

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Tese de doutorado**

*Análise estrutural e funcional de cofatores do  
exossomo em Saccharomyces cerevisiae e Pyrococcus*

**Juliana Silva da Luz**

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

São Paulo, 04 julho de 2006.

Às mulheres que mostraram o caminho para eu chegar até aqui:

*minha mãe, Dair,  
amor, carinho e confiança;  
minha mãezinha,  
Carmen, amizade e incentivo;  
minha orientadora,  
Carla, orientação constante.*

## *Agradecimentos*

A Deus;

A minha mãe, pelo amor, confiança, incentivo e por sempre me fazer acreditar que no final as coisas dão certo;

A minha família, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão;

Aos meus amigos novos, velhos, de perto ou de longe: Giselda, Marcos, Valdênia, Marcinha, Dilceli, Lígia, Eliane, Carlinhos, Wellington e Jaqueline pelo apoio constante, paciência, companheirismo e incentivo;

As meninas com quem dividi casa nestes anos, pela companhia e amizade;

A Carla, pela orientação, paciência, discussões e incentivo;

Aos colegas de laboratório, Fernando, Celso, Roberto, Daniela, Mauricio e Márcia, pela amizade, discussões, compreensão e aprendizado;

A Cris, Celinha e Alessandra por facilitarem nossa vida no laboratório, em especial a Celinha por sua ajuda na produção dos anti-soros;

Aos colegas de pós e colaboradores que auxiliaram de uma forma ou outra no desenvolvimento desse trabalho;

Aos funcionários das secretarias de pós e do Departamento de Bioquímica pela ajuda na parte burocrática;

A FAPESP, pelo suporte financeiro.

## ÍNDICE

Abreviaturas	iii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
1. MATERIAIS	15
2. MÉTODOS	18
2.1 Amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR)	18
2.2 Clonagens	18
2.3 Transformação de células	19
2.3.1 Bactérias competentes	19
2.3.2 Transformação de Bactéria	20
2.3.3 Transformação de levedura	20
2.4 Preparação de plasmídeos	21
2.4.1 A partir de <i>E. coli</i>	21
2.4.2 A partir de levedura	21
2.5 Análise de restrição	22
2.6 Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose	22
2.7 Expressão e purificação de proteínas com His-tag	22
2.8 Quantificação de proteínas	22
2.9 Proteólise limitada	23
2.10 Dicroísmo circular	23
2.11 Cristalização	23
2.12 Obtenção de anti-soro policlonal	23
2.13 Western blot	24
2.14 Duplo híbrido	24
2.15 Co-precipitação de proteínas e RNA	25

2.16	Extração de RNA	26
2.17	Ligação <i>in vitro</i> proteína-RNA	26
2.18	Ensaio de atividade de RNase <i>in vitro</i>	26
2.19	Reação de polimerização	27
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	28
1.	ESTUDO DA ESTRUTURA DE NOP17p	28
2.	EXOSSOMO DE <i>S. cerevisiae</i>	34
2.1	Purificação das proteínas componentes do anel do exossomo de <i>S. cerevisiae</i>	35
2.2	Análise da atividade das proteínas do exossomo de <i>S. cerevisiae</i>	37
3.	EXOSSOMO DE <i>Pyrococcus</i>	41
3.1	Purificação de Pab418p	41
3.2	Purificação de Pab1135p	44
3.3	Purificação de a-exossomo, aCsl4p e aNip7p	46
3.4	Análise da atividade dos possíveis cofatores Pab418p, Pab1135p, aCsl4p e aNip7p junto ao a-exossomo	46
4.	ESTUDO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE YLR022p	56
4.1	Purificação de Ylr022p	58
4.2	Ensaio funcionais para Ylr022p	60
4.2.1	Duplo híbrido	60
4.2.2	Co-imunoprecipitação de RNA e proteínas	63
4.2.3	Ligação de Ylr022p a RNA <i>in vitro</i>	65
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	68
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	76
<b>VI.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	77
<b>ANEXOS</b>		84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema simplificado da maturação e exportação das subunidades ribossomais 40S e 60S.	3
<b>Figura 2.</b> Processamento do pré-rRNA em <i>S. cerevisiae</i> .	4
<b>Figura 3.</b> 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.	10
<b>Figura 4.</b> Purificação e dados estruturais de His-Nop17p.	30
<b>Figura 5.</b> Proteólise limitada de His-Nop17p.	32
<b>Figura 6.</b> Clonagem e purificação das porções amino e carboxi-terminal de Nop17p.	33
<b>Figura 7.</b> Co-purificação das proteínas do anel do exossomo de levedura.	36
<b>Figura 8.</b> Atividade das proteínas componentes do anel do exossomo de <i>S. cerevisiae</i> .	38
<b>Figura 9.</b> Atividades de His-Rrp42 e His-Rrp42+GST-MTR3 do exossomo de levedura.	40
<b>Figura 10.</b> Purificação e dados estruturais de Pab418p.	43
<b>Figura 11.</b> Purificação de Pab1135p.	45
<b>Figura 12.</b> Análise da atividade de Rnase das proteínas Pab418p, Pab1135p e aNip7p quando associadas ao a-exossomo.	47
<b>Figura 13.</b> Análise da ligação a RNA para as proteínas Pab418p, Pab1135p e aNip7p isoladamente ou associadas ao aRrp4-exossomo.	49
<b>Figura 14.</b> Análise da ligação a RNA das proteínas isoladamente ou associadas ao aCsl4-exossomo.	50
<b>Figura 15.</b> Análise da atividade de fosforilação do aRrp4-Exossomo e aCsl4-Exossomo associados as proteínas Pab418p, Pab1135p e aNip7p.	52
<b>Figura 16.</b> Perfil de eluição das proteínas em Superose 6HR 10/30 e identificação por SDS-PAGE.	54
<b>Figura 17.</b> Perfil de eluição das proteínas em Superose 6HR 10/30 e SDS-PAGE.	55
<b>Figura 18.</b> Perfil de eluição das proteínas em Superose 6HR 10/30 e SDS-PAGE.	56
<b>Figura 19.</b> Purificação e dados estruturais de His-Ylr022p.	59
<b>Figura 20.</b> Duplo híbrido para Ylr022p.	61
<b>Figura 21.</b> Análise da co-imuprecipitação de RNAs e proteínas com Prot-A-022.	64

<b>Figura 22.</b> Interação de His-Ylr022p a RNA <i>in vitro</i> .	66
<b>Figura 23.</b> Modelo estrutural para Ylr022p.	67
<b>Figura 24.</b> Modelo da associação de aNip7p com o a-exossomo e dissociação do complexo.	73
<b>Figura 25.</b> Modelo de interação das proteínas Nop17p, Nop53p, Nip7p e Rrp43p com os pré-rRNA.	75

#### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Proteínas que compõem o exossomo em diferentes organismos.	8
<b>Tabela 2.</b> Cepas utilizadas neste estudo.	15
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos.	16
<b>Tabela 4.</b> Plasmídeos.	16
<b>Tabela 5.</b> Clones positivos no duplo híbrido com Ylr022p.	61

## RESUMO

A síntese ribossomal é uma das maiores atividades em células eucarióticas. Este processo inicia-se no nucléolo e é finalizado após a exportação das subunidades 40S e 60S para o citoplasma. Três dos RNAs ribossomais de eucariotos (18S, 5.8S e 25S) são sintetizados como um transcrito primário de 35S, o qual é processado através de uma complexa e ordenada série de modificações nucleotídicas e clivagens endo e exonucleolíticas. Estas reações dependem de aproximadamente 170 proteínas, 80 *small nucleolar RNAs* e de seqüências no pré-rRNA. Os fatores trans-atuantes envolvidos no processamento podem ser agrupados como RNA-helicases, endonucleases, snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein complexes*) e exonucleases, que incluem o complexo exossomo. O exossomo de levedura é formado por 10 proteínas essenciais que atuam na maturação de rRNAs, snRNAs, snoRNAs, além da degradação de mRNAs incorretamente processados. A estrutura do exossomo de archaea foi descrita recentemente, mas ainda não existem muitas informações sobre a regulação deste complexo e sobre a participação de cofatores que interagem de forma transiente com o exossomo.

Diante disso, este trabalho visou a caracterização funcional das proteínas que formam o anel de RNases PH em *Saccharomyces cerevisiae*, assim como a caracterização estrutural e funcional de possíveis cofatores do exossomo de *Saccharomyces cerevisiae*, Nop17p e Ylr022p, e do exossomo de *Pyrococcus*, Pab418p, Pab1135p e aNip7p. Os dados obtidos evidenciam que a atividade exonucleolítica do exossomo de levedura, assim como o de archaea, é dependente da formação de heterodímeros; Ylr022p, uma proteína de levedura com função não caracterizada, liga inespecificamente RNA *in vitro*, mas mais eficientemente alguns RNAs *in vivo*. Dentre as proteínas de archaea, Pab418p e aNip7p também ligam RNA, e como demonstrado aqui, aNip7p influencia significativamente a atividade do exossomo de archaea.



## ABSTRACT

The synthesis of ribosomes is one of the major metabolic pathways in eukaryotic cells. This process starts in the nucleolus and ends with the export and final maturation of the ribosomal subunits 40S and 60S in the cytoplasm. Three eukaryotic ribosomal RNAs (18S, 5.8S and 25S) are synthesized as a 35S primary transcript (35S pre-rRNA), which is then processed by a complex and ordered series of nucleotide modifications and endo- and exonucleolytic cleavage reactions. These processing reactions depend on 170 proteins, 80 small nucleolar RNAs and specific pre-rRNA sequences. The trans-acting factors, that take part in the processing can be grouped as RNA-helicases, endonucleases, snoRNPs (small nucleolar ribonucleoprotein complexes) and exonucleases, including the exosome. The yeast exosome is composed of 10 essential proteins that function in the processing of rRNAs, snRNAs, snoRNAs and in the degradation of aberrant mRNAs. Recently, the archaeal exosome structure was determined, but no information is yet available on the regulation of the exosome function or on the possible role of the cofactors that transiently interact with it.

The main goals of this work were the functional characterization of the protein components of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome RNase PH ring, as well as the structural and functional characterization of the possible cofactors of that complex, Nop17p and Ylr022p. Since the recent characterization of the *Pyrococcus* exosome, the study of the archaeal exosome cofactors, Pab418p, Pab1135p and aNip7p, was also included in this work, in order to correlate the data on the complex of these different organisms. Our results show that the exonucleolytic activity of the yeast exosome is dependent on the heterodimers formation, as described for archaea. Although it is not clear how Nip7p affects the exosome function in yeast, aNip7p binds RNA and inhibits a-exosome activity *in vitro*. Yeast Ylr022p binds RNA inespecifically *in vitro*, but coprecipitates specific RNAs more efficiently from total cell extracts. Its archaeal orthologue, Pab418p, also binds RNA, but does not affect significantly a-exosome function.

## INTRODUÇÃO

A interpretação dos dados obtidos com o seqüenciamento do genoma de diferentes organismos requer hoje um dos maiores esforços por parte dos pesquisadores. Diversas técnicas estão sendo empregadas simultaneamente com o objetivo de caracterizar o papel funcional e estrutural das proteínas codificadas por estes genes. Contudo, uma parcela significativa destes ainda é classificada como genes codificadores de proteínas de funções desconhecidas.

*Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos que vem sendo extensivamente estudado através das tecnologias proteômicas. Suas aproximadamente 6000 ORFs tiveram sua expressão analisada sob diversas condições (DeRisi *et al.*, 1997; Horak e Snyder, 2002); a deleção de cada ORF teve seu fenótipo caracterizado (Giaever *et al.*, 2002); as interações entre proteínas foram detectadas por análise bioquímicas, espectroscopia de massas e duplo híbrido (Ito *et al.*, 2001); e muitas das proteínas também foram localizadas por imunofluorescência indireta ou pela fusão com GFP (Huh *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2002). Soma-se a estes dados, os esforços em descrever a função e a estrutura das proteínas, ainda não caracterizadas, mas possivelmente envolvidas nos processos essenciais para a viabilidade celular (Hazbun *et al.*, 2003), o que tem resultado na caracterização de novos fatores relacionados ao metabolismo de RNA. As últimas avaliações indicam que cerca de 170 polipeptídeos estejam envolvidos em processamento de rRNA ou na formação do ribossomo (Fatica e Tollervy, 2002; Peng *et al.*, 2003).

A síntese ribossomal é uma das maiores atividades em células eucarióticas e é em *Saccharomyces cerevisiae* que o processo é mais bem conhecido, mesmo que ainda existam muitas respostas a serem obtidas. Os primeiros estudos com o objetivo de identificar as partículas ribossomais foram desenvolvidos por Warner e Planta em meados de 1970 (Udem e Warner, 1972; Trapman *et al.*, 1975). Eles identificaram por microscopia eletrônica aglomerados ligados aos pré-rRNAs 35S que estavam sendo transcritos pela RNA polimerase I a partir do rDNA. Esses aglomerados foram denominados de botões terminais e a caracterização desses revelou a presença do pré-rRNA 35S e de muitas proteínas ribossomais (Udem e Warner, 1972; Trapman *et al.*, 1975). Quando submetido a gradiente de glicerol, esse complexo sedimenta como 90S, e é em seguida processado para formar as partículas menores 66S e 43S, precursores das subunidades ribossomais maduras 60S e 40S (Udem e Warner, 1972; Trapman *et al.*, 1975). Contudo, apenas

recentemente foram descritos os fatores não ribossomais que estão associados às partículas 90S, 60S e 40S, esclarecendo alguns dos passos desta coordenada rede de processamento e maturação dos ribossomos (Nissan *et al.*, 2002; Hazbun *et al.*, 2003; Schäfer, *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2004).

Uma descoberta marcante foi a descrição do SSU (*Small subunit*) processomo (Dragon *et al.*, 2002). Um complexo > 2MDa, que é constituído pelo snoRNA U3 (*small nucleolar RNA*), pelas proteínas do “core” do U3 snoRNP e por 17 proteínas de função desconhecida que foram designadas Utp1-17 (*U three proteins*). O U3 snoRNP liga ao pré-rRNA e é necessário para as clivagens iniciais do pré-rRNA 35S e maturação da subunidade ribossomal 40S (Venema e Tollervey, 1999). Investigações por microscopia eletrônica da cromatina em mutantes do U3 snoRNA ou de proteínas específicas deste snoRNP, revelaram que a ausência de qualquer um destes fatores leva ao desaparecimento dos botões terminais, indicando que os complexo inicialmente identificado por Warner e Planta são constituídos pelo U3 snoRNP ligado ao pré-rRNA 35S que está sendo transcrito e por muitas das proteínas ribossomais do 40S (Dragon *et al.*, 2002).

Outra importante descoberta foi a relativa ausência de fatores relacionados à maturação do 60S na partícula 90S, sugerindo que os fatores relacionados à maturação da subunidade maior do ribossomo são associados mais tarde, possivelmente após a clivagem em A<sub>2</sub> (Fática e Tollervey, 2002). Além disso, a maturação do 60S envolve um sistema mais complexo de associação com fatores não ribossomais que o 40S e por isso foi dividido em três etapas, inicial, intermediária e tardia, em função da mudança dos fatores relacionados (Fática *et al.*, 2002) (Figura 1).

O processo de síntese das subunidades ribossomais inicia-se no nucléolo e é finalizado após a exportação das subunidades 40S e 60S para o citoplasma (Chen *et al.*, 2003). A organização básica do rRNA nuclear de eucariotos é similar em todas as espécies. Três dos RNAs ribossomais de levedura (18S, 5.8S e 25S) são sintetizados pela RNA polimerase I como um transcrito primário de 35S, que consiste da seqüência dos três rRNAs flanqueados por dois espaçadores externos (5'ETS e 3' ETS) e dois espaçadores internos (ITS1 e ITS2). Nas extremidades desta seqüência estão dois espaçadores não transcritos seguidos do gene do rRNA 5S, que é transcrito pela RNA polimerase III (Figura 2A). A seqüência do rDNA compreende 9.1kb e se repete de 100 a 200 vezes no cromossomo XII. A presença do gene do rRNA 5S, entre os do 35S, é uma característica do rDNA de *Saccharomyces cerevisiae* (Venema e Tollervey, 1995). A maturação destes rRNAs





se dá através de uma complexa e ordenada série de modificações nucleotídicas (2'-*O*-metilação e pseudouridilação) e clivagens endo e exonucleolíticas (Figura 2B).

As modificações ocorrem co-transcricionalmente no rRNA e possivelmente estão associadas à estabilidade e a alterações conformacionais do rRNA, já que estão concentradas nas regiões maduras dos rRNAs (Kiss, 2001), em especial na região de transferência de peptídeo (Fromont-Racine *et al.*, 2003). A isomerização de uridinas para pseudouridinas ( $\Psi$ ) e a 2'-*O*-metilação da ribose, constituem as modificações prevalentes. Aproximadamente 100 modificações já foram identificadas no pré-rRNA 35S em levedura, 55 metilações (Lowe e Eddy, 1999) e 44 pseudouridilações (Ganot *et al.*, 1997), enquanto *E. coli* possui apenas 4 metilações e 10 pseudouridinas (Rozenski *et al.*, 1999), as quais, ao contrário do que acontece em eucariotos, não envolvem RNAs como cofatores, as modificações são catalizadas por proteínas sítio específicas (Bachelierie *et al.*, 2002). Já em archaea o número de modificações é semelhante àquele de eucariotos e diversos sRNAs (*small RNAs*) envolvidos no processo de modificação foram identificados (Gaspin *et al.*, 2000). É importante lembrar que além dos rRNAs, snRNAs e tRNAs também são alvo de modificações.

Em eucariotos estas modificações são desempenhadas por duas grandes famílias de snoRNAs. Os snoRNAs envolvidos em pseudouridilação são conhecidos como snoRNAs de box H/ACA, pois possuem uma estrutura consenso com dois motivos conservados, os “boxes” H (ANANNA) e ACA. Cada snoRNA apresenta também uma seqüência complementar a seqüência alvo e se liga a quatro proteínas que constituem o “core” destes complexos, Cbf5p, a pseudouridilase, Gar1p, Nhp2p e Nop10p (Watkins *et al.*, 1998). Já os snoRNAs relacionados à metilação, são conhecidos como snoRNAs de box C/D, nos quais as seqüências consenso do box C (5'PuUGAUGA 3') e box D (5'CUGA 3') são parcialmente conservadas nos boxes C' e D'. As proteínas que estão presentes em todos os snoRNPs de box C/D são Nop1p, a metil transferase, Nop58p, Nop56p e Snu13p (Tollervey e Kiss, 1997; Wang *et al.*, 2000). Alguns dos snoRNPs envolvidos em modificações também estão diretamente relacionados às clivagens iniciais que ocorrem no pré-rRNA 35S, tais como U3, U14, snR10 e snR30 (Venema e Tollervey, 1995).

Uma terceira classe de snoRNPs é definida pelo seu único membro conhecido, o RNA componente da endonuclease RNase MRP, responsável pela clivagem no sítio A<sub>3</sub> do pré-rRNA 35S (Kressler *et al.*, 1999).

Concomitante às modificações, uma série de clivagens endo e exonucleolíticas ocorrem sequencialmente no pré-rRNA 35S, e estes processos são auxiliados por RNA-helicases, chaperonas, GTPases e AAA-ATPases (Kressler *et al.*, 1999).

O primeiro transcrito gerado pela RNA polimerase I se estende por +210 nucleotídeos no 3' do 25S enquanto o pré-rRNA 35S possui uma extensão de apenas +7 a +10 nucleotídeos. O pré-35S-rRNA é gerado então, por uma clivagem endonucleolítica entre os nucleotídeos +15 e +45, seguida de processamento até aproximadamente o nucleotídeo +7. Rnt1p é a endonuclease responsável pela clivagem e Rex1p também parece estar envolvida nesta etapa (Kressler *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 1983; van Hoof *et al.*, 2000A).

Os passos seguintes de clivagens em A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, estão estreitamente relacionados e parecem ocorrer quase simultaneamente. Todas envolvem a participação do U3 snoRNP (Venema e Tollervey, 1995). A ausência do U3 inibe a clivagem em A<sub>0</sub> e retarda a clivagem em A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, as quais também necessitam a participação dos snoRNPs U14, snR10 e snR30. Diversas proteínas também estão relacionadas a estas etapas do processamento, Rok1p, Rrp5p, Dim1p e Nop17p (Venema *et al.*, 1997; Venema e Tollervey, 1995; Lafontaine *et al.*, 1994; Gonzales *et al.*, 2005). A clivagem em A<sub>2</sub> separa os dois pré-rRNAs intermediários 20S e 27SA<sub>2</sub>. O 20S rRNA é dimetilado por Dim1p e exportado para o citoplasma onde será clivado no sítio D, originando o 18S rRNA maduro que faz parte da subunidade menor do ribossomo, 40S (Lafontaine *et al.*, 1994). Duas proteínas estão provavelmente envolvidas na clivagem no sítio D, Nob1p e Fap7p (Fatica *et al.*, 2003; Granneman *et al.*, 2005), embora ainda não existam informações suficientes para comprovar a atividade endonucleolítica de nenhuma dessas proteínas. A maturação do rRNA 27SA<sub>2</sub> pode seguir por duas vias, gerando 27SB<sub>1L</sub> e 27SB<sub>1S</sub>, sendo que 85% das moléculas seguem uma via preferencial, onde o rRNA 27SA<sub>2</sub> é clivado endonucleoliticamente pela RNase MRP no sítio A3 (Lygerou *et al.*, 1996) e é rapidamente processado por Rat1p até o sítio B<sub>1S</sub>. 15% do rRNA 27SA<sub>2</sub> é clivado diretamente no sítio B<sub>1L</sub>. Ao mesmo tempo, a extremidade 3' do pré-rRNA 25S é clivada em B<sub>2</sub>, esta etapa envolve a ação de Rex1p (Piper *et al.*, 1983; van Hoof *et al.*, 2000A). Após esta etapa os dois pré-rRNAs, 27SB<sub>1L</sub> e 27SB<sub>1S</sub>, seguem vias idênticas. Inicialmente, ocorre a clivagem em C<sub>1</sub>, que libera o rRNA 25S maduro e o pré-rRNA 7S que será processado para originar o rRNA 5.8S. Imediatamente após a clivagem em C<sub>1</sub> ocorre a clivagem em C<sub>2</sub>, o que resulta em uma extensão de aproximadamente 134 nucleotídeos no 3' do rRNA 5.8S. A remoção destes nucleotídeos envolve a participação de um complexo de 11 exonucleases 3'→5', o exossomo.

Todas as subunidades são necessárias para este processo, mas a contribuição de cada uma é diferente durante a reação e ainda tem o auxílio da RNA helicase Mtr4p (Allmang *et al.*, 1999). O exossomo deixa ainda aproximadamente seis nucleotídeos na extremidade 3' do rRNA 5.8S, que são removidos possivelmente pela ação de Rex1p (van Hoof, *et al.*, 2000A). Ainda não se conhecem as enzimas responsáveis pelas clivagens nos sítios C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>. Várias proteínas também foram relacionadas à maturação dos rRNA 25S e 5.8S, dentre elas: Nip7p, Nop2p, Sbp1p e Nop53p (Zanchin *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1990; Granato *et al.*, 2005), mas nenhuma dessas deve apresentar atividade de endonuclease.

A maturação do 5S rRNA parece necessitar apenas de uma clivagem endonucleolítica no 3' e o único fator identificado até o momento é Rex1p (Piper *et al.*, 1983; van Hoof, *et al.*, 2000A).

Com o final da maturação dos rRNAs 5.8S, 25S e 5S, a subunidade maior 60S é exportada para o citoplasma, para formar o ribossomo, juntamente com a subunidade 40S. Os ribossomos irão traduzir os mRNAs, e alguns desses serão degradados pelo exossomo citoplasmático, após a remoção do cap e da cauda de poli-A (van Hoof *et al.*, 2000B). Enquanto em levedura a principal via de degradação dos mRNAs é a do sentido 5'→3', em células de mamíferos a maioria dos mRNAs são degradados no sentido 3'→5' pelo exossomo (Mukherjee *et al.*, 2002; Wang e Kiledjian, 2001).

O exossomo é extremamente conservado entre as espécies. Ele foi inicialmente caracterizado em levedura (Mitchel *et al.*, 1997), mas homólogos já foram descritos em humanos, plantas, moscas, parasitas unicelulares e arqueobactérias hipertermófilas (Tabela 1) (Allmang *et al.*, 1999; Chekanova *et al.*, 2002; Andrullis *et al.*, 2002; Estevez *et al.*, 2001; Evguenieva *et al.*, 2003). Há uma grande variação no número de subunidades do complexo em cada organismo, assim como parece haver interações proteína-específicas para cada um, mas em todos, o complexo está relacionado à degradação de RNAs (Raijmakers *et al.*, 2004).

Em 1977 Wolfe e colaboradores descreveram que o soro de pacientes que sofriam de polimiosite apresentaram auto-anticorpos que precipitaram um antígeno PM-1. Mais tarde demonstrou-se que soro de pacientes que apresentavam polimiosite e escleroderma era reativo a este antígeno, e por isso foi denominado antígeno PM/Scl (Treadwell *et al.*, 1984). Este antígeno faz parte de um complexo nuclear de 11 a 16 subunidades, essas proteínas foram clonadas e revelaram constituir os homólogos humanos das proteínas do exossomo de levedura, que foi designado complexo PM/Scl (Reimer *et al.*, 1986; Allmang *et al.*, 1999).



**Tabela 1.** Proteínas que compõem o exossomo em diferentes organismos.

Proteína <i>S. cerevisiae</i>	Fenótipo em <i>S. cerevisiae</i>	Homólogo em <i>E. coli</i>	Homólogo em <i>T. brucei</i>	Homólogo em <i>A. thaliana</i>	Homólogo em <i>H. sapiens</i>	Homólogo em <i>Archeae</i>
Rrp4p	essencial	S1 RNA BD	TbRrp4p	AtRrp4p	hRrp4p	aRrp4p
Rrp40p	essencial	S1 RNA BD	TbRrp40p	AtRrp40p	hRrp40p	
Rrp41p	essencial	RNase PH	TbRrp41Ap	AtRrp41p	hRrp41p	aRrp41p
Rrp42p	essencial	RNase PH	TbEAP1p	AtRrp42p	HRrp42p	aRrp42p
Rrp43p	essencial	RNase PH	TbEAP2p	AtRrp43p	OIP2	aRrp42p
Rrp44p	essencial	RNase R	TbRrp44p		hDis3p	
Rrp45p	essencial	RNase PH	TbRrp45p	AtRrp45p	KIAA0116	aRrp41p
Rrp46p	essencial	RNase PH	TbRrp41B	AtRrp46p	PMScl-75	aRrp41p
Csl4p	essencial	S1 RNA BD	TbCsl4p		hCsl4p	aCsl4p
Mtr3p	essencial	RNase PH	TbEAP4p		HMtr3p	aRrp42p
Rrp6p	ts letal	RNase D	TbRrp6p	AtRrp6p	PMScl-100	

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o exossomo é um complexo de exoribonucleases 3'→5' que participa da degradação do 5'ETS e da maturação do rRNA 5.8S (Mitchell *et al.*, 1997). Também foi demonstrado seu papel no processamento 3' de snRNAs, snoRNAs (Allmang *et al.* 1999) e SRP RNA, em humanos (Raijmakers *et al.*, 2002). Além disso, este complexo, está envolvido na degradação 3'→5' do corpo de mRNAs que sofreram “decapping” e deadenilação, assim como de mRNAs aberrantes e seus precursores (Decker, 1998; Oliveira *et al.*, 2002). Outro mecanismo de degradação de mRNAs que não apresentam codons de terminação, também envolve a participação do exossomo, onde este é necessário para a rápida degradação do corpo do mRNA e da cauda poliA (van Hoof *et al.*, 2002). LaCava *et al.*, 2005 descreveram que a degradação de rRNA e snoRNAs nucleares pelo exossomo necessita da adição de uma pequena cauda poli-A no 3', o que estimula sua atividade. Estes dados revelam que o exossomo é o principal responsável pela degradação nuclear de RNAs aberrantes.

O exossomo de *S. cerevisiae* é constituído por 11 subunidades, formando um complexo de aproximadamente 400 kDa e coeficiente de sedimentação 14S (Mitchell e Tollervey, 2000). Esse complexo está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma (Mitchell *et al.*, 1997), sendo que as duas formas diferem apenas pela presença de uma subunidade, a Rrp6p que aparece no complexo nuclear (Allmang *et al.*, 1999). As demais subunidades (*ribosomal RNA processing* – Rrp) são comuns às duas formas, e seis apresentam homologia de sequência a RNase PH (Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p) (Allmang *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 1997). Rrp44p revelou homologia a RNase R e Rrp6p a RNase D. Rrp40p e Csl4p são parálogos de Rrp4p e as três apresentam domínios S1, de ligação a RNA (Mitchell e Tollervey, 2000). Dentre estas apenas quatro tiveram sua atividade de exorribonuclease 3'→5' comprovada *in vitro* Rrp4p, Rrp6p, Rrp41p e Rrp44p (Mitchell *et al.*, 1997; Burkard e Butler, 2000). Rrp4p tem atividade hidrolítica e distributiva, enquanto Rrp44p e Rrp6p são hidrolíticas e processivas (Mitchell *et al.*, 1997; Burkard e Butler, 2000). As proteínas humanas OIP2 e hRrp4p, também apresentam atividade de exonuclease 3→5' *in vitro* (Burkard e Butler, 2000; Jiang e Altman, 2002).

Recentemente, as estruturas do exossomo de *Sulfolobus solfataricus* (Lorentzen e Conti, 2005) *Archaeoglobus fulgidus* (Büttner *et al.*, 2005) e *Pyrococcus* (Ramos *et al.*, 2006) foram descritas, revelando que o “core” do exossomo tem uma arquitetura molecular similar àquela da polinucleotídeo fosforilase (PNPase) bacteriana, um complexo de exorribonucleases 3'→5', organizado em forma de anel (Figura 3). Esta família de RNases degrada RNA pela adição de fosfato inorgânico entre a ligação fosfodiéster 5'-3' do último e penúltimo nucleotídeos, liberando nucleotídeos difosfato (Symmons *et al.*, 2002).

O exossomo de archaea é formado por duas subunidades com domínios de RNases PH, aRrp41p e aRrp42p, que formam um trímero de heterodímeros, estruturado em forma de anel, o anel de RNases PH. Em eucariotos, este anel é formado por seis diferentes subunidades com domínios de RNase PH. Três das proteínas de levedura, Rrp41p, Mtr3p, e Rrp46p, têm maior similaridade com aRrp41p, enquanto Rrp45p, Rrp42p e Rrp43p, apresentam maior similaridade à aRrp42p. Tanto em archaea quanto em eucariotos o anel de RNases PH está associado a proteínas com domínios de ligação a RNA, aRrp4p ou aCsl4p em archaea e Rrp4p, Rrp40p e Csl4p em levedura. As proteínas de archaea, com domínios de ligação a RNA, formam um trímero que se sobrepõe ao anel de RNases PH e possivelmente direcionam o substrato ao sítio ativo das RNases. Acredita-se que as proteínas de levedura assumam uma conformação semelhante (Figura 3).



Como a PNPase bacteriana, o exossomo de archaea liga RNA, tem atividade de RNase, e na presença de ADP, poliadenila o substrato (Lorentzen *et al.*, 2005; Büttner *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006).

Em *A. fulgidus* o complexo parece co-existir em duas formas. Uma com o anel de RNases PH associado a aRrp4p, e outro associado a aCsl4p, esses complexos diferem quanto à atividade (Büttner *et al.*, 2005). Lorentzen *et al.*, 2005, descreveram que em *S. solfataricus* a atividade de degradação do RNA está restrita à subunidade aRrp41p, mas a catálise só é obtida com a associação de aRrp42p. Além disso, a atividade de RNase é processiva e fosforolítica, resultando na liberação de nucleotídeos difosfato (Lorentzen e Conti, 2005). As análises de estrutura revelaram a presença de um poro no centro do anel, que conduz o substrato ao sítio ativo e que possivelmente também funcione como mecanismo de regulação, pois são necessários ao menos cinco nucleotídeos de forma estendida para alcançar o sítio ativo, indicando que estruturas secundárias no RNA podem restringir o acesso do exossomo, o que já foi demonstrado *in vivo* para o exossomo de levedura (Allmang *et al.*, 1999). Contudo não é descartada a possibilidade de que outras proteínas se associem ao a-exossomo e atuem como fatores regulatórios.

Em levedura os cofatores identificados até então são o complexo Ski, o complexo Lsm e recentemente o TRAMP (Butler, 2002; He e Parker, 2001; LaCava *et al.*, 2005). O nome ‘Ski’ refere-se ao fato de mutações nas proteínas do complexo resultarem em um fenótipo “super killer” (Winder e Wickner, 1993). Três das proteínas (Ski2p, Ski3p, Ski8p) existem no citoplasma como um complexo heterotrimérico de helicases, que interagem com o exossomo através de Ski7p (Symmons *et al.*, 2002; Butler, 2002; van Hoof *et al.*, 2000a). Isso sugere que o complexo Ski recrute mRNAs para o exossomo via Ski7p, ativando o processo de degradação 3’→5’ do mRNA (Butler, 2002). Já o complexo Lsm 2-8p auxilia o exossomo nuclear na degradação 3’→5’ do espaçador 5’ETS e no processamento do 7S (Kufel *et al.*, 2003). Outra proteína que interage com o exossomo nuclear é a RNA helicase ATP - dependente Mtr4p/Dob1p, uma das subunidades do TRAMP e que participa do processamento do pré-mRNA, snRNA, snoRNA e 7S pré-rRNA (Butler, 2002). O TRAMP poliadenila substratos nucleares do exossomo, o que ativa sua atividade exonucleolítica (LaCava *et al.*, 2005). Além destas, Nip7p, Rrp47p e Nop53p também são possíveis fatores regulatórios do exossomo nuclear, pois têm sua atividade ligada ao processamento de rRNA, assim como o exossomo (Zanchin *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2003; Granato *et al.*, 2005).

A diversidade funcional deste complexo, participando do processamento de rRNAs, mRNAs, snRNAs e snoRNAs representa um ponto chave no entendimento de como um grande número de exoribonucleases pode manter-se estavelmente reunidas, reconhecer corretamente os substratos e apresentar função distributiva e processiva em um mesmo sistema sem demonstrar clara subunidade regulatória. Como podemos notar pelo período em que os dados foram obtidos, este complexo ainda é bastante jovem e informações estruturais foram obtidas apenas no último ano, com as proteínas de archaea. Contudo, existem divergências na organização dos complexos de diferentes organismos, o que sugere a ocorrência de alterações evolutivas na constituição do exossomo e talvez até na atividade específica de cada proteína. Por isso, muito ainda resta ser esclarecido sobre seu mecanismo de ação e a participação dos cofatores.

Em nosso laboratório foi identificada através do sistema de duplo híbrido uma nova proteína de *S. cerevisiae*, Nop17p, que interage com a subunidade do exossomo Rrp43p (Oliveira *et al.*, 2002; Gonzales *et al.*, 2005). Outras interações foram identificadas através desse sistema, quando Nop17p foi utilizada como “isca”, dentre elas, a interação com Nop58p (Gonzales *et al.*, 2005). Ensaio funcionais com Nop17p, utilizando a cepa  $\Delta nop17$  (com o gene *NOPI7* deletado) revelaram defeito no processamento do pré-rRNA 35S e redução dos níveis de subunidades ribossômicas. Além disso, a ausência de Nop17p promove a hipermetilação do pré-rRNA, provavelmente devido a um processamento mais lento do pré-rRNA. O significado destas alterações ainda não é muito claro, mas os dados obtidos com Nop17p sugerem que a hipermetilação sinalize defeitos no processamento do pré-rRNA e direcione-o à degradação, possivelmente via exossomo (Gonzales *et al.*, 2005).

Outra interação detectada com Nop17p, foi a da proteína Nop53p (Granato *et al.*, 2005). Descrita inicialmente como um componente do pré-60S (Rout *et al.*, 2000), Nop53p é uma proteína essencial que está localizada exclusivamente no nucléolo e liga-se diretamente ao rRNA 5.8S. A cepa  $\Delta nop53$  apresenta severos defeitos nos eventos finais do processamento do rRNA, levando ao acúmulo do 27S e 7S e conseqüentemente à redução dos rRNAs maduros 25S e 5.8S. Este fenótipo é semelhante àquele de mutantes do exossomo (Zanchin e Goldfarb, 1999a; Allmang *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002; Granato *et al.*, 2005).

Dados recentes revelaram que as proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas no processamento de rRNA estão na sua grande maioria sob a forma de complexos proteicos (Grandi, *et al.*, 2002; Peng, *et al.*, 2003; Schäfer, *et al.*, 2003; Krogan, *et al.*, 2004), os quais parecem ser

formados na fase inicial do processamento e muitos permanecem associados aos rRNAs até a exportação das subunidades ribossômicas para o citoplasma. Esta associação entre as proteínas pode ser o fator limitante para sua estabilidade, o que explicaria as dificuldades em obter dados estruturais para as proteínas isoladamente, por isso grandes avanços estão sendo obtidos pela utilização de ortólogos destas proteínas em organismos termófilos.

Dentro do operon do exossomo da archaea *Pyrococcus abyssi* está presente o gene *PAB418*, o que indica possível relação funcional entre este gene e o exossomo, embora outros genes, presentes em distintas regiões do genoma, tenham sido anotados como componentes do exossomo (FuKui *et al.*, 2005). *PAB418* representa uma família altamente conservada de proteínas, pois homólogos existem desde archaea a vertebrados e plantas. O gene humano, SBDS, está envolvido com a síndrome autossômica recessiva Shwachman-Diamond, que se manifesta na infância e apresenta características clínicas de disfunções hematológicas, insuficiência pancreática e em casos mais graves, mielodisplasia e leucemia aguda (Ginzberg *et al.*, 2000). Recentemente, Shammass *et al.* (2005) e Savchenko *et al.* (2005) descreveram a estrutura do ortólogo de SBDS em *Archaeoglobus Fulgidus* e a conservação estrutural do domínio FYSH (*Fungal*, *YHR087Wp*, *Shwachaman*) em YHR087Wp de *Saccharomyces cerevisiae*. YHR087Wp é uma proteína de levedura que apresenta pequena similaridade a YLR022C no domínio FYSH (Savchenko *et al.* 2005). A estrutura de AfSBDS apresenta uma arquitetura de três domínios: um novo domínio N-terminal com  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , que foi denominado domínio FYSH, um domínio central com 3  $\alpha$ -hélices, possivelmente envolvido na interação entre proteínas e um domínio C-terminal semelhante ao domínio de ferredoxina, que pode estar envolvido em ligação a RNA (Shammass *et al.*, 2005).

YLR022C é o ortólogo de *PAB418* em levedura e é um gene essencial, cuja proteína está no núcleo e citoplasma de *Saccharomyces cerevisiae* (Hazbun *et al.*, 2003). Experimentos de “microarray” relacionam Ylr022p ao metabolismo de rRNA (Boocock *et al.* 2002), e em especial no processo de degradação do espaçador 5’ETS e no processamento do rRNA 5.8S (Peng *et al.*, 2003). Savchenko e colaboradores (2005) citam sua interação com proteínas ribossomais e diferentes fatores relacionados ao processamento de rRNAs. A correlação de Ylr022p ao processamento do rRNA 5.8S, etapa do metabolismo do rRNA na qual o exossomo participa diretamente, reforça a possibilidade de correlação funcional desta proteína com o exossomo.

Com estas informações buscamos resumir sucintamente os dados disponíveis na literatura para o entendimento do metabolismo de RNA e a importância que o estudo do exossomo assumiu nos últimos anos, devido à sua participação nas diferentes etapas de maturação e controle de qualidade dos RNAs. Esta rápida e dinâmica aquisição de informações foi favorecida pelo desenvolvimento de novas tecnologias, que propiciaram grandes avanços no esclarecimento de muitas questões antigas, ao mesmo tempo, que induzem a novas interrogações, algumas das quais nós buscamos entender neste trabalho.

## OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho são:

- Caracterizar estrutural e funcionalmente os possíveis cofatores do exossomo, Nop17p e Ylr022p em levedura; Pab418p, Pab1135p e aNip7p em *P. abyssi*;
- Caracterizar a atividade das proteínas do anel de RNases PH do exossomo de levedura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Materiais

Os meios de cultura e soluções foram preparados, seguindo protocolos de Sambrook e Russell (2001) e Sherman *et al.* (1986).

As cepas de bactéria e levedura, oligonucleotídeos e plasmídeos utilizados estão descritos nas tabelas 2, 3, 4, respectivamente.

**Tabela 2.** Cepas utilizadas neste estudo.

CEPAS	GENÓTIPO	FONTE
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>SupE44 <math>\Delta</math>lacU169(<math>\phi</math> 80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi 1 relA1</i>	Hanahan, 1983.
BI21-Codon Plus (DE3) RIL	<i>E. coli B F- ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) dcm+ Tet<sup>r</sup> gal 1 (DE3) end A Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]*</i>	Stratagene
<i>S. cerevisiae</i>		
L40	MATa; <i>his3d200; trip1-901; leu2-3,311; ade2; lys2-801 am URA3:: (lexAop)<sub>8</sub>-LACZ</i>	Bartel <i>et al.</i> , 1993.
W303	MAT-a, <i>trp1-1, leu2-3, 112 his3-11, 15 ade2-1 ura3-1 can-100</i>	
WBRS003(HE)	W303; MATa/alpha; <i>his3-11/his3-11; leu2-3_112/leu2-3_112;ura3-1/ura3-1;ade2-1/ade2-1;can1-100/can1-100;&amp;YLR022c::kanMX4/YLR022c</i>	Euroscarf



**Tabela 3.** Oligonucleotídeos.

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQÜÊNCIA
5'Nop17 Bam/Nde	5'CCGGATCCCATATGGCCGATTTCTTATTG 3'
3'Nop17	5'GAATACTCGAGATGTTAG3'
Nop17 Bamint5d2	5'GGATCCCCCAAGATGAAGAAG3'
Nop17 RevStopXho	5'CTCGAGTTATGCAATGCGATCTCT3'
5'ecoLR022	5'GGTAGAATTCGCAATGCC 3'
3' xhoLR022	5'GTGTCTCGAGGATATGTATG 3'
PAB418Bam5'	5'AGGATCCCATATGCCTATTAGCGTTG3'
PAB418Xho3'	5'CGGCCTCGAGTCATAGCCCCCTT3'
PAB1135Bam5'	5'GTTAGGGGGGATCCATGGCAG3'
PAB1135Xho3'	5'CGGCCTCGAGTCAATCCTCCC3'

**Tabela 4.** Plasmídeos.

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	FONTE
pGEX-4T	Amp <sup>R</sup>	GE Healthcare
pET-28a	Kan <sup>R</sup>	Novagen
pET-29a	Kan <sup>R</sup>	Novagen
pET-28- NOP17	His::NOP17, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET-28-N-NO17	His::N-NOP17, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET-28-C-NOP17	His::C-NOP17, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET-28- YLR022	His::YLR022, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET-28- PAB418	His::PAB418, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET-28- PAB1135	His::PAB1135, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET29-RRP42	His::RRP42, Kan <sup>R</sup>	Tavares, 2004.
pET28-RRP43	His::RRP43, Kan <sup>R</sup>	Este estudo
pET29-RRP45	His::RRP45, Kan <sup>R</sup>	Tavares, 2004.
pET29-aRRP41	aRRP41, Kan <sup>R</sup>	Ramos <i>et al.</i> , 2005.

pET29-aRRP4	aRRP4, Kan <sup>R</sup>	Ramos <i>et al.</i> , 2005.
pAE-aRRP42	His::RRP45, Amp <sup>R</sup>	Ramos <i>et al.</i> , 2005.
pGEX-RRP41	GST::RRP41, Amp <sup>R</sup>	Oliveira, dados não publicados.
pGEX-RRP46	GST::RRP46, Amp <sup>R</sup>	Oliveira, dados não publicados.
pGEX-MTR3	GST::MTR3, Amp <sup>R</sup>	Tavares, 2004.
pGEM-T-5'ETS	Amp <sup>R</sup>	Oliveira, dados não publicados.
pBTM-116	BdlexA, TRP1 2 $\mu$	Bartel <i>et al.</i> , 1993.
pBTM-YLR022	BdlexA:: YLR022, TRP1 2 $\mu$	Este estudo
pBTM-NIP7	BdlexA:: NIP7, TRP1 2 $\mu$	Zanchin e Goldfarb, 1999.
pACT-cDNA	ADGAL4:: biblioteca de cDNA LEU 2 $\mu$	ATCC, 87002
pACT-NOP8	ADGAL4:: NOP8 LEU 2 $\mu$ m	Zanchin e Goldfarb, 1999.
pGADC <sub>2</sub> -RRP4	ADGAL4:: RRP4 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - RRP40	ADGAL4:: RRP40 LEU 2 $\mu$ m	Tavares, 2004.
pGADC <sub>2</sub> - RRP41	ADGAL4:: RRP41 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - RRP42	ADGAL4:: RRP42 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pACT- RRP43	ADGAL4:: RRP43 LEU 2 $\mu$ m	Zanchin e Goldfarb, 1999.
pGADC <sub>1</sub> - RRP44	ADGAL4:: RRP44 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - RRP45	ADGAL4:: RRP45 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pACT- RRP46	ADGAL4:: RRP46 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - MTR3	ADGAL4:: MTR3 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - CSL4	ADGAL4:: CSL4 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - RRP6	ADGAL4:: RRP6 LEU 2 $\mu$ m	Oliveira <i>et al.</i> , 2002.
pGADC <sub>2</sub> - NOP1	ADGAL4:: NOP1 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales <i>et al.</i> , 2005.
pGADC <sub>2</sub> - NOP58	ADGAL4:: NOP58 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales <i>et al.</i> , 2005.
pGADC <sub>2</sub> - NOP56	ADGAL4:: NOP56 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales <i>et al.</i> , 2005.
pGADC <sub>2</sub> - SNU13	ADGAL4:: SNU13 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales <i>et al.</i> , 2005.
pGADC <sub>2</sub> - GAR1	ADGAL4:: GAR1 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales, dados não publicados.
pGADC <sub>2</sub> - CBF5	ADGAL4:: CBF5 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales, dados não publicados.
pGADC <sub>2</sub> - NOP10	ADGAL4:: NOP10 LEU 2 $\mu$ m	Coltri, dados não publicados.

pGADC <sub>2</sub> - NHP2	ADGAL4:: NHP2 LEU 2 $\mu$ m	Coltri, dados não publicados.
pGADC <sub>1</sub> - LSM8	ADGAL4:: LSM8 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales, dados não publicados.
pGADC <sub>2</sub> - NOP17	ADGAL4:: NOP17 LEU 2 $\mu$ m	Gonzales <i>et al.</i> , 2005.
pGAD-YLR022	ADGAL4:: YLR022 LEU 2 $\mu$ m	Este estudo
pACT- NOP53	ADGAL4:: NOP53 LEU 2 $\mu$ m	Granato <i>et al.</i> , 2005.
pACT- PRP43	ADGAL4:: PRP43 LEU 2 $\mu$ m	Este estudo
Ycp33GAL-A-YLR022	GAL1::ProtA-YLR022,URA3,CEN4	Este estudo

## 2. Métodos

### 2.1. Amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR)

Os genes *NOP17*, *N-NOP17*, *C-NOP17*, *YLR022C*, *PRP43* foram amplificados utilizando DNA genômico da cepa de levedura W303. Os genes *PAB418* e *PAB1135* foram amplificados utilizando DNA genômico da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*, gentilmente cedido pelo Dr. Patrick Forterre (Instituto de Genética de Microorganismos, Universidade de Paris, França). Os oligonucleotídeos estão descritos na tabela 3 e foram sintetizados pela Invitrogen, contendo sítios de restrição específicos. Para amplificação de *PRP43* utilizamos os primers da coleção da *Research Genetics* (40502a – GENEPAIRS™). Os ciclos utilizados no termociclador tiveram as temperaturas de anelamento e extensão adaptadas para cada par de oligonucleotídeos, específicos para cada gene amplificado, sendo que, após o último ciclo a temperatura de extensão foi mantida por 15 minutos, seguida de resfriamento a 4°C.

### 2.2. Clonagens

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram inicialmente inseridos no vetor pGEM-T (Promega), seguindo instruções do fabricante. Após a análise de restrição os clones foram submetidos à reação de seqüenciamento. Com a confirmação do clone de interesse, este foi removido do pGEM-T por clivagens nos sítios de restrição contidos nos primers: *NOP17*, *N-NOP17*, *C-NOP17*, *PAB418* e *PAB1135* - BamHI e XhoI; *YLR022C* – EcoRI e XhoI e subclonado no pET-28a, clivado nos sítios de restrição idênticos.

*YLR022C* também foi subclonado em pBluescript e pBTM-116 nos sítios de EcoRI e XhoI. pBTM-YLR022 resultou na fusão de *YLR022C* ao domínio de ligação a DNA de *lexA*, sob controle do promotor constitutivo ADH. Este clone foi utilizado nos ensaio de duplo híbrido. Para obtenção do gene fusionado a um promotor de levedura que permite a ativação ou inibição da expressão do gene, este foi removido do pBluescript, utilizando os sítios de SpeI e XhoI, e fusionado ao Ycp33-GAL-proteína-A, nos sítios de XbaI e SalI (Ycp33GAL-A-YLR022).

*PRP43* foi removido do pGEM-T nos sítios de SmaI e PvuII e inserido no pGAD-C1 clivado com SmaI.

*RRP43* foi removido de pAE-RRP43 nos sítios de BamHI e HindIII e subclonado no pET-28a nos sítios idênticos.

As reações de ligação foram efetuadas a 16°C por 14 horas, de acordo com Sambrook e Russell (2001), utilizando T4 DNA ligase. O DNA ligado ao vetor foi então utilizado para transformar bactérias competentes (DH5 $\alpha$ / BL21) por PEG ou CaCl<sub>2</sub>, segundo Sambrook e Russell (2001), que foram plaqueadas em LB/agar contendo o antibiótico específico para a seleção dos transformantes.

## 2.3. Transformação de células

### 2.3.1 Bactérias competentes

**A. DH5 $\alpha$  competentes para transformação com polietilenoglicol (PEG).** 5mL de pré-inóculo foram diluídos 1:100 em 10mL de TYM (20g triptona, 5g extrato de levedura, 5,8g NaCl, 2,5g MgSO<sub>4</sub>-7 H<sub>2</sub>O) e mantidos sob agitação constante a 37°C até atingirem OD<sub>600</sub> entre 0,2 e 0,6. Foram adicionados 40mL de TYM e a cultura mantida em crescimento até atingir OD<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,9. Os 50mL de cultura foram homogeneizados com 200mL de TYM e crescidos até atingirem OD<sub>600</sub> = 0,6. As células foram resfriadas no gelo e coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após descarte do meio, as células foram ressuspensas em 100mL de TBF1 (0,03M KOAc, 0,05M MnCl<sub>2</sub>, 0,1M KCl, 0,01M CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol) gelado. As células foram coletadas novamente por centrifugação e ressuspensas em 10mL de TBF2 (0,01M MOPS pH 7, 0,075M CaCl<sub>2</sub>, 0,01M KCl, 15% glicerol) gelado. Em seguida as células foram divididas em alíquotas de 100 $\mu$ L, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Onde são estáveis por até 6 meses.

**B. *Bl21 competentes*.** Colônia isolada da bactéria foi inoculada em 2mL de LB e mantida sob agitação constante a 37°C por 16 horas. As células foram diluídas 100 vezes e mantidas em cultura nas mesmas condições até atingirem  $OD_{600} = 0,6$ , quando foram transferidas para tubos de centrifuga e incubadas no gelo por 15 minutos. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em metade do volume de cultura em 0,1M  $CaCl_2$  fresco. Foi realizada nova incubação no gelo por 1 hora, seguida de centrifugação e ressuspensão em 10% do volume final em 0,1M  $CaCl_2$  e 15% glicerol. Neste momento as células foram divididas em alíquotas de 50 $\mu$ L, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Onde são estáveis por até 6 meses.

### 2.3.2. Transformação de Bactéria

**A. *Transformação com PEG*.** Alíquotas de 100  $\mu$ L de DH5 $\alpha$  competentes, foram homogeneizadas a 80 $\mu$ L de tampão de transformação (0,1M KCl, 0,03M  $CaCl_2$ , 0,05M  $MnCl_2$ , 1,5% PEG 4000) e 20 $\mu$ L de solução contendo o DNA de interesse. As células foram mantidas no gelo por 30 minutos e em seguida, transferidas para temperatura ambiente por 10 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 1mL de meio LB e as células cresceram por 1 hora a 37°C, quando foram coletadas e transferidas para placas de LB/agar, contendo o antibiótico específico para seleção dos transformantes.

**B. *Transformação com  $CaCl_2$* .** Seguindo protocolo de Sambrook e Russell (2001), alíquotas de 50 $\mu$ L de Bl21-Codon-Plus (DE3) RIL foram homogeneizadas com 1 $\mu$ L de DNA e incubadas no gelo por 30 minutos e em seguida, transferidas para 42°C por 2 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 1mL de meio LB e as células cresceram por 1 hora a 37°C, quando foram coletadas e transferidas diretamente para o volume de pré-inóculo desejado, contendo o antibiótico específico para seleção dos transformantes.

### 2.3.3. Transformação de levedura

**A. *Transformação com acetato de lítio e DNA carreador*:** seguindo protocolo de Sherman *et al.* (1986), as células foram incubadas em 10 mL de YNB-glicose, acrescido dos aminoácidos necessários, a 30°C sob agitação constante até atingirem  $OD_{600}$  entre 0,8-1,0, quando foram centrifugadas, lavadas com 2mL de água e centrifugadas novamente. As células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de TE contendo 0,1M de acetato de lítio. Em seguida foram

adicionados 5 $\mu$ g de DNA plasmidial, 200 $\mu$ g de Salmon Spermam DNA (Gibco) e 600 $\mu$ L de solução de 40% PEG 4000, 0,1M LiOAc, 1X TE. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos e em seguida submetida a choque térmico de 42°C por 15 minutos, após o qual, as células foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias, aproximadamente 48 horas.

**B. Transformação com acetato de lítio e DTT:** como descrito por Chen *et al.* (1992), as células foram incubadas em YPD a 30°C sob agitação constante até atingirem fase estacionária (OD<sub>600</sub>  $\geq$  1,0). 200  $\mu$ L de células foram coletadas, lavadas com TE e ressuspensas em solução de 40% PEG 4000, 0,2M LiOAc, 0,1M DTT. 2-5 $\mu$ g de DNA plasmidial foi adicionado. As amostras foram incubadas a 42°C por 30 minutos e em seguida, plaqueadas em meio seletivo e mantidas a 30°C até o aparecimento de colônias.

## 2.4. Preparação de plasmídeos

2.4.1 A partir de *E.coli*: bactérias transformadas foram inoculadas em 2 mL de LB líquido e incubadas a 37°C por 16 horas. 1,5 mL da cultura foi coletado e ressuspensado em 100  $\mu$ L de GET (25mM Tris/HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 1% glicose). Seguido da adição de 200  $\mu$ L de 1% SDS, 0,2M NaOH. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, quando foram adicionados 150 $\mu$ L de acetato de amônio 7,5M, seguido de nova incubação de 5 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante transferido para novo tubo, acrescido de 500  $\mu$ L de isopropanol e submetido novamente à centrifugação. O material precipitado foi lavado com 750  $\mu$ L etanol 70% e centrifugado. O etanol foi removido. O DNA foi seco a 42°C e ressuspensado em TE pH 8,0.

2.4.2. A partir de levedura: Seguindo protocolo de Bartel e Fields (1995) foi inoculada colônia isolada da levedura de interesse em YNB-glicose, contendo os aminoácidos necessários, que foi mantida em cultura sob agitação constante a 30°C até atingir fase estacionária. As células foram transferidas para tubos de 1,5 mL, centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução A (0,1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA). Foram adicionados 0,2 g de pérolas de vidro e 200  $\mu$ L de fenol-clorofórmio. As células foram lisadas em vórtex por 2 minutos, homogeneizadas a 200  $\mu$ L de solução A, e centrifugadas a 12.000 rpm por 5

minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foi adicionado 200  $\mu$ L de fenol-clorofórmio e realizada nova extração. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescido de NaCl para concentração final 200mM e 500  $\mu$ L de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Nova centrifugação foi efetuada, seguida de lavagem com etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco e ressuspendido em 10  $\mu$ L de TE.

## **2.5. Análise de restrição**

Os DNAs plasmidiais foram clivados com enzimas de restrição específicas, seguindo instruções dos fabricantes. Para análise das reações, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando TAE 1X como tampão, sob voltagem constante (100 volts).

## **2.6. Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose**

Todos os fragmentos de DNAs utilizados nas reações de ligação foram purificados de gel de agarose utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Após a extração os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose.

## **2.7. Expressão e purificação de proteínas com His-tag**

Bactérias competentes (BI21-Codon-Plus (DE3) RIL) foram transformadas e testadas em ensaios de expressão das proteínas de fusão, onde observamos melhor meio nutritivo, temperatura ótima de expressão e solubilidade, densidade celular, tempo de indução, tipo e concentração do indutor (IPTG ou lactose). Após a determinação das melhores condições de produção da proteína de interesse, partimos para a produção em grande escala.

As proteínas foram purificadas em colunas de afinidade Ni-NTA (Qiagen), utilizando tampão 50mM de Tris/HCl em pH adequado a cada uma, 500mM de NaCl, 5mM imidazol. A eluição foi obtida com gradiente de concentração de imidazol. As condições utilizadas para cada proteína estão descritas nos resultados.

Os resultados de purificação de proteínas foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguindo protocolo de Sambrook e Russell (2001).

## 2.8. Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de BCA (Sigma), utilizando ácido bicinônico e sulfato de cobre II. As proteínas reduzem Cu (II) a Cu(I), e a quantificação é feita através da medida de absorvância em 562nm. BSA (Amresco) foi utilizada como padrão.

## 2.9. Proteólise limitada

As proteínas purificadas foram concentradas, utilizando filtros Amicon Ultra (Millipore), a 1mg/mL e submetidas à proteólise com diferentes proteases em concentrações variáveis. Alíquotas foram coletadas após 0, 5, 15, 30, 60, 120 minutos de incubação a temperatura ambiente. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos, na presença de tampão de amostra, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol, e separadas em gel de poliácridamida.

## 2.10. Dicroísmo circular

Dicroísmo circular foi utilizado como ferramenta inicial de avaliação do enovelamento das proteínas recombinantes. As proteínas purificadas foram dialisadas em tampões específicos, concentradas, utilizando filtros Amicon Ultra (Millipore), e avaliadas quanto à sua conformação.

Os experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), e as medidas foram obtidas em espectropolarímetro Jasco J-810, utilizando cubetas de quartzo de 0,1 cm.

## 2.11. Cristalização

Os testes de cristalização também foram realizados no LNLS, utilizando as proteínas recombinantes, dialisadas e concentradas com filtros Amicon Ultra (Millipore), a pelo menos 10mg/mL. Os ensaios seguiram o método de difusão de vapor com gota sentada a 20°C. Inicialmente foram utilizados os kits Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research) e JBScreen 1 a 10 (Jena Bioscience), totalizando 408 condições.

## 2.12. Obtenção de anti-soro policlonal

Foram utilizados 10 camundongos Balb-c fêmeas, adultos jovens, para obtenção de anti-soro. Cada animal recebeu 10 $\mu$ g de proteína purificada em cada inóculo, emulsificada em igual



volume de adjuvante de Freud (Freuds' adjuvant – Sigma), sendo que no primeiro inóculo, foi utilizado adjuvante completo e nos demais, incompleto. As injeções foram subcutâneas e realizadas em intervalos de 7 dias.

Um animal foi sacrificado anteriormente aos inóculos para testarmos o possível reconhecimento da proteína pelo soro pré-imune. Após o terceiro inóculo foi coletado um pouco de sangue para testar a resposta imune aos inóculos. Quando obtida resposta satisfatória, os animais foram sacrificados em, no máximo, 7 dias após o quarto inóculo. Após a coleta do sangue, este foi incubado a 37°C por 1 hora, para promover a coagulação. Em seguida foi incubado a 4°C por 12 horas. O soro foi isolado por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e dividido em pequenas alíquotas para armazenamento a -20°C. O título foi avaliado por Western blot, utilizando a proteína purificada e extrato celular.

### 2.13. Western blot

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e em seguida transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare). O bloqueio desta foi realizado com 5% de BSA em PBS por 18 horas a 4°C, seguido de três lavagens em PBS por 15 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo/anti-soro específico, em 0,1% de BSA/ PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário em 0,1% de BSA/PBS a temperatura ambiente por 2 horas. Foi realizada nova lavagem e o filme foi revelado utilizando ECL (GE Healthcare).

### 2.14. Duplo híbrido

O sistema do duplo híbrido permite identificar interações entre proteínas *in vivo*. O que possibilita a identificação de interações entre duas proteínas conhecidas ou a busca por novas interações em bibliotecas genômicas ou de cDNA. Os plasmídeos construídos para utilização deste sistema foram o pBTM-116 (Bartel *et al.*, 1993), o pACT (Durfée *et al.*, 1993) e o pGAD (James *et al.*, 1996), sendo que o pBTM-116 contém o domínio de ligação a DNA de *lexA*, enquanto que pACT e pGAD contêm o domínio de ativação da transcrição de GAL4. Todos os domínios estão sob o controle do promotor ADH1. Quando as proteínas fundidas a estes domínios interagem, ocorre a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *LacZ*, permitindo a identificação e quantificação da força de interação entre elas. *YLR022C* foi fusionado ao domínio de ligação ao DNA de *lexA*,

(pBTM-YLR022), ou ao domínio de ativação da transcrição de GAL4 (pGAD-YLR022) e transformado (Sherman, 1986) na cepa de levedura L40 com uma biblioteca de cDNA (ATCC 87002 – American type Culture Collection) e com plasmídeos expressando outras proteínas envolvidas em metabolismo de RNA, fusionadas ao domínio de ativação da transcrição de GAL4. As interações foram identificadas através da ativação dos genes repórteres *HIS3* e  $\beta$ -galactosidase (Bartel e Fields, 1995).

Para análise da ativação de *HIS3*, as células foram crescidas na ausência de histidina, enquanto que para a análise de transcrição de  $\beta$ -galactosidase, as células foram crescidas em 1 mL de meio líquido (YNB-glicose-adenina-histidina) até atingirem OD<sub>600</sub> de 0,5. As células foram coletadas, ressuspensas em 100  $\mu$ L de água e 3  $\mu$ L foram pingados em membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) sobre placa de meio mínimo (YNB-glicose-adenina-histidina) e incubadas por 48 horas a 30°C. A membrana foi removida da placa e as células lisadas em nitrogênio líquido por 40 segundos. Em seguida, a membrana foi sobreposta a papel filtro embebido em solução de Tampão Z (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, pH7) e X-gal (50 $\mu$ g/mL) e incubada a 37°C por 1 hora.

A quantificação da atividade da  $\beta$ -galactosidase foi obtida através do ensaio colorimétrico que utiliza ONPG (O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) como substrato (Miller, 1972). 3 mL de cultura foram crescidos a 30°C sob agitação constante até atingir OD<sub>600</sub> entre 0,5 e 1,0. As células foram coletadas, ressuspensas em tampão Z, e lisadas na presença de pérolas de vidro. O extrato proteico foi quantificado, utilizando BCA (Sigma) e concentrações iguais foram adicionadas a 4mg/mL de ONPG em tampão fosfato 100mM. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e a atividade de  $\beta$ -galactosidase medida a 420nm.

### **2.15. Co-precipitação de proteínas e RNA**

A cepa W303 foi transformada com Ycp33-ProtA ou Ycp33-ProtA-022 e as células foram crescidas em 1L de YNB-galactose, contendo os aminoácidos necessários, até OD<sub>600</sub>= 1. As células foram coletadas e lisadas na presença de pérolas de vidro e do tampão A (20mM tris/HCl pH 8, 10 mM acetato de magnésio, 150 mM acetato de potássio, 0,2% triton X-100, 1mM DTT, 1mM PMSF). O extrato total foi quantificado por BCA (Sigma) e igual quantidade foi incubado com 200  $\mu$ L de IgG-sefarose (GE Healthcare) por 2 horas. Após a lavagem da resina com 80 mL

do tampão A, uma fração da resina foi utilizada para analisar a precipitação de proteínas e o restante foi submetido à extração de RNA.

### 2.16. Extração de RNA

O RNA total foi extraído segundo Kohrer e Domdey (1991), quantificado, desnaturado na presença de glioxal ou formamida e separado em gel de agarose (1,3%) ou poliacrilamida/ 8M uréia (6%), respectivamente. Após a eletroforese, o RNA foi transferido para membrana de nylon (GE Healthcare) e hibridizado contra diferentes sondas (Gonzales *et al.*, 2005). Os resultados foram visualizados em Phosphorimager.

### 2.17. Ligação *in vitro* proteína-RNA

As proteínas foram expressas em *E. coli* e purificadas em colunas de afinidade, concentradas e quantificadas por BCA (Sigma).

Regiões específicas do rDNA foram amplificadas por PCR e clonadas em vetor pGEM-T, que foi clivado e utilizado como molde na reação de transcrição. Para a reação, utilizando SP6 RNA polimerase e 50 $\mu$ Ci de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP, seguimos instruções do fabricante. O RNA transcrito foi quantificado por absorbância em espectrofotometro.

Para reação de ligação das proteínas ao RNA, foram utilizadas diferentes concentrações de proteína, 1pmol do RNA transcrito e a reação foi conduzida em tampão A (20mM Tris/HCl pH 8, 10 mM acetato de magnésio, 150 mM acetato de potássio, 0,2% triton X-100, 1mM DTT, 1mM PMSF) acrescido de RNasin, o volume final de reação foi de 20  $\mu$ L. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi exposta ao UV por 15 minutos, no gelo. Após o *cross-link* as amostras foram tratadas com RNase-A por 30 minutos a 37°C. A reação foi finalizada através da adição de 5  $\mu$ L de tampão de amostra contendo formamida. As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e separadas em gel 6% poliacrilamida/uréia. Os resultados foram visualizados em Phosphorimager.

### 2.18. Ensaio de atividade de RNase *in vitro*

As proteínas foram expressas em *E. coli*, purificadas em colunas de afinidade, concentradas e quantificadas por BCA (Sigma).

O ensaio de RNase foi conduzido segundo Mitchell *et al.*, 1996. A Atividade de RNase das proteínas foi analisada através de incubação com substratos de RNA, formados por oligoribonucleotídeo poli-rA(14 nucleotídeos) marcado no 5' com  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, ou por fragmentos do pré-rRNA, transcritos *in vitro* como descrito para o ensaio de ligação a RNA. Concentrações crescentes das proteínas foram incubadas com os RNAs a 37°C por 30 minutos. As condições específicas de tampão para cada proteína estão descritas nos resultados. Para parar a reação adicionou-se tampão de amostra contendo formamida. As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e separadas em gel desnaturante de poliacrilamida 6%.

### **2.19. Reação de polimerização**

Para reação de polimerização utilizamos o oligonucleotídeo poli-rA (14 nt) marcado no 5' com  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, seguindo protocolo descrito por Ramos *et al.*, 2006.

## RESULTADOS

### 1. Estudo da estrutura de NOP17p

Nop17p foi identificada em nosso laboratório através do sistema do duplo híbrido, utilizando como “isca” a subunidade do exossomo Rrp43p (Gonzales *et al.*, 2005). Nop17p é codificada pelo gene *NOP17*, presente no cromossomo VIII de *S. cerevisiae*, que não é essencial para a célula, mas é evolutivamente conservado, uma vez que homólogos existem em *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*. Predições estruturais utilizando os bancos de dados disponíveis no ExPasy (<http://www.expasy.ch>), sugerem que Nop17p pode apresentar aproximadamente 20% de alfa hélice, 27% de folhas beta e um elevado conteúdo de “random coil” (53%). Além da interação com Rrp43p, uma das subunidades do exossomo, Nop17p também interage com Nop53p, presente no complexo 60S e com Nop58p, uma das subunidades de snoRNPs de boxC/D (Granato *et al.*, 2005; Gonzales *et al.*, 2005). Essas interações com proteínas que participam em diferentes etapas do processamento indicam que Nop17p poderia atuar como um cofator ou um possível regulador no processamento de RNA. Por isso, informações estruturais poderiam favorecer significativamente o entendimento destas interações e seu papel funcional, que foi estudado paralelamente no laboratório (Gonzales *et al.*, 2005).

Com o objetivo de caracterizar estruturalmente Nop17p, nós clonamos o gene *NOP17* em um vetor de expressão de *E. coli* (pET-28a), em fusão com His-tag. O clone foi verificado por seqüenciamento e análise de restrição. Após a verificação da integridade do clone obtido, realizamos testes de expressão de His-Nop17p.

His-Nop17p manteve nível de expressão constante quando foi expressa em diferentes cepas de B121-DE3, ou meios de cultura (LB ou 2YT). Assim como o nível parece não ser alterado após 3 horas de adição do indutor (IPTG). Contudo, sua solubilidade foi significativamente afetada em função da temperatura de crescimento da cultura e concentração do indutor. Proteínas obtidas de cultura a 37°C, em concentrações de IPTG variando entre 0,5 e 1mM, apresentaram-se totalmente insolúveis. Enquanto que a mudança da temperatura de expressão para 30°C e adição de indutor na concentração final de 0,5 mM, resultaram em semelhante nível de expressão e a proteína foi obtida de forma solúvel.

As condições de expressão de His-Nop17p foram assim otimizadas a partir da cepa de *E. coli* (BI21-Codon-Plus (DE3) RIL) transformada com o plasmídeo pET-28-NOP17: crescimento da cultura em meio 2YT a 37°C, até atingir OD<sub>600</sub> entre 0,6 – 0,7 e indução a 30°C com adição de 0,5mM IPTG por 3 horas.

Após a cultura, as células foram coletadas e submetidas à lise em “french-press”, na presença de 50 mM Tris/HCl pH8, 500mM NaCl, 5mM imidazol, 1mM PMSF. O extrato total foi submetido à precipitação com sulfato de estreptomicina (na relação 10% peso/volume) por 2 horas sob agitação a 4°C. Esta etapa teve como objetivo a remoção de ácidos nucleicos, do extrato proteico. Em seguida, o extrato foi clarificado por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos e incubado por 1 hora com 1mL de Ni-NTA agarose (Qiagen), previamente equilibrada no tampão de lise. As proteínas que não ligaram à coluna foram removidas por lavagem com 20 volumes de coluna de tampão de lise e as proteínas ligadas foram eluídas através de gradiente crescente de imidazol, de 20 a 500mM. O pico de eluição foi entre 50 e 100mM de imidazol, mas His-Nop17p foi eluída ao longo de todo o gradiente (Figura 4A). A fusão foi confirmada por western blot, utilizando anticorpo  $\alpha$ -His e com o antisoro produzido a partir da proteína purificada (Figura 4C).

As frações foram homogeneizadas e submetidas à clivagem com trombina (GE Healthcare), para a remoção do His-tag. A reação foi acompanhada por 1, 2, 3, 4 e 16 horas. Sendo que os melhores resultados foram obtidos após 16 horas (Figura 4B). Após a clivagem, precisávamos reduzir a concentração de sal e imidazol para conduzir os ensaios estruturais seguintes. Com este objetivo, a proteína foi dialisada contra 5mM Tris/HCl pH8, 10mM NaCl, 5% glicerol. Para nossa surpresa, a proteína foi clivada em dois peptídeos menores, apesar de não apresentar sítios internos de clivagem para trombina (Figura 4B), o que levantou a hipótese da presença de dois domínios estruturais em Nop17p. Por isso, PMSF foi adicionado em todas as demais purificações de His-Nop17p, após a clivagem com trombina.

A análise do enovelamento de Nop17p foi realizada através de ensaios de dicroísmo circular (Figura 4D). Semelhante aos cálculos obtidos nos programas de predição de estrutura secundária, o perfil de His-Nop17p corresponde a uma proteína com elevado conteúdo de *random coil*, aproximadamente 53% de seus aminoácidos, enquanto 30% correspondem a folhas  $\beta$  e 17% a  $\alpha$ -hélices. Ao mesmo tempo também avaliamos sua estabilidade térmica, seguindo seu perfil em dicroísmo circular diante do aumento da temperatura (Figura 4D).



Os resultados revelaram que His-Nop17p é uma proteína bastante estável em temperaturas elevadas, já que a variação observada na estrutura entre 20 e 90°C não é significativa. O que pode ser atribuído à presença de nove cisteínas entre seus aminoácidos, que possivelmente formam pontes de dissulfeto e contribuem para a estabilidade térmica da proteína.

De posse de uma proteína com mais de 80% de pureza, enovelada e estável a altas temperaturas nós realizamos um “screening” de cristalização. His-Nop17p foi concentrada a 10mg/mL e avaliada quanto à sua capacidade de cristalização, como descrito em materiais e métodos. Após 15 dias de incubação a 20°C, seis das condições testadas revelaram a formação de agulhas finas. Estas condições foram refinadas quanto a concentração de sal, pH e temperatura, mas só foi possível alterar o tamanho das agulhas. O melhor padrão foi obtido quando utilizamos 50% MPD, 0,1M Tris/HCl pH 8.5, 0,2M de fosfato de amônio, como precipitante (Figura 4E).

Como a qualidade dos cristais poderia estar relacionada ao grau de pureza da proteína, nós fizemos diversas tentativas de melhorar os resultados de purificação. Testamos diferentes condições em colunas de troca iônica, colunas de gel filtração, coluna de heparina e precipitação com sulfato de amônio, mas infelizmente os resultados obtidos não foram satisfatórios e sugeriam elevada instabilidade de Nop17p no processo de purificação, como identificado na proteólise com trombina. Por isso nós decidimos explorar a possibilidade da presença de domínios em Nop17p através de proteólise limitada e da construção de clones parciais.

Os ensaios de proteólise limitada foram conduzidos como descrito em materiais e métodos, as proteases utilizadas foram tripsina, termolisina, subtilisina, quimiotripsina e papaína (Figura 5). Os ensaios de proteólise revelaram elevada suscetibilidade de Nop17p a qualquer das proteases testadas e todas resultaram em um (Figura 5C e D) ou dois peptídeos (Figura 5E) com peso molecular entre 10 e 20kDa, sugerindo a presença de pelo menos um domínio mais estável em Nop17p. Com a disponibilidade dos clones correspondendo às porções N e C-terminal de Nop17p (Figura 6A), nós decidimos estudar essas porções de Nop17p isoladamente. Os ensaios de expressão seguiram procedimentos idênticos aos utilizados para His-Nop17p. Contudo apenas a porção C-terminal pôde ser obtida de forma solúvel e purificada em coluna de níquel (Figura 6C).







Os ensaios de dicroísmo circular revelaram que C-Nop17p apresentava-se totalmente como random coil, desencorajando nossas tentativas de descrever a estrutura total ou parcial de Nop17p. Sendo assim, nós produzimos anticorpo policlonal  $\alpha$ -Nop17 em camundongos (Figura 4C), que é eficiente no reconhecimento tanto da proteína recombinante de *E. coli* como da proteína presente no extrato total de levedura, e passamos a colaborar com os ensaios funcionais que foram desenvolvidos no laboratório e resultaram nos dados publicados em Gonzales *et al.*, 2005.

## 2. Exossomo de *S. cerevisiae*

O exossomo é um complexo formado por 10 proteínas essenciais que degradam RNAs 3'→5', tanto no núcleo quanto no citoplasma. No núcleo o complexo é acrescido da subunidade Rrp6p. Seis das proteínas que constituem o complexo têm homologia com RNase PH (Rrp41p, Rrp45p, Mtr3p, Rrp42p, Rrp43p e Rrp46p) e três possuem domínios de ligação a RNA (Rrp4p, Rrp40p e Csl4p). Quatro das proteínas do exossomo de levedura tiveram sua atividade descrita *in vitro*, Rrp4p, Rrp41p, Rrp44p (Mitchell *et al.*, 1997) e Rrp6p (BurKard e Butler, 2000). Mas apesar dos inúmeros esforços em entender os mecanismos pelos quais todas estas proteínas estão reunidas em um único complexo e são capazes de distinguir diferentes substratos, rRNA, snRNAs e mRNAs, pouco ainda se sabe sobre este complexo multifuncional. As interações proteína-proteína foram estudadas por duplo híbrido e revelaram as interações entre as subunidades Rrp43p-Rrp46p (Oliveira *et al.*, 2002), Rrp42p-Mtr3p, Rrp41p-Rrp45p (Ito *et al.*, 2001), proteínas que formam o “core” do exossomo, além das interações da proteína Rrp4p com Mtr3p, Rrp6p, Rrp44p e Rrp41p, entre outras (Tavares, tese de mestrado, 2004; manuscrito em preparação).

Recentemente, as estruturas do exossomo de *Sulfolobus solfataricus* (Lorentzen e Conti, 2005), *Archaeoglobus fulgidus* (Büttner *et al.*, 2005) e *Pyrococcus* (Ramos *et al.*, 2006) foram descritas, revelando que o “core” do exossomo tem uma arquitetura molecular similar àquela da polinucleotídeo fosforilase bacteriana, um complexo de exoribonucleases 3'→5' fosforolíticas, organizado em forma de anel. Em archaea o exossomo consiste de duas proteínas com domínios de RNases PH, aRrp41p e aRrp42p, que formam heterodímeros. Três desses heterodímeros formam um anel. Em eucariotos, este anel é formado por seis diferentes subunidades com domínios de RNase PH. Sendo que, tanto em archaea quanto em eucariotos o anel de RNase PH está associado

a proteínas com domínios de ligação a RNA. Lorentzen e Conti (2005), descreveram que em *S. solfataricus* a atividade de degradação do RNA está restrita à subunidade aRrp41p, mas a catálise só é obtida com a associação de aRrp42p. Além disso, a atividade de RNase é processiva e dependente de fosfato, resultando na liberação de mononucleotídeos difosfato. Três das proteínas de levedura (Rrp41p, Mtr3p, e Rrp46p), têm maior similaridade com aRrp41p enquanto Rrp45p, Rrp42p e Rrp43p, apresentam maior similaridade com aRrp42, o que pode sugerir que também em levedura o anel de RNases PH do exossomo possa ser formado por três heterodímeros (Lorentzen *et al.*, 2005). Para investigar essa hipótese nós decidimos realizar experimentos *in vitro*, com as proteínas que compõem o anel do exossomo de *S. cerevisiae*.

### 2.1 Purificação das proteínas componentes do anel do exossomo de *S. cerevisiae*

Nós clonamos as seis subunidades que compõem o anel do exossomo de *S. cerevisiae*, Rrp41p, Rrp45p, Rrp42p, Mtr3p, Rrp43p e Rrp46p em vetores de expressão de *E. coli*, sendo que Rrp41p, Mtr3p e Rrp46p foram fusionadas a GST, em vetores pGEX-4T, enquanto Rrp45p, Rrp42p e Rrp43p foram fusionadas ao His-tag, em vetores pET. Os dímeros Rrp41p-Rrp45p e Rrp42p-Mtr3p foram co-expressos em BL21-Codon-Plus (DE3) RIL seguindo protocolo de Lorentzen *et al.*, 2005. Contudo, Rrp43p e Rrp46p só puderam ser obtidas quando expressas em células isoladas. Por isso, BL21-Codon-Plus (DE3) RIL foi transformada com cada um dos plasmídeos e a cultura cresceu a 37°C até atingir OD<sub>600</sub> entre 0,6 – 0,8, quando o indutor (IPTG na concentração final de 0,5mM) foi adicionado e a indução realizada por 3 horas a 37°C. Após a cultura, as células foram coletadas e ressuspensas no mesmo tampão para lise (50mM Tris/HCl pH 7, 150mM NaCl, 5mM imidazol, 1mM PMSF). As células foram rompidas em sonicador, o extrato clarificado por centrifugação e incubado por 1 hora com 500 µL de resina, Ni-NTA agarose (Qiagen). Após a lavagem para remoção das proteínas não ligadas, as proteínas foram eluídas através de gradiente de imidazol (Figura 7A, B e C).



Os dímeros que compõem o anel do exossomo foram eficientemente co-purificados. As fusões foram verificadas por Western blot utilizando anticorpo  $\alpha$ -GST (Sigma) ou  $\alpha$ -His (GE Healthcare) (Figura 7 D e E), confirmando que as proteínas isoladas correspondem às proteínas de interesse. A presença significativa de contaminantes na purificação de Rrp43-Rrp46 não afetaram a atividade do dímero, como discutiremos adiante, apenas alteraram a quantificação das proteínas. A presença destes contaminantes foi atribuída ao baixo nível de expressão das proteínas e a insolubilidade parcial de His-Rrp43p.

His-Rrp42p, His-Rrp43p e GST-Rrp46p também foram purificadas isoladamente. His-Rrp45p não foi expressa isoladamente, em nenhuma das condições testadas. Apesar de seguirmos o protocolo previamente estabelecido por Mitchell *et al.* (1997) para purificação de GST-Rrp41p, esta também não pôde ser satisfatoriamente purificada, quando isolada, e GST-Mtr3p não é estável após a purificação, indicando a possível relação entre a formação do dímero e a estabilidade estrutural e funcional dessas proteínas.

## **2.2 Análise da atividade das proteínas do exossomo de *S.cerevisiae***

Para avaliar a atividade de RNases das subunidades do exossomo de levedura, as proteínas purificadas foram concentradas e quantificadas por BCA. Os ensaios de atividade de exonuclease foram realizados segundo Mitchell *et al.* (1996). 0,1 pmol de um oligonucleotídeo poli-rA(14 nucleotídeos) marcado radioativamente foi incubado a 37°C por 30 minutos com quantidades crescentes de proteína: 2, 10 e 20 pmol, na presença ou ausência de fosfato (Figura 8).

As proteínas isoladas não apresentaram atividade de RNase (Figura 8A). A atividade residual observada em GST-Rrp46p é semelhante à observada no controle GST, sugerindo que seja resultante de algum contaminante específico da coluna de Glutaciona-sefárose, o que já foi observado por Mitchell *et al.* (1996).

Quando utilizamos os dímeros sob condições idênticas, o substrato foi eficientemente degradado. Resultando em um resíduo de 4 ou 5 nucleotídeos e a atividade foi dependente da concentração de proteína (Figura 8B). Curiosamente a atividade não foi estimulada na presença de fosfato, como era esperado para proteínas com homologia a RNase PH. Mitchell *et al.* (1996) também observou atividade de Rrp41p na ausência de fosfato. O complexo do



exossomo purificado por Tap-tag também parece apresentar uma atividade hidrolítica predominante (LaCava *et al.*, 2005).

A reconstituição do anel de RNases PH do exossomo e sua utilização na reação (Anel - Figura 8B), resultou em atividade semelhante à observada com os heterodímeros, provavelmente porque um excesso de proteína tenha sido utilizado nas reações em relação ao substrato.

His-Rrp42p e o heterodímero His-Rrp42p-GST-Mtr3p também tiveram suas atividades testadas em substratos específicos, regiões do pré-rRNA 35S, transcritos *in vitro* na presença de 50 $\mu$ Ci de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP. 1pmol RNA transcrito foi utilizado em cada reação. As proteínas foram utilizadas em concentrações crescentes de 2, 5, 10 e 20 pmol, na presença ou ausência de fosfato, como descrito acima (Figura 9).

Semelhante ao observado para His-Rrp43p e GST-Rrp46p, His-Rrp42p não apresenta atividade quanto testada isoladamente com nenhum dos substratos, mas o dímero His-Rrp42p-GST-Mtr3p degrada eficientemente ambos substratos. Contudo, apenas alguns nucleotídeos são removidos, o que está de acordo com o observado anteriormente por Allmang *et al.* (1999) em ensaios *in vivo* com o exossomo de levedura e recentemente por Lorentzen e Conti (2005) com o exossomo de archaea. Como demonstrado nesses trabalhos, a presença de estrutura secundária no RNA, impede que este seja totalmente degradado pelo exossomo, e há necessidade de 5 nucleotídeos lineares para atingir o sítio ativo do exossomo (Allmang *et al.*, 1999; Lorentzen e Conti, 2005).

Assim, podemos concluir que as proteínas Rrp42p, Rrp43p e Rrp46p não apresentam atividade de exonuclease isoladamente. A atividade destas proteínas é dependente da formação do heterodímero, semelhante ao que foi descrito para o exossomo de *Sulfolobus solfataricus* (Lorentzen e Conti, 2005), *Archaeoglobus fulgidus* (Büttner *et al.*, 2005) e *Pyrococcus* (Ramos *et al.*, 2006). Nestes trabalhos também foi demonstrado que a estrutura das proteínas restringe o acesso do substrato ao sítio ativo, o que parece ocorrer de forma semelhante para as proteínas de levedura, pois o substrato de fita simples, de 14 nucleotídeos, é degradado liberando um fragmento de 5 nucleotídeos.





### 3. Exossomo de *Pyrococcus*

Resultados recentes revelaram a organização estrutural do exossomo de *Pyrococcus* (Ramos *et al.*, 2006). Esse é formado por um anel hexamérico de subunidades com domínios de RNases PH, que interage com a proteína aRrp4p, a qual possui dois domínios de ligação a RNA. Análises funcionais descreveram que o anel de RNases liga RNA, apresenta atividade fosforolítica e de polimerização. Contudo ainda não está claro como ocorre a regulação da atividade destas proteínas, pois em *A. fulgidus* foi descrita a presença de duas formas do a-exossomo, uma associada a aRrp4p (aRrp4-exossomo) e outra associada a aCsl4 (aCsl4-exossomo), que diferem quanto à atividade total (Büttner *et al.*, 2005), sugerindo algum mecanismo de regulação proteína-específico. Mas ainda não se sabe se esta regulação se dá através do reconhecimento de substratos específicos ou se necessita da participação de outros cofatores proteicos.

Informações disponíveis no banco de dados de *Pyrococcus abyssi* sugerem que outras proteínas (Pab418p e Pab1135p) também podem fazer parte do a-exossomo ou interagir com este. Além disso, já foi identificada em *P. abyssi* aNip7p (Coltri *et al.*, 2004), ortóloga da proteína Nip7p de levedura, que interage com Rrp43p e está envolvida em processamento de rRNA (Zanchin *et al.*, 1997).

Para avaliar se essas proteínas associam-se ao exossomo de archaea, nós clonamos os genes: *PAB418* e *PAB1135* em fusão com His-tag em vetor pET-28a e utilizamos os clones de aCsl4p (Ramos, C. R.) e aNIP7p (Coltri *et al.*, 2005), gentilmente cedido pelo Dr. Nilson I. T. Zanchin, para ensaios de co-purificação e atividade. As proteínas Pab418p e Pab1135p também foram utilizadas em ensaios estruturais.

#### 3.1 Purificação de Pab418p

*PAB418* está localizado no operon do exossomo em *P. abyssi*, *upstream* dos genes *aRRP4*, *aRRP41* e *aRRP42*, o que indica que haja uma correlação funcional entre estas proteínas. Além disso, *PAB418* é altamente conservado, pois ortólogos foram identificados desde archaea a vertebrados e plantas. O ortólogo em *S. cerevisiae*, *YLR022C* está relacionado ao metabolismo de rRNA (Boocock *et al.* 2002), em especial no processo de degradação do 5'ETS e no

processamento do rRNA 5.8S (Peng *et al.*, 2003), etapas do processamento nas quais o exossomo participa diretamente. Esses dados ressaltam a possibilidade do envolvimento de Pab418p na atividade do exossomo de *Pyrococcus*, o que nos levou a iniciar estudos estruturais e funcionais de Pab418p.

O clone obtido de *PAB418* foi submetido aos ensaios de expressão, como descrito para Nop17p. His-Pab418p é eficientemente expressa em forma solúvel na cepa B121-Codon-Plus (DE3) RIL, em meio 2YT, depois de 3 horas de indução com 0,5mM de IPTG a 37°C.

As células coletadas a partir de três litros de cultura foram lisadas em “french-press” na presença de 50mM Tris/HCl pH 7, 500mM NaCl, 5mM imidazol, 1mM PMSF. O extrato total foi submetido à precipitação com sulfato de estreptomicina (na relação 2% peso/volume) por 1 hora, sob agitação a 4°C. Após clarificação do extrato por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos, este foi incubado a 80°C por 30 minutos, para desnaturar as proteínas de *E. coli*. O extrato foi centrifugado novamente e em seguida aplicado à coluna de níquel (500µL Ni-NAT agarose), como descrito para Nop17p.

His-Pab418p apresenta pico de eluição em 100mM de imidazol (Figura 10A). A remoção do His-tag e proteólise com tripsina também foram conduzidas como descrito para Nop17p. A remoção do His-tag foi eficiente já após 16 horas de incubação. A proteólise com tripsina revelou elevada estabilidade da proteína, sendo que a clivagem parece ocorrer em um único sítio e o resultado não é alterado após 2 horas de reação (Figura 10B). Acreditamos que a clivagem esteja ocorrendo entre os aminoácidos 7 e 14 em Pab418p, o que significa uma diferença de aproximadamente 2kDa em relação à proteína com His-tag e corresponde a diferença observada em SDS-PAGE. Após a proteólise com tripsina Pab418p foi submetida à diálise em diferentes tampões para estabelecermos as melhores condições de manutenção de sua estabilidade. Pab418p é estável em 10mM acetato de sódio pH5. Nesta condição a proteína foi concentrada, quantificada e submetida aos ensaios de dicroísmo circular e cristalização.

O perfil observado por dicroísmo circular descreve uma proteína com elevado conteúdo de  $\alpha$ - hélices e folhas  $\beta$  (Figura 10C), pois tanto os picos negativos em 207 e 222nm, característicos de  $\alpha$ - hélice, quanto o pico positivo em 190nm, estão presentes. Estes dados estão de acordo com os dados estruturais publicados para o ortólogo de Pab418p em *A. Fulgidus*, (Shammas *et al.*, 2005).



Para os ensaios de cristalização Pab418p foi concentrada a 15mg/ml e submetida ao “screening” de cristalização utilizando os kits Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research) a 20°C. Após 30 minutos foram obtidos mini-cristais em 0,4M de fosfato de amônio. Esta condição foi refinada e obtivemos cristais maiores após 48 horas (Figura 10D), mantendo a mesma concentração de proteína, porém reduzindo a concentração de precipitante para 0,2M de fosfato de amônio. Estes cristais são estáveis e resistentes aos crioprotetores: glicerol, etilenoglicol e PEG 400. Mesmo após várias tentativas de refinamento das condições de cristalização, os cristais obtidos não têm índice de difração suficiente para determinação da estrutura de Pab418p. Por isso, resolvemos concentrar nossos esforços em obter informações funcionais e dar continuidade nos estudos estruturais em colaboração com os grupos de pesquisa dos Drs. Nilson I. T. Zanchin e Beatriz Guimarães, no LNLS, Campinas.

### 3.2 Purificação de Pab1135p

Pab1135p é codificada por um gene bastante conservado em archaea e análises de seqüência revelam sua homologia com DUF54, uma proteína de *Thermococcus kodakarensi*, que foi anotada como uma possível subunidade do exossomo (FuKui *et al.*, 2005). Entretanto, *PAB1135* não apresenta homologia com genes de eucariotos. Devido à sua possível correlação com o exossomo de archaea, decidimos iniciar estudos estruturais e funcionais de Pab1135p.

Todos os procedimentos de expressão e purificação foram idênticos aos descritos para Pab418p, com exceção do pH do tampão utilizado (pH 8). O pico de eluição de His-Pab1135p ocorre entre 100 e 200mM imidazol (Figura 11). O His-tag é removido eficientemente após 16 horas de incubação com trombina, assim como Pab1135p apresenta perfil semelhante ao de Pab418p na proteólise com tripsina. Contudo, neste caso a clivagem parece ocorrer entre os aminoácidos -3 (aminoácido -3 em relação a metionina inicial de Pab113p, codificado pelo “polylinker” do vetor de expressão) e 4 em Pab1135p, o que resulta em uma diferença de aproximadamente 2kDa com a proteína contendo o His-tag.

Apesar das similaridades no processo de purificação entre Pab418p e Pab1135p, Pab1135p somente é estável em concentrações menores que 4mg/mL e em solução com elevada concentração de sal  $\geq 300$ mM, dificultando nossas tentativas de tentar cristalizar esta proteína.



### 3.3 Purificação de a-exossomo, aCsl4p e aNip7p

A purificação do trímico que compõe o aRrp4-exossomo (aRrp4p - aRrp41p - aRrp42p) foi realizada seguindo protocolo estabelecido por Ramos *et al.* (2006). Embora não tenha sido possível detectar a expressão de aCsl4p sob as condições estabelecidas para o aRrp4-exossomo, aCsl4p foi eficientemente co-expressa com a proteína aRrp42p. Desta forma, as duas proteínas apresentaram elevado nível de expressão e co-purificaram em coluna de níquel. Para purificação de aNip7p seguimos protocolos estabelecidos por Coltri *et al.* (2004).

### 3.4 Análise da atividade dos possíveis cofatores Pab418p, Pab1135p, aCsl4p e aNip7p junto ao a-exossomo

Os ensaios de atividade de RNase, ligação a RNA e polimerização foram realizados como descrito em Ramos *et al.* (2006), utilizando como substrato o oligo poli-rA(14nt) marcado radioativamente.

Para o ensaio de atividade com aRrp4-exossomo, 0,5, 1 e 10 pmol de proteína foi incubado com substrato por 15 minutos a 60°C. As amostras foram desnaturadas e separadas em gel de poliacrilamida 8% desnaturante.

Pab418p, Pab1135p e aNip7p não possuem atividade de RNase (Figura 12A), como era esperado, pois nenhuma delas apresenta domínio de RNase PH, ou homologia com RNases já descritas. A adição de Pab418p e Pab1135p ao aRrp4-exossomo parece afetar discretamente sua atividade. Por outro lado, aNip7p parece inibir a atividade do aRrp4-exossomo (Figura 12B).

Ensaio semelhante foi realizado para aCsl4-exossomo (Figura 12C). Neste caso o substrato foi rapidamente degradado, mesmo na presença de baixas concentrações de proteína, por isso reduzimos o tempo de reação para cinco minutos. Lorentzen e Conti (2005) também observaram maior atividade do aCsl4-exossomo de *S. solfataricus* em relação à aRrp4-exossomo. Esses resultados reforçam a hipótese de que a associação das diferentes proteínas ao exossomo tem função reguladora. Fica claro neste ensaio, que aCsl4p não apresenta atividade de RNase isoladamente, e quando associada ao anel de RNases PH (aCsl4-exossomo) não altera a atividade





do mesmo. Já a associação das outras proteínas, Pab418p, Pab1135p e aNip7p, ao aCsl4-exossomo, faz com que sua atividade seja levemente inibida (Figura 12C).

Já que a atividade de RNase do exossomo foi afetada na presença das proteínas adicionais, nós resolvemos avaliar a ligação destas proteínas ao RNA, assim como, sua influência junto ao a-exossomo. Os ensaios foram conduzidos como descrito em Ramos *et al.* (2006). Utilizamos 1, 10 e 20pmol de proteína, incubados a 37°C por 30 minutos, com oligo poli-rA(14nt) marcado radioativamente. Nestes ensaios podemos ver que Pab418p e aNip7p ligam RNA (Figura 13).

O ortólogo de Pab418p em *A. Fulgidus*, AfSBDS (Shammas *et al.*, 2005), tem um domínio estrutural de ligação a RNA (RRM-RNA recognition motif) em sua porção C-terminal. A ligação de Pab418p a RNA que observamos deve ocorrer através do domínio C-terminal de Pab418p. aNip7p apresenta o domínio PUA, que também está associado à ligação a RNA (Aravind e Koonin, 1999), contudo, nas condições usadas a ligação a RNA da proteína isolada é pouco acentuada (Figura 13).

Quando associadas ao aRrp4-exossomo, Pab418p e Pab1135p não afetaram a ligação do complexo a RNA. Contudo, quando aNip7p foi adicionada à reação, bandas menores foram detectadas, provavelmente correspondentes a complexos menores que aRrp4-exossomo ligados ao RNA (Figura 13).

aCsl4p, co-purificada com aRrp42p, não ligou RNA, mas quando o exossomo é reconstituído através da adição de aRrp41p, o complexo liga RNA, porém menos eficientemente que aRrp4-exossomo (Figura 14). Büttner *et al.* (2005) descreveram a estrutura de aCsl4p a aRrp4p, as quais estão organizadas em três domínios. Um domínio N-terminal, seguido de um domínio central semelhante à proteína ribossomal S1 e um domínio C-terminal “Zinc-ribbon”, em aCsl4p e KH em aRrp4p. Os domínios N-terminal e S1 formam a interface de interação dessas proteínas ao anel de RNases PH. Ao mesmo tempo em que, o domínio S1 possivelmente regula o acesso do substrato ao sítio ativo das RNases PH, enquanto, os domínios “Zinc-ribbon” e KH, que estão na superfície das proteínas, podem estar envolvidos no reconhecimento de substratos específicos ou cofatores. As evidências estruturais suportam a ligação de aCsl4p a RNA e a sua co-purificação com aRrp42p possibilitou a formação do aCsl4-exossomo, após a adição de aRrp41p. O fato de aCsl4-exossomo não ter ligado RNA eficientemente levanta a hipótese da existência de um substrato específico para esse complexo. Novos experimentos serão conduzidos para testarmos





esta hipótese. Novamente, a adição de Pab418p e Pab1135p não afetaram a ligação observada para o complexo, mas a presença de aNip7p resulta no aparecimento de complexos menores, mesmo quando adicionada apenas ao anel de RNases PH (Figura 14), o que sugere fortemente que aNip7p interaja com alguma das subunidades desse anel, aRrp41p ou aRrp42p, e possivelmente afeta a formação do exossomo.

Depois de avaliar a atividade de RNase e ligação a RNA, nós verificamos a atividade de polimerização dos complexos. Os ensaios foram conduzidos como descrito em Ramos *et al.* (2006), utilizando 5 e 20pmol de proteína incubadas por 30 minutos a 37°C com oligo poli-rA(14nt) marcado radioativamente.

Como descrito anteriormente, a atividade de polimerização é detectada tanto para o anel de RNases PH como para o a-exossomo (Figura 15). O produto da reação com aRrp4-exossomo é maior que o obtido para o anel de RNases PH, pois fica retido no início do gel. aCsl4-exossomo apresenta pouca diferença na taxa de polimerização em relação àquela observada para o anel de RNases PH. A adição de Pab418p e Pab1135p estimulam a polimerização tanto pelo complexo aRrp4-exossomo quanto pelo aCsl4-Exossomo, enquanto que a adição de aNip7p inibe significativamente esta atividade, principalmente a do aRrp4-exossomo.

Os resultados obtidos até aqui são muito interessantes e sugerem que além das proteínas que compõem o "core" do exossomo, as quais são as principais responsáveis pela sua atividade, outras proteínas afetam a atividade total do complexo. Além disso, os dois complexos que foram descritos para o exossomo de *Sulfolobus*, aRrp4-exossomo e aCsl4-exossomo, também estão presentes em *Pyrococcus* e apresentam significativas diferenças em todas as atividades testadas. O resultados da adição de Pab418p e Pab1135p são bastante discretos na atividade de RNase, talvez porque sua interação com o a-exossomo não seja muito estável nessas condições. Mas o aumento na taxa de polimerização na presença destas proteínas é evidente. Em oposição a estes dados, aNip7p tem efeito negativo em todas as atividades dos complexos. No ensaio de ligação a RNA, o complexo formado é menor que aquele correspondendo ao a-exossomo-RNA, indicando fortemente que aNip7p afeta a formação do a-exossomo, e conseqüentemente, sua atividade.

Para caracterizar a interação entre Pab418p, Pab1135p, aNip7p e o a-exossomo, bem como para avaliar se o complexo aCsl4-exossomo foi efetivamente formado, nós realizamos ensaios de gel filtração. Para esta análise nós utilizamos a coluna Superose 6HR 10/30 (GE Healthcare) pré-



equilibrada com 10mM Tris/HCl pH 8, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA. As proteínas foram eluídas em fluxo constante de 0,2mL/minuto. A massa molecular de cada proteína ou complexo foi estimada com base na massa molecular dos padrões: Catalase, 232 kDa; BSA, 67kDa; Ovoalbumina, 43kDa; Quimotripsinogênio, 25kDa e Ribonuclease A, 31,7kDa.

Inicialmente, nós verificamos o volume em que cada proteína ou complexo foi eluído (Figura 16). O anel de RNases PH e o aRrp4-exossomo eluíram em 15,3 e 14,5mL, como previamente observado por Ramos *et al.* (2006). Pab418p, Pab1135p e aNip7p eluem próximo ao volume de eluição de Quimotripsinogênio, 18,5mL. Como a massa calculada para cada uma destas proteínas é 29kDa, 20kDa e 19kDa, respectivamente, concluímos que nas condições testadas estas proteínas são monoméricas.

Em seguida as proteínas foram adicionadas ao anel de RNases PH ou ao aRrp4-exossomo. aRrp42p-aCsl4p, co-purificadas a partir de *E. coli*, foram eluídas em dois picos na gel filtração, um em aproximadamente 17,8mL e outro em 19,5mL, correspondendo provavelmente às proteínas complexadas e às duas livres, respectivamente (Figuras 17 A). A adição de aRrp41p ao complexo aRrp42p-aCsl4p resultou na eluição dessas três proteínas em um volume de aproximadamente 15,7mL, provavelmente correspondendo a reconstituição de aCsl4-exossomo (Figura 17A).

aNip7p é eluída da gel-filtração com um volume de 18,5mL e aRrp4-exossomo com 14,5mL (Figura 16). Quando misturados, um novo complexo é formado, eluindo com um volume de 16,8mL e significativo aumento da absorção a 280nm, e que, quando analisado por SDS-PAGE contém aNip7p, aRrp41p e aRrp42p (Figura 17B). Embora a banda de aRrp4p não seja visível, ainda não podemos excluir que esta também esteja presente, e que a adição de aNip7p leve a alteração da conformação do a-exossomo, sem interferir na interação entre suas subunidades. Entretanto, os dados de gel-filtração somados aos de ligação a RNA indicam que aNip7p interfere na montagem do a-exossomo, refletindo em uma menor atividade de RNase do complexo.

A adição de Pab418p e Pab1135p ao aRrp4-exossomo não altera o perfil de eluição do complexo. Vemos picos correspondentes ao aRrp4-exossomo, que não contém Pab418p ou Pab1135p, e outro correspondente ao perfil de eluição das proteínas isoladas, onde também estão presentes as proteínas do exossomo (Figura 18). Acreditamos que as proteínas do a-exossomo que estão presentes nesta fração de eluição, entre 18 e 19mL são proteínas que se dissociaram do complexo, em função dos processos de manipulação. Estes dados complementam os resultados de









testes de atividade e nos levam à conclusão de que Pab418p e Pab1135p não se associam estavelmente ao a-exossomo, correspondendo ao seu pequeno efeito na atividade do a-exossomo.

Já os dados obtidos com aNip7p, além de reveladores, podem esclarecer a função desta proteína junto ao exossomo de eucariotos, uma vez que revelam que sua estável associação com o complexo é evolutivamente conservada, assim como demonstram que sua ligação ao complexo culmina na dissociação parcial do a-exossomo e conseqüente redução de sua atividade. Maiores informações, entretanto, são necessárias para confirmar esta hipótese.

#### **4. Estudo estrutural e funcional de Ylr022p**

*YLR022C* é um gene essencial de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja proteína está distribuída no núcleo e citoplasma (Hazbun *et al.*, 2003). Experimentos de “microarray” relacionam Ylr022p ao metabolismo de rRNA (Boocock *et al.* 2002), em especial no processo de degradação do 5’ETS e no processamento do 5.8S (Peng *et al.*, 2003). Savchenko e colaboradores (2005) citam sua interação com proteínas ribossomais e diferentes fatores relacionados ao processamento de rRNAs. *YLR022C* é o ortólogo em *S. cerevisiae* de *PAB418*, que está localizado no operon do a-exossomo de *P. abyssi*, e como apresentamos, liga RNA e parece afetar a função do a-exossomo, mas sem ligação estável ao complexo. Diante destas evidências nós decidimos explorar a homologia entre Ylr022p e Pab418p através de estudos estruturais e verificar a relação de Ylr022p com o metabolismo de RNA.

##### **4.1 Purificação de Ylr022p**

Para os estudos estruturais, nós clonamos *YLR022C* no vetor de expressão de *E. coli* pET-28a. Os testes de expressão foram realizados como descrito para Nop17p, sendo que a proteína só foi obtida na forma solúvel quando as bactérias transformadas foram crescidas em 2YT a 30°C e a expressão da proteína induzida pela adição de 10mM de lactose, que foi adicionado em seguida à diluição do pré-inóculo. A cultura (1 litro) foi mantida a 30°C por 16 horas. As células foram coletadas e lisadas em “french-press” na presença de 50mM Tris/HCl pH 7, 500mM NaCl, 5mM imidazol, 1mM PMSF. O extrato total foi submetido à precipitação com sulfato de estreptomicina (na relação 2% peso/volume) por 1 hora, sob agitação a 4°C. O extrato foi centrifugado a

10.000rpm por 30 minutos e em seguida aplicado à coluna de níquel. A proteína foi eluída através de gradiente de imidazol.

O pico de eluição de His-Ylr022p é em 50 mM de imidazol (Figura 19A), mas a proteína é eluída ao longo de todo o gradiente. As frações de eluição foram homogeneizadas, quantificadas e submetidas à proteólise com trombina e tripsina. O His-tag foi eficientemente removido em apenas uma hora de reação com trombina. Já a proteólise com tripsina, resulta em grande e rápida fragmentação de His-Ylr022p (Figura 19B), pois em 5 minutos apenas uma pequena fração da proteína inteira é detectada, o que poderia indicar o não enovelamento da proteína. Por isso, His-Ylr022p foi dialisada em 10 mM acetato sódico pH5 e nós verificamos seu padrão de estrutura secundária por dicroísmo circular (Figura 19C). Ao contrário do esperado, His-Ylr022p estava enovelada, apresentando elevado conteúdo de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ , semelhante ao que foi verificado para Pab418p. Por isso atribuímos a elevada suscetibilidade à tripsina a um possível enovelamento mais distendido para Ylr022p, o que facilitaria o acesso da tripsina aos sítios de clivagem, permitindo sua rápida fragmentação. Nós concentramos a proteína para 12,5mg/mL e iniciamos o “screening” de cristalização utilizando os kits Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research) a 20°C. Após 24 horas foram obtidos esferolitos em presença de 100mM MES pH 6,1, 20% PEG 8000, 200mM Ca(OAc)<sub>2</sub> (Figura 19D). Esta condição foi refinada, mas conseguimos apenas alterar o número, a transparência e o tamanho dos esferolitos. Como temos grande interesse em entender a estrutura e a função de Ylr022p, pois pode se tratar de um novo cofator do exossomo, resolvemos dar continuidade ao trabalho estrutural em colaboração e concentrar nossos esforços em obter dados funcionais.

Como citado anteriormente, e concomitante aos resultados descritos acima, a estrutura do ortólogo de Ylr022p foi descrita em *Archaeoglobus Fulgidus* (Shammas *et al.*, 2005; Savchenko *et al.*, 2005), revelando uma estrutura dividida em três domínios: um novo domínio N-terminal com  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , que foi denominado domínio FYSH, um domínio central com 3  $\alpha$ -hélices e um C-terminal semelhante ao domínio de ferredoxina, que apresenta conformação característica de RRM. Estes domínios se distribuem em forma de “V”, ou seja, uma estrutura que pode facilmente ser acessada por proteases. Explicando o resultado que obtivemos na proteólise com tripsina para Ylr022p.



## 4.2 Ensaio funcionais para Ylr022p

### 4.2.1. Duplo híbrido

Dados gerados em estudos de larga escala com proteínas de levedura, apontam para o envolvimento de Ylr022p no metabolismo de RNA. Para tentar restringir este amplo leque de opções nós resolvemos utilizar o sistema do duplo híbrido, com intuito identificar proteínas com as quais Ylr022p poderia interagir e definir em que via do metabolismo de RNA Ylr022p atua efetivamente. Com este objetivo *YLR022C* foi fusionado ao domínio de ligação ao DNA de *lexA*, (pBTM-YLR022), ou ao domínio de ativação da transcrição de GAL4 (pGAD-YLR022) e transformado (Sherman, 1986) na cepa de levedura L40, com uma biblioteca de cDNA (ATCC 87002), onde os genes estão fusionados ao domínio de ativação de GAL4 (pACT-cDNA), ou com clones de várias proteínas envolvidas em etapas diferentes do metabolismo de RNA, já disponíveis no laboratório: as 11 subunidades do exossomo, envolvido em processamento e degradação de diferentes tipos de RNA; as proteínas Nop53p, Nip7p, fatores do pré-60S; eEFT2p, fator de alongação da tradução; Lsm8p e Prp43p, proteínas envolvidas em splicing e processamento e as proteínas de snoRNP de box H/ACA- Cbf5p, Nop10p, Nhp2p e Gar1p, responsáveis pela pseudouridilação do pré-rRNA, assim como com as proteínas Nop1p, Nop58p, Nop56p e Snu13p, componentes de snoRNP de box C/D, que são responsáveis pelo processo de metilação do pré-rRNA. As interações foram identificadas através da ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*.

A transformação com a biblioteca de cDNA resultou em 620 colônias, que foram transferidas para novas placas e 60 confirmaram crescimento na ausência de histidina na segunda semeadura. Dentre os 60 clones His<sup>+</sup>, 57 também apresentaram expressão do segundo gene repórter *lacZ*. O DNA plasmidial de cada um dos transformantes foi isolado e transformado em HB101 para obtenção dos clones provenientes da biblioteca de cDNA. Após serem isolados, os DNAs dos clones de pACT-cDNA foram re-transformados em L40/pBTM-YLR022, para comprovação das interações, dos quais 17 clones foram seqüenciados. Os genes que estavam em fase de leitura correta, e mantiveram a ativação dos genes repórteres após a segunda transformação estão relacionados na tabela 5 (Figura 20).



**Tabela 5.** Clones positivos no duplo híbrido com Ylr022p.

CLONE	GENE	FUNÇÃO
4	Rpl3	componente ribossomal
5	EFT2	fator de elongação de tradução
12	ND	ND
26	SSP382	ORF não caracterizada, mas possivelmente envolvida em splicing
27	HT2	histona
46	YLR020C/YEH2	<i>Steryl ester hydrolase</i>

Dentre as interações identificadas estão aquelas com Rpl3p e EFT2, indicando o envolvimento de Ylr022p em processamento de rRNA ou montagem do ribossomo, corroborando dados da literatura (Boocock *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003). Ylr022p também interagiu com SSP382, uma proteína ainda não caracterizada, mas que possivelmente está envolvida em splicing. Experimentos de co-purificação utilizando TAP-tag detectaram a interação entre Ylr022p e Prp43p, outro fator de splicing (Peng *et al.*, 2003) que por sua vez também interage com SSP382 e com a histona HT2 (Lebaron *et al.*, 2005). A interação com YEH2 parece ter pouca relação com o papel de Ylr022p no metabolismo de RNA, mas em uma análise de interação de proteínas com lipídios por “microchip”, Ylr022p e YEH2 ligaram fofatidilinositol-4-5-bisposfato (Zhu *et al.*, 2001). Em levedura, este lipídio é produzido via MSS4, uma proteína essencial que, quando depletada da célula, causa desorganização do citoesqueleto de actina e altera a morfologia celular (Desrivières *et al.*, 1998). Os dados de interação com proteínas ribossomais e fatores de splicing, relacionam Ylr022p a mais de uma das vias de processamento de RNA, o que também foi observado para Prp43p e para as proteínas do complexo Lsm (Combs *et al.*, 2006; Kufel *et al.*, 2003).

Os ensaios com as proteínas específicas, disponíveis no laboratório, revelaram a interação de Ylr022p apenas com Nip7p e Prp43p (Figura 20). Ylr022p só interagiu com Nip7p inteira, e não com suas porções N-terminal e o domínio PUA. Entretanto, Ylr022p interagiu com a proteína mutante nip7-1p. Desta forma, a interação entre Ylr022p e Nip7p é semelhante àquela descrita entre Nip7p e Rrp43p por Zanchin e Goldfarb (1999). Estes dados corroboram aqueles de

interação de Ylr022p com Prp43p (Peng *et al.*, 2003) e o possível envolvimento de Ylr022p na maturação do 60S.

Nos ensaios de duplo híbrido a atividade da  $\beta$ -galactosidase foi quantificada por ONPG e os resultados da média de três experimentos e desvios padrão estão apresentados na figura 20B. A quantificação da atividade de  $\beta$ -galactosidase para Lsm8p, não está de acordo com o observado no ensaio de X-gal e por isso, esta não foi considerada uma interação positiva.

#### 4.2.2. Co-imunoprecipitação de RNA e proteínas

Para analisarmos a possível ligação de Ylr022p a RNA e a proteínas relacionadas ao processamento, a cepa W303 foi transformada com YCp33-Gal-Prot-A ou YCp33-Gal-Prot-A-022 e submetida a ensaios de co-imunoprecipitação de RNAs e proteínas através da utilização de IgG-sefarose. Uma fração da resina (correspondendo a eluição) foi utilizada para a análise de proteínas e o restante utilizados para extração de RNA.

Prot-A-022 co-imunoprecipitou Nip7p eficientemente, confirmando a interação detectada no duplo híbrido (Figura 21B).

Na análise dos RNAs co-imunoprecipitados com Prot-A-022, a média das quantificações dos diferentes experimentos realizados revelou que Prot-A-022 co-precipita cinco vezes mais RNA que o controle negativo, Prot-A. Todos os RNAs testados, correspondentes a rRNA, snoRNAs, snRNAs e o pré-mRNA CYH2, foram precipitados mais eficientemente por Prot-A-022 que por Prot-A (Figura 21A). O que foi confirmado através da quantificação dos Northern blots, utilizando Scr1 como controle interno. Resultado interessante é a co-precipitação do snRNA U2, um dos “*small nuclear RNA*” diretamente envolvido em splicing, que corresponde ao snRNA com quem Prp43p interage. Ylr022p também co-precipitou o pré-mRNA de CYH2, o que reforça seu envolvimento em splicing. Além disso, a co-precipitação dos rRNAs 27S, 25S e 5.8S e do snoRNA de box H/ACA, snR10 relacionam Ylr022p ao processamento do pré-60S, assim como a interação com Nip7p. snR10 participa da maturação do 18S, que também foi co-imunoprecipitado por Prot-A-022. Estes resultados correlacionam Ylr022p ao metabolismo de rRNA e a splicing, ao mesmo tempo que indica que a ligação de Pab418p a RNA, esteja conservada evolutivamente. Contudo, a co-purificação de tantos RNAs diferentes com Prot-A-022 sugere ligação inespecífica a RNA.





#### 4.2.3. Ligação de Ylr022p a RNA *in vitro*

Para testarmos se a interação entre Ylr022p e RNA, observada nos experimento de co-imunopurificação, ocorre de forma direta e se essa ligação é específica, nós realizamos experimentos “*in vitro*”, utilizando a proteína recombinante purificada. Os ensaios foram conduzidos como descrito para as proteínas do exossomo de levedura, utilizando o oligonucleotídeo poli-rA(14nt) marcado radioativamente, ou seqüências do rRNA 5.8S ou das regiões espaçadoras do pré-rRNA 35S 5'ETS e ITS2, transcritos “*in vitro*”. Estes RNAs foram incubados com His-Ylr022p em diferentes concentrações, e a ligação analisada em gel de poliacrilamida (Figura 22). No ensaio realizado com 5.8S rRNA nós também avaliamos a especificidade da ligação, através da adição de RNAs competidores.

Como observado na co-imunopurificação com Prot-A-022, His-Ylr022p ligou todos os rRNAs testados, mas mais significativamente a 5' ETS e 5.8S, porções do pré-rRNA 35S onde Peng e colaboradores (2003) sugerem o envolvimento de Ylr022p. Contudo, a ligação ocorre de forma inespecífica, uma vez que a presença do competidor afeta a ligação da proteína ao RNA analisado (Figura 22D). Estes dados sugerem que Ylr022p liga diretamente ao RNA, assim como foi observado para Pab418p. Talvez esta ligação possa funcionar como sinalização em diferentes etapas do metabolismo.

A recente descrição de estrutura do ortólogo de Ylr022p em *Archaeoglobus Fulgidus*, AfSBDS (Shammas *et al.*, 2005), sugere a presença de um domínio estrutural de ligação a RNA (RRM-RNA recognition motif). Nós modelamos Ylr022p, utilizando como base à estrutura de *A. Fulgidus* depositada no PDB (1P9Q). Estas proteínas apresentam 26.8% de identidade e 26% de similaridade. O modelo gerado (Figura 23A) é bastante favorável, uma vez que todos o resíduos foram utilizados e o RMSD é de 1,59 Å. Sendo assim, podemos considerar que a região C-terminal de Ylr022p assume conformação semelhante ao RRM de AfSBDS e é o domínio candidato a desempenhar a interação com RNA que observamos, além disso, comparação dos espectros de dicroísmo circular de Pab418p e Ylr022p descreve a similaridade entre estas proteínas (Figura 23B).





## DISCUSSÃO

Inicialmente, o objetivo deste trabalho era o de determinar a estrutura de proteínas de levedura relacionadas ao metabolismo de RNA. Contudo, devido aos baixos níveis de expressão dessas em *E. coli* e as dificuldades em produzir proteínas estáveis e bem enoveladas, que pudessem produzir cristais passíveis de difração a índices suficientes para a determinação da estrutura das proteínas, nós optamos por concentrar nossos esforços no estudo funcional das proteínas alvo. Como podemos verificar nos inúmeros trabalhos publicados recentemente e nos dados apresentados neste trabalho, as proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas em processamento de RNA participam, na sua grande maioria, de grandes complexos protéicos ou ribonucleoprotéicos (Grandi, *et al.*, 2002; Peng, *et al.*, 2003; Schäfer, *et al.*, 2003; Krogan, *et al.*, 2004), o que talvez possa explicar a dificuldade em se obter proteínas isoladas solúveis. Dentre os exemplos de complexos envolvidos em processamento, podemos citar o SSU processomo, formado pelo snoRNA U3, pelas proteínas Nop1p, Nop56p, Nop58p, Snu13p, 17 Utps e possivelmente outros fatores acessórios, tais como Nop17p, que interage com Nop58p (Dragon *et al.*, 2002); o complexo de splicing, que envolve a associação dos snRNAs U1, U2, U4, U5 e U6, sendo que cada um apresenta um conjunto de proteínas específicas, necessárias para a atividade do snRNP (Brow, 2002); o complexo Lsm, presente no núcleo (Lsm2-8) e citoplasma (Lsm1-7) de *S. cerevisiae*, que participa tanto de processamento de rRNA, como de splicing e degradação de pré-mRNA (He e Parker, 2001; Kufel *et al.*, 2003); e o exossomo, complexo de 10 exonucleases principais, que processa rRNAs, snoRNAs e snRNAs no núcleo e degrada RNAs tanto no núcleo como no citoplasma (Allmang *et al.*, 1999; Anderson e Parker, 1998). Atualmente, a estratégia de co-purificação de proteínas recombinantes parece uma opção bastante promissora e a identificação de complexos homólogos em organismos termófilos está contribuindo muito para a caracterização estrutural e funcional destas proteínas.

Apesar dos dados estruturais obtidos aqui para Nop17p, Ylr022p e Pab418p ainda não permitirem a descrição de sua estrutura terciária, estes geraram informações importantes para os trabalhos futuros e foram fundamentais para a complementação dos dados funcionais que obtivemos.

Nop17p é uma proteína pouco abundante em *S. cerevisiae*, mas a obtenção de anti-soro, a partir da proteína recombinante, permitiu sua identificação em ensaios de co-precipitação com outras proteínas. O elevado conteúdo de “random coil” de Nop17p sugere que ela interaja com outras proteínas celulares e que essa interação seja importante para a manutenção de sua estrutura. As interações identificadas por duplo-híbrido confirmam essa hipótese, já que Nop17p interage com Nop58p, Rrp43p e Nop53p, interações essas confirmadas por ensaios de co-purificação de proteínas (Gonzales *et al.*, 2005; Granato *et al.*, 2005). A interação com Nop58p é a mais forte no sistema do duplo-híbrido, e pode indicar a função principal de Nop17p, de regulação dos snoRNPs de box C/D. Na cepa  $\Delta nop17$ , a ligação de Nop58p a snoRNAs de box C/D é mais intensa e os rRNAs são hipermetilados (Gonzales *et al.*, 2005). O papel da interação de Nop17p com Rrp43p e Nop53p ainda não está claro, mas indica que esta tenha um papel de sinalização para degradação de rRNAs aberrantes pelo exossomo (Gonzales *et al.*, 2005; Granato *et al.*, 2005). Nop53p liga o rRNA 5.8S diretamente e parece regular a função do exossomo, de processamento do rRNA intermediário 7S na formação do rRNA maduro 5.8S (Granato *et al.*, 2005). No sistema do duplo-híbrido, entretanto, Nop53p não interage com o exossomo.

A caracterização da atividade de Rrp43p e dos heterodímeros que compõem o anel de RNases PH em *S. cerevisiae* são fundamentais para o entendimento da função do exossomo e dos fatores que interagem com ele, direta ou indiretamente, alterando sua atividade. Até este momento foram descritas apenas as atividades *in vitro* de Rrp4p, Rrp41p, Rrp44p e Rrp6p (Mitchell *et al.*, 1997; Burkard e Butler, 2000). Entretanto, dados mais recentes (Lorentzen e Conti, 2005; Büttner *et al.*, 2005) e aqueles apresentados aqui indicam que as subunidades do exossomo que fazem parte do anel de RNases PH só degradam RNA na forma de heterodímeros (Rrp41p-Rrp45; Rrp42p-Mtr3p; Rrp43p-Rrp46). Como demonstrado aqui, o anel de RNases PH do exossomo de levedura degrada RNAs exonucleoliticamente *in vitro* até gerar uma molécula de cinco nucleotídeos, que deve corresponder ao tamanho necessário para atingir o sítio ativo das subunidades catalíticas do anel, como no caso do a-exossomo (Lorentzen e Conti, 2005). Os ensaios de degradação de regiões do rRNA *in vitro*, revelaram que apenas alguns nucleotídeos são removidos da extremidade 3', sugerindo que a presença de estruturas secundárias no rRNA funcionam como inibidores da degradação pelo exossomo, como foi descrito em análises *in vivo* (Allmang *et al.*, 1999).

Nos ensaios demonstrados aqui, o exossomo tem atividade hidrolítica. Estes resultados contrastam com aqueles obtidos por Mitchell *et al.* (1997), que mostram atividade fosforolítica de

Rrp41p. Em concordância com nossos resultados, entretanto, análises de seqüência não identificaram sítios de ligação a fosfato em nenhuma das subunidades que constituem o anel de RNases PH do exossomo de levedura (Lorentzen e Conti, 2005).

A influência do complexo TRAMP na atividade do exossomo nuclear foi descrita recentemente (LaCava *et al.*, 2005). O TRAMP é composto pela RNA helicase Mtr4p, pela poli-A polimerase Trf4 e por Air2p (LaCava *et al.*, 2005). Este complexo adiciona uma pequena cauda de poli-A nos RNAs nucleares que serão substrato de degradação pelo exossomo (LaCava *et al.*, 2005). Essa interligação entre um complexo de poliadenilação (TRAMP) e um de degradação (exossomo) pode ter evoluído a partir da PNPase bacteriana, que tem as duas atividades (Godefroy, 1970). De maneira semelhante, o exossomo de archaea pode polimerizar e degradar o RNA (Lorentzen e Conti, 2005; Büttner *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006).

A descrição das estruturas do a-exossomo em *Sulfolobus solfataricus* (Lorentzen e Conti, 2005) *Archaeoglobus fulgidus* (Büttner *et al.*, 2005) e *Pyrococcus* (Ramos *et al.*, 2006) trouxeram informações significativas para o reconhecimento da organização do complexo e seu mecanismo de ação. Três heterodímeros das subunidades com domínios de RNase PH, aRrp41p e aRrp42p, formam um anel hexamérico ao qual se sobrepõem três moléculas de uma das subunidades com domínios de ligação a RNA, aRrp4p ou aCsl4p. Em levedura, as interações foram mapeadas por duplo híbrido, identificando os três heterodímeros diferentes que constituem o anel de RNases PH e as interações de Rrp4p com Mtr3p, Rrp6p, Rrp44p e Rrp41p entre outras (Tavares, tese de mestrado, 2004). Hernández *et al.* (2006) utilizaram outra metodologia para o estudo de complexos protéicos envolvendo co-precipitação das subunidades por Tap-tag e espectrometria de massas. Quando utilizaram amostras do exossomo de levedura citoplasmático (sem a subunidade Rrp6p), eles identificaram as interações já descritas (Oliveira *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2001) dos heterodímeros que compõem o anel de RNases PH e apresentaram evidências para a ligação de Rrp4p, Rrp40p e Csl4p com as proteínas do anel de RNases PH, possivelmente estabilizando sua estrutura (Hernández *et al.*, 2006). Naquele trabalho, Rrp44p foi somente identificada em subcomplexos contendo Rrp42p, Rrp41p e Rrp45p, e considerando-se o tamanho de Rrp44p (114kDa), é razoável supor que ela possa interagir com essas três subunidades ao mesmo tempo (Hernández *et al.*, 2006). Considerando-se essas informações, aqueles autores sugerem que Rrp44p interaja com Rrp41p-Rrp45p-Rrp42p na face do anel de RNases PH oposta àquela onde estão as subunidades que ligam RNA, Rrp4p, Rrp40p e Csl4p (Hernández *et al.*, 2006). Entretanto, dados

obtidos em nosso laboratório indicam que Rrp44p possa interagir também com Rrp4p, e conseqüentemente, ligar-se ao anel de RNases PH na mesma face que Rrp4p (Figura 3; Tavares, tese de mestrado). Análises comparativas entre os complexos dos diferentes organismos (archaea, levedura, humanos, moscas e parasitas) sugerem que possa haver duplicação de subunidades em moscas, e que as interações entre as subunidades também possa variar entre esses organismos (Raijmakers *et al.*, 2004). A obtenção de informações estruturais mais detalhadas deverá esclarecer as diferenças de composição do exossomo nos diferentes organismos.

Além da organização das subunidades do exossomo, outras questões são alvos constantes no estudo desse complexo. Como é a sua regulação? Como ocorre o reconhecimento dos substratos? Qual é a contribuição das proteínas que interagem de forma transiente com o complexo?

O a-exossomo foi identificado em duas formas, uma onde o anel de RNases PH está associado a aCsl4p, e outra a aRrp4p (Büttner *et al.*, 2005). Os resultados deste trabalho demonstram que o complexo formado por aCsl4-exossomo é mais ativo *in vitro* que aquele formado por aRrp4p, sugerindo que além da restrição espacial ao sítio ativo, a associação com proteínas específicas também regula a atividade do exossomo. Por isso, nós investigamos a influência de Pab418p, Pab1135p e aNip7p, junto ao a-exossomo de *Pyrococcus*.

Pab418 faz parte do operon do exossomo de archaea, e os resultados apresentados aqui demonstram que Pab418p liga RNA, fortalecendo a hipótese do operon conter somente genes de proteínas envolvidas em processamento de RNA. Nas condições testadas, entretanto, Pab418p não influencia significativamente a atividade do a-exossomo, o que pode ser devido a uma interação transiente com o complexo. A estrutura de um ortólogo de Pab418p foi determinada recentemente, revelando uma organização em três domínios, um domínio FYSH N-terminal, uma porção central contendo três  $\alpha$ -hélices, possivelmente envolvida na interação entre proteínas, e um domínio C-terminal semelhante ao domínio de ferredoxina (Shammas *et al.*, 2005), que constitui um RRM comum a muitas ribonucleoproteínas, a proteínas envolvidas na regulação de splicing e componentes de snRNPs (Oubridge, *et al.*, 1994).

Pab1135p não apresenta nenhum domínio característico em sua seqüência primária e apesar de estar anotada com uma subunidade do a-exossomo, não interage estavelmente com o a-exossomo, e não influencia a atividade do complexo. A influência nas atividades do a-exossomo pela adição de Pab418p e Pab1135p é mais significativa na polimerização, tanto pelo aRrp4-



exossomo como pelo aCsl4-exossomo. Como o objetivo deste trabalho foi de verificar a participação dessas proteínas na atividade do a-exossomo, ainda resta investigar se assim como aCsl4p e aRrp4p, Pab418p e Pab1135p são capazes de formar complexos com o anel de RNases PH.

Os resultados obtidos com aNip7p são muito interessantes e revelaram um efeito negativo em todas as atividades do a-exossomo. Análise da estrutura de aNip7p, identificou a presença do domínio PUA, possivelmente envolvido na ligação de RNA (Aravind e Koonin, 1999). Nós confirmamos a ligação de aNip7p a RNA através de ensaios *in vitro*, utilizando um oligoribonucleotídeo oligo poli-rA(14nt), mas seu efeito na ligação do a-exossomo ao mesmo substrato foi intrigante. A adição de aNip7p ao anel de RNases PH ou ao a-exossomo fez com que a ligação a RNA formasse complexos menores que a-exossomo-RNA. A alteração do a-exossomo por aNip7p foi confirmada pelos ensaios de gel filtração, pois aNip7p se liga ao anel de RNases PH ou ao aRrp4-exossomo, resultando na desestabilização do complexo aRrp4p-aRrp41p-aRrp42p. Além disso, a interação aNip7p-a-exossomo leva a um surpreendente aumento da absorção a 280mM, possivelmente devido à mudança de conformação das subunidades do complexo. A melhor candidata à ligação de aNip7p é aRrp42p, que apresenta maior homologia com Rrp43p de *S. cerevisiae*, já que Rrp43p e Nip7p de levedura interagem. A redução da atividade do a-exossomo na presença de aNip7p deve se dar, conseqüentemente, por sua interferência na estabilidade do complexo. Resta saber se a interação de aNip7p com o a-exossomo também interfere na ligação de aRrp4p e aCsl4p ao anel de RNases PH, já que aRrp4p não é muito estável e por isso não foi facilmente identificada nos géis de poliacrilamida após os ensaios de gel filtração (Figura 24).

Em levedura, Nip7p é essencial para a viabilidade celular e formação da subunidade ribossomal 60S (Zanchin *et al.*, 1997). Sua depleção causa uma série de defeitos no processamento do pré-rRNA, em especial acúmulo do intermediário 27S e redução dos níveis dos rRNAs 25S e 5.8S (Zanchin *et al.*, 1997). Mutantes de Rrp43p apresentam acúmulo dos intermediários 27S e 7S e redução do nível do rRNA 5.8S maduro, fenótipo semelhante ao observado em mutantes de Nop53p, proteína que se liga diretamente ao rRNA 5.8S. O papel de Nip7p no processamento precede a atividade de RNase do exossomo, mas ainda resta saber se em levedura, Nip7p também desestabiliza o exossomo e qual é o papel de Nop53p. Neste caso, Nip7p poderia ligar o rRNA 27S através do domínio PUA, ou via Nop53p e permanecer associada a ele após a clivagem em C<sub>2</sub>,



quando o rRNA 7S é liberado, e sinalizar ao exossomo o ponto de parada da degradação. A interação de Nip7p com Rrp43p, pode resultar em alterações conformacionais das subunidades, desestabilizando o exossomo e promovendo sua liberação do 3' do pré-rRNA 5.8S (Figura 25). Esta é uma hipótese que poderá ser avaliada através de novos experimentos *in vitro*.

Outra questão que surge a partir dos dados discutidos acima é a de que momento ocorre a interação Nop17p-Nop53p, já que Nop53p também interage com Nip7p, que, por sua vez, interage com Rrp43p. Uma alternativa possível é a de que Nop17p e Nip7p atuem como ponte na ligação de Nop53p ao exossomo, e talvez a alternância da interação de Nop53p com Nop17p e Nip7p separe duas vias de processamento de rRNA. Uma via, na qual o rRNA é corretamente processado e apenas alguns nucleotídeos são removidos, e outra, onde o rRNA que não é corretamente processado é totalmente degradado. Essa hipótese, entretanto, ainda tem que ser comprovada experimentalmente.

Além da interação com Rrp43p e Nop53p, Nip7p também interage com Nop8p e Ylr022p. Todas proteínas relacionadas à maturação da subunidade pré-60S, embora os efeitos diretos de Ylr022p ainda não tenham sido esclarecidos. Os dados de duplo híbrido com Ylr022p revelam sua interação com diferentes proteínas relacionadas ao metabolismo de rRNAs da subunidade 60S, Rpl3p, eFT2, Nip7p e Prp43p. Ensaio de co-imunoprecipitação revelaram que Ylr022p co-precipita os rRNAs 27S, 25S e 5.8S, assim como o snoRNA snR10, responsável pela pseudouridilação do 25S na posição  $\Psi$ 2919, que fica no centro de transferência de peptídeo e está diretamente relacionada à integridade da subunidade 60S e à síntese de proteínas (King *et al.*, 2003). Além disso, snR10 está relacionado às clivagens iniciais do pré-rRNA 35S (Venema e Tollervey, 1995), o que o correlaciona com a correta maturação do 18S, rRNA que também foi co-precipitado por Ylr022p. Embora a ligação a RNA por Ylr022p ocorra de forma inespecífica *in vitro*, sua interação com RNAs e fatores protéicos envolvidos em etapas fundamentais para a viabilidade celular apontam para sua participação nestes eventos.

Outras informações apontam para o envolvimento de Ylr022p em splicing: sua interação com Prp43p e SSP382, e a co-precipitação do snRNA U2 e do pré-mRNA CYH2. Outros experimentos precisam ser realizados para verificar se há uma relação direta de Ylr022p com o snRNA U2, ou se sua co-imunoprecipitação é efeito da interação com Prp43p.

Apesar de não termos detectado a interação direta de Ylr022p com componentes do exossomo, como dito acima, ela interage com Nip7p, que interage com Rrp43p e todas apresentam



relação direta com o metabolismo do rRNA 5.8S. Com isso, não podemos descartar a hipótese de que Ylr022p tenha função correlacionada ao exossomo. Ylr022p está presente tanto no núcleo como citoplasma, como o exossomo. Liga diferentes RNAs, potenciais substratos para o exossomo, e por isso, não podemos descartar a possibilidade de que a interação do Ylr022p ao pré-mRNA CYH2, esteja relacionada à sua degradação pelo exossomo. Estas hipóteses ainda precisam ser testadas e sugerem que ainda temos muito para desvendar da complexa rede do metabolismo de RNA. Muitos fatores estão envolvidos em mais de uma etapa, a interferência em determinados passos promove o bloqueio de outros, possivelmente como mecanismos de sinalização de erro no processamento e manutenção da viabilidade celular.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho várias proteínas foram alvo de estudo estrutural e funcional, envolvidas em diferentes etapas de processamento de RNA:

- No estudo funcional do exossomo de levedura, foi caracterizada a atividade exonucleolítica do anel de RNases PH, que é hidrolítica e depende da formação dos três heterodímeros Rrp41p-Rrp45p, Rrp42p-Mtr3p e Rrp43p-Rrp46p.
- No estudo de cofatores do exossomo de archaea, aNip7p foi a proteína estudada que mais influencia a atividade desse complexo, inibindo-o.
- O estudo funcional das ortólogas Pab418p e Ylr022p nos permitem afirmar que essas são novas proteínas que ligam RNA, possivelmente envolvidas nas vias de processamento das quais o exossomo participa.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., e Mitchell, P. (1999). *Genes Dev.*, **13**, 2148-2158.
2. Anderson, J.S. e Parker, R.P. (1998). *EMBO J.*, **17**, 1497-1506.
3. Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. e Lis, J.T. (2002). *Nature*. **420**, 837-841.
4. Aravind, L. e Koonin, E. V. (1999). *J. Mol. Evol.* **48**, 291-302.
5. Bachellerie, J.P., Cavaille, J. e Huttenhofer, A. (2002). *Biochimie*. **84**, 775-90
6. Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. e Fields. S. (1993). *Biotechniques*. **14(6)**, 920-924.
7. Bartel, P.L e Fields, S. (1995). *Methods Enzymol.* **254**: 241-263.
8. Boocock, G. R. G., Morrison, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. D., e Rommens, J. M. (2002). *Nature genetics*, **33**, 97-101.
9. Brow, D.A. (2002). *Annu. Rev. Genet.* **36**, 333-360.
10. Burkard, K. T. D. e Butler, S. (2000). *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 604-616.
11. Butler, J. S. (2002). *TRENDS in Cell Biology*. **12**. 90-96.
12. Büttner, K., Wenig, K. E Hopfner, K. (2005). *Molecular Cell*, **20**, 461-471.
13. Chekanova, J.A., Dutko, J. A., Mian, S. e Belostotsky, D. A. (2002). *Nucleic Acids Research*, **30**, 695-700.
14. Chen, D.C., Yang, B.C. e Kuo, T.T. (1992). *Current Genetics*. **21(1)**: 83-84.
15. Chen, W., Bucaria, J., Band, D. A., Sutton, A., and Sternglanz, R. (2003). *Nucleic Acids Research*, **31**, 690-699.
16. Clark, M. W., M. L. Yip, J. Campbell, e J. Abelson. (1990). *Journal Cell Biology*. **111**, 1741-1751.
17. Coltri, P.P., Guimaraes, B.G., Oliveira, C.C. e Zanchin, N.I. (2004). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **60**, 1925-1928.
18. Combs, D.J., Nagel, R.J., Ares, M, Jr. e Stevens, S.W. (2006). *Molecular and Cellular Biology*. **26(2)**:523-534.
19. Decker, J.C. (1998). *Curr. Biol.* **8**: R238-R240.
20. DeRisi, J. L., Iyel, V. R. e Brown, P. O. (1997). *Science*, **278**, 680-686.

21. Desriviers, S., Cooker, F. T., Parker, P. J. e Hall, M. N. (1998). *J. Biol Chem.* **273**, 15787-15793.
22. Dobbyn, H. C. e O'Keefe, R. T. (2004). *RNA*, **10**, 308-320.
23. Dragon, F., Gallagher, J. E. e Compagnono-Post, P. A. (2002). *Nature*. **9**, 967-970.
24. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. e Elledge, S.J. (1993). *Genes Dev.* **7(4)**:555-569.
25. Estévez, A., Kempf, T., e Clayton, C. (2001). *EMBO J.*, **20**, 3831-3839.
26. Evguenieva-Hackenberg, E., Walter, P. Hochleitner, E., Lottspeich, F. e Klug, G. (2003). *EMBO Rep.*, **4**, 889-893.
27. Fatica, A., Cronshaw, A., D., Dlakic, M. e Tollervey, D. (2002). *Molecular and Cellular Biology*, **9**, 341-351.
28. Fatica, A., e Tollervey, D. (2002). *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 313-318.
29. Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakié, M., e Tollervey, D. (2003). *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 7053-7065.
30. Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakié, M., e Tollervey, D. (2003). *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 1798-1807.
31. Frischmeyer, P. A., Hoof, A. v., O'Donnell, K., Guerrerio, A. L., Parker, R. e Dietz, H. C. (2002). *Nature*. **295**, 2258-2261.
32. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., e Fasiolo, F. (2003). *Gene*. **313**, 17-42.
33. Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., e Imanaka, T. (2005). *Genome Research*, **15**, 352-63.
34. Ganot, P., Bortolin, M. L. e Kiss. T. (1997). *Cell*, **89**, 799-809.
35. Gaspin, C., Cavaille, J., Erauso, G. e Bachellerie, J.P. (2000). *Journal Molecular Biology*, **297**, 895-906.
36. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneaus, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., and Andre, B. (2002). *Nature*, **418**, 507-518.
37. Ginzberg, H., Shin. J., Ellis, L. Goobie, S., Morrison, J., Corey, M., Durie, P. R. e Rommens, J. M. (2000). *American journal of human genetics*, **66**, 1413-1416.
38. Godefroy, T. (1970). *European Journal Of Biochemistry*. **14**, 222-231.
39. Gonzales, F. A., Zanchin, N. I. T., Luz, J. S., and Oliveira, C. C. (2005). *Journal Molecular Biology*. **346**, 437-455.

40. Granato, D. C., Gonzales, F. A., Luz, J. S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G. M., e Oliveira, C. C., (2005). *Febs Journal*. **272**, 4450-4463.
41. Grandi, P., Rybin, V., Babler, J., Petfalski, E., Straub, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A., e Hurt, E. (2002). *Molecular Cell*, **10**, 105-115.
42. Granneman, S., Nandineni, M. R. e Baserga, S. J. (2005). *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 10352-10364.
43. Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997). *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
44. Hanahan, D. (1983). *Journal Molecular Biology*. **166**, 557.
45. Hazbun, T. R., Malmström, L., Anderson, S., Graczyk, B. J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B. A., Aranda, J. D., McDonald, W. H., Chiu, C., Snyderman, B. E., Bradley, P., Muller, E. G. D., Fields, S., Baker, D., Yates III, J. R., e Davis, T. (2003). *Molecular Cell*, **12**, 1353-1365.
46. He, W. e Parker, R. (2001). *Genetics*, **158**, 1445-1455.
47. Hernandez, H., Dziembowski, A., Taverner, T., Seraphin, B., Robinson, C.V. (2006). *EMBO Rep.* **7**, 605-610.
48. Hong, B., Brockenbrough, J.S., Wu, P. e Aris, J.P. (1997). *Molecular and Cellular Biology*. **1**, 378-388.
49. Horak, C. E. e Snyder, M. (2002). *Genomics*, **2**, 171-180.
50. Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., e O'Shea, E. K. (2003). *Nature*, **425**, 686-691.
51. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R. Yoshida, M., Hattori, M., e Sakaki, Y. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 4569-4574.
52. James, P., Halladay, J. e Craig, E.A.(1996). *Genetics*, **144**, 1425-1436.
53. Jiang, T. e Altman, S. (2002). *PNAS*, **99**, 5295-5300.
54. Kiss, T. (2001) *EMBO Journal*. **20**, 3617-3622.
55. Kohrer, K. e Domdey, H. (1991). *Methods Enzymol.* **194**, 398-405.
56. Kressler, D., Linder, P. e de la Cruz, J. (1999). *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 7897-7912.
57. Krogan, N. J., Peng, W., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadian, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Lalev, A., Zhang, W., Davierwala,



- A. P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A. P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J. E., Hughes, T. R., Emili, A., e Greenblatt, J. F. (2004). *Molecular Cell*, **13**, 225-239.
58. Kufel, J., Allmang, C., Petfalski, E., Beggs, J. e Tollervey, D. (2003). *J Biol Chem*. **278(4)**:2147-2156.
59. Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S. e Snyder, M.(2002). *Genes Dev.* **16**, 707–719.
60. LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A. e Tollervey, D. (2005). *Cell*. **121**, 713-724.
61. Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A. L., Desgrès, J. e Vandenhoute, J. (1994). *Journal Molecular Biology*. **241**, 492-497.
62. Lebaron, S., Froment, C., Fromont-Racine, M., Rain, J.C., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M. e Henry Y. (2005). *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 9269-9282.
63. Lygerou, Z., Allmang, D., Tollervey, D. e Séraphin, B. (1996). *Science*. **272**, 268-270.
64. Lorentzen, E., Walter, P., Fribourg, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Klug, G. e Conti, E. (2005). *Nature structural and molecular biology*.**12**, 575-581.
65. Lorentzen, E. e Conti, E. (2005). *Molecular Cell*. **20**, 473-481.
66. Lowe, T. M. e Eddy, S. R. (1999). *Science*. **283**, 1168-1171.
67. Miller, J. H. (1972). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
68. Mitchell, P., Petfalski, E. e Tollervey, D. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 502-513.
69. Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M. e Tollervey, D. (2003). *Molecular and Cellular Biology*. **23**, 6982-6992.
70. Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. and Tollervey, D. (1997). *Cell*, **91**, 457-466.
71. Mitchell, P. and Tollervey, D. (2000). *Nature structural biology*. **10**, 843-846.
72. Morrissey, J., Tollervey, D. (1995). *TIBS*, **20**, 78-82.
73. Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S. e Wilusz, J. (2002). *EMBO Journal*. **21**, 165-74.
74. Nissan, T, A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. e Hurt, E. (2002). *EMBO Journal*, **21**, 5539–5547.
75. Oeffinger, M. e Tollervey, D. (2003). *EMBO Journal*, **22**, 6573-6583.

76. Oliveira, C. C., Gonzales, F. A. e Zanchin, N. I. T. (2002). *Nucleic Acids Research*, **30**, 4186-4198.
77. Oubridge, C., Ito, N., Evans, P. R., Teo, C. H. e Nagai, K. (1994). *Nature*, **372**, 432-438.
78. Peng, W. T., Robinson, M. D., Mnaimneh, S., Krogan, N. J., Cagney, G., Morris, Q., Davierwala, A. P., Grigull, J., Yang, X., Zhang, X., Mitsakakis, N., Ryan, O. W., Datta, N., Jojic, V., Pal, C., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B. K., Wu, L. F., Altschuler, S. J., Roweis, S., Frey, B. J., Emili, A., Greenblatt, J. F., e Hughes, T. R. (2003). *Cell*, **113**, 919-933.
79. Piper, P. W., Bellatin, J. A., Lockheart, A. (1983). *EMBO Journal*, **2**, 353-359.
80. Raijmakers, R., Noordman, Y. E., van Venrooij, W. J., Pruijn, G. J. M. (2002). *J. Mol. Biol.* **315**, 809-818.
81. Raijmakers, R., Schilders, G. e Pruijn, G. J. M. (2004). *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 175-183.
82. Ramos, C. R. R., Oliveira, C. L. P., Torriani, I. L., Oliveira, C. C. (2006). *J Biol Chem.* **281(10)**, 6751-6759.
83. Reimer, G., Scheer, U., Peters, J. M., Tan, E. M. (1986). *J. Immunol.*, **137**, 3802-3808.
84. Rokmill, B., Lambie, E. C., Roeder, G. C. (1974). *Methods in enzymology.* **194**, 146-149.
85. Rout, M. P., Aitchinson, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., Chait, B. T. (2000). *J. Cell Biol*, **148**, 635-651.
86. Rozenski, J., Crain, P. F. e McCloskey, J. A. (1999). *Nucleic Acids Research*, **27**, 196-197.
87. Sambrook, J. e Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*, **3rd**.
88. Sánchez, R., Piper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Mirkovic, N., Sali, A. (2000). *Nature structural biology.* **7**, 986-990.
89. Savchenko, A., Krogan, N., Cort, J.R., Evdokimova, E., Lew, J.M., Yee, A.A., Sanchez-Pulido, L., Andrade, M.A., Bochkarev, A., Watson, J.D., Kennedy, M.A., Greenblatt, J., Hughes, T., Arrowsmith, C.H., Rommens, J.M, e Edwards, A.M. (2005). *J Biol Chem.* **280(19)**, 19213-19220.
90. Schäfer, T., Straub, D., Petfalski, E., Tollervey, D., e Hurt, E. (2003). *EMBO Journal*, **22**, 1370-1380.
91. Shammass, C., Menne, T.F., Hilcenko, C., Michell, S.R., Goyenechea, B., Boocock, G.R., Durie, P.R., Rommens, J.M., e Warren, A.J. (2005). *J Biol Chem.* **280(19)**, 19221-19229.

92. Sherman, F., Fink, G.R. e Hicks, J.B. (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
93. Symmons, M. F., Williams, M. G., Luisi, B. F., Jones, G. H., Carpousis, A. J. (2002). *TRENDS in Biochemical Sciences*. **27**, 11-17.
94. Tavares, J. R. (2004). *Tese de mestrado apresentada junto ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP*.
95. Thornton, J. M., Todd, A. E., Milburn, D., Borkakoti, N., Orengo, C. A. (2000). *Nature structural biology*. **7**, 991-994.
96. Tollervey, D. e Kiss, T. (1997). *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 337-342.
97. Trapman, J., Retèl, J. e Planta, R. J. (1975). *Exptl. Cell Res.* **90**, 95-104.
98. Treadwell, E. L., Alspaugh, M. A., Wolfe, J. F. e Sharp, G. C. (1984). *J. Rheumatol.* **11**, 658-662.
99. Tschochner, H. e Hurt, E. (2003). *Trends in Cell Biology*. **13**, 255-263.
100. Udem, S. A. e Warner, J. R. (1972). *J. Mol. Biol.* **65**, 227-242.
101. van Hoof, A., Lennertz, P. e Parker, R. (2000A) *EMBO Journal*. **19**, 1357-1365.
102. van Hoof, A., Parker, R. (2002). *Current Biology*. **12**, 285-287.
103. van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E. e Parker, R. (2000B) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8230-8243.
104. Venema, J. e Tollervey, D. (1995). *Yeast*. **11**, 1629-1650.
105. Venema, J., Bousquet-Antonelli, C., Gelugne, J. P., Caizergues-Ferre, M., Tollervey, D. (1997). *Molecular and Cellular Biology*. **17**, 3398-3407.
106. Venema, J. e Tollervey, D. (1999). *Annu. Rev. Genet.* **33**, 261-311.
107. Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. e Rothstein, R. (1989). *Cell*. **58(2)**:409-19.
108. Wang, H., Boisvert, D., Kim, K. K., Kim, R., e Kim, S-H. (2000). *EMBO Journal*, **19**, 317-323.
109. Wang, Z. e Kiledjian, M. (2001). *Cell*. **107**, 751-62.
110. Watkins, N.J., Gottschalk, A., Neubauer, G., Kastner, B., Fabrizio, P., Mann, M. e Luhrmann, R. (1998). *RNA*. **12**, 1549-1568.
111. Widner, W.R. e Wickner, R.B. (1993). *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4331-4341.
112. Wolfe, J. F., Adelstein, E. e Sharp, G. C. (1977). *J. Clin. Invest.* **59**, 176-178.

113. Zanchin, N.I., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F. e Goldfarb D.S.(1997). *Mol Cell Biol.* **17(9)**:5001-15.
114. Zanchin, N.I.T., e Goldfarb, D.S. (1999A). *Nuc. Acids Res.*, **27**, 1283-1288.
115. Zanchin, N.I.T., e Goldfarb, D.S. (1999B). *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 1518-1525.
116. Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M. e Snyder, M. (2001). *Science*. **293**, 2101-2105.

## ANEXOS

- I. Curriculum
  
- II. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* 2005.437-455.
  
- III. Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 2005. 272 (17): 4450-4463.

## CURRICULUM VITAE

### 1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: Juliana Silva da Luz

Nacionalidade: brasileira

Data de nascimento: 18/10/1978      Naturalidade: Passo Fundo

CPF: 802757610-53

RG: 5073646803      Órgão expedidor: SSP      UF: RS

Endereço: Av. José Alves Cunha Lima, 251. Butantã.

São Paulo, SP.

05360-050

Telefone: (11) 37190993/ (11)84727278

e-mail: [jsluz@iq.usp.br](mailto:jsluz@iq.usp.br)

### 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Doutorado em Ciências, área de concentração bioquímica, pela Universidade de São Paulo, Instituto de Química - Departamento de Bioquímica. São Paulo - SP. Início em fevereiro de 2002 e aprovada no exame de qualificação em novembro de 2005.

“Purificação e determinação da estrutura da proteína codificada pelo gene YHR034C de *S. cerevisiae*”

2.2 Graduação em Ciência Biológicas (Licenciatura plena/Bacharelado) pela Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS, no período de 1996 a 2000.

### 3. PUBLICAÇÕES

3.1 **Rodrigues, O., Didonet, A. D., Lhamby, J. C. B., Bertagnolli, P. F. e Luz, J. S.**

Resposta quantitativa do florescimento da soja à temperatura e ao fotoperíodo. *Pesq. agropec. bras.* 2001. V. 36, nº. 3, p. 431-437.

3.2 **Gonzales, F. A., Zanchin, N. I. T., Luz, J. S., and Oliveira, C. C.** Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* 2005. 437-455.

3.3 **Granato, D. C., Gonzales, F. A., Luz, J. S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G. M., and Oliveira, C. C.** Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 2005. 272(17):4450-63.

#### 4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

4.1 46º Congresso Nacional de Genética, realizado de 19 a 23 de setembro/00.

**Apresentação do poster:** Análise genotóxica da água do Rio Passo Fundo através do teste de *Allium*

4.2 VI Congresso do Departamento de Bioquímica da USP, realizado de 14 a 15 de abril de 2003.

**Apresentação do poster:** Luz, J. S., Martin, F. J. M. e Oliveira, C. C. Caracterização estrutural da proteína codificada pelo gene YHR034C de *Saccharomyces cerevisiae*

4.3 XXXIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizado de 18 a 21 de maio de 2003.

**Apresentação do poster:** Luz, J.S., Gonzáles, F.A., Zanchin, N.I.T., Martin, F. J. M. and Oliveira, C.C. Structural and functional characterization of the Yeast protein 137p

4.4 RNA 2003, 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, realizado de 01 a 6 de junho de 2003.

**Apresentação do poster:** Gonzáles, F.A., Zanchin, N.I.T., Luz, J.S. and Oliveira, C.C. Characterization of Rmflp, a novel Yeast protein interacting with the exosome subunit Rrp43p that is involved in the Early steps of pre-rRNA processing

4.5 VII Congresso do Departamento de Bioquímica da USP, realizado de 5 a 6 de abril de 2004.

**Apresentação do poster:** Luz, J.S., Gonzáles, F.A., Guimarães, B.G., Barbosa, J.A.R.G., Medrano, F.J. and Oliveira, C.C. Caracterização estrutural de um novo fator de regulação da metilação de rRNA em *Saccharomyces cerevisiae*

4.6 XXXIIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizado de 18 a 21 de maio de 2004.

**Apresentação do poster:** Luz, J.S., Gonzáles, F.A., Guimarães, B.G., Barbosa, J.A.R.G., Medrano, F.J. and Oliveira, C.C. Structural characterization of a novel *Sacchromyces cerevisiae* rRNA methylation regulatory factor

4.7 RNA 2003, 9<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, realizado de 01 a 6 de junho de 2004.

**Apresentação do poster:** Gonzáles, F.A., Zanchin, N.I.T., Luz, J.S. and Oliveira, C.C. Characterization of Rmf1p, a novel Yeast protein interacting with Nop58p that is involved in the Early steps of pre-rRNA processing

4.8 RNA 2003, 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, realizado de 24 a 29 de maio de 2005.

**Apresentação do poster:** Granato, D.C., Gonzáles, F.A., Luz, J.S., and Oliveira, C.C. Nop53p, na essencial nucleolar protein tha interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-RNA processing in *Saccharomyces serevisiae*

4.9 XXXIV<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizado de 2 a 5 de junho de 2005.

**Apresentação do poster:** Granato, D.C., Gonzáles, F.A., Luz, J.S., and Oliveira, C.C. Nop18, an essencial nucleolar protein, is involved in the late stesp of pré-rRNA processing in *Saccharomyces serevisiae*

4.10 10<sup>th</sup> Congress of World Muscle Society

**Apresentação do poster:** Mitne-Neto, M., Nishimura, A.L., Gonzalez, F. A., Luz, J. S. Ramos, C.R.R., Soares-Netto, L.E., Oliveira, C.C., Zatz, M. Secondary structure characterization of VAP-B, tha protein related with amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8)