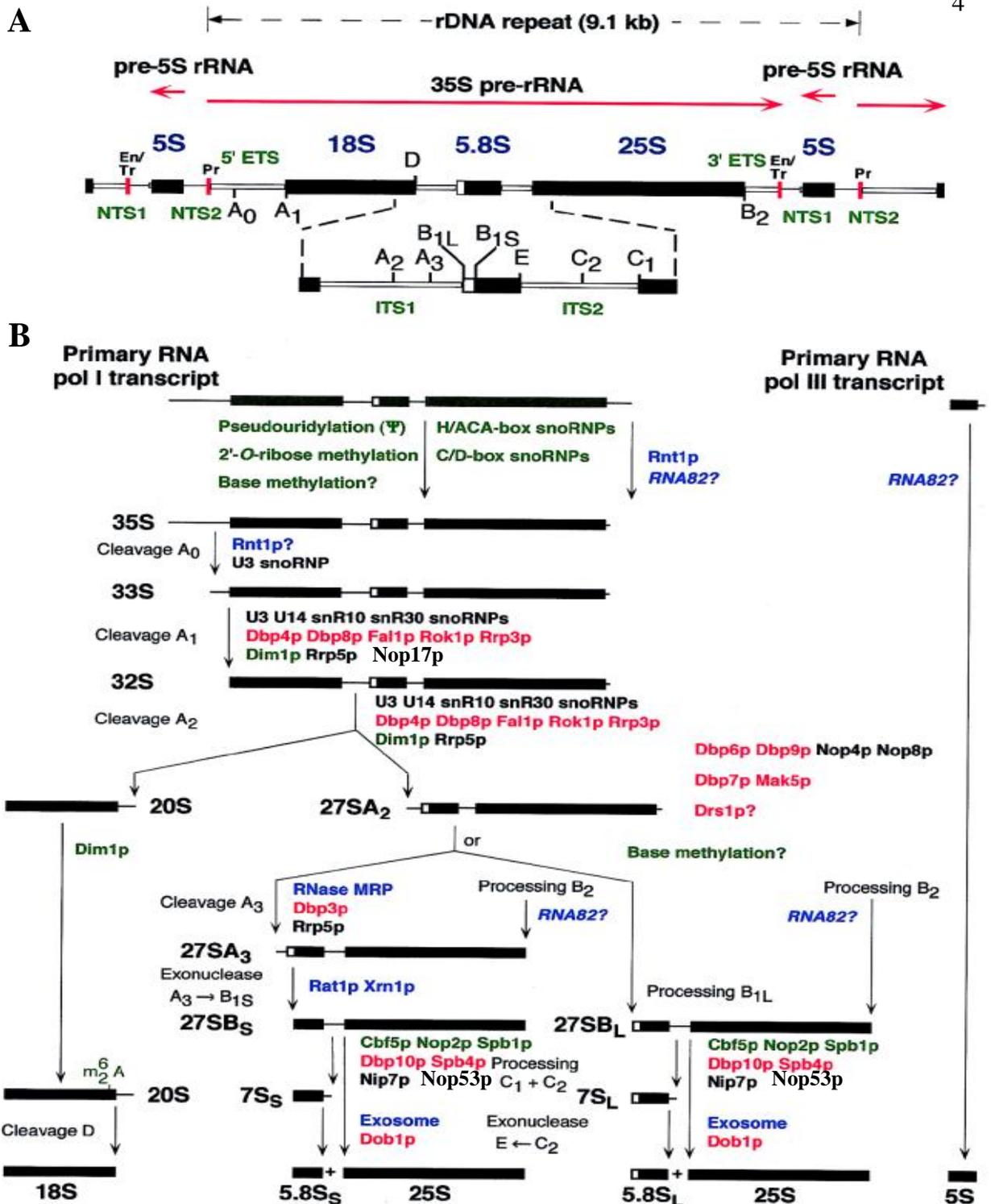
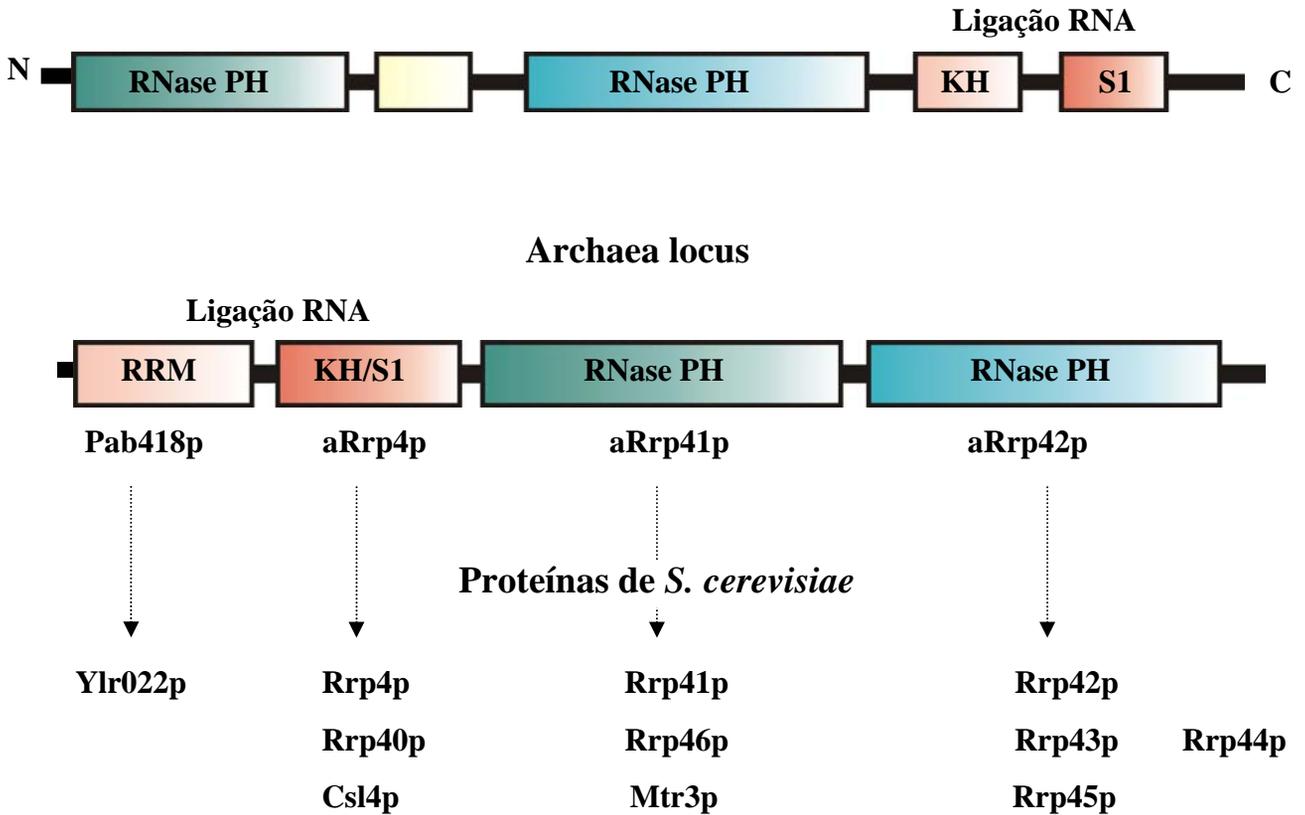


**Figura 1.** Esquema simplificado da maturação e exportação das subunidades ribossomais 40S e 60S. O precursor primário 90S é composto pelo pré-rRNA 35S, o U3 snoRNP e muitas proteínas ribossomais do 40S. Após a clivagem em A<sub>2</sub> o 90S é dividido em pré-60S e pré-40S. Os fatores não ribossomais dissociam do pré-40S e este é exportado para o citoplasma onde ocorre a etapa final da maturação. A maioria dos fatores associados ao pré-60S interagem e após a clivagem em A<sub>2</sub> e a maturação no nucleoplasma requer a associação e dissociação de numerosos fatores. Os fatores de exportação dissociam do 60S após a sua liberação no citoplasma. Modificado a partir de Tschochner e Hurt, 2003.

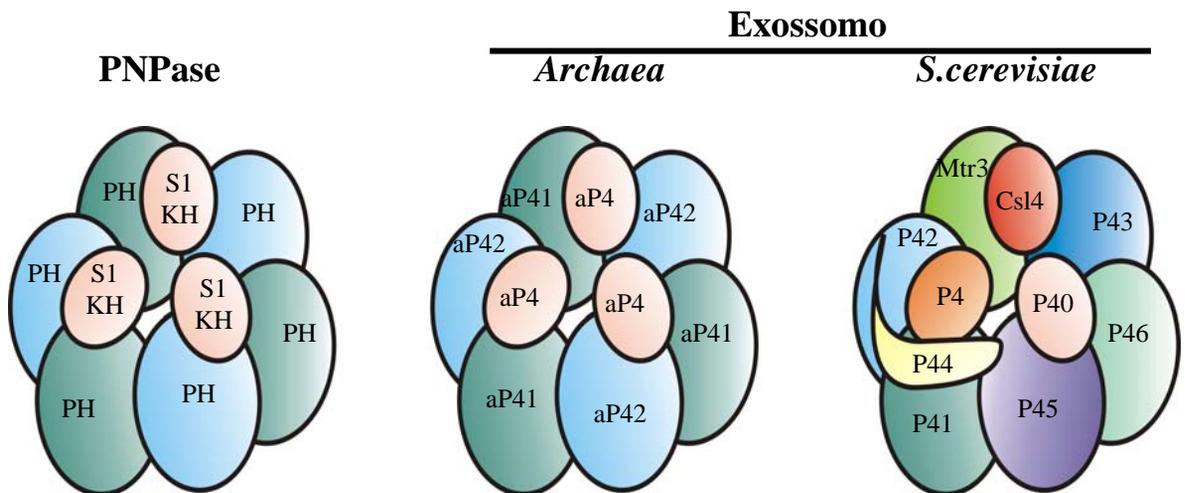


**Figura 2.** Processamento do pré-rRNA em *S. cerevisiae*. A. Estrutura do rDNA, cada unidade contém duas cópias do gene que codifica o 5S e uma cópia do 18S, 5.8S e 25S. As seqüências são separadas pelos espaçadores externos 5'ETS e 3'ETS e pelos espaçadores internos ITS1 e ITS2. As barras pretas representam os RNAs maduros e os sítios de processamento são destacados. B. Resumo da via de processamento do pré-rRNA, indicando cada etapa do processamento e alguns dos fatores relacionados a cada uma. Em azul, endo e exonucleases; vermelho, helicases; verde, fatores envolvidos em modificação; preto, outros fatores que influenciam cada uma das etapas. Modificado a partir de Kressler *et al.*, 1999.

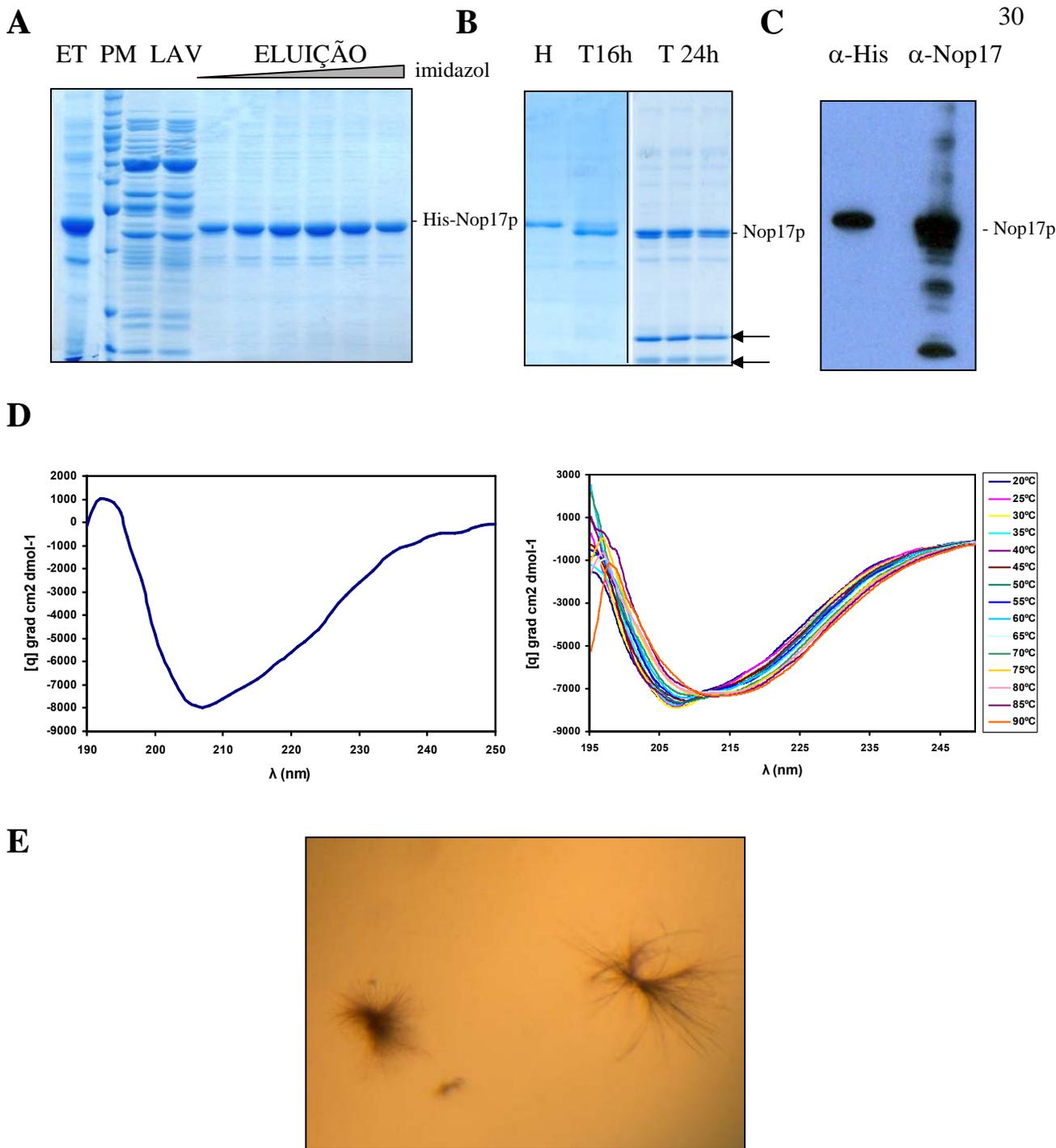
## A A PNPase de *Streptomyces antibioticus*



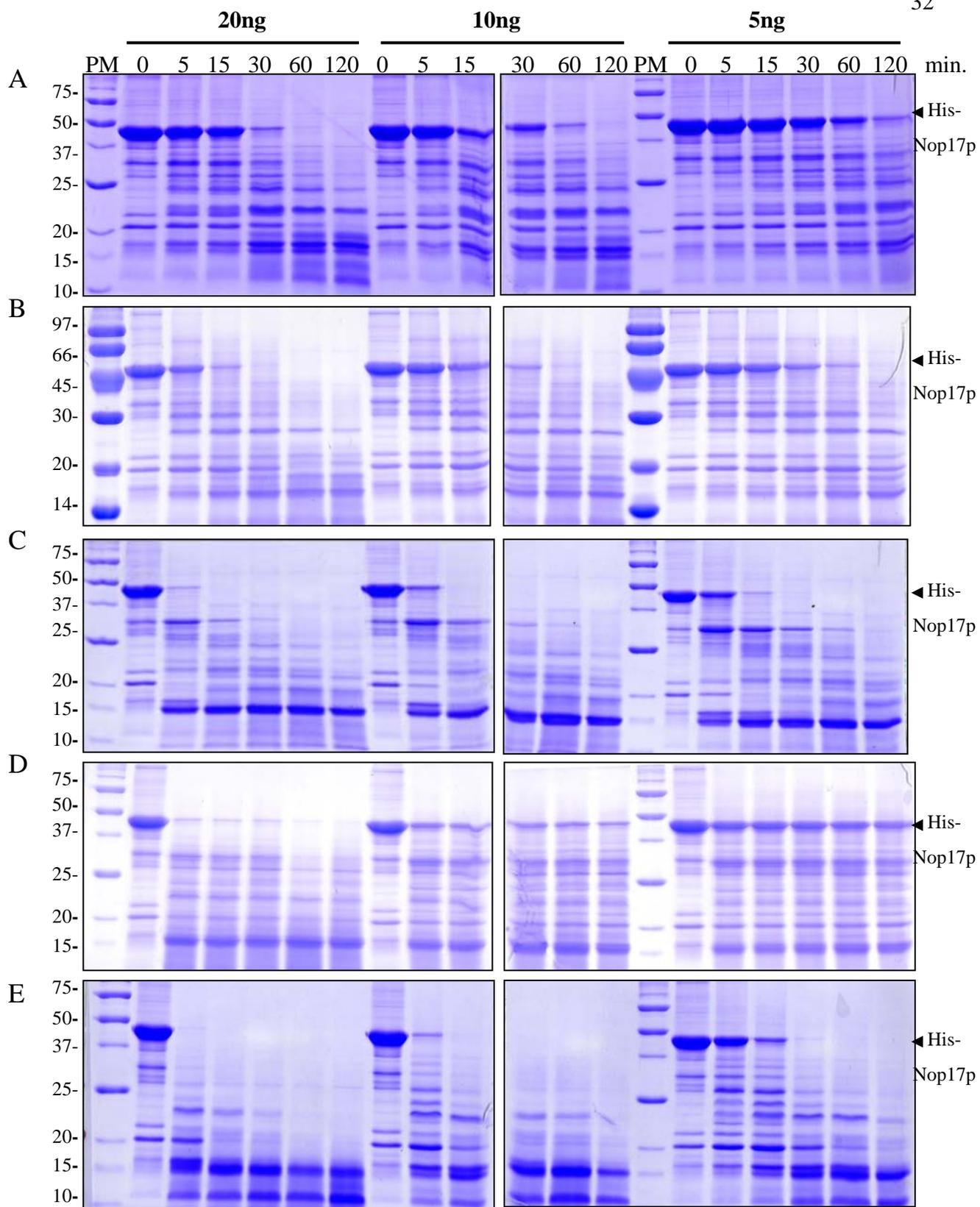
## B



**Figura 3.** Organização dos domínios da PNPase e sua relação com o operon de archaea e as proteínas de levedura e o modelo estrutural em forma de anel para estes complexos. **A.** A PNPase é formada por dois domínios de RNase PH interligados por um domínio de  $\alpha$ -hélices, seguidos de dois domínios de ligação a RNA, KH e S1. Em archaea, subunidades diferentes contêm esses domínios de RNase e de ligação a RNA, cujos genes estão em um mesmo operon. Para cada uma das proteínas de archaea existem três proteínas correlatas em *S. cerevisiae*. A proteína Rrp44p tem homologia a RNase R. Ylr022p foi citada devido a sua homologia com Pab418p. **B.** Modelo da organização do anel de Rnases PH (em azul e verde) e dos domínios de ligação a RNA (laranja). No exossomo de *S. cerevisiae* Rrp44p está representada em amarelo e a subunidade Rrp6p foi omitida.

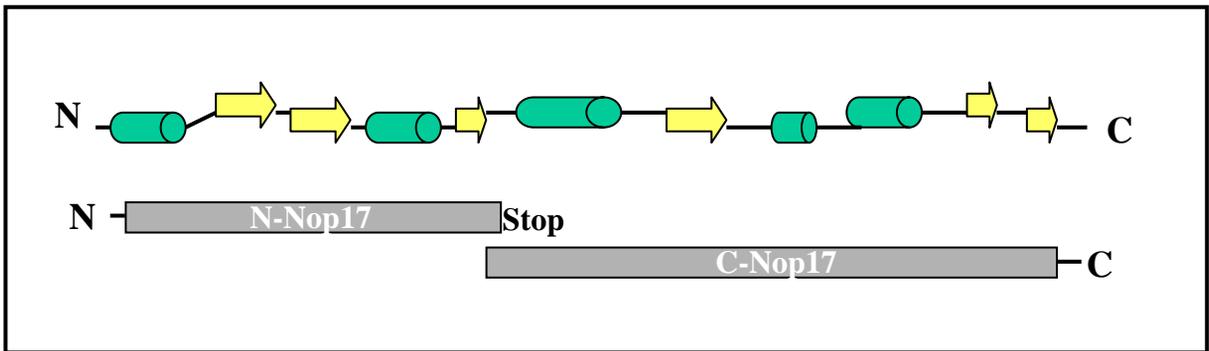


**Figura 4.** Purificação e dados estruturais de His-Nop17p. **A.** Perfil de purificação de His-Nop17p em coluna de níquel. ET-extrato total; PM- peso molecular; **B.** Clivagem com trombina. H-His-Nop17p; T-clivagem com trombina. As setas indicam os fragmentos gerados após longo tempo de incubação com trombina. Gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue. **C.** Western blot, com a proteína purificada. **D.** Espectros de dicroísmo circular obtidos para His-Nop17, em espectropolarímetro Jasco J-810. Dados coletados a diferentes temperaturas, utilizando cubeta de 0,1cm. **E.** Cristais obtidos para Nop17p. Nop17p a 10mg/ml em 5mM Tris HCl pH8, 10mM NaCl e 5% Glicerol. Agulhas foram obtidas após 30 dias em 50% MPD, 0,1M Tris HCl pH8.5 e 0,2M de fosfato de amônio.

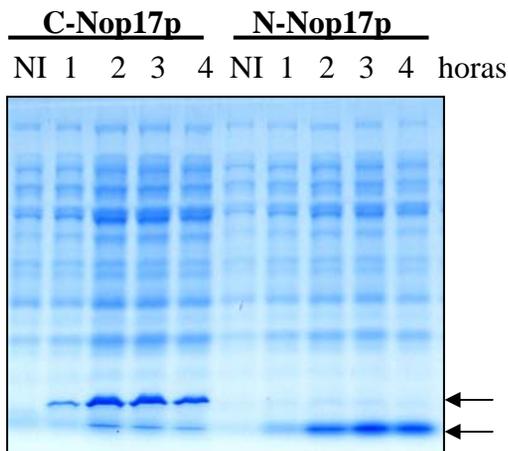


**Figura 5 .** Proteólise limitada de His-Nop17p. His-Nop17p foi concentrada a 1mg/ml e submetida à proteólise com diferentes proteases nas seguintes concentrações: 20ng, 10ng e 5ng. Alíquotas foram coletadas após 0, 5, 15, 30, 60, 120 minutos de incubação a temperatura ambiente. **A.** Tripsina ; **B.** Quimiotripsina; **C.** Termolisina; **D.** Papaína; **E.** Subtilisina. Gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue.

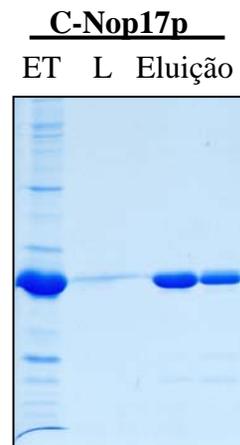
A



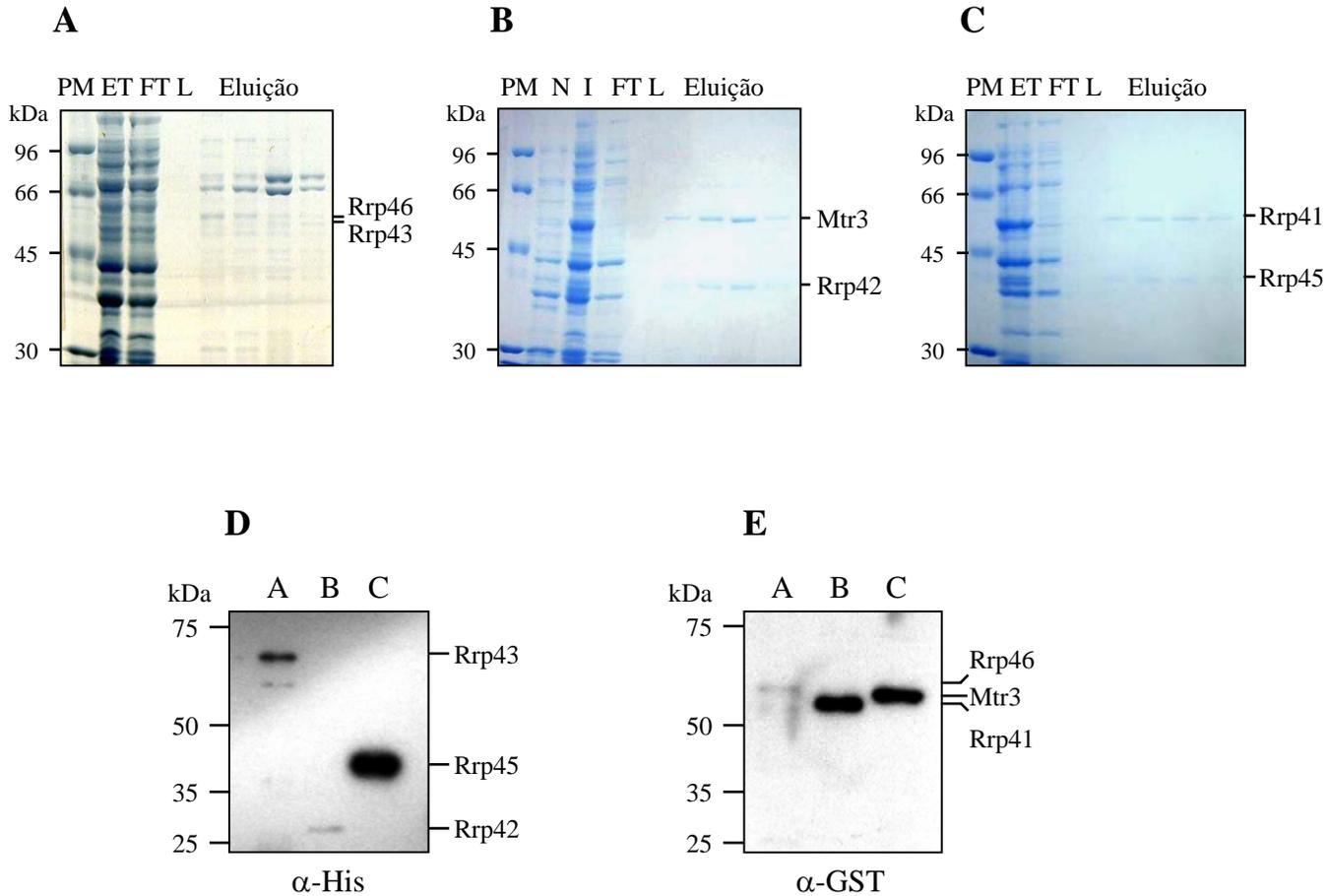
B



C

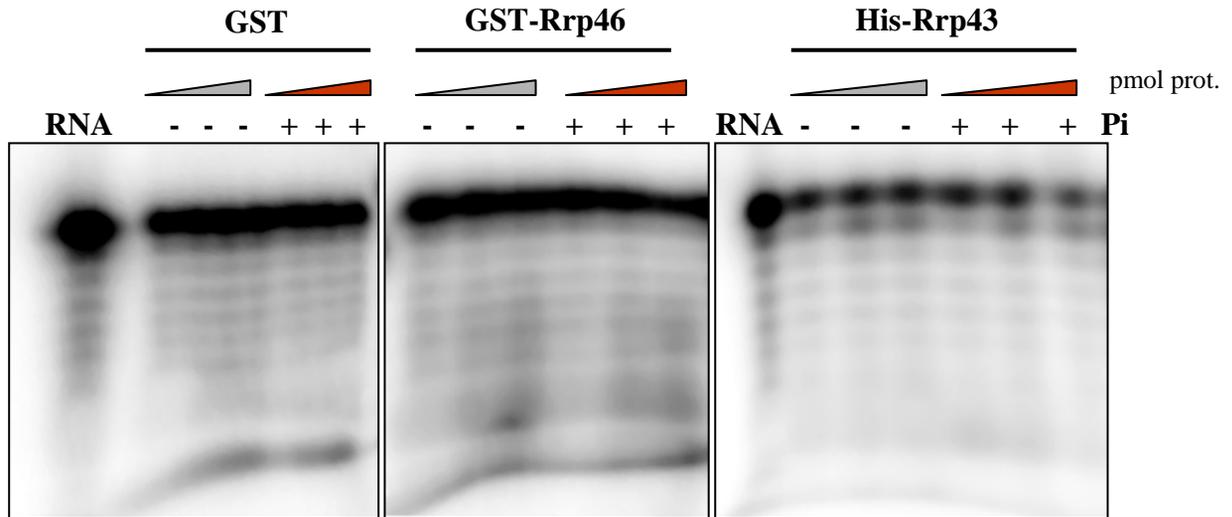


**Figura 6.** Clonagem e purificação das porções amino e carboxi-terminal de Nop17p. **A.** Esquema da estrutura secundária de Nop17p e clonagens das porções N e C-terminal de Nop17p. **B.** Teste de indução para as porções N e C-terminal. **C.** Purificação de C-Nop17p em coluna de níquel. NI-cultura não induzida; ET- extrato total; L-lavagem. Gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue. As setas indicam a expressão das proteína.

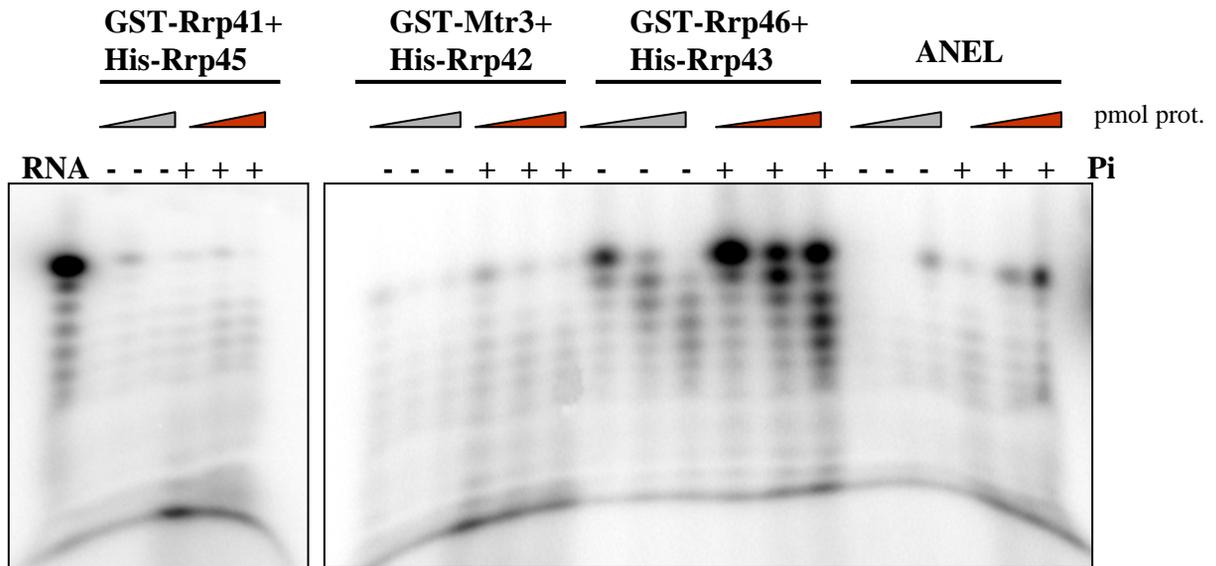


**Figura 7.** Co-purificação das proteínas do anel do exossomo de levedura. **A.** Perfil de eluição de His-Rrp43 +GST-Rrp46; **B.** Perfil de purificação de His-Rrp42+GST-Mtr3; **C.** Perfil de purificação de His-Rrp45 e GST-Rrp41. Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie Blue. **D** e **E.** Western blot, com as proteínas co-purificadas. **D.**  $\alpha$ -His; **E.**  $\alpha$ -GST. PM-Peso molecular; ET-Extrato total; FT-Não ligado; N-Não induzido; I-induzido; L-Lavagem.

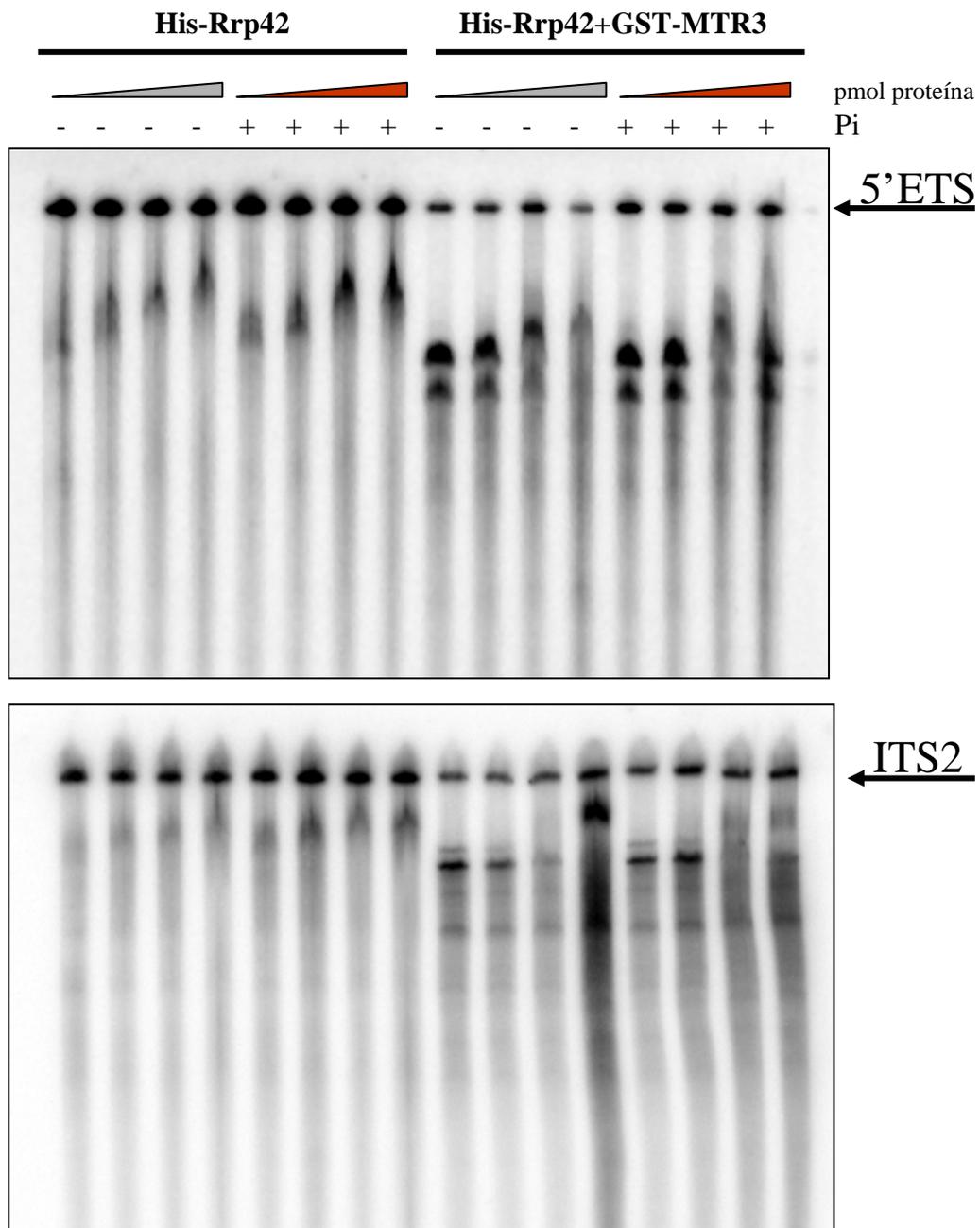
A



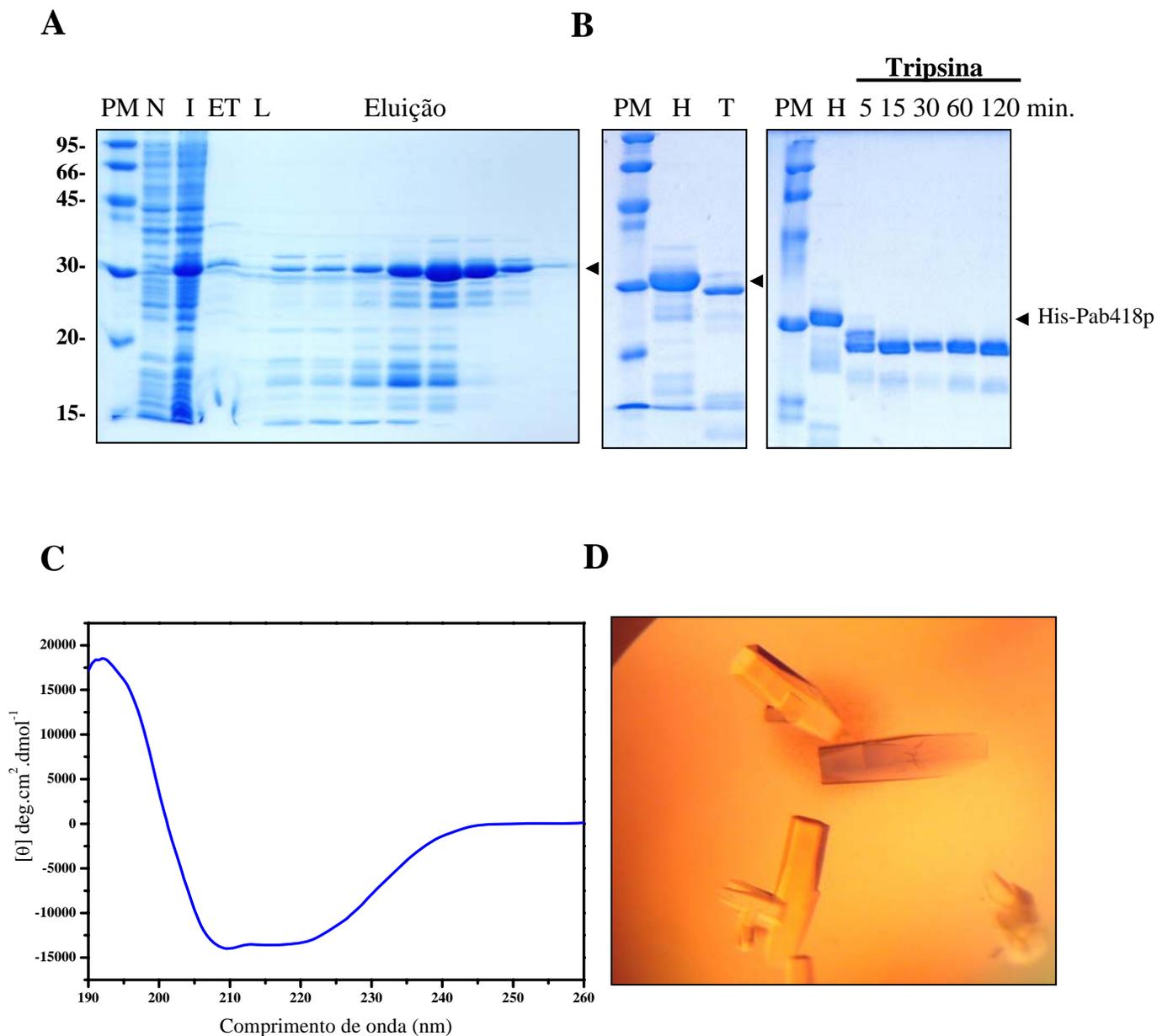
B



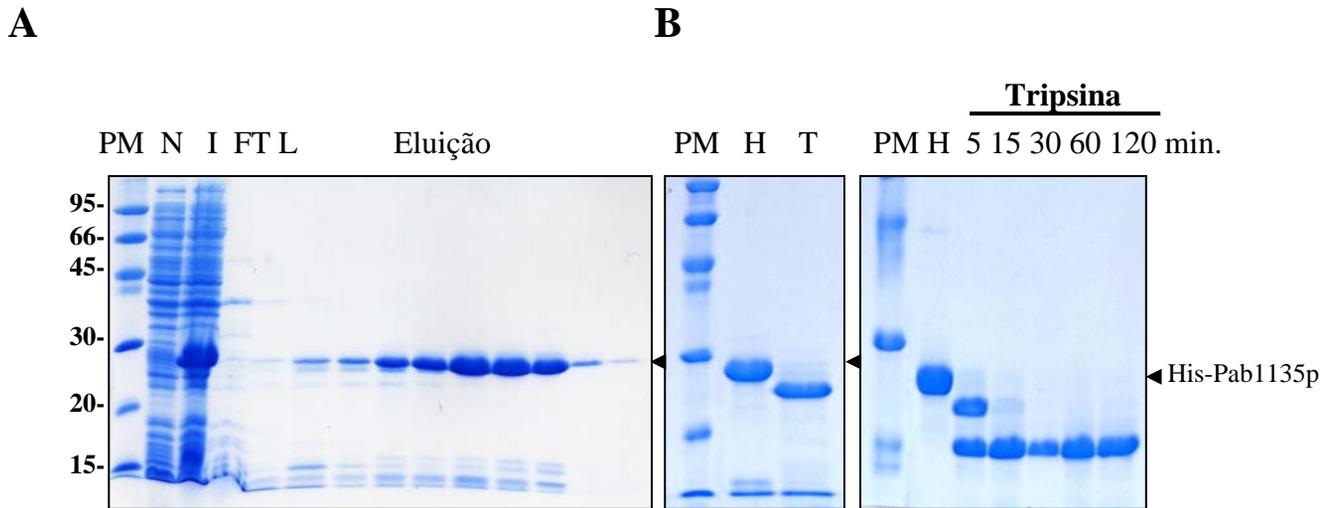
**Figura 8.** Atividade de RNase das proteínas componentes do anel do exossomo de *S. cerevisiae*. As proteínas foram purificadas e concentrações crescentes 2, 10 e 20 pmol foram incubadas com o substrato, na ausência ou presença de fosfato inorgânico, por 30 minutos a 37°C. As amostras foram desnaturadas e separadas em gel de poliácridamida desnaturante 8%. **A.** Proteínas GST, His-Rrp43p e GST-Rrp46p. **B.** Os heterodímeros que compõem o anel de RNases PH. As imagens foram obtidas em fosforimager.



**Figura 9.** Atividades de RNase de His-Rrp42p e His-Rrp42p+GST-Mtr3p de levedura., 2, 5, 10 e 20 pmol de proteína foram testados quanto à atividade de degradação dos espaçadores 5'ETS e ITS2, na ausência ou presença de fosfato. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 6% desnaturante. As imagens foram obtidas em phosphorimager.



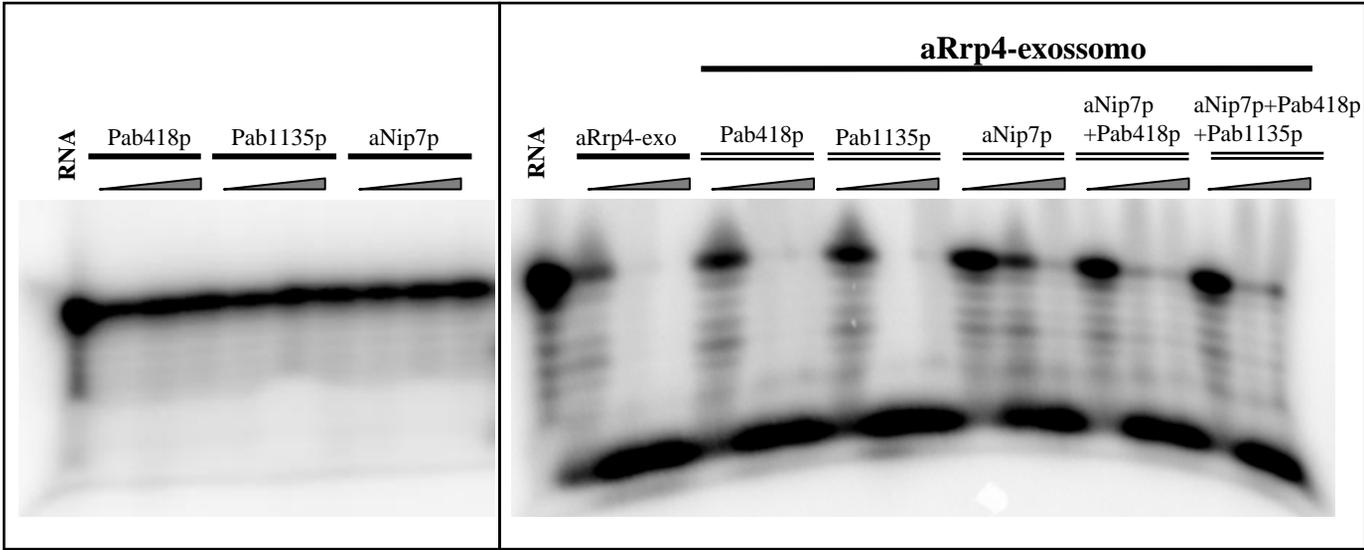
**Figura 10.** Purificação e dados estruturais de Pab418p. **A.** Perfil de purificação de His-Pab418p em coluna de níquel. **B.** Clivagem com trombina e proteólise limitada com tripsina. PM- peso molecular; N-cultura sem indução; I-cultura expressando His-Pab418p; ET-extrato total; L-lavagem; H-His-Pab418p; T-clivagem com Trombina. Gel de poliácridamida 15% corado com Coomassie Blue. **C.** Espectro de dicroísmo circular obtido para His-Pab418p, em espectropolarímetro Jasco J-810, utilizando cubeta de 0,1cm. **D.** Cristais de Pab418p. Pab418p em 10mM acetato de sódio pH 5, concentrada a 15mg/mL e incubada por 48 horas na presença de 0,2M de fosfato de amônio.



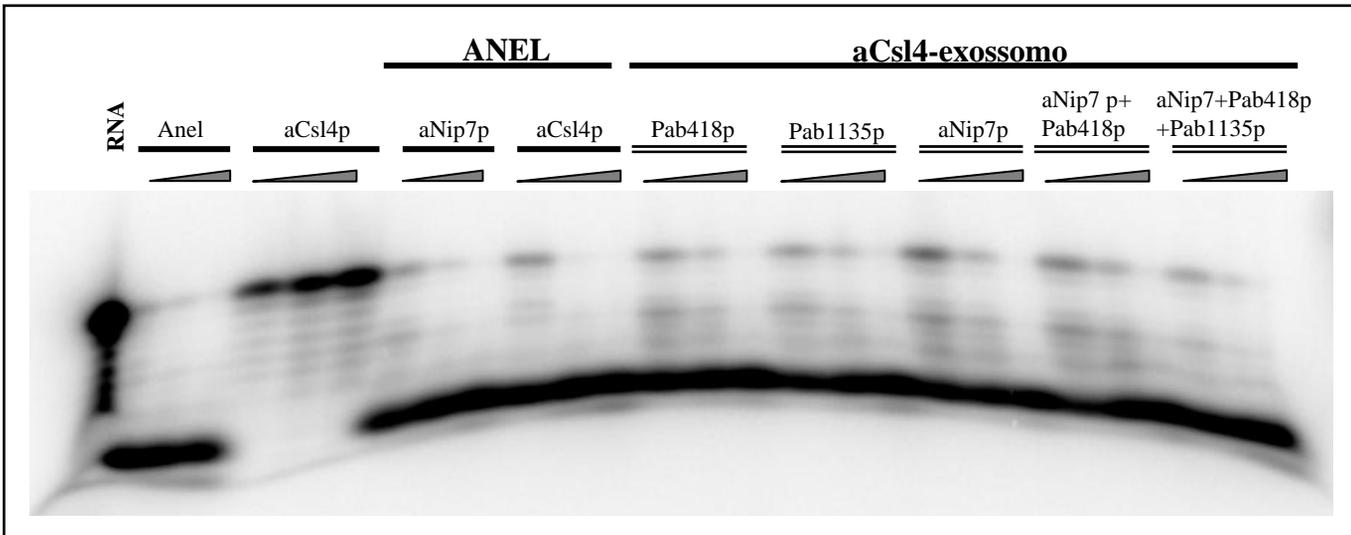
**Figura 11.** Purificação de Pab1135p. **A.** Perfil de purificação de His-Pab1135p em coluna de níquel. **B.** Clivagem com trombina e proteólise limitada com tripsina. PM- peso molecular; N-cultura sem indução; I-cultura expressando His-PAB1135p; ET-extrato total; L-lavagem; H-His-Pab1135p; T-clivagem com Trombina. Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie Blue.

A

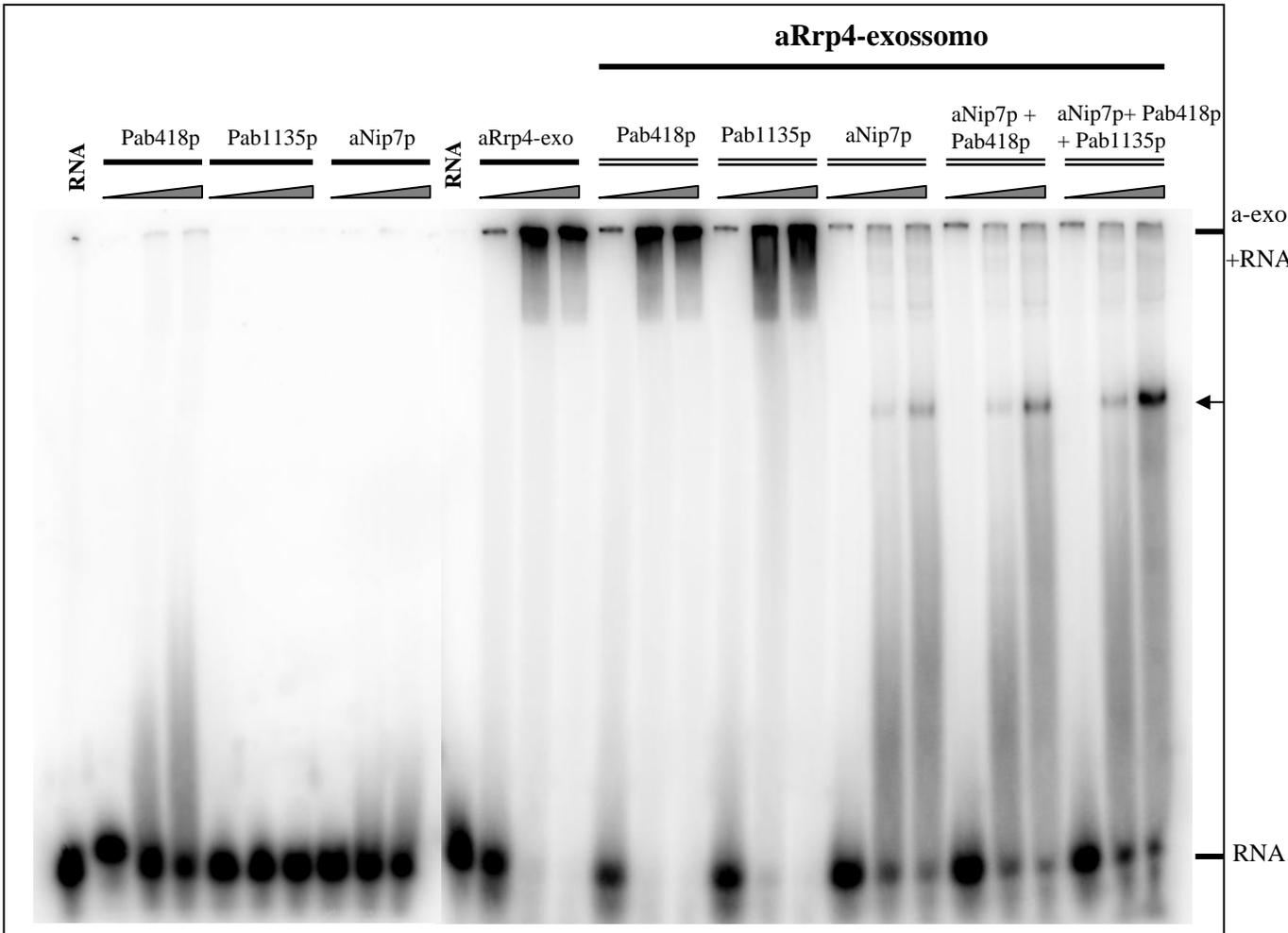
B



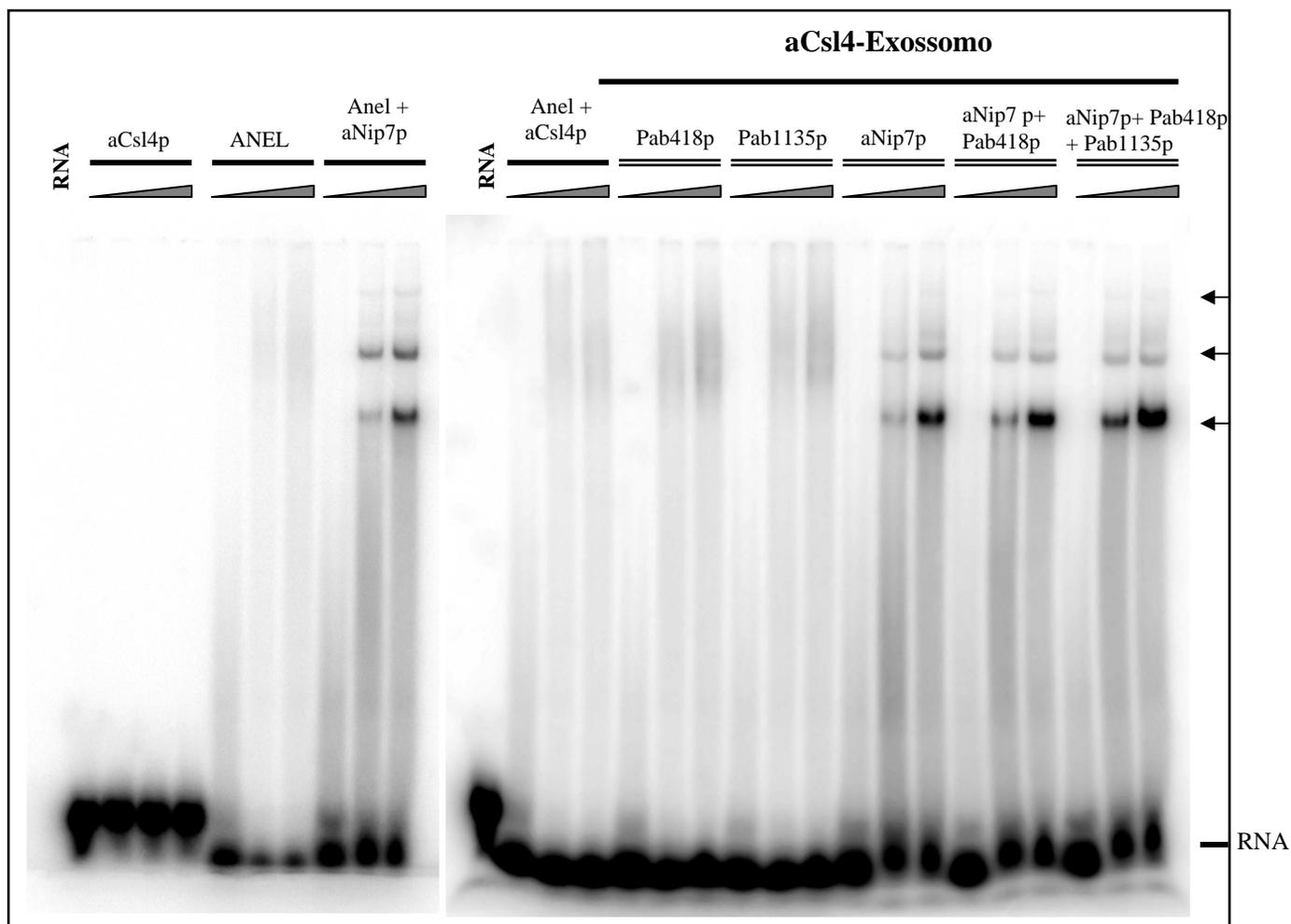
C



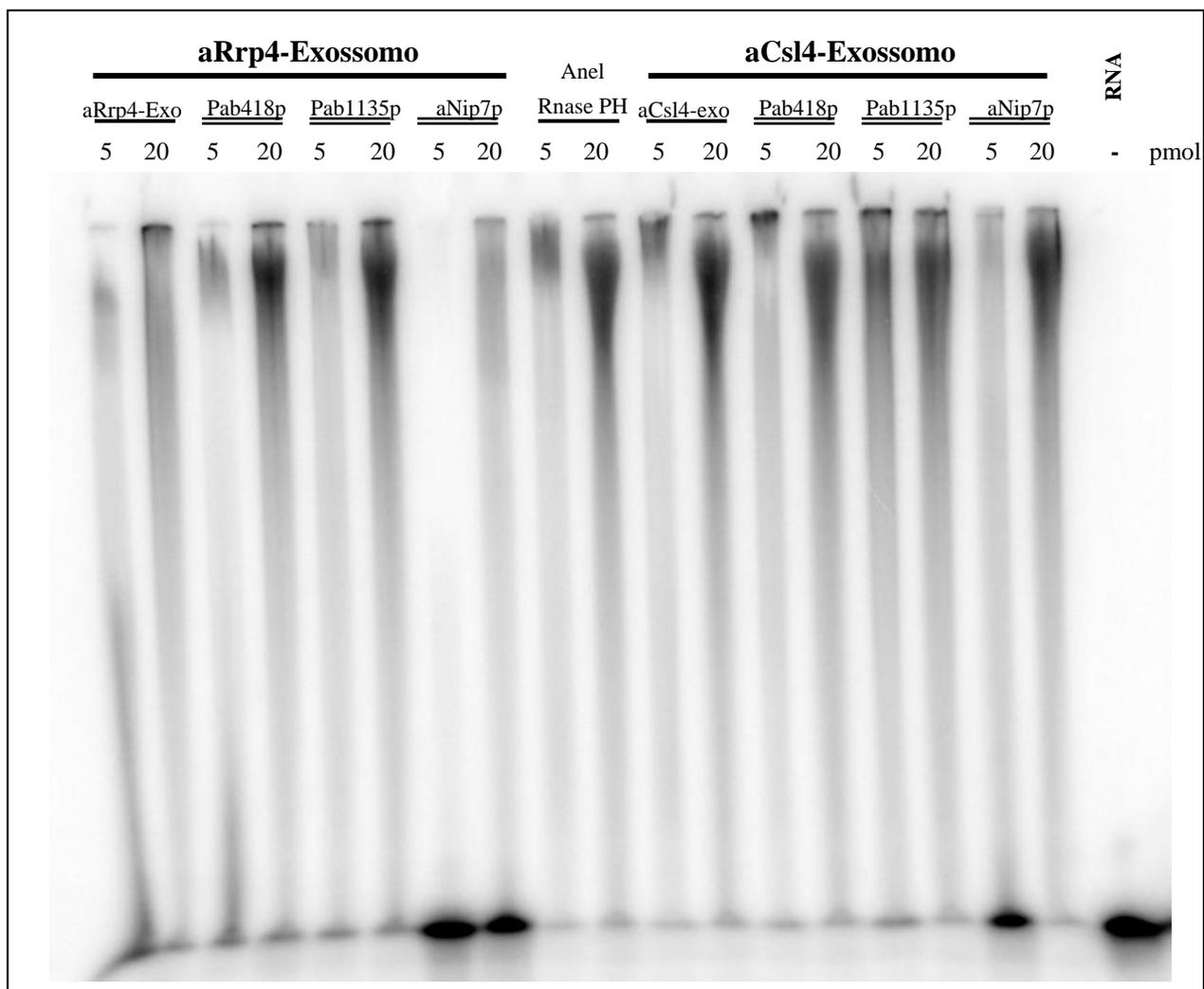
**Figura 12.** Análise da atividade de RNase das proteínas Pab418p, Pab1135p e aNip7p quando associadas ao a-exossomo. **A.** Teste de atividade das proteínas isoladas. **B.** Teste da influência de diferentes proteínas na atividade do aRrp4-exossomo. 0,5, 1, e 10 pmol de cada proteína foi incubado por 15 minutos a 60°C com oligonucleotídeos poli-rA(14) marcado com  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. **C.** Atividade do aCsl4-exossomo e sua associação a outras proteínas. As reações foram incubadas por 5 minutos a 60°C. As amostras foram desnaturadas e separadas em gel de poli-acrilamida desanaturante 8%. As imagens foram obtidas em phosphorimager.



**Figura 13.** Análise da ligação a RNA pelas proteínas Pab418p, Pab1135p e aNip7p, isoladamente ou associadas ao aRrp4-exossomo. 1, 10 e 20 pmol de proteína foram incubados a 37°C por 30 minutos, com oligo poli-rA(14nt) marcado radioativamente. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 8%. As imagens foram obtidas em phosphorimager. Bandas correspondentes ao RNA livre e ao complexo aRrp4-exossomo estão indicadas. Seta indica complexos menores que aRrp4-exossomo, que ligaram ao RNA na presença de aNip7p.

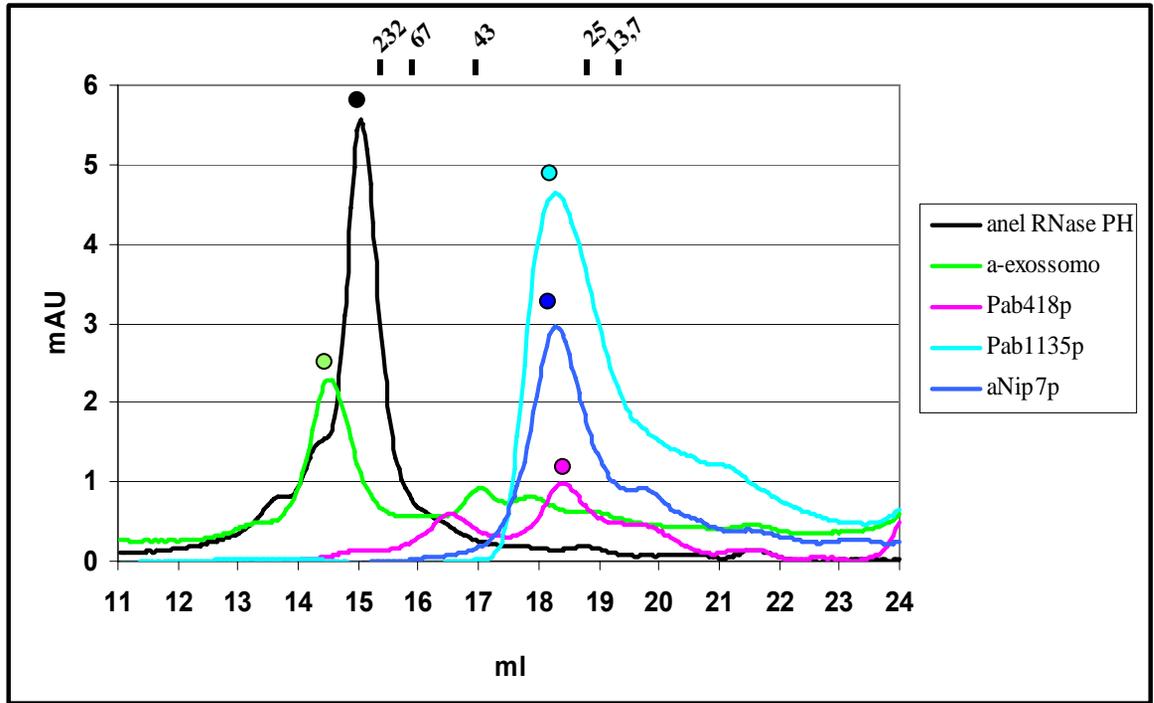


**Figura 14.** Análise da ligação a RNA das proteínas isoladamente ou associadas ao aCsl4-exossomo. 1, 10 e 20 pmol de proteína foram incubados a 37°C por 30 minutos, com oligo poli-rA(14nt) marcado radioativamente. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 8%. As imagens foram obtidas em phosphorimager. Banda correspondente ao RNA livre esta indicada. Setas indicas complexos menores que aRrp4-exossomo, que ligaram ao RNA na presença de aNip7p.

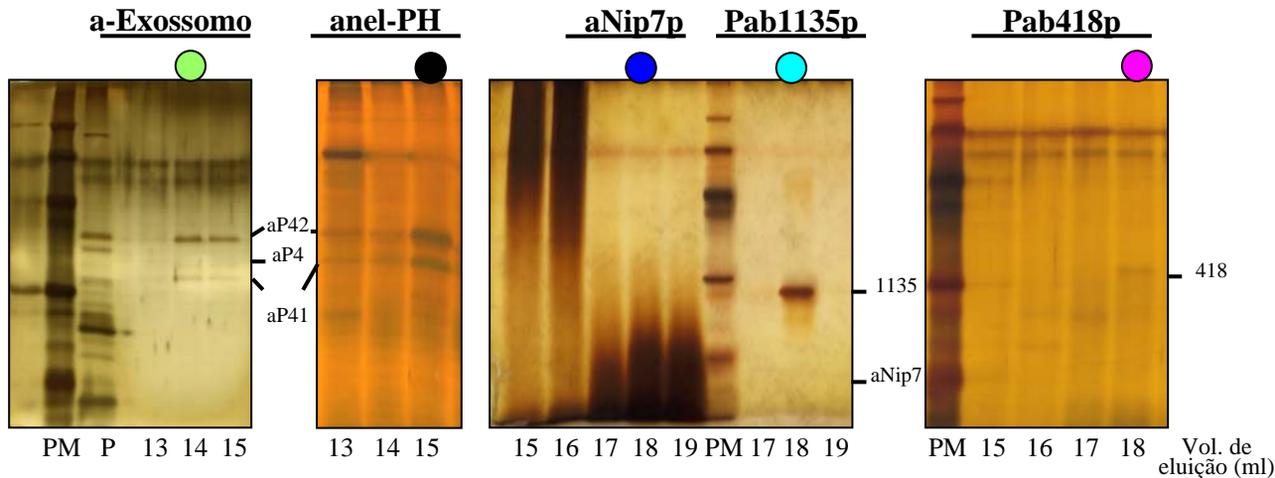


**Figura 15.** Análise da atividade de polimerização do aRrp4-Exossomo e aCsl4-Exossomo associados às proteínas Pab418p, Pab1135p e aNip7p. 5 e 20pmol de proteína foram incubadas por 30 minutos a 37°C com oligo poli-rA(14nt) marcado radioativamente. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 8%. As imagens foram obtidas em phosphorimager.

A

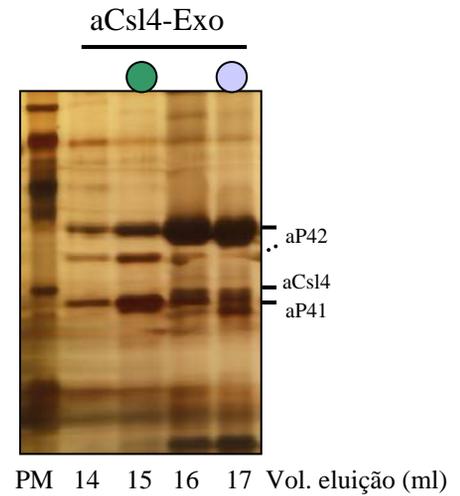
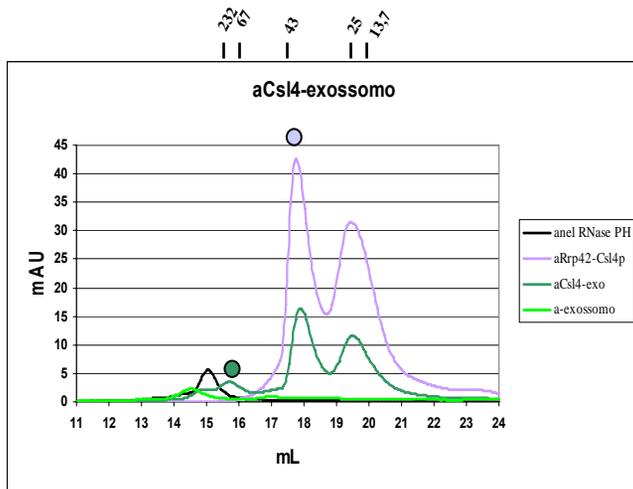


B

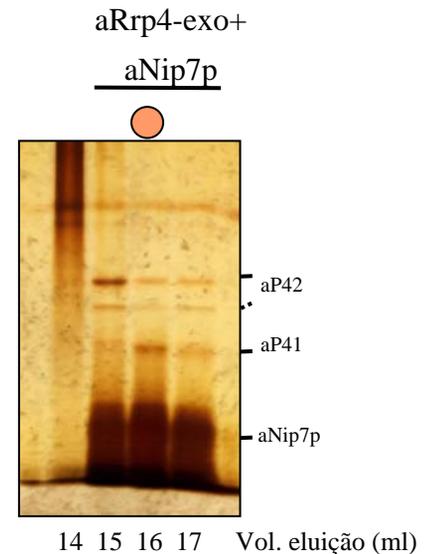
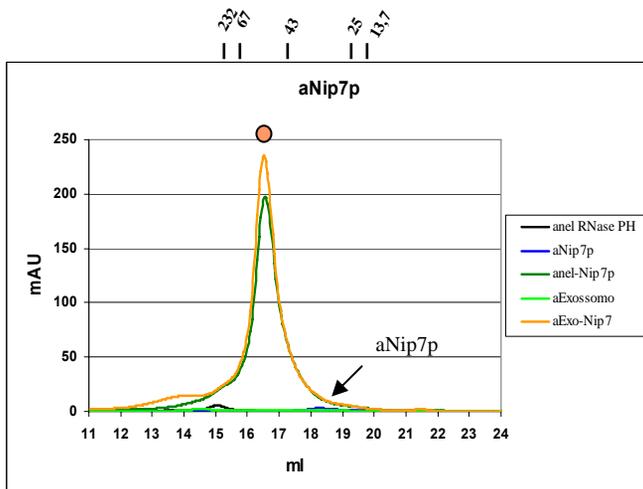


**Figura 16.** Perfil de eluição das proteínas em Superose 6HR 10/30 e identificação por SDS-PAGE. **A.** A coluna foi pré-equilibrada com 10mM Tris/HCl pH 8, 150mM NaCl e 0,5mM EDTA e as proteínas eluídas em fluxo constante de 0,2ml/minuto. O peso molecular dos padrões de calibração utilizados estão na parte superior do gráfico. Catalase, 232kDa; BSA, 67kDa; Ovoalbumina, 43kDa; Quimotripsinogênio, 25kDa e Ribonuclease A, 31,7kDa. **B.** Gel de poliácridamida corado com prata. Círculos coloridos indicam as frações de gel filtração, analisadas por SDS-PAGE, que correspondem ao pico de eluição das proteínas.

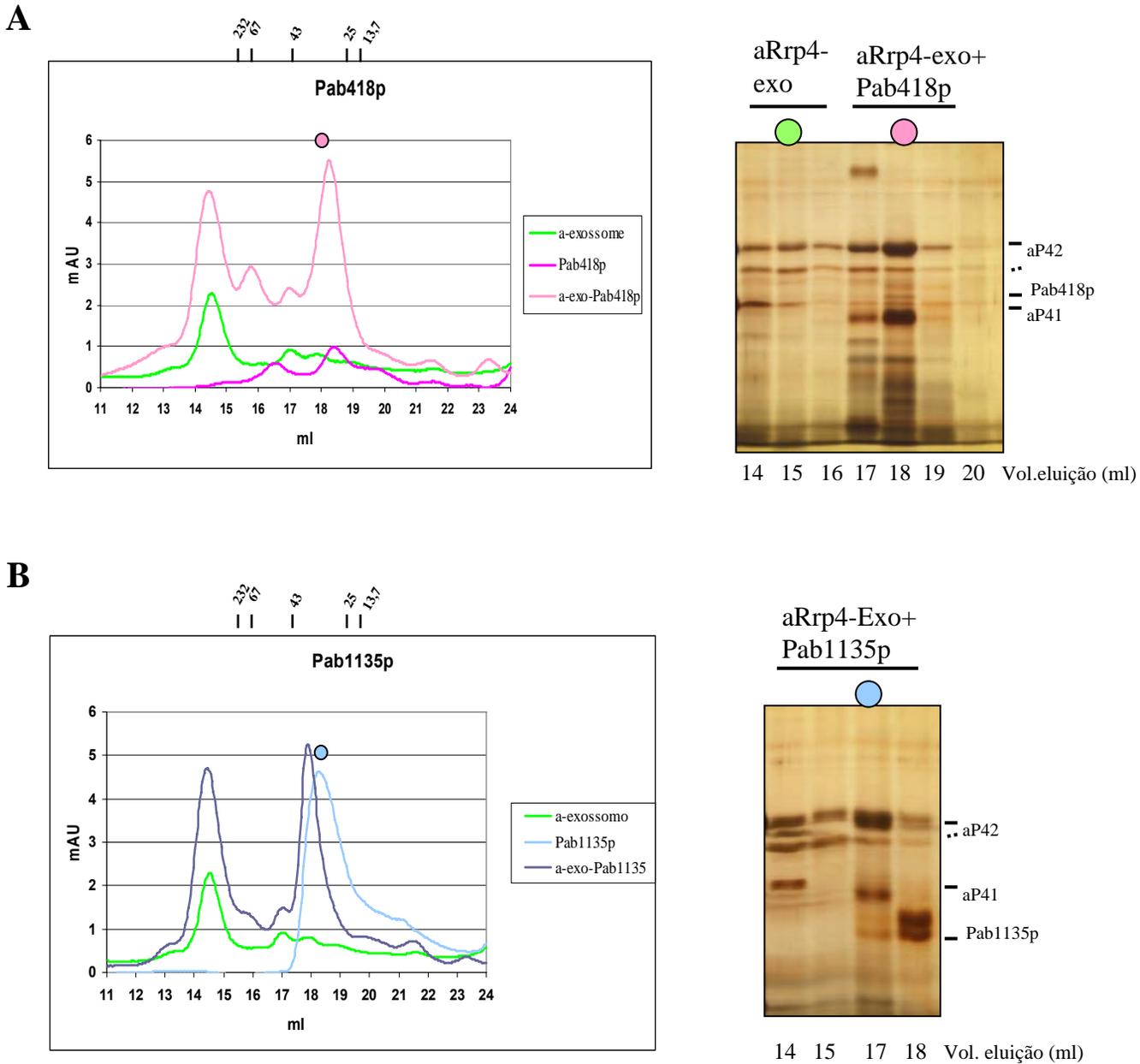
A

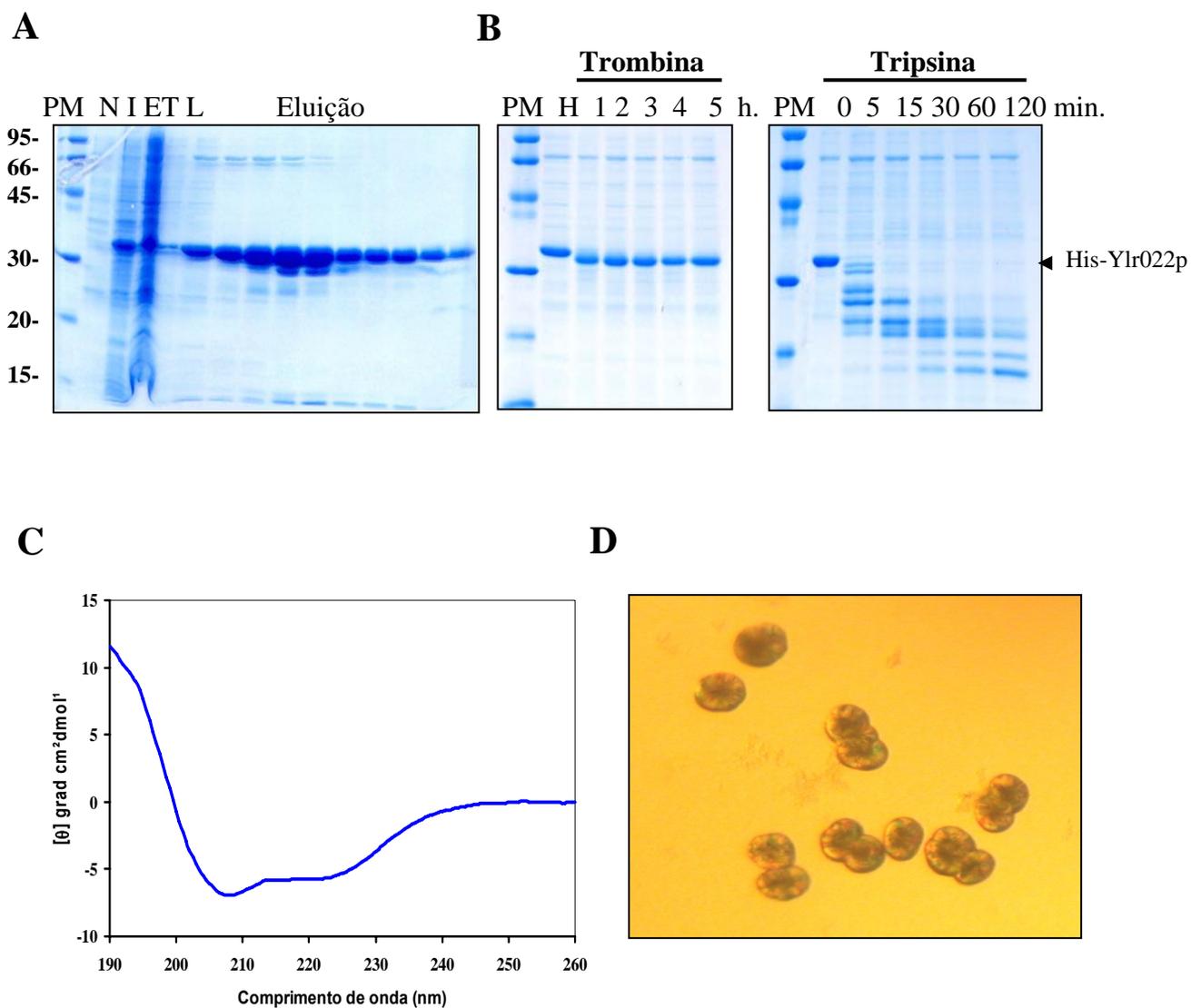


B



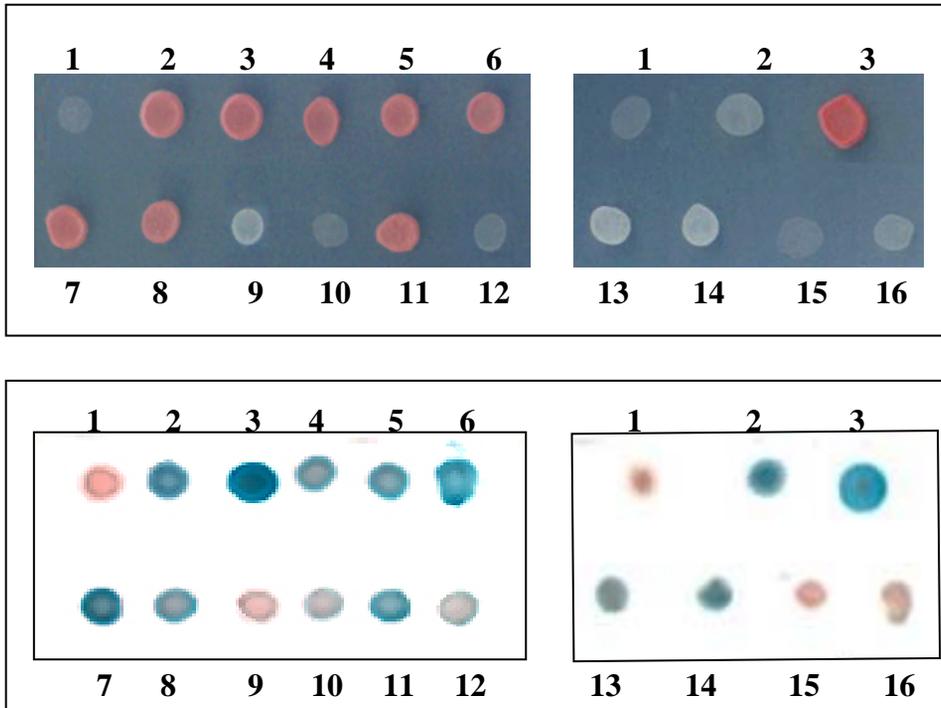
**Figura 17.** Perfil de eluição das proteínas em Superose 6HR 10/30 e SDS-PAGE. A coluna foi pré-equilibrada com 10mM Tris/HCl pH 8, 150mM NaCl e 0,5mM EDTA e as proteínas eluídas em fluxo constante de 0,2ml/minuto. **A.** Perfil de eluição de aCsl4-aRrp42p e sua associação com anel de Rnases PH. **B.** Perfil de eluição de aNip7p e sua associação com aRrp4-exossomo. O peso molecular padrões de calibração utilizados estão na parte superior do gráfico. Devido o aumento da absorção nas amostras anel-Nip7p e aExo-Nip7p os padrões das proteínas isoladas podem ser melhor visualizadas na Figura 16. Catalase, 232kDa; BSA, 67kDa; Ovoalbumina, 43kDa; Quimotripsinogênio, 25kDa e Ribonuclease A, 31,7kDa. **B.** Gel de poliacrilamida 15% corado com prata. Circulos coloridos indicam as frações de gel filtração, analisadas por SDS-PAGE, que correspondem ao pico de eluição das proteínas.





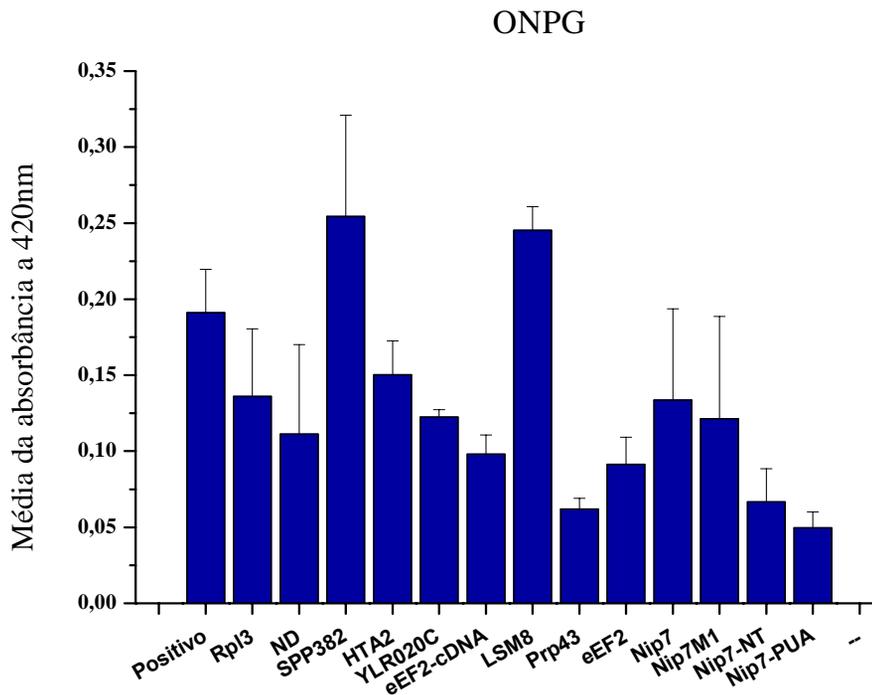
**Figura 19.** Purificação e dados estruturais de His-Ylr022p. **A.** Perfil de purificação de His-Ylr022p em coluna de níquel. **B.** Clivagem com trombina e proteólise limitada com tripsina. PM- peso molecular; N-cultura sem indução; I-cultura expressando His-Ylr022p; ET-extrato total; L-lavagem; H-His-Ylr022p. Gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue. **C.** Espectro de dicroísmo circular obtido para His-Ylr022p, em espectropolarímetro Jasco J-810, utilizando cubeta de 0,1cm. **D.** Cristais obtidos para Ylr022p. Ylr022p a 12,5mg/mL na presença de 100mM MES pH 6,1, 20% PEG 8000 e 200mM Ca(OAc)<sub>2</sub>.

A

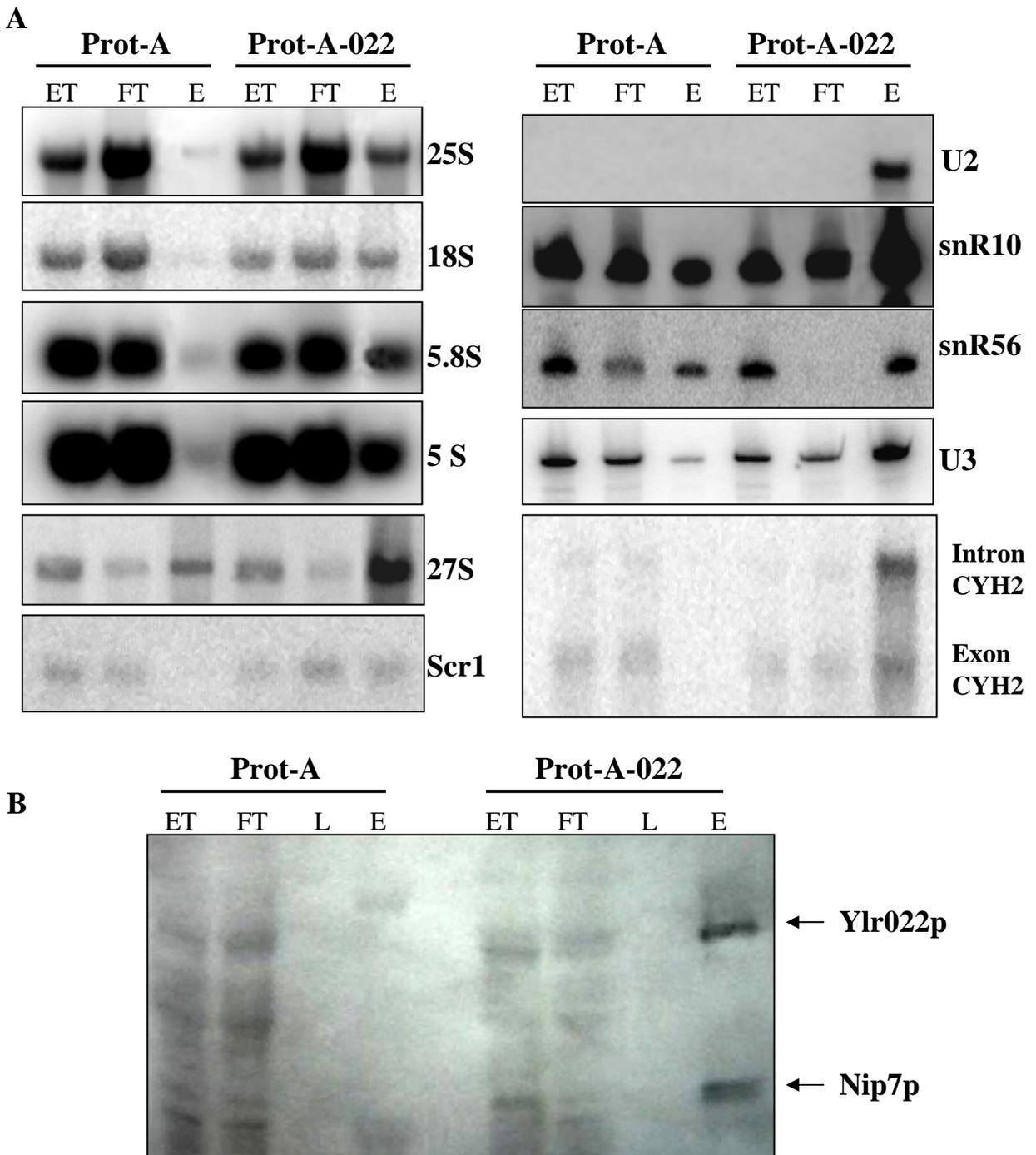


- 1- (-) pBTM-022/pGAD-C1
- 2- (+) pBTM-NIP7/pACT-RRP43
- 3- (++) pBTM-NIP7, pACT-NOP8
- 4- pBTM-022/pGAD-cDNA-Rpl3
- 5- pBTM-022/pGAD-cDNA-ND
- 6- pBTM-022/pGAD-cDNA-SPP382
- 7- pBTM-022/pGAD-cDNA-HT2
- 8- pBTM-022/pGAD-cDNA-YLR020C
- 9- pBTM-022/pGAD-Lsm8
- 10- pBTM-022/pGAD-eFT2
- 11- pBTM-022/pGAD-cDNA-eFT2
- 12- pBTM-022/pGAD-Prp43
- 13- pBTM-Nip7/pGAD-022 \*
- 14- pBTM-Nip7-1/pGAD-022 \*
- 15- pBTM-Nip7-N/pGAD-022 \*
- 16- pBTM-Nip7-PUA/pGAD-022 \*

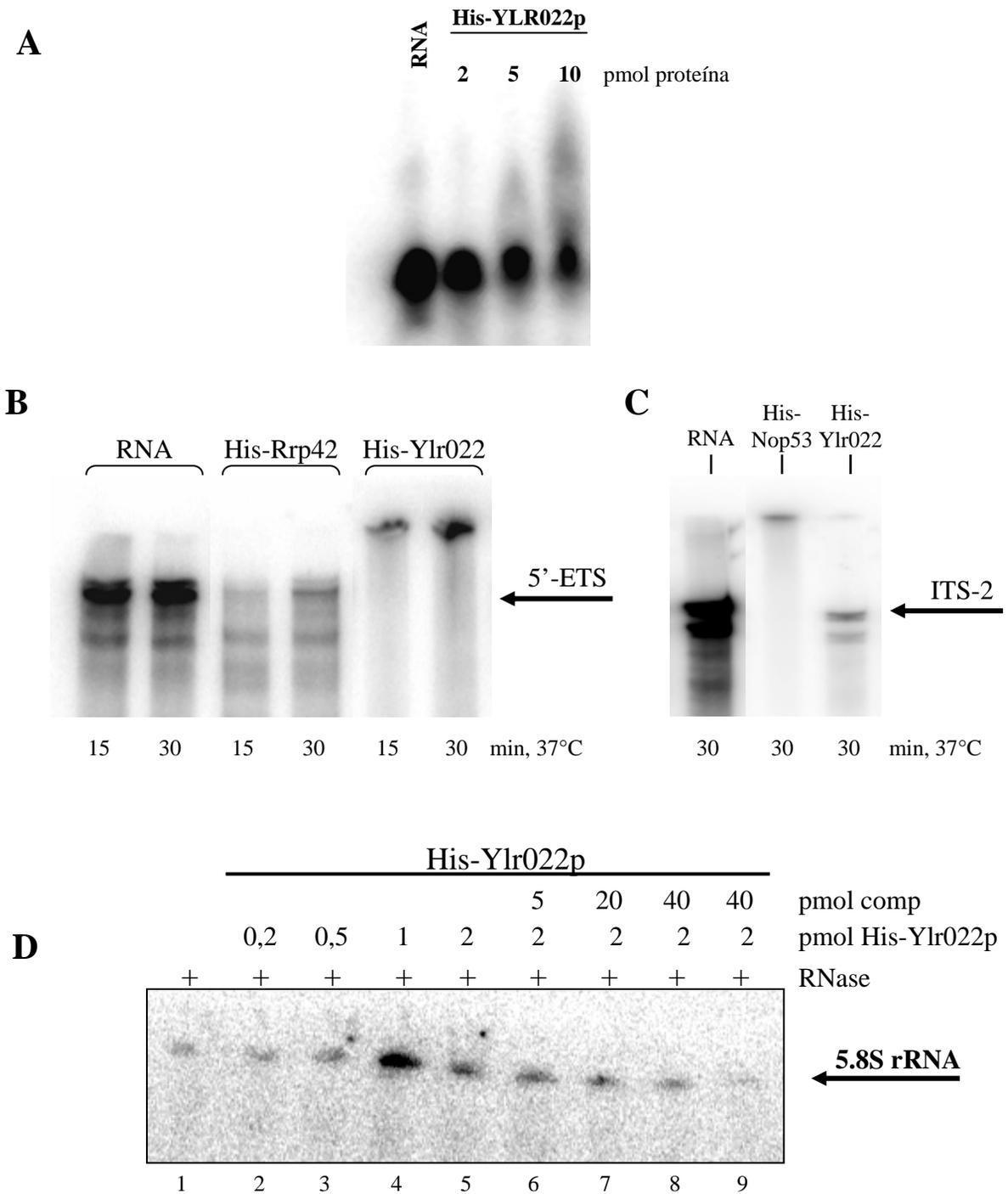
B



**Figura 20.** Duplo híbrido. Ylr022p foi fusionada ao domínio de ligação ao DNA de lexA ou ao domínio de ativação da transcrição de GAL4 e transformada na cepa de levedura L40 com a biblioteca da cDNA ou clones específicos de proteínas que participam do metabolismo de RNA. **A.** Teste de expressão do gene *HIS3* e  $\beta$ -galactosidase, por crescimento em meio sem histidina e/ou na presença de X-Gal. “\*” Presença de 1mM 3AT. **B.** Teste da atividade de  $\beta$ -galactosidase com ONPG. Como controle negativo utilizamos (L40, pBTM-022, pACT) e como controles positivos + (L40, pBTM-NIP7, pACT-Rrp43), ++(L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP8).

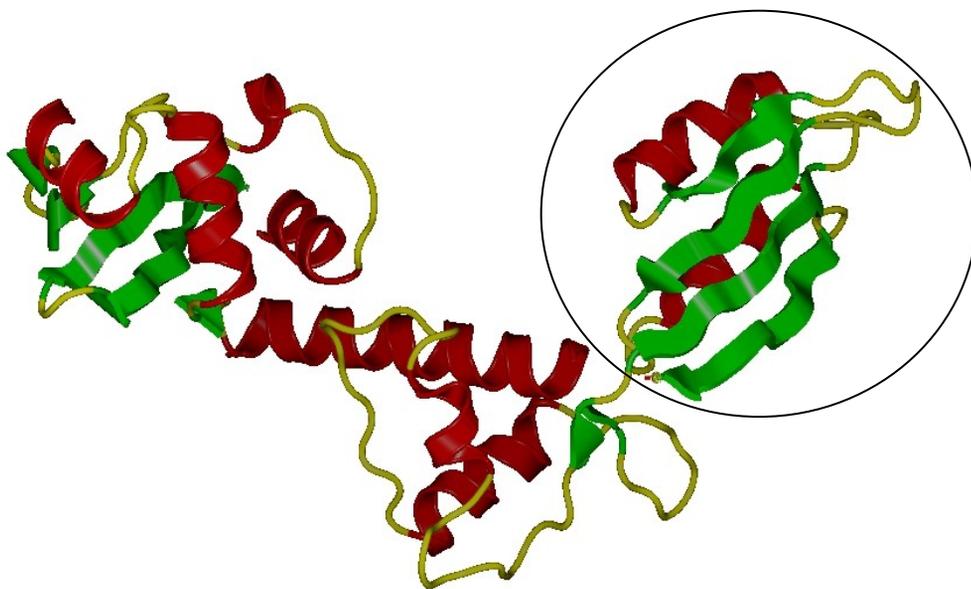


**Figura 21.** Análise da co-imunoprecipitação de RNAs e proteínas com Prot-A-022. **A.** Northern blot dos RNAs que co-imunoprecipitam com Prot-A-022. Extrato total de células expressando Prot-A ou Prot-A-022 foi incubado com IgG-sefarose. O RNA ligado a resina foi extraído com fenol, quantificado, separado em gel e transferido para membranas de nylon. Os oligonucleotídeos utilizados como sonda, estão descritos em Gonzales *et al.*, 2005, específicos para rRNAs, snoRNAs e snRNAs. Os RNAs snR10, snR56 e U3 foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% e os demais em gel de agarose 1,3%. As imagens foram obtidas por phosphorimager. **B.** Análise por Western blot das proteínas que co-imunoprecipitaram com Prot-A-022. Frações correspondentes ao material usado para análise de RNAs com tampão de amostra e desnaturada a 95°C. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 15% e transferidas para membrana de PVDF. As proteínas Nip7p e Prot-A-022 foram detectadas através de antígeno anti-Nip7 e anti-IgG, respectivamente. ET- extrato total; FT- material não ligado; L- lavagem; E- material ligado a resina.

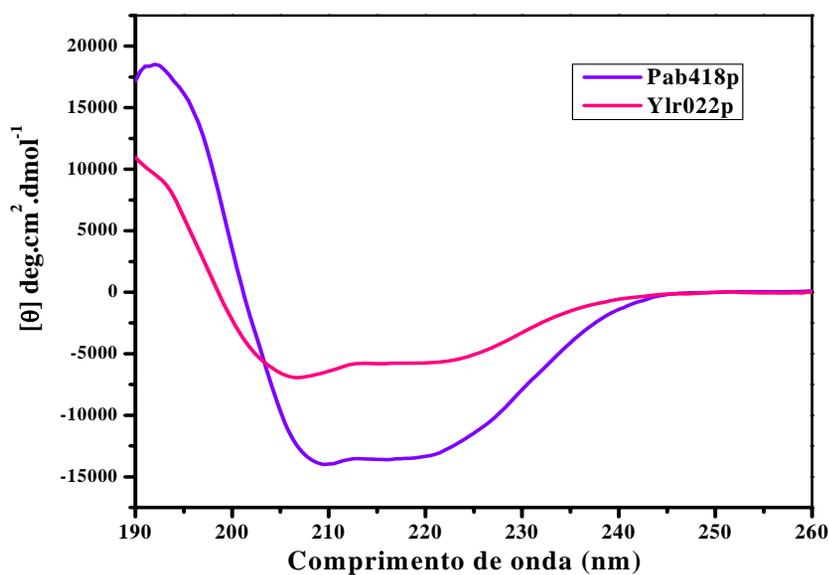


**Figura 22.** Interação de His-Ylr022p a RNA “*in vitro*”. O oligo poli rA(14) foi marcado radioativamente no 5’ e os rRNAs foram transcritos “*in vitro*” e incubados com diferentes concentrações de proteína recombinante. **A.** Ligação ao oligo poli rA(14). Amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. **B.** Ligação ao RNA espaçador 5’-ETS. His-Rrp42p foi utilizada como controle negativo. **C.** RNA espaçador ITS-2. His-Nop53p foi utilizada como controle negativo. **D.** “UV cross-linking” foi realizado depois de incubação de 1 pmol de rRNA 5.8S, com quantidades crescentes de His-Ylr022p, na ausência ou presença de competidor frio. Depois de digestão com RNaseA as amostras foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida. 1- <sup>32</sup>P-5.8S RNA; 2-5, <sup>32</sup>P-5.8S incubado com 0,2-2 pmol de His-Ylr022p; 6-8, 20 pmol de His-Ylr022p e 5-40 pmol de 5.8S rRNA frio; 9, 20 pmol de His-Ylr022p e 40 pmol de RNA competidor frio inespecífico.

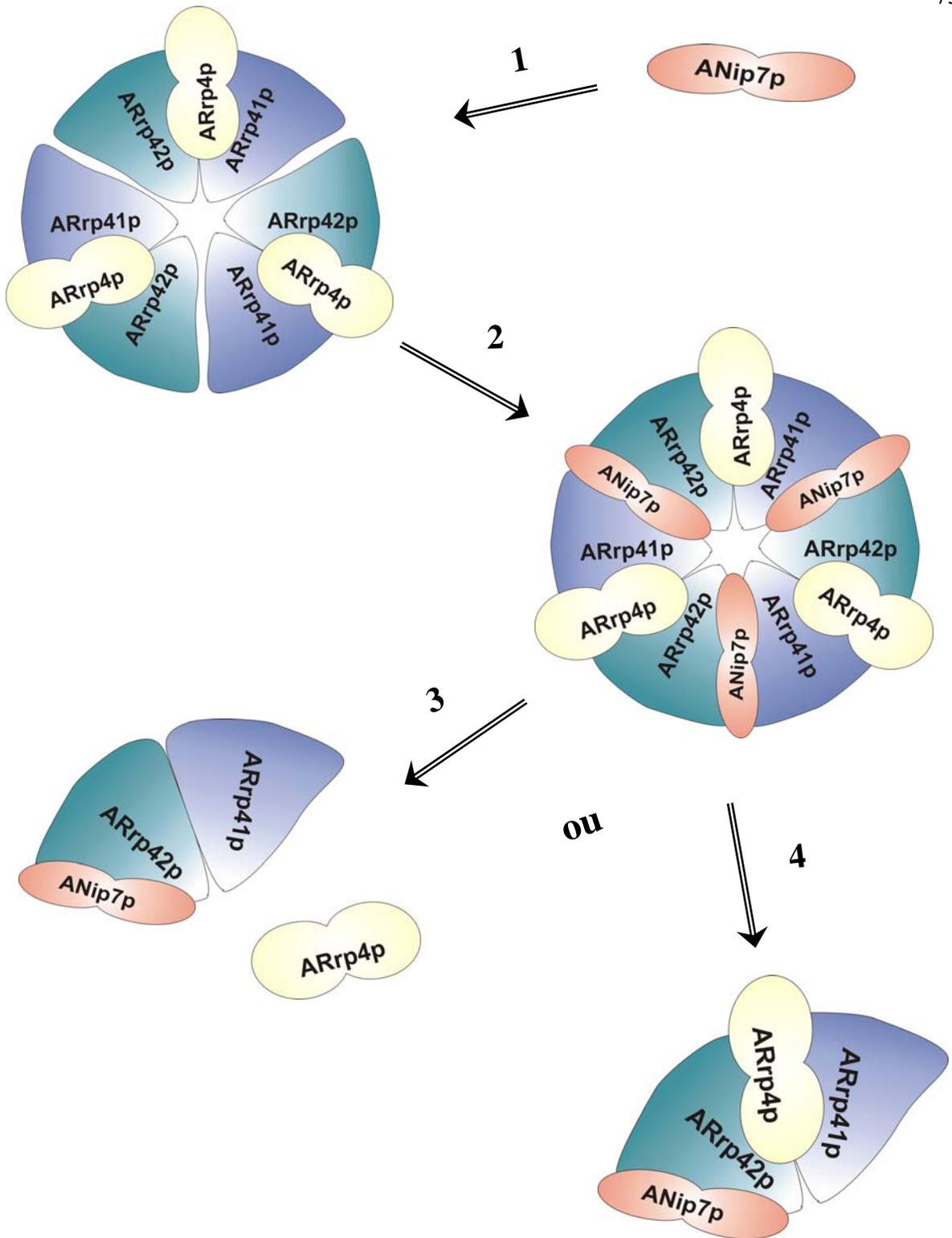
A



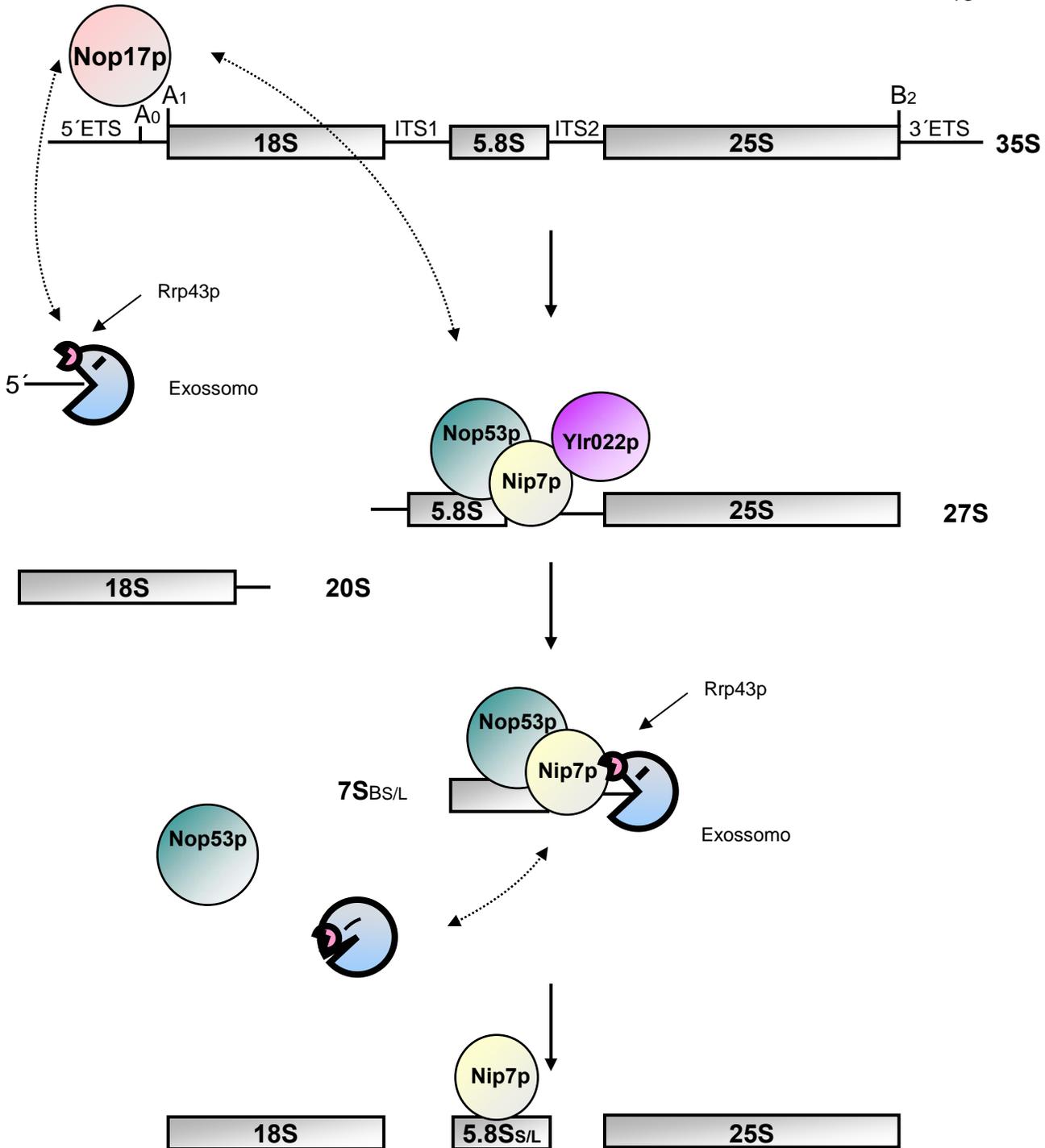
B



**Figura 23.** Modelo estrutural para Ylr022p e comparação da estrutura secundária de Ylr022p e Pab418p. **A.** A modelagem de Ylr022p foi obtida através da estrutura do ortólogo SBDS em *Archaeoglobus Fulgidus* (1P9Q) no programa Swiss-PDB Viewer v3.7b2 (<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html>), e submetida ao SWISS-MODEL Protein Modelling Server (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Guex e Peitsch, 1997). A estrutura foi visualizada através do programa NOC. A região assinalada corresponde ao domínio C-terminal. **B.** Comparação dos dados de dicroísmo circular para Ylr022p e Pab418p.



**Figura 25.** Modelo da associação de aNip7p com o a-exossomo e as possíveis alternativas de dissociação do complexo. Possivelmente aNip7p se associa com aRrp42p, desestabilizando o a-exossomo. Duas hipóteses ainda precisam ser testadas, na primeira aRrp4p é liberada depois da associação de aNip7p e na segunda a associação de aNip7p afeta a associação dos heterodímeros, e aRrp4p permanece no complexo.



**Figura 24.** Modelo de interação das proteínas Nop17p, Nop53p, Nip7p e Rrp43p com os pré-rRNA. Nop17p está envolvida nas etapas iniciais do processamento. Nop53p e Nip7p fazem parte do pré-rRNA 60S, assim como Ylr022p. O exossomo é responsável pela de gradação do 5'ETS e maturação do 3' do rRNA 5.8S.