corresponds to the 27S pre-rRNA.

SUPPLEMENTARY DATA

The ribosome assembly factor Nop53 has a structural role in the formation of nuclear pre-60S intermediates, affecting late maturation events

Felipe F. M. Bagatelli¹, Francisca N. de Luna Vitorino^{2,3}, Julia P. C. da Cunha^{2,3}, Carla C. Oliveira^{1*}

¹Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Laboratory of Cell Cycle, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

³Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

*To whom correspondence should be addressed – email: ccoliv@iq.usp.br

SUPPLEMENTARY FIGURES

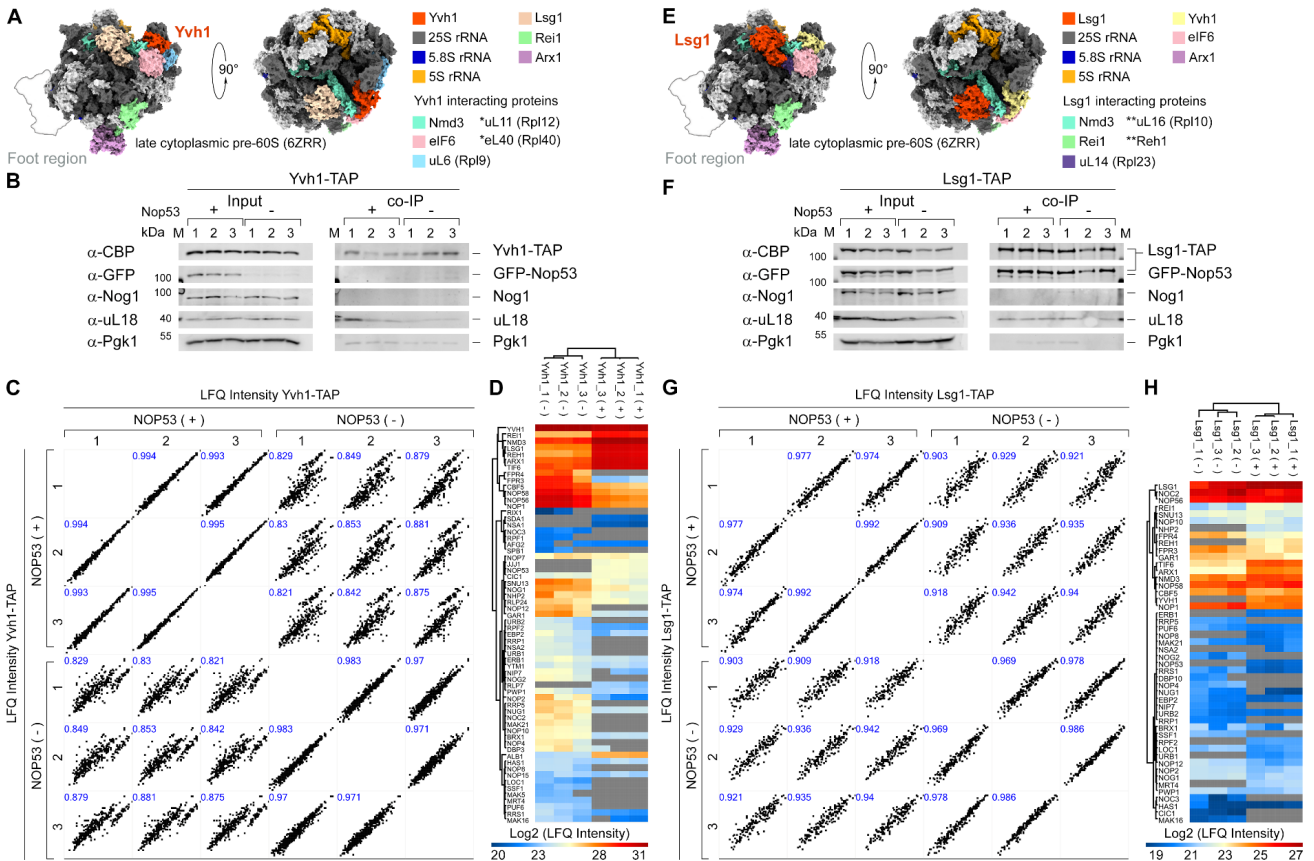
Figure S6. Co-IP assays with Yvh1-TAP and Lsg1-TAP

Figure S7. Mrt4 is not trapped in cytoplasmic pre-60S intermediates upon Nop53 depletion

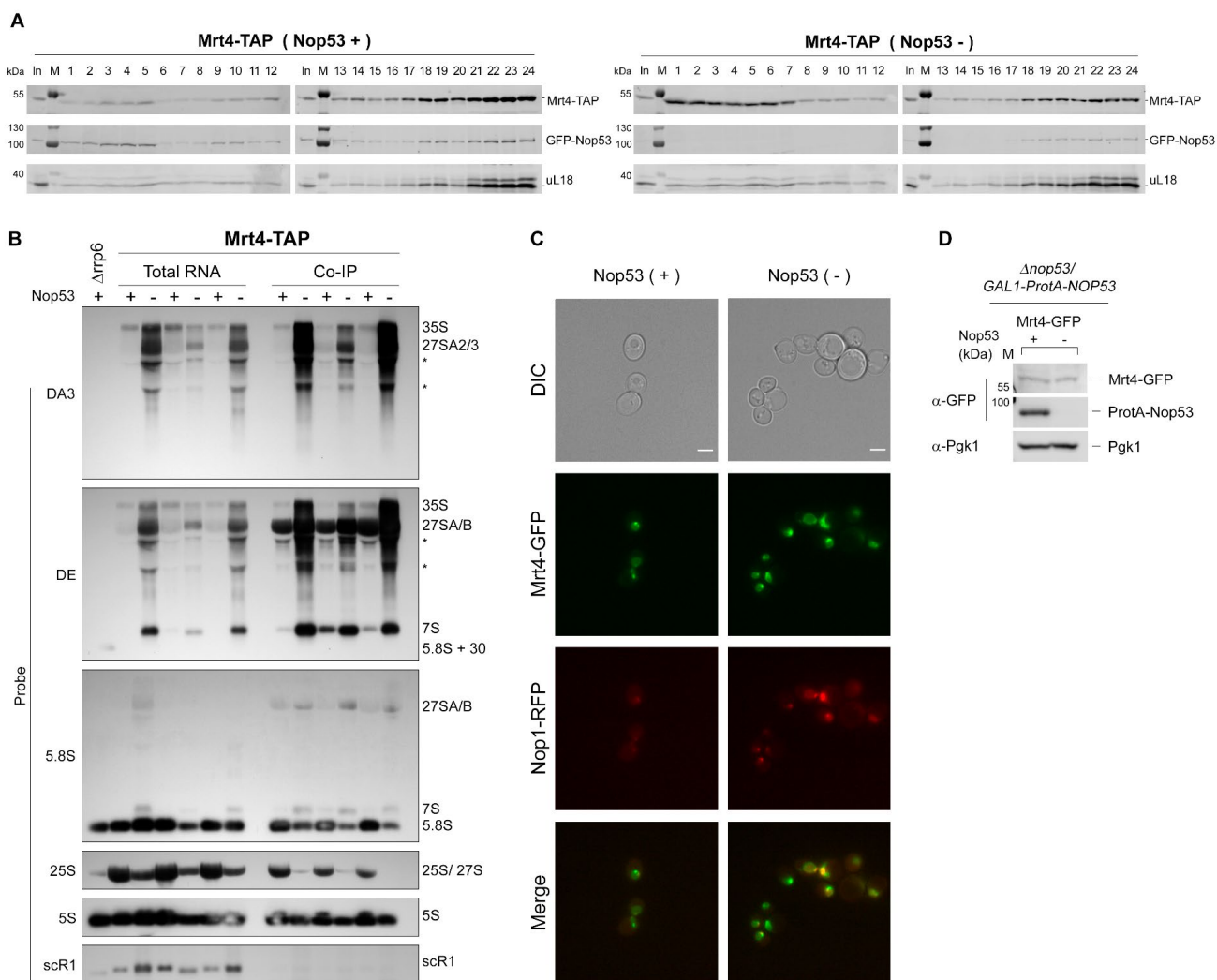
Figure S8. Growth phenotype, effect on the 7S pre-rRNA processing, and expression level of *nop53* N- and C-terminal truncated mutants

Figure S9. Nop53 and Yvh1-binding sites on the 25S rRNA are differentially affected by Nop53 depletion and *nop53* N-terminal mutants

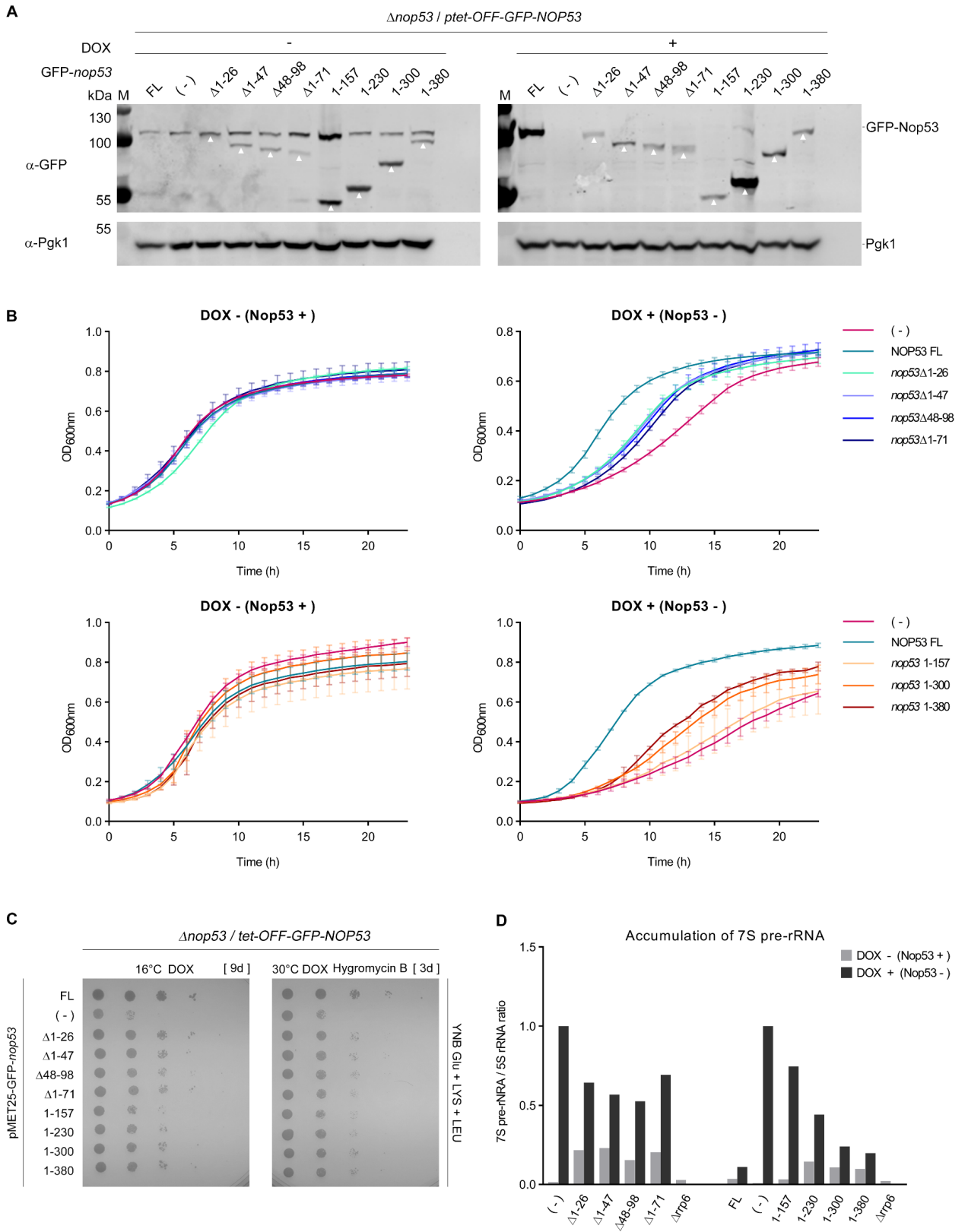
Figure S10. Comparison between the effect of Nop53 depletion and *nop53* N-terminal mutants on the interactome of Nop7



Supplementary Figure S6. Co-IP assays with Yvh1-TAP and Lsg1-TAP. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of preribosomes affinity-purified with the 60S AFs (A-D) Yvh1-TAP and (E-H) Lsg1-TAP under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions. (A, E) Both Yvh1 and Lsg1 are depicted in the cytoplasmic Lsg1 pre-60S particle (PDB ID: 6ZRR). (A) Yvh1 is a nucleocytoplasmic zinc-binding dual-specificity phosphatase, whose C-terminal domain (shown in red) binds near the P-stalk, allosterically inducing the dissociation of Mrt4. (E) Lsg1 is a cytoplasmic GTPase that directly binds to Nmd3 and whose dissociation is linked to the release of Nmd3, and to the PTC remodeling. (B, F) Western blot analysis of Input and elution (co-IP) fractions of all biological replicates with the indicated antibodies. M: Protein MW marker. (C, G) Correlation matrix of biological replicates based on label-free quantitative (LFQ) intensities showing the Pearson correlation coefficients in blue. (D, H) Heatmap of log₂-transformed LFQ intensities showing the affinity-purified 60S AFs.

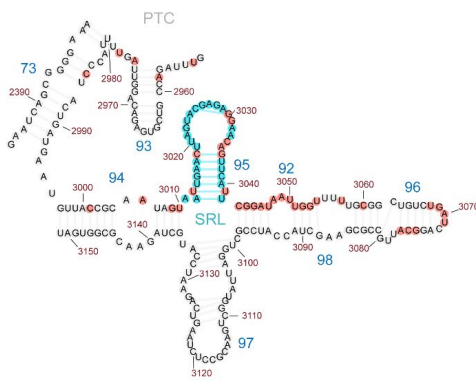
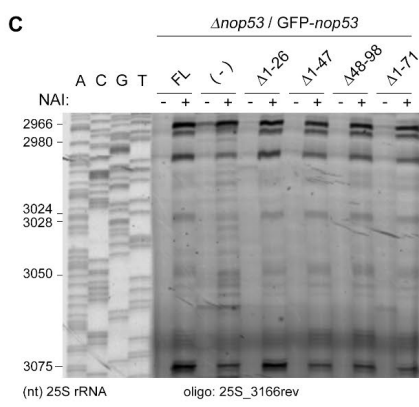
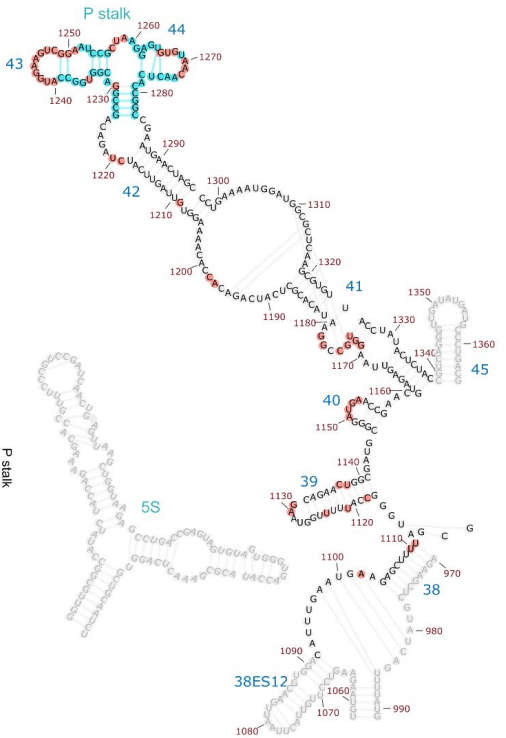
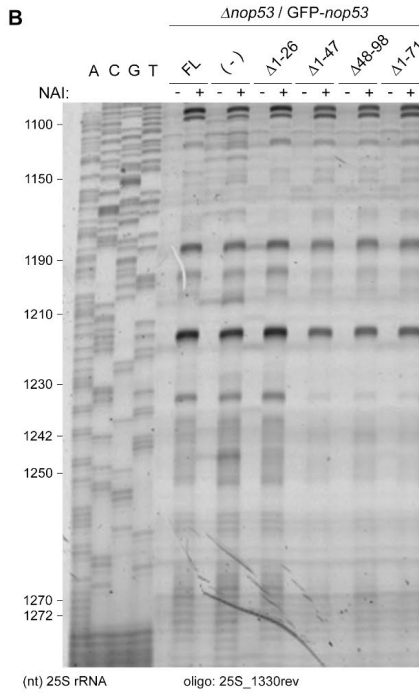
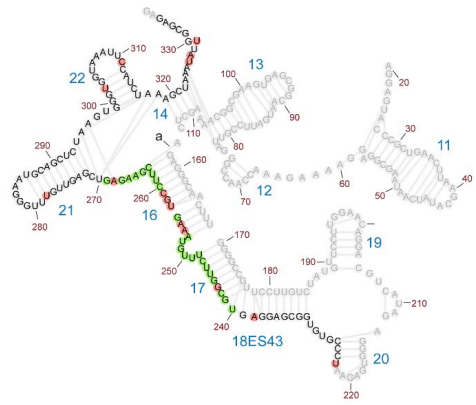
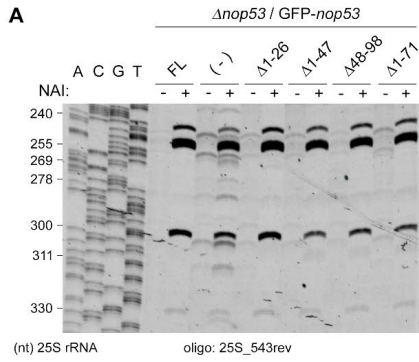


Supplementary Figure S7. Mrt4 is not trapped in cytoplasmic pre-60S intermediates upon Nop53 depletion. To analyze whether Nop53 depletion, by affecting Yvh1 recruitment, would also impair the release of Mrt4, **(A)** sedimentation profile of whole-cell lysates and **(B)** Northern blot analysis of copurified pre-rRNAs with Mrt4-TAP were performed under Nop53 depleted (-) and non-depleted (+) conditions. In the first case **(A)**, the 24 fractions from 10-30% glycerol density gradient sedimentation were analyzed by Western blot with anti-CBP, anti-GFP, and anti-uL18 (In: Input – whole cell lysate; M: Protein MW marker). In the second case **(B)**, both input (total RNA) and elution (IP) in biological triplicates were assayed by Northern blot using the indicated probes. The $\Delta rrp6$ strain was employed as a control for the accumulation of 5.8S+30 pre-rRNA. *non-specific band. **(C)** The subcellular localization of Mrt4-GFP in the conditional strain $\Delta nop53/GAL1-ProtA-NOP53$ expressing RFP-Nop1 as a nucleolar marker was evaluated by fluorescence microscopy in live yeast cells grown either in galactose (Nop53+) or shifted to glucose (Nop53-) containing medium. Scale bar, 2 μ m. Frequency of the phenotypes observed in over 150 cells in replicate experiments is shown in Suppl. Table S4. **(D)** Whole-cell lysates of the yeast cultures used for fluorescence microscopy were analyzed by Western blot with the indicated antibodies.



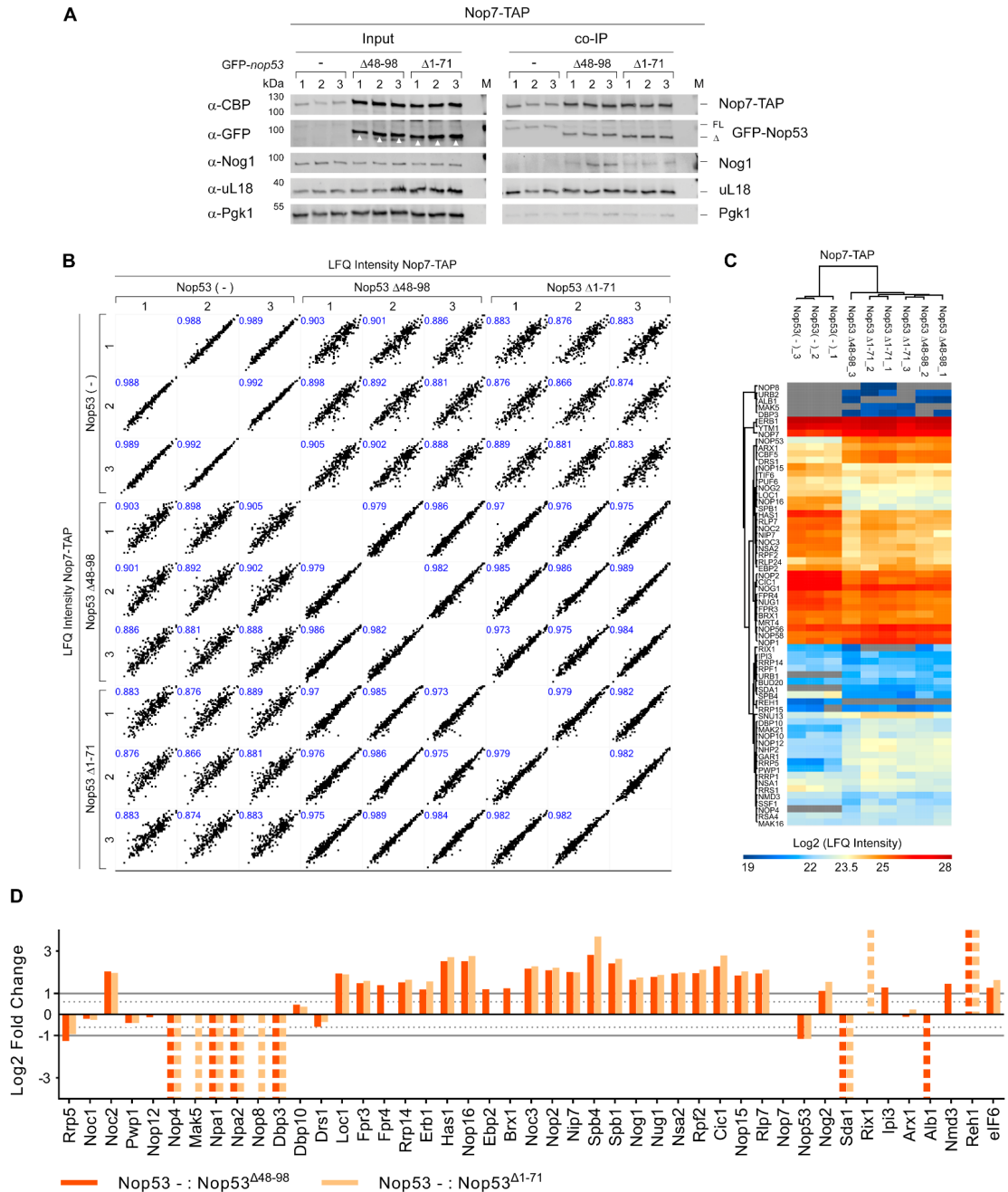
Supplementary Figure S8

Supplementary Figure S8. Growth phenotype, effect on the 7S pre-rRNA processing, and expression level of *nop53* N- and C-terminal truncated mutants. Analysis of the conditional strain $\Delta nop53/tet-OFF-GFP-NOP53$ expressing the positive control GFP-Nop53 full length (FL), the negative control empty vector (-), or the indicated GFP-tagged *nop53* N- and C-terminal truncated mutants. **(A)** Western blot analysis of fractions from the yeast cell cultures used for the growth assays, with and without doxycycline (DOX - 1.5 μ g/ml) supplementation, performed with the indicated antibodies. White arrowheads indicate the bands of the *nop53* truncated mutants. GFP-Nop53 designates the Nop53 full-length copy. *non-specific band. M: Protein MW marker. **(B)** Growth curves performed in biological triplicates at 30° C in YNB Glu +LYS+LEU medium supplemented (DOX +) or not (DOX -) with doxycycline (1.5 μ g/ml). **(C)** Spot growth assay with the same strains incubated at 16° C, or 30° C with hygromycin B (200 μ g/ml), for the period indicated in square brackets. A similar profile to hygromycin B was obtained with the translation inhibitor cycloheximide (not shown). **(D)** Accumulation of the 7S pre-rRNA in *nop53* N- and C- mutant strains. The ratio 7S pre-rRNA/ 5S rRNA was calculated based on the quantification of Northern blot bands shown in Fig. 6C using FIJI ImageJ. Values were normalized to the negative control (-) upon Nop53 depletion.



Supplementary Figure S9

Supplementary Figure S9. Nop53 and Yvh1-binding sites on the 25S rRNA are differentially affected by Nop53 depletion and *nop53* N-terminal mutants. *In vivo* SHAPE analysis of Nop53 and Yvh1 binding sites on the 25S rRNA performed on the total pool of pre-60S/mature 60S subunits in the conditional strain $\Delta nop53/tet-OFF-GFP-NOP53$ expressing either the GFP-Nop53 full length (FL), the negative control empty vector (-), or the indicated GFP-tagged *nop53* N-terminal truncated mutants. These strains were grown with doxycycline (1.5 μ g/ml) and briefly incubated with the acylating reagent NAI 100 mM (+) or DMSO as control (-). Total RNA was subjected to primer extension with oligos (25S_543rev, 25S_1330rev, and 25S_3166rev) complementary to different regions of the 25S rRNA, allowing us to probe **(A)** Nop53 interacting site - helices 16-17 in the 25S rRNA Domain I, **(B)** and Yvh1 binding sites - the P stalk in the 25S rRNA Domain II, as well as **(C)** the sarcin-ricin loop (SRL) in the 25S rRNA Domain VI. The DNA ladder (ACGT), obtained from a different sequence, was used to identify the nucleotide positions in the sequence of the 25S rRNA, which are indicated on the left of the gel. The gel images were cropped and distortions attenuated for easier visualization of bands. Modified nucleotides whose signal increased or decreased in comparison with the positive control (FL) are highlighted in red in the 25S rRNA secondary structure on the right of the gel (RiboVision 1.15).



Supplementary Figure S10. Comparison between the effect of Nop53 depletion and *nop53* N-terminal mutants on the interactome of Nop7. Co-IP assays with Nop7-TAP upon depletion (-) of Nop53 or upon expression of *nop53* N-terminal deletion mutants Nop53^{Δ48-98} and Nop53^{Δ1-71}. **(A)** Western blot analysis of Input and elution (co-IP) fractions of all biological replicates using the indicated antibodies. White arrowheads indicate the bands of the *nop53* truncated mutants. (FL: full-length, Δ: truncated mutants, M: Protein MW marker) **(B-D)** Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomic analysis of the affinity-purified preribosomes. **(B)** The correlation matrix of biological replicates based on label-free quantitative (LFQ) intensities exhibits the Pearson correlation coefficients in blue. **(C)** Heatmap of log₂-transformed LFQ intensities showing the affinity-purified 60S AFs. **(D)** log₂-transformed fold change values of each identified 60S AF normalized to the bait and orderly plotted following the 60S assembly pathway. Dashed columns indicate the 60S AFs exclusively identified in one condition.