

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ELLEN KAZUMI OKUDA

Estudo dos mecanismos de transporte celular das  
subunidades do complexo exossomo em *Saccharomyces*  
*cerevisiae*.

Versão corrigida da Dissertação

São Paulo

10/09/2020

ELLEN KAZUMI OKUDA

Estudo dos mecanismos de transporte celular das  
subunidades do complexo exossomo em *Saccharomyces*  
*cerevisiae*.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química*  
*da Universidade de São Paulo para obtenção*  
*do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Carla Columbano de Oliveira

São Paulo

2020

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

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

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

O41e Okuda, Ellen Kazumi  
Estudo dos mecanismos de transporte celular das subunidades do complexo exossomo em *Saccharomyces cerevisiae*. / Ellen Kazumi Okuda. - São Paulo, 2020. 159 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: Oliveira, Carla Columbano

1. Transporte nuclear. 2. NLS. 3. Nucleolo. 4. Exossomo. I. T. II. Oliveira, Carla Columbano, orientador.



Este trabalho é dedicado aos meus pais:

**Edson e Elisa.**

Eu sou grata por todo o amor e apoio.

Obrigada por sempre me ajudarem voar.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, por me proporcionar trabalhar em um projeto desafiador. Além da oportunidade, agradeço pela orientação, paciência, incentivo e disponibilidade.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Alexis Gonzales Zubiato pela paciência, orientação e pelos inúmeros cafés.

Thanks to Prof. Dr. Olivier Gadal, for accepting me in his lab, for guiding me, being patient, for telling me a lot of histories about France and for all the wine and cheese.

Agradeço a todos os membros e ex-membros do laboratório da Profa. Dra. Carla, por toda a ajuda durante meu mestrado e por todas as risadas. Obrigada Fiorella, Paola, Fernando, Felipe Carvalho, Felipe Bagatelli, Luiz, Thierry, Ivanilde, Flávia e Gabi. Obrigada especialmente para Maria Griselda e Alessandra por tanto me ajudarem em tantas coisas.

Thanks to all the member of Dr. Olivier lab, specially to Marta, Lise and Isabelle. Thank you very much for everything you had done for me. I really appreciate all the help. I specially thank Isabelle for helping me with electron microscopy experiments.

Thanks to Sylvain Cantaloube for the spinning-disk microscopy training and for all the help editing and quantifying my images. Thanks for the development of “Macro”.

Agradeço ao CEFAP e a Central Analítica por todo o serviço e suporte prestado. Agradeço principalmente ao técnico de microscopia confocal Mário Costa Cruz, por todo o suporte, atenção e por me mostrar imagens incríveis.

Agradeço ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho pelo suporte e uso do microscópio de fluorescência. Agradeço também aos pós-graduandos Arthur e Luciana por toda a ajuda.

Agradeço aos meus amigos cientista Paola, Fiorella, Felipe Carvalho e Ingrid por todo o carinho, suporte, broncas e ajudas. Vocês são presentes que a USP me deu, e espero leva-los para sempre na minha vida.

Agradeço a todos os meus amigos pelas conversas, caronas, jantares e ajudas, especialmente Aline, Minami, Kelly e Évelyn.

Agradeço aos meus pequenos Pipins pelo amor.

Agradeço a minha família. Agradeço ao meu tio, Emílio e a minha tia, Márcia, por todo o carinho. Agradeço ao meu irmão, Emerson, por toda as risadas e descontrações. Agradeço a Mitiko por todo o carinho. Agradeço a minha falecida avó Kimiko e ao meu avô Akira por todo o amor. Agradeço à minha avó Kyoko por tudo de maravilhoso que ela faz por mim e pelas conversas sobre o passado. Agradeço ao meu falecido avô Keiji, por toda a força e inspiração.

Agradeço a Felipe Miyashiro por todo o amor, companheirismo e todas as broncas objetivas.

Agradeço aos meus pais, Edson e Elisa, por todo o amor e suporte. Obrigada por sempre me incentivarem e me darem forças. Obrigada por sempre iluminarem meu caminho e me guiar.

Agradeço a Kami-sama, por me dar forças, coragem e proteção.

Agradeço ao programa de Bioquímica do Instituto de Química (USP)

Agradeço ao CNPq e a FAPESP (2017/17777-9) pelo apoio financeiro nacional.

Agradeço a FAPESP (2018/19451-6), ao CBI e ao CNRS pelo apoio financeiro internacional.

“May the wind under your wings bear you  
where the sun sails and the moon walks”

**O Hobbit**

J. R. R. Tolkien



## Resumo

OKUDA, E. K. Estudo dos mecanismos de transporte celular das subunidades do complexo exossomo em *Saccharomyces cerevisiae*. 2020. 161. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O exossomo é um complexo multiproteico envolvido em processamento e degradação de vários tipos de RNA em eucariotos. Este complexo está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma da levedura. O complexo exossomo possui duas subunidades catalíticas: Rrp6, a qual é exclusivamente nuclear; e Rrp44, que possui domínios endonucleolítico e exonucleolítico, sendo essencial para a sobrevivência da célula. O objetivo do presente trabalho foi analisar a localização do complexo exossomo e as vias de transporte de suas subunidades para o núcleo celular, com foco na subunidade Rrp44. Para tal, a principal técnica empregada neste trabalho foi a microscopia de fluorescência, através da qual foram feitas análises utilizando-se diversas cepas mutantes e fusões proteicas com GFP e com mCherry. Os resultados apresentados mostram uma localização subnucleolar do complexo exossomo quando suas subunidades são expressas em níveis endógenos, sob controle dos seus próprios promotores, em fusão com GFP. As subunidades Rrp6 e Rrp44 localizam-se no núcleo mesmo quando superexpressas. Já outras subunidades do complexo, como Rrp41 e Rrp43, apresentam forte sinal citoplasmático na mesma condição de expressão. Ademais, pudemos identificar os possíveis sinais de localização nuclear da subunidade Rrp44, reconhecidos pelas carioferinas essenciais Srp1 e Kap95,

responsáveis pelo transporte nuclear de Rrp44. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o exossomo de levedura está principalmente localizado no núcleo e concentrado no nucléolo, o que tem grande importância no estudo funcional deste complexo.

Palavras-chave: Rrp44, Exossomo, Localização, Transporte Nuclear.

## Abstract

Okuda, E. K. Study of the cellular transport mechanism of Exosome complex subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. 2020. 161. Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Exosome is a multiprotein complex responsible for processing and degradation of many classes of RNAs in eukaryotic cells. This complex localizes both to the nucleus and cytoplasm. Exosome complex has two catalytic subunits: Rrp6, which is exclusively nuclear; and Rrp44, that has endonucleolytic and exonucleolytic domains, being essential for cell growth. The aim of this project was to analyze the localization of the exosome and the nuclear transport pathways of its subunits, focusing on Rrp44. For that, the main technique used was fluorescent microscopy, which allowed the analysis in several different strains and protein fusions with GFP and mCherry. The results show a subnucleolar localization of the exosome complex when its subunits are expressed at endogenous levels, under control of their own promoters, fused to GFP. Interestingly, the subunits Rrp6 and Rrp44 still localize to the nucleus when overexpressed, whereas other exosome subunits, such as Rrp41 and Rrp43 show strong signals in the cytoplasm when they are overexpressed in the same conditions. Moreover, we could identify the putative nuclear localization signals of Rrp44, which are recognized by the essential karyopherins Srp1 and Kap95, the main karyopherins affecting the nuclear transport of Rrp44. The results of this work show that the yeast exosome is mainly localized to the nucleus and concentrated in the nucleolus, which is particularly important for the functional study of this complex.

Keywords: Rrp44, Exosome, Localization, Nuclear transport.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

µg - Micrograma

µL - Microlitro

BCA - Ácido bicinconínico

BSA - Albumina de soro bovino

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

C-terminal - Carboxi-terminal

CEFAP – Centro de Facilidade de Apoio à Pesquisa

DAPI - 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride

dNTPs – Desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)

DTT - ditioneitol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetrático

ETS - Sequência espaçadora externa (*external transcribed spacer*)

GAL1 - Promotor do gene GAL1/YBR020W (galactose 1-epimerase) de *Saccharomyces cerevisiae*

GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent protein*)

GST – Glutathione-S-transferase

IPTG – Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

ITS - Sequência espaçadora externa (*internal transcribed spacer*)

Kb - quilobase

KDa - quilodalton

LB - Meio Luria-Bertani

LSU - Subunidade ribossomal maior (large subunit)

M - Molar

mA - Miliamper

mL - Mililitros

mM - Milimolar

mRNA - RNA mensageiro

Ng - nano grama

nt - Nucleotídeo

N-Terminal - Amino-terminal

NTPs - Ribonucleotídeos (ATP, CTP, TTP, GTP)

OD - Densidade ótica

PAGE - *Polyacrilamide gel electrophoresis*

pb - Pares de bases

PBS - Solução salina tamponada de fosfatos

PCR - Reação de polimerase em cadeia

PEG - polietilenoglicol

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila

Pol - polimerase

Pré-rRNA - Precursor de RNA ribossomal

ProtA – domínio ZZ da proteína A de *S. aureus*

rDNA – DNA que codifica o RNA ribossomal

RNP - Ribonucleoproteína

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

rRNA - RNA ribossomal

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

snoRNAs - RNAs nucleolares pequenos (*small nucleolar RNAs*)

snoRNP - Ribonucleoproteína nucleolar pequena (*small nucleolar ribonucleoprotein*)

TAE - Tampão contendo tris, acetato e EDTA

TAP - *Tandem affinity purification*

TCA - Ácido tricloroacético

TE – Tampão contendo tris e EDTA

TEMED - N',N',N',N'-tetrametiletlenodiamina

Tris - Tris-hidroximetilaminometano

tRNA - RNA transportador

YNB - *Yeast nitrogen base* (meio mínimo para levedura)

2YT - Meio de duas vezes extrato levedura-triptona

## Lista de Figuras

1. O complexo exossomo.
2. Diferentes funções do complexo exossomo.
3. Esquema representativo da via clássica de transporte nuclear.
4. O tamanho do complexo exossomo.
5. Localização do complexo exossomo e de seus cofatores nos diferentes compartimentos celulares.
6. Esquema representativo da reação de sequenciamento.
7. Resultado obtido pelo programa ImageJ Macro.
8. Subunidades do exossomo fusionados ao GFP expressas endogenamente localizam no nucléolo.
9. Enriquecimento do sinal das subunidades do exossomo fusionadas ao GFP.
10. Porcentagem do sinal das subunidades do exossomo em diferentes compartimentos.
11. Validação da localização nucleolar de Rpa190 em comparação à Nop1.
12. Localização citoplasmática das subunidades Rrp6 e Rrp41 comparadas ao cofator citoplasmático Ski7.
13. Quantificação do sinal das subunidades Rrp6 e Rrp41 comparadas ao cofator citoplasmático Ski7.
14. As subunidades do exossomo não colocam exatamente com a subunidade Rpa190 da RNA polimerase I.
15. Imunolocalização de Rrp44-GFP e Rrp6-GFP por microscopia eletrônica.
16. Super expressão das subunidades episomais do exossomo altera sua localização.



17. Deleção de Rrp44 não afeta a localização subcelular das subunidades do core Rrp41 e Rrp43.
18. Localização das subunidades do exossomo na cepa  $\Delta rrp6$ .
19. Representação esquemática dos mutantes de deleção e mutantes pontuais de Rrp44.
20. Localização dos mutantes de Rrp44 mostram que o NLS1 é o mais importante para localização nuclear de Rrp44.
21. Análise quantitativa das células expressando os mutantes episomais de Rrp44 fusionados ao GFP.
22. Expressão episomal dos mutantes GFP-Rrp44 na cepa selvagem.
23. Análise da complementação dos mutantes de Rrp44 na cepa  $\Delta rrp44$ .
24. Análise da localização do mutante GFP-Rrp44<sub>(1-218)</sub> por microscopia Spinning-disk.
25. Localização de GFP-Rrp44 não é afetada em mutantes das carioferinas Kap114, Kap123, Kap104 e Sxm1.
26. Inibição da expressão das carioferinas afeta na localização subcelular de GFP-Rrp44.
27. Western blot mostrando os níveis de expressão de GFP-Rrp44 e das carioferinas Srp1 e Kap95.
28. Interação indireta de Rrp44 com as carioferinas Srp1 e Kap95.
29. GFP interage inespecificamente com a resina IgG sepharose.
30. Interação direta de Rrp44 com carioferinas.
31. Interação direta de Rrp44 não é dependente da formação do dímero carioferina  $\alpha$ -carioferina  $\beta$ .
32. Resumo dos dados obtidos dos mutantes de deleção de Rrp44.

33. Modelo do transporte nuclear de Rrp44.

## Lista de Tabelas

1. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.
2. Plasmídeos usados neste estudo.
3. Lista de cepas de *Escherichia coli*.
4. Meios de cultura bacteriana.
5. Meios de cultura de levedura.
6. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.
7. Condição de crescimento do teste de complementação.
8. Programa de Criosubstituição.
9. Lavagens das *grids* após incubação com anticorpo.
10. Condições de expressão das proteínas recombinantes.

## Sumário

Resumo.....	8
Abstract.....	10
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas.....</b>	<b>11</b>
Lista de Figuras.....	15
Lista de Tabelas.....	18
<b>Introdução.....</b>	<b>22</b>
<b>1. O Complexo Exossomo.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Estrutura e Subunidades do Exossomo.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1.1. A subunidade Rrp44.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2. Função do Complexo Exossomo.....</b>	<b>25</b>
<b>2. Maturação do RNA ribossomal e o nucléolo.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Funções alternativas associadas ao complexo exossomo.....</b>	<b>28</b>
<b>4. O transporte nuclear.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Carioferinas: as proteínas responsáveis pelo transporte nuclear.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2. O mecanismo de transporte nuclear.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3. Sinal de localização nuclear.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Localização do Complexo Exossomo.....</b>	<b>39</b>
<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>44</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>44</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>45</b>
<b>Construção de plasmídeos.....</b>	<b>45</b>
<b>Cepas de <i>Escherichia coli</i> e condições de crescimento utilizadas neste trabalho. ....</b>	<b>49</b>
<b>Transformação de células competentes (DH5<math>\alpha</math>).....</b>	<b>50</b>
<b>Transformação de células competentes (BL21). ....</b>	<b>50</b>
<b>Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>Purificação de DNA em gel de agarose. ....</b>	<b>51</b>
<b>Preparação de DNA para Sequenciamento.....</b>	<b>51</b>
<b>Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e condições de crescimento utilizadas neste trabalho.....</b>	<b>52</b>
<b>Transformação de levedura de alta eficiência.....</b>	<b>56</b>
<b>Transformação rápida de levedura.....</b>	<b>57</b>
<b>Teste de complementação. ....</b>	<b>57</b>
<b>Microscopia de Fluorescência.....</b>	<b>58</b>

<b>Contagem dos Mutantes de Rrp44.</b> .....	59
<b>Microscopia Confocal Spinning-Disk.</b> .....	59
<b>Análise de imagem e Quantificação do Sinal do Exossomo.</b> .....	60
<b>Microscopia Eletrônica.</b> .....	63
<b>Preparação de Extrato Celular por Hidróxido de Sódio.</b> .....	64
<b>Quantificação de Proteínas pelo Método do Ácido Binciconínico (BCA).</b> .....	65
<b>Experimentos de Imunoblot</b> .....	66
<b>Teste de expressão em pequena escala.</b> .....	66
<b>Expressão em grande escala.</b> .....	67
<b>Ensaio de interação proteica direta (<i>pull-down</i>).</b> .....	68
<b>Coimunoprecipitação.</b> .....	69
<b>Resultados</b> .....	71
<b>O complexo exossomo está concentrado no nucléolo.</b> .....	71
<b>O exossomo está presente em baixos níveis no citoplasma.</b> .....	76
<b>O exossomo está concentrado em um subcompartimento do nucléolo.</b> .....	79
<b>A subunidade Rrp44 provavelmente possui seu próprio NLS.</b> .....	83
<b>O N-terminal de Rrp44 é responsável por sua localização nuclear.</b> .....	89
<b>As carioferinas Srp1 e Kap95 são responsáveis pelo transporte nuclear de Rrp44.</b> .....	101
<b>Discussão</b> .....	113
<b>Conclusão</b> .....	120
<b>Referências</b> .....	121
<b>Anexo</b> .....	126
<b>Anexo A – SÚMULA CURRICULAR</b> .....	126
<b>Anexo B – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	129

# Introdução

## 1. O Complexo Exossomo

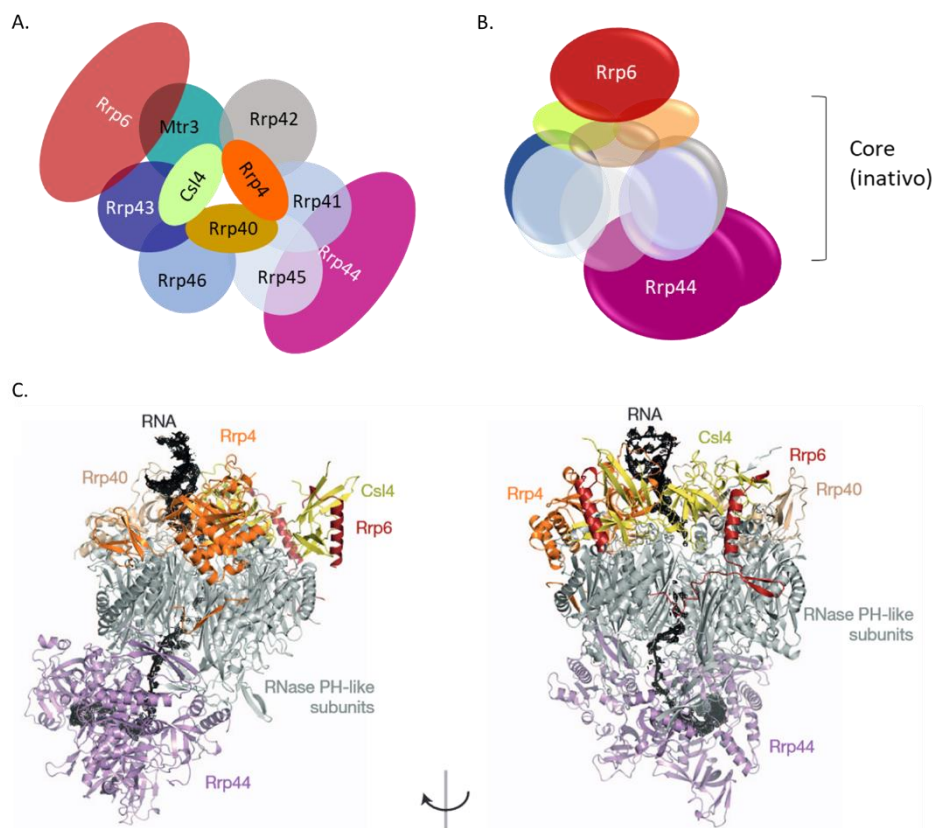
O exossomo é um complexo multiproteico identificado inicialmente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Mitchell et al., 1997), que catalisa o processamento e a degradação 3'-5' de diferentes tipos de RNAs em diferentes compartimentos celulares em todos os eucariotos estudados. O exossomo é bastante conservado, mantendo sua similaridade desde levedura até humanos, com pequenas diferenças (Lingaraju et al., 2020; Wasmuth and Lima, 2012; Zinder and Lima, 2017).

### 1.1. Estrutura e Subunidades do Exossomo

O exossomo é um complexo multiproteico, composto por 10 subunidades no citoplasma (core + Rrp44) e 11 subunidades no núcleo (core + Rrp44 + Rrp6). Esse complexo possui um *core*, o qual é composto por um anel hexamérico de RNase PH e um *cap* trimérico, localizado acima do anel (Januszyk and Lima, 2014; Wasmuth and Lima, 2012). A maioria das subunidades do exossomo de levedura é chamada de proteínas Rrp (*ribossomal RNA processing*), enquanto que em humanos, a maioria das subunidades é denominada EXOSC (*Exosome component*) (Morton et al., 2018).

O anel de RNase PH no *core* do exossomo é formado por seis proteínas (Rrp41, Rrp45, Rrp46, Rrp43, Mtr3 e Rrp42) e contém um canal central com o diâmetro exato para acomodar um RNA de fita simples (Januszyk and Lima, 2014). Nenhuma das proteínas do *core* possui atividade catalítica, entretanto, todas elas são essenciais para célula e são de suma importância para a coordenação da atividade catalítica das subunidades Rrp44 e Rrp6. As subunidades do anel do exossomo são muito

semelhantes às subunidades da RNase PH encontrada em bactérias, entretanto, enquanto a RNase PH é cataliticamente ativa, o anel do exossomo não possui atividade catalítica. O *cap*, parte do core que se encontra em cima do anel, é composto por 3 outras proteínas (Rrp40, Csl4 e Rrp4). As subunidades Rrp4 e Rrp40 possuem domínios S1 e KH de interação com RNA, enquanto Csl4 possui apenas o domínio S1 (Januszyk and Lima, 2014; Wasmuth and Lima, 2012; Zinder and Lima, 2017). A subunidade Rrp6 é uma exonuclease com atividade hidrolítica distributiva e é descrita como exclusivamente nuclear e não é essencial para a célula de levedura (Allmang et al., 1999; Burkard and Butler, 2000; Zinder and Lima, 2017).



**Figura 1. O complexo exossomo.** A. Esquema do complexo exossomo, com suas subunidades representadas em cores diferentes e identificadas. As subunidades Csl4, Rrp40 e Rrp4 compõem o

cap, as subunidades Rrp43, Rrp46, Rrp45, Rrp41, Rrp42 e Mtr3 compõem o anel de RNase PH, e as subunidades Rrp6 e Rrp44 são as subunidades cataliticamente ativas do complexo, ligadas em lados diferentes do *core*. **B.** Esquema da visão lateral do exossomo, com o anel do complexo representado em tons de azul, o cap, em tons alaranjados, Rrp6 em vermelho e Rrp44 em lilás. **C.** Estrutura do complexo exossomo, mostrando a subunidade catalítica Rrp44 na parte inferior do *core*, e a subunidade catalítica Rrp6 na parte superior do *core* (Makino et al., 2013).

### 1.1.1. A subunidade Rrp44

A subunidade cataliticamente ativa do exossomo Rrp44, está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma. Rrp44 possui cinco domínios: um domínio N-terminal *Pilus-forming N-terminus* (PIN), o qual contém o sítio ativo da atividade endonucleolítica; dois domínios *cold-shock* (CSD1 e CSD2); um domínio central com atividade exonucleolítica (RNB); e um domínio S1 no seu C-terminal (Januszyk and Lima, 2014; Wasmuth and Lima, 2012; Zinder and Lima, 2017).

A subunidade Rrp44 se liga a região inferior do *core* do exossomo, sendo seus domínios PIN e CSD1 os responsáveis pela interação direta de Rrp44 com as subunidades Rrp41, Rrp45 e Rrp43. Quando Rrp44 se associa ao *core* do exossomo, esta subunidade apresenta uma diminuição na sua ligação a RNAs e na sua atividade exonucleolítica, mostrando a importância do *core* do exossomo na regulação da atividade de Rrp44 (Januszyk and Lima, 2014). Além disso, tanto a atividade endonucleolítica quanto a atividade exonucleolítica dessa subunidade são dependentes da integridade do canal central do exossomo, uma vez que mutações que levam à oclusão do canal central acarretam na diminuição da ligação a RNAs e da atividade RNase (Wasmuth and Lima, 2012).

Em levedura, existe apenas uma Rrp44, mas em outros eucariotos, existem duas ou três isoformas de Rrp44, com atividades diferentes e restritas a regiões subcelulares diferentes. Em humanos, existem três isoformas de Rrp44, as quais são



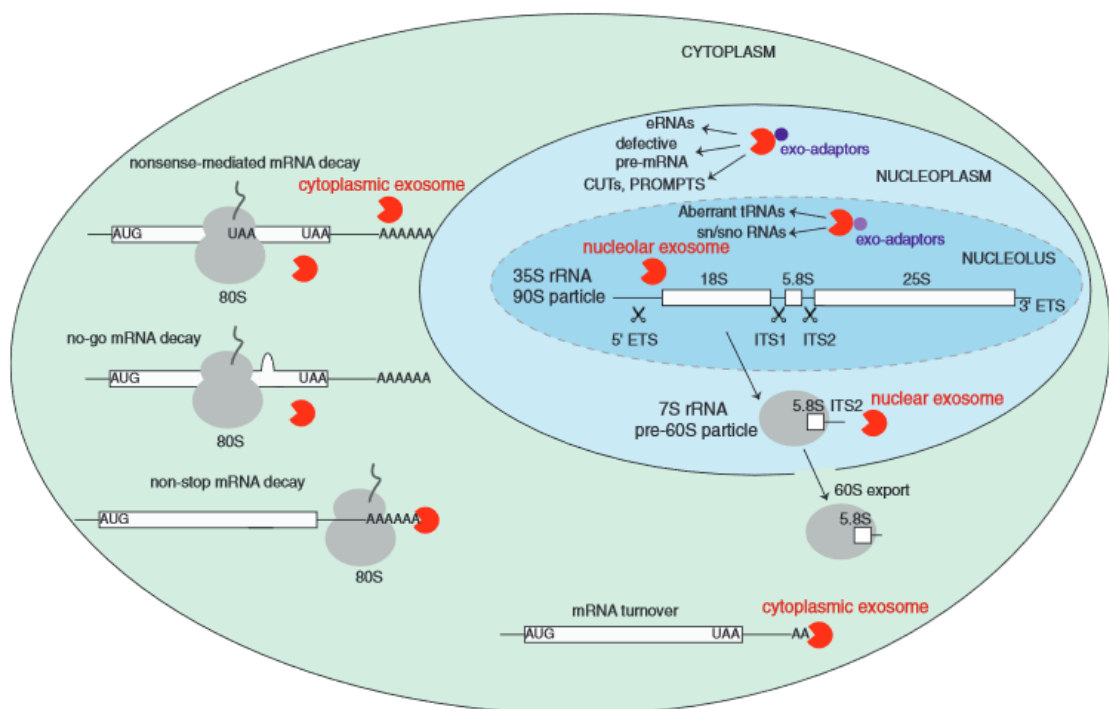
conhecidas como hDis3, hDis3L1 e hDis3L2. hDis3 e a hDis3L1 associam-se ao core do exossomo e contêm todos os cinco domínios observados em levedura, embora hDis3L1 não apresente atividade endonucleolítica detectável. hDis3L2 não possui o domínio PIN e não interage com o core do exossomo (Januszyk and Lima, 2014; Wasmuth and Lima, 2012).

## 1.2. Função do Complexo Exossomo

O exossomo é um complexo com atividade endonucleolítica e exonucleolítica 3'-5', o qual exerce um papel chave na maquinaria de controle de qualidade de RNAs. Esse complexo degrada vários tipos de RNAs, tanto no núcleo quanto no citoplasma, e também é responsável pela maturação, na direção 3'-5', de extremidades 3' de diversos precursores de diferentes tipos de RNAs (Houseley et al., 2006; Januszyk and Lima, 2014).

O exossomo nuclear é responsável pela maturação de RNAs e degradação de precursores aberrantes de diversos tipos de RNAs, incluindo pre-mRNAs, pre-tRNAs e pre-rRNAs. No núcleo, o exossomo está envolvido na maturação 3' de pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNAs), na formação do RNA ribossomal 5.8S, na degradação da sequência espaçadora 5'-ETS do pré-rRNA, e no controle de qualidade dos rRNAs. No citoplasma, a única função conhecida do exossomo é o *turnover*, a partir da extremidade 3', de mRNAs normais, regulando seus níveis. O exossomo também é capaz de degradar RNAs defeituosos, participando de duas vias de degradação diferentes: *nonsense-mediated decay* (NMD) e *non-stop decay* (Houseley et al., 2006; Zinder and Lima, 2017). O *nonsense-mediated decay* é o processo pelo qual a célula destrói mRNAs cuja tradução foi prematuramente interrompida devido à presença de um códon *nonsense* na região

codificadora. Já a via de degradação *non-stop decay* é a via de degradação de mRNAs que não contêm um códon de terminação da tradução. O exossomo citoplasmático também degrada os fragmentos 5' de mRNA frutos da via de degradação *no-go decay* (NGD) (Houseley et al., 2006), que tem como alvo mRNAs nos quais a síntese de proteína foi bloqueada devido a parada do ribossomo. Esses mRNAs são clivados endonucleoliticamente, e os produtos são degradados pelo exossomo e pela RNase Xrn1 (Harigaya and Parker, 2010).



**Figura 2. Diferentes funções do complexo exossomo.** O complexo exossomo está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma dos eucariotos. Em ambos os compartimentos, o complexo exerce diversas funções. No citoplasma, sua função está mais relacionada a vias de degradação de RNAs. No núcleo, além da degradação, o exossomo exerce função na maturação de RNAs. (Lingaraju et al., 2020).

Diversos tipos de RNAs são substrato do exossomo, por isso, o exossomo depende de proteínas auxiliares que ajudam no reconhecimento dos possíveis RNAs alvos. Essas proteínas que guiam o complexo são chamadas de cofatores do

exossomo (Ogami et al., 2018). No núcleo, o principal cofator do exossomo é chamado de complexo TRAMP (*Trf-Air-Mtr4 polyadenylation complexes*), o qual possui uma helicase e uma poli-A polimerase na sua composição, sendo responsável pela poliadenilação de RNAs alvos, levando a sua degradação pelo exossomo. A adição de uma cauda curta (~7 resíduos) de poli-A aos RNAs alvo parece ser importante para endereçá-los ao exossomo, ademais a interação do complexo TRAMP com o exossomo aumenta a eficiência da degradação (Houseley et al., 2006).

No citoplasma, todas as atividades conhecidas do exossomo requerem os mesmos cofatores: o complexo Ski, composto pelas proteínas Ski2, Ski3 e Ski8; e a proteína Ski7. A Ski2 é uma helicase homóloga a Mtr4, já Ski3 e Ski8 são homólogas a outros componentes do complexo TRAMP (Houseley et al., 2006). Já a proteína Ski7 é responsável por mediar a interação do complexo Ski com o exossomo. O complexo Ski contribui principalmente para o turnover de mRNAs e degradação de mRNAs aberrantes (Zinder and Lima, 2017). O complexo Ski se liga ao exossomo via Ski7 para participar da degradação de mRNAs 3'-5', por meio da associação com o aparato de tradução (Januszyk and Lima, 2014).

## **2. Maturação do RNA ribossomal e o nucléolo**

O ribossomo 80S de eucariotos é composto por duas subunidades desiguais, as quais possuem juntas quatro rRNAs diferentes e por volta de 80 proteínas ribossomais. A subunidade menor 40S possui o rRNA 18S e 33 proteínas ribossomais. A subunidade maior 60S possui os rRNAs 25S/28S, 5.8S e 5S e, na maioria dos eucariotos, 47 proteínas ribossomais. A montagem do ribossomo se inicia no nucléolo da célula, aonde o DNA ribossomal é transcrito em um longo precursor pre-rRNA (conhecido como 35S em levedura), no qual acontece a montagem ordenada de

proteínas ribossomais no pre-rRNA, e concomitantemente, o processamento em espécies maduras do rRNA. As etapas seguintes da maturação do RNA ribossomal acontecem no núcleo e é finalizado no citoplasma (Klinge and Woolford, 2019; Kressler et al., 2017).

A maioria dos passos de maturação do RNA ribossomal acontecem no nucléolo (Klinge and Woolford, 2019; Kressler et al., 2017), o qual pode ser dividido em três subcompartimentos: o centro fibrilar (FC), o componente fibrilar denso (DFC) e componente granular (GC). O subcompartimento FC contém o DNA ribossomal, sendo a região na qual é transcrito em RNA; o DFC é onde ocorre parte do processamento do pre-rRNA; e o GC é o local no qual a partícula pre-ribossomal começa a ser montada (Léger-Silvestre et al., 1999; Strom and Brangwynne, 2019). Devido à resolução dos microscópios, os primeiros dados obtidos acerca dos subcompartimentos nucleolares foram em microscópios eletrônicos (Léger-Silvestre et al., 1999; Strom and Brangwynne, 2019). Mais recentemente, com a evolução da microscopia de fluorescência, alguns grupos conseguiram mostrar os subcompartimentos nucleolares sobrepondo o sinal de fluorescência de proteínas de diferentes estágios da síntese do rRNA. Esses grupos sugerem a existência de diversas sub-regiões, ou fases líquidas, que são imiscíveis e por isso permanecem separadas mesmo estando no mesmo subcompartimento do nucléolo (Feric et al., 2016; Yao et al., 2019).

### **3. Funções alterativas associadas ao complexo exossomo**

A contribuição do complexo exossomo na maturação do RNA ribossomal é bastante estudada e bem estabelecida. Recentemente, foram descobertas diferentes doenças relacionadas a mutações em diferentes subunidades do complexo em

humanos, e a hipótese de funções individuais das subunidades começou a ganhar mais força (Morton et al., 2018).

Mutações nas subunidades estruturais EXOSC3 (Rrp40) e EXOSC8 (Rrp43) estão relacionadas a doença hipoplasia pontocerebelar, e mutações na subunidade EXOSC2 (Rrp4) parecem estar relacionadas a uma nova síndrome que afeta diferentes tecidos. A maioria das mutações identificadas são mutações *missense*, levando a uma alteração de um aminoácido conservado numa região de sequências evolutivamente conservadas (Morton et al., 2018). Um estudo recente mostrou que mutações em EXOSC5 (Rrp46) também podem causar problemas cerebrais, atrasos no desenvolvimento e fraqueza motora em recém nascidos (Slavotinek et al., 2020).

Já a subunidade catalítica Dis3 (Rrp44), havia sido descrita inicialmente como associada à separação de cromossomo durante a mitose (Ohkura et al., 1988) e mais tarde à promoção da divisão celular (Kinoshita et al., 1991). Esta subunidade vem ganhando notoriedade por sua função na proliferação celular e por ter sido identificada como um dos genes mais mutados em estudos genômicos de mieloma múltiplos (Zinder and Lima, 2017). Um outro estudo mostrou que a outra subunidade catalítica do complexo, Rrp6, também possui função independente do exossomo. Desta vez utilizando-se levedura como organismo de estudo, foi mostrado o papel de Rrp6 em promover a sobrevivência durante o estresse por calor. Essa sua função é descrita como independente de sua atividade catalítica e de sua associação ao restante do complexo, mas o mecanismo pelo qual Rrp6 deve agir ainda não foi descoberto (Wang et al., 2020).

#### 4. O transporte nuclear

O núcleo é o principal componente que define uma célula eucariótica. Esse compartimento é responsável pela separação do material genético do restante da célula (Wilson and Dawson, 2011). A separação da transcrição de genes da tradução de mRNAs em proteínas é um mecanismo poderoso quando se trata do controle da expressão gênica. Por outro lado, devido à separação física entre a transcrição e a tradução, há a necessidade da existência de um mecanismo de transporte eficaz, que permita a passagem seletiva de proteínas e RNAs (Stewart, 2007).

O envelope nuclear é a barreira física pela qual os RNAs e proteínas precisam atravessar para chegar aos seu compartimento de destino. O envelope nuclear é composto por duas bicamadas fosfolipídicas, que se encontram somente em regiões específicas, as quais permitem a comunicação entre o citoplasma e o núcleo da célula (Stewart, 2007).

Os portais que permitem a passagem de moléculas entre o núcleo e o citoplasma são chamados de complexo do poro nuclear (NPC). Os NPC são transportadores bidirecionais, altamente seletivos que permitem a passagem de diversos tipos de moléculas (Wente and Rout, 2010).

Em levedura, o NPC tem por volta de 66MDa, e permite a passagem de duas principais maneiras: por difusão ou por translocação facilitada. Um dos fatores que influenciam a seletividade do poro nuclear é o tamanho das moléculas a serem transportadas. Em condições fisiológicas, macromoléculas maiores que ~40kDa não são capazes de difundir para o núcleo. Inversamente, íons metálicos, pequenos metabolitos e moléculas mais leves que ~40kDa em massa ou ~5nm em diâmetro conseguem atravessar o poro nuclear relativamente livres (Wendler and Enenkel, 2019; Wente and Rout, 2010).

A estrutura do complexo do poro nuclear é bastante conservada, sendo que em levedura, esse complexo tem aproximadamente 100nm de diâmetro e 40nm de comprimento. O *core* do NPC consiste de um cilindro simétrico, perpendicular ao envelope nuclear, composto por diferentes anéis os quais permitem que o NPC se ancore firmemente ao envelope nuclear. No interior dos anéis do NPC reside o canal central, com 40nm de diâmetro, através do qual todo o tráfico núcleo-citoplasmático acontece (Aitchison and Rout, 2012).

As proteínas que compõem e permanecem no *core* do complexo do poro nuclear são conhecidas como nucleoporinas (Nups) (Wente and Rout, 2010). Um subconjunto de nucleoporinas conhecidas como FG-nucleoporinas, as quais contêm repetições de sequências dos aminoácidos fenilalanina e glicina, são importantes tanto para o movimento através do NPC quanto para a exclusão de outras macromoléculas do canal central do NPC. As FG-nucleoporinas (FG-Nups) contêm de 20 a 30 dessas repetições FG, separadas por sequências de resíduos hidrofílicos (Aitchison and Rout, 2012; Wente and Rout, 2010). Essas repetições, encontradas tanto nas faces citoplasmática e nuclear do NPC, quanto no interior do seu canal central (Aitchison and Rout, 2012), caracterizam regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs) das FG-Nups. Por possuírem IDRs, essas nucleoporinas acabam formando uma malha por meio das interações hidrofóbicas das suas repetições de fenilalanina. Essa malha assemelha-se a um hidrogel, que preenche o canal do poro nuclear (Wente and Rout, 2010; Yoshimura and Hirano, 2016). As cadeias laterais da fenilalanina das repetições FG são capazes de se ligar às cavidades hidrofóbicas encontradas na superfície de proteínas que mediam o transporte nuclear. Essa interação é fraca, e portanto, suficientemente transiente para permitir um transporte rápido do complexo proteína-carreadora:proteína-carga através do poro (Stewart, 2007).

Para superar a barreira de permeabilidade imposto pelo poro nuclear, moléculas maiores interagem com fatores de transporte solúveis, permitindo sua importação para o núcleo. De forma geral, NPC são capazes de transportar cargas de até 39 nm de diâmetro. Macromoléculas maiores ainda podem ser translocadas através do NPC, como mRNPs (mRNAs acoplados às proteínas), que podem chegar a algumas milhares de centenas de daltons (Aitchison and Rout, 2012; Wentz and Rout, 2010).

O proteassoma é um exemplo de um complexo multiproteico, contendo 40 subunidades, que precisa ser transportado através do poro nuclear. Quando as células de levedura se encontram na fase exponencial, o proteassoma encontra-se no núcleo da célula. Durante longos períodos quiescentes, nos quais os níveis de ATP declinam muito devido à falta de nutrientes, a holoenzima é desassociada e levada para o citoplasma (Wendler and Enenkel, 2019).

As teorias vigentes sobre o transporte nuclear do proteassoma sugerem que a exportação do complexo seja feita com ele desmontado em 19S RP (complexo regulatório) e 20S CP (partícula do core), ou até em subcomplexos menores. O mecanismo de exportação do proteassoma permanece desconhecido. Já no citoplasma, os dois subcomplexos se agregam e permanecem armazenados nos Grânulos de armazenamento do proteassoma (PSGs) (Wendler and Enenkel, 2019). Quando a célula deixa o estado quiescente, o proteassoma precisa ser transportado para o núcleo novamente. Acredita-se que o complexo possa ser importado em subcomplexos ou até inteiro. É possível que a holoenzima seja transportada inteira uma vez que, apesar do proteassoma ter 45nm de comprimento, ele possui 15nm de diâmetro, o que permitiria sua passagem através do poro nuclear (Synowsky et al., 2009; Wendler and Enenkel, 2019).



#### **4.1. Carioferinas: as proteínas responsáveis pelo transporte nuclear**

Existem diferentes vias pelas quais uma proteína pode ser importada para o núcleo, mas todas elas possuem as mesmas características: a proteína responsável pelo transporte reconhece sua proteína carga no citoplasma, elas são translocadas para o núcleo através do poro nuclear, e a proteína carga é, então, liberada no núcleo.

O grupo de proteínas solúveis que facilita esse movimento entre núcleo e citoplasma é chamado de carioferinas (kaps), sendo as importinas as responsáveis pela importação nuclear, e as exportinas, pela exportação (Fiserova and Goldberg, 2010; Lange et al., 2007). As proteínas endereçadas ao núcleo são reconhecidas pelas importinas por meio do seu sinal de localização nuclear (NLS) (Stewart, 2007).

A via clássica/canônica é a via de importação nuclear mais bem caracterizada (Lange et al., 2007), sendo capaz de transportar entre cem a mil cargas por minuto por NPC (Stewart, 2007). Essa via tem como proteínas responsáveis pelo transporte nuclear um heterodímero de carioferinas que é capaz de reconhecer a proteína carga e levá-la para o núcleo. Esse heterodímero é composto por uma carioferina  $\alpha$  e uma carioferina  $\beta$ .

As carioferinas  $\alpha$  são conservadas em todos os eucariotos (Tewari et al., 2010). Essas carioferinas são compostas por uma série de sequência Armadillo (ARM), fazendo com a que proteína tenha uma forma côncava. Na parte interna da superfície côncava, encontra-se uma matriz rica em triptofano, ácido aspártico e ácido glutâmico, que compõem o sítio de ligação ao sinal de endereçamento presente nas proteínas carga (Stewart, 2007). O N-terminal das importinas  $\alpha$  contém o domínio de ligação à importina  $\beta$  (domínio IBB), responsável por essa ligação. O domínio IBB contém um

cluster de resíduos básicos similar a um sinal de endereçamento para o núcleo, e que pode se ligar ao sítio de ligação à NLS. Portanto, além de conectar a importina  $\alpha$  à importina  $\beta$ , o domínio IBB tem uma função autorregulatória, pois quando não ligado à importina  $\beta$ , compete com a proteína carga pelo sítio de ligação ao NLS da própria importina  $\alpha$ , ajudando na liberação da proteína carga (Stewart, 2007). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém somente uma carioferina  $\alpha$ , a importina Srp1 (Yano et al., 1994).

As carioferinas  $\beta$  são as que mais contribuem para o transporte nuclear. Em levedura, existem 14 membros da família de carioferinas  $\beta$ , as quais mediam o transporte ou para dentro ou para fora do núcleo. Apenas a carioferina Msn5 é capaz de realizar ambos, importação e exportação (Chook and Süel, 2011; Fiserova and Goldberg, 2010; Soniat and Chook, 2015). As carioferinas  $\beta$  são compostas quase que inteiramente por repetições HEAT, cada uma formada por duas hélices antiparalelas, A e B, que formam um *hairpin* helicoidal (Andrade et al., 2001; Soniat and Chook, 2015). A matriz das hélices anfifílicas das repetições HEATs está organizada por interações hidrofóbicas fracas, isso confere propriedade flexível e elástica às repetições HEATs, permitindo grandes mudanças conformacionais por interação com outras proteínas (Andrade et al., 2001; Yoshimura and Hirano, 2016). Durante o transporte nuclear, as carioferinas  $\beta$  são capazes de interagir fracamente com as repetições FG das proteínas do NPC. Dessa forma, as carioferinas conseguem romper a interação hidrofóbica entre as nucleoporinas, abrindo a malha presente no interior do NPC (Yoshimura and Hirano, 2016). Essas carioferinas também são capazes de interagir com a RanGTP, que controla a direção do transporte (Soniat and Chook, 2015). A maioria das carioferinas  $\beta$  é capaz de reconhecer diretamente alguns

NLSs e transportar a proteína carga para o núcleo, independente da carioferina  $\alpha$ , numa via de transporte alternativa (Chook and Süel, 2011).

Considerando o número de proteínas transportadoras presente numa célula e o número de proteínas nucleares, é plausível o fato de que as carioferinas são capazes de reconhecer mais de um alvo, e também mais de um sinal de endereçamento nuclear. Mas isso acontece também com as proteínas cargas, que podem ser reconhecidas por mais de uma carioferina, como no caso das histonas, que são transportadas por diversas importinas (Fiserova and Goldberg, 2010).

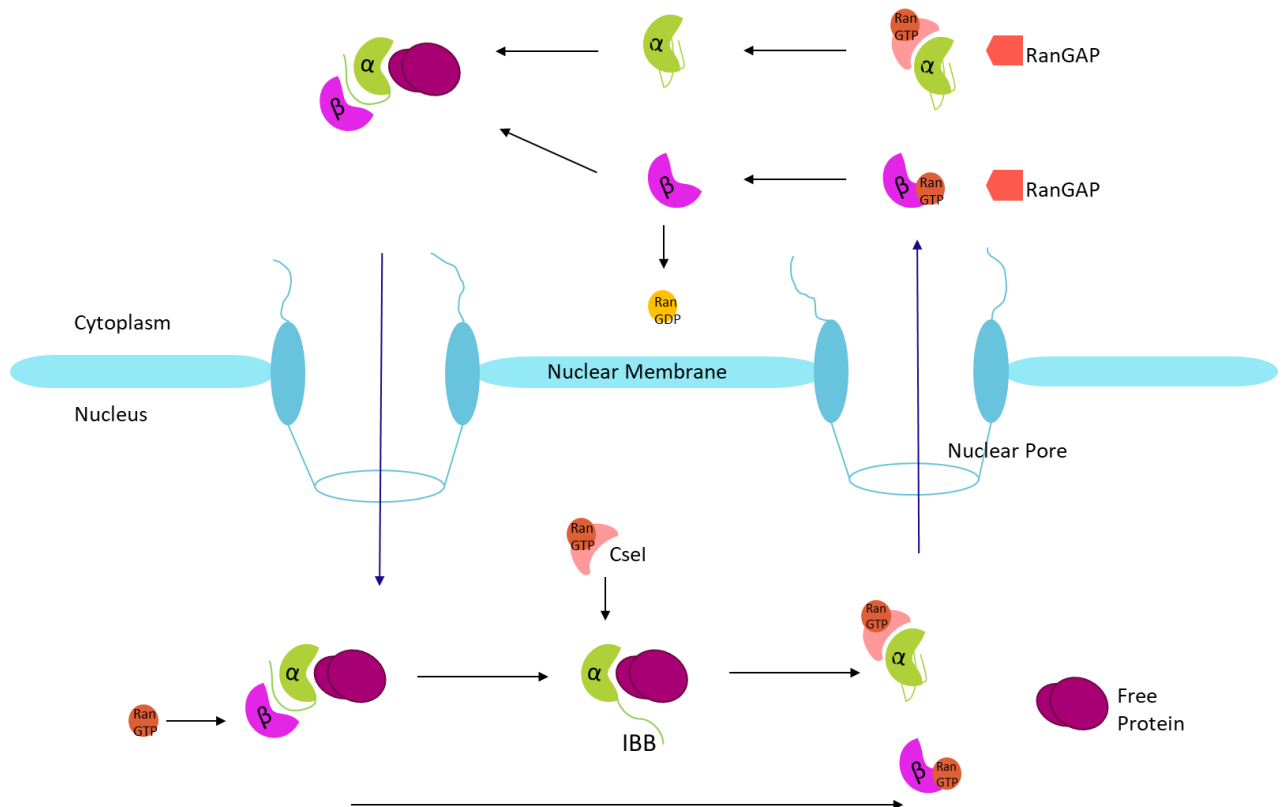
#### **4.2. O mecanismo de transporte nuclear**

O início da via clássica de transporte nuclear é caracterizado pela ligação da proteína carga ao heterodímero carioferina  $\alpha$  – carioferina  $\beta$ , sendo a carioferina  $\alpha$  a responsável por reconhecer o cNLS presente na proteína carga. Essas três proteínas são, então, transportadas para o núcleo através do poro nuclear. Dentro do núcleo, RanGTP se liga a importina  $\beta$  causando uma mudança conformacional na proteína, forçando a dissociação das carioferinas  $\alpha$  e  $\beta$ . Uma vez que o heterodímero é separado, o domínio IBB da carioferina  $\alpha$ , que conectava essa à carioferina  $\beta$ , começa a competir com a proteína carga pelo seu próprio sítio de ligação ao NLS, facilitando a liberação da proteína carga por meio de um mecanismo auto inibitório (Stewart, 2007).

Depois do complexo de importação ser desmontado, as importinas precisam ser transportadas novamente para o citoplasma. A carioferina  $\beta$  é reciclada complexada ao RanGTP, enquanto a importina  $\alpha$  é transportada ativamente pela CAS (Cse1 em *S. cerevisiae*) complexada ao RanGTP (Wente and Rout, 2010). A proteína CAS é estruturalmente muito semelhante à importina  $\beta$ , e é conhecida como Kap109. Para

que haja a formação do complexo de exportação da carioferina  $\alpha$  é crucial que o domínio IBB esteja ligado ao sítio de ligação ao NLS da importina  $\alpha$ , ou seja, que a proteína carga tenha sido liberada no núcleo, evitando assim, que a importina  $\alpha$  retorne ao citoplasma ainda ligada à proteína carga (Stewart, 2007).

Uma vez que a importina  $\beta$ :RanGTP e CAS:RanGTP:importina  $\alpha$  encontram-se no citoplasma, a RanGAP (junto com a proteína acessória RanBP1, que remove a RanGTP da importina  $\beta$ ) estimula a hidrólise do GTP, liberando as importinas para um novo ciclo (Stewart, 2007).



**Figura 3. Esquema representativo da via clássica de transporte nuclear.** A carioferina  $\alpha$ , responsável pelo reconhecimento do NLS clássico está representada e verde; a carioferina  $\beta$ , que se liga a carioferina  $\alpha$  interagindo com o seu domínio IBB, está representada em rosa; e a proteína carga está representada em vinho. A carioferina  $\alpha$ , ligada à carioferina  $\beta$ , reconhece o NLS na proteína carga. O trímero é transportado para o núcleo, onde a RanGTP se liga à carioferina  $\beta$ , liberando-a. A carioferina  $\alpha$  se solta da proteína carga, liberando a proteína carga no núcleo. A carioferina  $\alpha$  se liga a

uma outra carioferina  $\beta$  (Cse1 em levedura), sendo transportada de volta para o citoplasma. No citoplasma, a hidrólise do GTP (auxiliado pela RanGAP), libera as carioferinas para um novo ciclo de importação nuclear.

A RanGTP é a responsável pelo direcionamento do transporte nuclear. Essa proteína se encontra cem vezes mais concentrada no núcleo quando comparada ao citoplasma. A diferença de concentrações acontece pois a RanGAP, responsável pela hidrólise do GTP, é uma proteína citoplasmática, enquanto a RanGEF RCC1, responsável pela troca do GDP pelo GTP, encontra-se no núcleo (Kim et al., 2017).

Além da forma clássica de transporte nuclear, a carioferina  $\beta$  também é capaz de reconhecer NLS e interagir diretamente com a proteína carga. Essa forma de transporte nuclear é então, uma via alternativa à via clássica, e é a forma pela qual a maior parte das carioferinas  $\beta$  realizam o transporte. O que difere por qual via e qual carioferina será a responsável pelo transporte nuclear de determinada proteína é o seu sinal de localização nuclear.

#### **4.3. Sinal de localização nuclear**

O primeiro passo para o transporte nuclear é a diferenciação entre as proteínas que devem ser transportadas para o núcleo das que devem permanecer no citoplasma. As carioferinas são capazes de reconhecer as proteínas endereçadas ao núcleo por meio do Sinal de Localização Nuclear (NLS) presente na sequência destas (Lange et al., 2007).

Os NLS clássicos (cNLS) são assim chamados pois são reconhecidos pela carioferina  $\alpha$ , sendo importados ao núcleo pela via clássica de transporte nuclear. Esses NLS são compostos por um (monopartido) ou dois (bipartido) trechos básicos, ricos em lisinas (K) e argininas (R). A sequência dos NLSs monopartidos é curta (5-7 resíduos) e bastante básico (Kim et al., 2017; Lange et al., 2007; Marfori et al., 2011).

A natureza compacta e polar desses NLSs pode favorecer a sua localização na superfície de loops, onde o sinal é acessível (Chook and Süel, 2011).

Diferente dos NLS clássicos, os PY-NLS possuem uma estrutura maior e mais variações na sua sequência, mesmo assim, as carioferinas  $\beta$  são capazes de reconhecer diretamente esses NLSs por meio de múltiplas interações fracas. Os PY-NLS são compostos por um motivo  $RX_{2-5}PY$  no seu C-terminal e motivos básicos no seu N-terminal, variando de proteína para proteína. Normalmente, os PY-NLS são levados para o núcleo pela carioferina  $\beta$  Kap104 (*S. cerevisiae*) ou Kap $\beta$ 2 (humanos) (Chook and Süel, 2011; Kim et al., 2017; Soniat and Chook, 2015). Kap104 é uma carioferina não essencial em levedura e, além de ser importante para os PY-NLS, é capaz de importar outras proteínas as quais não possuem as características de um PY-NLS (Soniat and Chook, 2015).

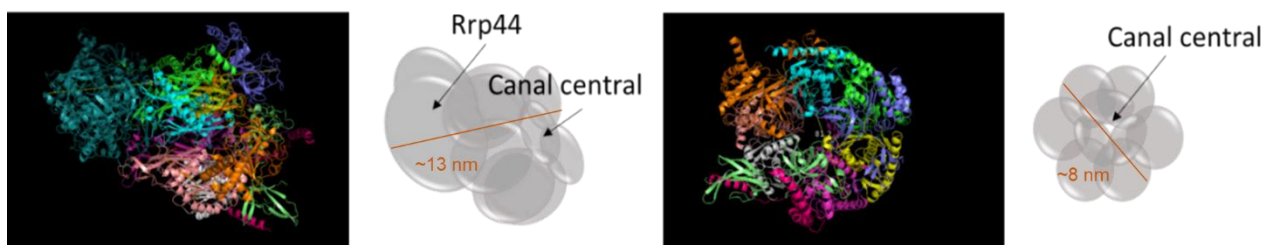
Os NLSs ricos em lisina são NLS não muito longos (menores que 25 aminoácidos), mais complexos e mais diversos que os NLSs clássicos. Apesar dos vários NLSs já identificados, não foi possível identificar uma sequência consenso. Os NLS ricos em lisinas são reconhecidos pela carioferina  $\beta$  essencial Kap121 ou pela carioferina  $\beta$  não essencial Kap123. As duas carioferinas são responsáveis pelo transporte de diversas proteínas ribossomais e das histonas H3 e H4, uma servindo de rota alternativa ao transporte realizado pela outra (Chook and Süel, 2011).

Algumas outras carioferinas  $\beta$  são conhecidas por transportarem diretamente suas proteínas-carga, mas pouco se sabe sobre os NLSs das proteínas carga. Esse é o caso da carioferina Kap108 ou Sxm1, que também auxilia na importação das proteínas ribossomais; e da Kap114, que media a importação das histonas H2A e H2B, fatores de transcrição TBP (TATA-binding protein) e TFIIB (Chook and Süel, 2011).

## 5. Localização do Complexo Exossomo

Na levedura *S. cerevisiae*, o exossomo é um complexo tanto nuclear quanto citoplasmático, tendo uma das subunidades catalíticas, Rrp6, como subunidade exclusivamente nuclear (Kilchert et al., 2016).

Os primeiros estudos de localização do exossomo foram feitos em *S. cerevisiae*, utilizando-se algumas subunidades do complexo. No ano de 1999, dois grupos diferentes publicaram artigos avaliando a localização do exossomo. Zanchin *et al.* mostrou por meio de experimentos de microscopia utilizando GFP-Rrp43 superexpressa, que essa subunidade estava concentrada no núcleo da célula, mas também presente no citoplasma (Zanchin and Goldfarb, 1999). Já Allmang *et al.* analisaram a localização das subunidades Rrp4 e Rrp6 superexpressas através de imunolocalização. Os resultados mostraram que o sinal proveniente de Rrp6 era nuclear, enquanto que Rrp4 apresentava um sinal nuclear, mas também estava presente no citoplasma. Experimentos de coimunoprecipitação usando ProtA-Rrp4 corroboraram aqueles resultados, mostrando dois complexos: um nuclear, com Rrp6, e outro citoplasmático, sem Rrp6 (Allmang et al., 1999).



**Figura 4. O tamanho do complexo exossomo.** A estrutura apresentada acima foi retirada do PDB (*Protein Data Bank* – 5G06), e medida a partir do programa *pymol*. O exossomo possui por volta de 13

nm de altura (considerando a subunidade Rrp44), e 8 nm de largura, o que permitiria a passagem do complexo montado pelo poro nuclear. <https://www.rcsb.org/structure/5G06>.

A localização do complexo exossomo também foi avaliada em *Drosophila melanogaster* (Graham et al., 2006), organismo no qual a imunolocalização das subunidades do exossomo foi feita de duas maneiras: por meio de anticorpos específicos contra as subunidades do complexo expressas em condições endógenas, e por meio de anticorpo anti-FLAG para as subunidades fusionada ao FLAG no seu C-terminal, sob controle de um promotor induzível. No caso de *D. melanogaster*, os fenótipos observados para as subunidades do exossomo variam bastante de acordo com a subunidade. Algumas subunidades, como Mtr3 e Rrp40, foram observadas no citoplasma da célula e ao redor do núcleo. Outras subunidades, como Rrp46, Rrp4, Rrp42 e Csl4, encontravam-se no citoplasma, mas também em grânulos. As subunidades Rrp44 e Rrp41 apresentaram localizações restritas, ou no citoplasma ou no núcleo, sendo Rrp44 predominantemente nuclear e Rrp41 predominantemente citoplasmática. A subunidade Rrp6 encontrava-se enriquecida no nucléolo e no núcleo, mas não no citoplasma (Graham et al., 2006).

Em um outro trabalho usando *D. melanogaster* como modelo, analisou-se localização da subunidade Rrp44 (dDIS3). Este estudo avaliou a localização de Rrp44 *full-length* e mutantes de deleção, fusionados ao FLAG no seu C-terminal, sob controle de um promotor induzível. A subunidade *full-length* apresentou um fenótipo predominantemente nuclear (90% das células), enquanto os mutantes de deleção sem seu C-terminal mostraram um fenótipo predominantemente citoplasmático. Ademais, mutantes de deleção do N-terminal de dDIS3 também mostraram que essa região é importante para localização nuclear desta proteína, mostrando que a localização desta subunidade é baseada num balanço entre seu N-terminal (abrangendo uma região um

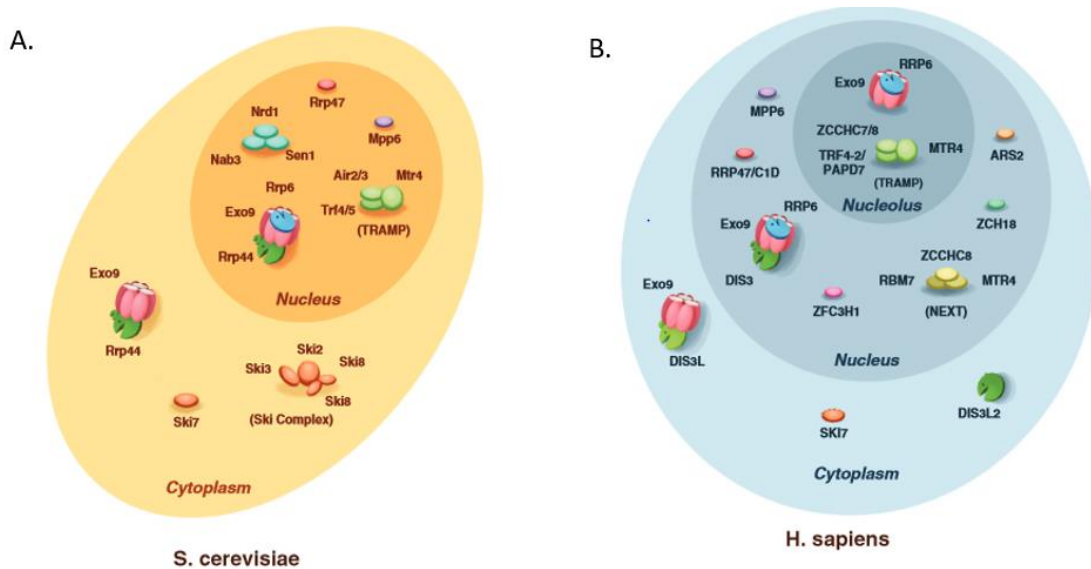


pouco maior que seu domínio PIN) e seu C-terminal (um porção de 54 aminoácidos, localizada após o domínio S1) (Mamolen et al., 2010).

Os estudos em *D. melanogaster* levantam pontos interessantes sobre a existência de subcomplexos e funções restritas às subunidades, as quais poderiam estar agindo individualmente. Para entender um pouco mais da dinâmica de interação do complexo, Hernández *et al.* (2006) avaliou a composição do exossomo de levedura por meio de experimentos de espectrometria de massa, fazendo uso de agentes desnaturantes para testar a força de interação do complexo. O exossomo de levedura é encontrado, principalmente, na forma montada, ou seja, as 10 subunidades podem ser recuperadas juntas numa proporção 1:1. Entretanto, quando testadas as forças de interação entre as subunidades, é possível observar subcomplexos como os dímeros Rrp42:Mtr3, Rrp41:Rrp45 e Rrp43:Rrp46. Alguns outros subcomplexos, como Rrp45:Rrp46, Rrp41:Rrp40:Rrp45:Rrp46, Rrp40:Rrp45, Csl4:Rrp43 e Casl4:Rrp43:Mtr3 também foram encontrados, o que ajudou na montagem do mapa de interação das subunidades do exossomo (Hernández et al., 2006). Mesmo sendo um complexo grande, o exossomo poderia ser transportado para o núcleo já montado, uma vez que o poro nuclear permite a passagem de complexos até 39 nm e o exossomo tem 13 nm (Fig. 4).

Em células humanas, Rrp44 ou hDis3 é majoritariamente nuclear, mas pouco presente no nucléolo, ademais a presença dessa subunidade no citoplasma não é descartada. hDis3 possui duas outras isoformas encontradas em alguns outros eucariotos, hDis3L1 e hDis3L2, as quais são descritas como presentes exclusivamente no citoplasma da célula. Além disso, ao contrário do que é observado para hDis3, a outra subunidade catalítica hRrp6 possui uma localização nuclear e enriquecida no nucléolo. Além disso, existe a possibilidade da presença de hRrp6 no

citoplasma das células humanas, uma vez que foi observado um sinal fraco de hRrp6 nesse compartimento (Tomecki et al., 2010).



**Figura 5. Localização do complexo exossomo e de seus cofatores nos diferentes compartimentos celulares.** A localização do *core* do exossomo (rosa) e de suas subunidades catalíticas está ilustrado na figura. A localização dos cofatores do exossomo também está ilustrado acima, dentre eles, o complexo TRAMP no núcleo e o complexo SKI no citoplasma. A. Em levedura, o exossomo é descrito como presente no núcleo e no citoplasma, sendo Rrp6 a única subunidade exclusivamente nuclear. O *core* e a subunidade Rrp44 estão presentes em ambos os compartimentos. B. Em humanos, A subunidade catalítica Rrp6 está presente por todo o núcleo, enquanto a subunidade Dis3 (ou Rrp44) está exclusivamente no nucleoplasma. No citoplasma, as células humanas possuem duas isoformas de Dis3, uma chamada de Dis3L1, que se liga ao exossomo; a outra chamada de Dis3L2, a qual não se liga ao complexo. Imagem retirada de (Januszyk and Lima, 2014).

Recentemente, identificamos que a região N-terminal da subunidade Rrp6 do exossomo de *S. cerevisiae* é importante para seu transporte nuclear, assim como seu C-terminal, o qual contém a sequência NLS clássica. Além disso, Rrp6 é capaz de interagir com as carioferinas Srp1 e Kap95, e sua localização é afetada em mutantes condicionais dessas importinas, e no mutante de deleção da carioferina Sxm1 (Gonzales-Zubiarte et al., 2017). Contudo, ainda pouco é conhecido a respeito do transporte nuclear e da localização do complexo exossomo. Esses dados são relevantes para o melhor entendimento da montagem e da regulação de um complexo

essencial para as células, conservado em diversos organismos. Além disso, o entendimento do mecanismo de transporte do exossomo é importante porque o complexo tem como sua principal função a maturação do RNA ribossomal no nucléolo, o que é enfatizado pelos dados apresentados. Neste trabalho, focamos o estudo na localização subcelular de Rrp44 e na identificação dos mecanismos de transporte nuclear desta subunidade do exossomo. A elucidação dos mecanismos de transporte do exossomo ajuda a entender a regulação e montagem do complexo, e possivelmente poderá auxiliar no descobrimento de funções alternativas de subunidades específicas e na elucidação de mecanismo de doenças encontradas em humanos.

## Objetivo Geral

Estudar os mecanismos de transporte da subunidade do exossomo Rrp44 em *Saccharomyces cerevisiae*, e analisar o transporte das outras subunidades do exossomo na ausência das subunidades Rrp6 e Rrp44.

### Objetivos Específicos

- Definir a região de Rrp44 importante para o seu transporte nuclear por meio da construção de mutantes de deleção de Rrp44;
- Identificar e testar possíveis sequências NLS de Rrp44;
- Identificar as carioferinas responsáveis pelo transporte de Rrp44 para o núcleo, por meio da análise da localização de GFP-Rrp44 em mutantes de carioferinas;
- Analisar a localização de outras subunidades do exossomo nos mutantes de deleção de Rrp44 e Rrp6 para determinar se estas subunidades estão envolvidas no transporte do complexo para o núcleo.

## Materiais e Métodos

### Construção de plasmídeos

Os oligonucleotídeos listados na tabela abaixo foram utilizados para clonagem plasmidial e genômica, e também para a checagem das clonagens.

<b>Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo</b>			
<b>N°</b>	<b>Nome</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
1	P187A- Y188A GP for	5'-GCTGCTGACATAAACGTCGTTCTTGTTAC-3'	Este estudo
2	P187A- Y188A GP reverse	5'- GTTTATGTCAGCAGCTTTCAAGTGCTCACTATA CCATTG -3'	Este estudo
3	seq NLS central rev	5'-AGCTTTTTTCGCATGTAGGGC-3'	Este estudo
4	RRP44- Spe5- pUG34	5'- AAAAGTAGTATGTCAGTTCCCGCTATCGCCCC -3'	(Okuda et al., 2020)
5	p44- EcoRI- 218rev	5'- GAATTCTTACAAGCTCTTGGTTATTATATTGGA CTCC-3'	Este estudo
6	p44- SpeI- 236for	5'-ACTAGTCCTCAAATGGATTCTTTTGATAAAG- 3'	Este estudo
7	p44- EcoRI- 475rev	5'- GAATTCTTATTCAATTGTACCGAGGTCTCTCAC- 3'	(Okuda et al., 2020)
8	p44- SpeI- 475for	5'-ACTAGTGAATCTGCTCAAGCTGAAACAG-3'	(Okuda et al., 2020)
9	EcoRI- p44- 985rev	5'-AAAGAATTCCGACCTAACTTGAAGTTCGACC- 3'	(Okuda et al., 2020)
10	RRP44- Eco3- pUG34	5'-AAAGAATTCCTATTTTAACAATAATTCTGCC-3'	(Okuda et al., 2020)
11	Sp6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'	Promega

12	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Promega
13	XhoAnt esXYZr ev	5'-AAACTCGAGGGTGGTATTGGAAGAGGACTC-3'	(Okuda et al., 2020)
14	XhoDep oisXYZf or	5'-AAACTCGAGGCACCAAGTTCTGTTGATCCAC-3'	(Okuda et al., 2020)
17	F2_cor e	5'-TCGATGAATTCGAGCTCGTT-3'	Sung et al., 2008
18	R1_cor e	5'-GGTCGACGGATCCCCGGGTT-3'	Sung et al., 2008
19	Rrp41- Checku p	5'-CTACCCATTATTAGATACCAATTCA-3'	Este estudo
20	Rrp41- Checkd own	5'-CCAAAATGTAACGCACTTAAGGAGA-3'	Este estudo
21	Rrp43- Checku p	5'-GGAGTTAGACCCCGAATGCCAATTAC-3'	Este estudo
22	Rrp43- Checkd own	5'-GTTAACGTTGACTTGAAAAACGTTC-3'	Este estudo
23	o- R1_RP A190	5'-CTTTTCTTCTGACCTTCTCCTTCAAATAAACTAA TATTAATCGTAATAATTATGGGACCTTTTGCCT GCTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Darrière et al., 2019
24	o- F2_RP A190	5'-ATTGTGGTGGGTAAATTGAACAATGTTGGTACG GGTTCATTTGATGTGTTAGCAAAGGTTCCAAAT GCGGCTCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	Darrière et al., 2020
25	o- Check- DIS3- up	5'-CAGGTGCCATTGGGTATGAACCCCTAAGTTTG AC-3'	Este estudo
26	o- Check- DIS3- do	5'-GGTTTAGTGGTAAAATCCAACGTTGCCATCGTT G-3'	Este estudo
27	CD147	5'-GAGCATGATATTGCATATAGC-3'	Dez & Gadal, não publicado
28	CD148	5'-CAGTAACCTTTTGCCAATGGCC-3'	Dez & Gadal, não publicado
29	F2_Dis 3	5'-CGATAAGGTCGAAGTTCAAGTTAGGTCGGTGA TGGATCCAATTACTAGCAAGCGTAAGGCAGAA TTATTGTTAAAACGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	Dez & Gadal, não publicado

30	R1_Dis 3	5'- ATTGACTACTTTACGATGTGTTTTATATATGAGT TATGAATTCCTTTTCGTTTTTATATCCTGATACT GAAGCATCTTCCATGAATTCGAGCTCGTTTAAA C-3'	Dez & Gadal, não publicado
----	-------------	--	-------------------------------

Para construção dos plasmídeos deste estudo, dois métodos foram empregados. Na construção dos mutantes de deleção, primeiro o fragmento de interesse foi amplificado por PCR com o par de primers correspondente, usando como molde o plasmídeo pUG34-Rrp44. A reação de PCR foi feita utilizando-se a enzima GoTaq DNA Polymerase (Promega). O fragmento foi, então, clonado no vetor pGEMT-easy (Promega). O plasmídeo foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SpeI*, o fragmento purificado do gel de agarose por meio do Kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) e clonado no plasmídeo *pUG34*.

No caso do mutante pontual Rrp44<sub>(P187A-Y188A)</sub>, o plasmídeo pUG34-Rrp44 foi amplificado utilizando primers contendo as duas mutações pontuais desejadas. O PCR foi feito com o kit CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara). O plasmídeo foi circularizado por recombinação, e transformado segundo as especificações do In-Fusion Cloning kit (Takara).

**Tabela 2. Plasmídeos usados neste estudo**

Nome	Características/marcas	Referência
<b>pFA6-mCherry-HIS3</b>	HIS3, integrative, C-term mCherry	(Bachelier-Bassi et al., 2008)
<b>pFA6-GFP(S65T)-KIURA3</b>	URA3, integrative, C-term GFP	(Sung et al., 2008)
<b>pRS305-Nup57-tDimer</b>	LEU2, integrative, Nup57-RFP	(Okuda et al., 2020)
<b>pFA6a-mCherry-KIURA3</b>	URA3, integrative, C-term mCherry	(Gadal, O., não publicado)

<b>pUN-GFP-Nop1</b>	LEU2, CEN/ARS, GFP-NOP1	(Hellmuth et al., 1998)
<b>pUN100-mcherry-Nop1</b>	LEU2, CEN/ARS, mCherry-NOP1	(Berger et al., 2008)
<b>pUG34</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3	(Niedenthal et al., 1996)
<b>pUG34-Rrp6</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25:: yEGFP3-RRP6	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
<b>pUG34-Rrp41</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25:: yEGFP3-RRP41	(Okuda et al., 2020)
<b>pUG34-Rrp43</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25:: yEGFP3-RRP43	((Okuda et al., 2020)
<b>pUG34-Rrp44</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25:: yEGFP3-RRP44	(Okuda et al., 2020)
<b>pUG34-rrp44(1-985)</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44[1-985]	(Okuda et al., 2020)
<b>pUG34-rrp44Δ(364-407)</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44Δ[364-407]	(Okuda et al., 2020)
<b>pUG34-rrp44(1-363)(408-985)</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44Δ[364-407]	(Okuda et al., 2020)
<b>pUG34-rrp44(1-218)</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44[1-218]	Este estudo
<b>pUG34-rrp44(263-475)</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44[263-475]	Este estudo
<b>pUG34-rrp44(1-475)</b>	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44[1-475]	Este estudo
<b>pUG34-rrp44(475-1001)</b>	HIS3, ARS/CEN6/ PMET25::yEGFP3-rrp44[475-1001]	Este estudo
<b>YCplac33-RRP44</b>	URA3,ARS/CEN/PGAL1::ProtA-RP44	((Okuda et al., 2020)
<b>YCplac33-SRP1</b>	GAL1::ProtA-SRP1, URA3, CEN4	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
<b>YCplac33-KAP95</b>	GAL1::ProtA-KAP95, URA3, CEN4	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
<b>pGEX</b>	GST <sup>7</sup> , lacI, Amp <sup>R</sup>	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
<b>pET28-KAP95</b>	His::KAP95, Kan <sup>R</sup>	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
<b>pET29-SRP1</b>	His::SRP1, Kan <sup>R</sup>	(Gonzales-Zubiate et al., 2017)
<b>pGEX-RRP44</b>	GST::RRP44, Amp <sup>R</sup>	(Bagatelli et al., não publicado)
<b>pGEMT-easy</b>	lacZ, Amp <sup>R</sup>	<i>Promega</i>



**Cepas de *Escherichia coli* e condições de crescimento utilizadas neste trabalho.**

As cepas de *E. coli* utilizadas como intermediárias de clonagem para construção de mutantes e para ensaios de interação proteica estão listadas na tabela 3. As cepas bacterianas foram manipuladas de acordo com os protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 1989.

**Tabela 3. Lista de cepas de *Escherichia coli***

Cepa	Genótipo	Referência
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU163</i> ( $\phi$ 80 <i>LacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli B F<sup>-</sup> ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> galA</i> (DE3) <i>endA Hte [argU ileY</i> <i>leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene

O cultivo das cepas bacterianas DH5 $\alpha$  e BL21 (DE3) foi feito em meio LB ou 2YT e suplementadas com os antibióticos ampicilina (Amp), cloranfenicol (CHL) e canamicina (Kan), de acordo com a seleção requerida.

**Tabela 4. Meios de cultura bacteriana**

Meio	Composição
LB	1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 2% ágar
2YT	1,6% triptona; 1% extrato de levedura; 1% NaCl
	Suplementação
Ampicilina	100 $\mu$ g/mL
Cloranfenicol	50 $\mu$ g/mL
Canamicina	20 $\mu$ g/mL
IPTG	0,5mM

### **Transformação de células competentes (DH5α).**

Adicionamos aproximadamente 400 ng de DNA proveniente de reação de ligação ou por volta de 10 ng de DNA plasmidial a 100 µl de suspensão de células competentes. Em seguida, foram adicionados 80 µl de tampão de transformação (0,1 M KCl; 0,03 M CaCl<sub>2</sub>; 0,05 M MgCl<sub>2</sub> e 7% PEG) e a transformação foi incubada 30 minutos no gelo. As células foram submetidas a um choque térmico por incubação a temperatura ambiente por 10 minutos (25°C). Após o choque térmico, foi adicionado 1 ml de meio LB, e as células foram incubadas por 1 hora a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, resuspendidas em 100µl de meio LB e plaquedas em meio LB seletivo.

### **Transformação de células competentes (BL21).**

Foram adicionados 10 ng de DNA plasmidial a 50 µl de células competentes, e em seguida, a transformação foi incubada no gelo por 30 minutos. As células foram, então, submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos, e logo após foi adicionado 1 ml de meio LB e a cultura foi incubada por 1 hora a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação à 12000 rpm por 1 minuto e plaqueadas em meio seletivo.

### **Extração de DNA plasmidial de *E. coli*.**

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

As células bacterianas foram incubadas overnight a 37°C em meio LB seletivo. Foi coletado 1,5 ml dessa cultura celular por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto. As células foram resuspendidas em 100 µl de tampão GET (25 mM Tris-HCl, pH=8,0; 50 mM EDTA, pH=8; e 1% glicerol). As células foram lisadas por incubação por 5 minutos com 200 µl de solução de lise (200 mM NaOH e 1% SDS, preparado no momento da utilização a partir de soluções concentradas 10 vezes) e logo após foram adicionados 150 µl de solução 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Foram adicionados, então, 500 µl de isopropanol, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos para que o DNA fosse precipitado. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70%, com agitação no vórtex por 1 minuto. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, o etanol foi retirado e o DNA foi seco a 42°C por 5 minutos. Por fim, o DNA foi ressuspendido em 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH=8,0; 1 mM EDTA, pH=8,0), incubando-o a 42°C por 10 minutos.

### **Purificação de DNA em gel de agarose.**

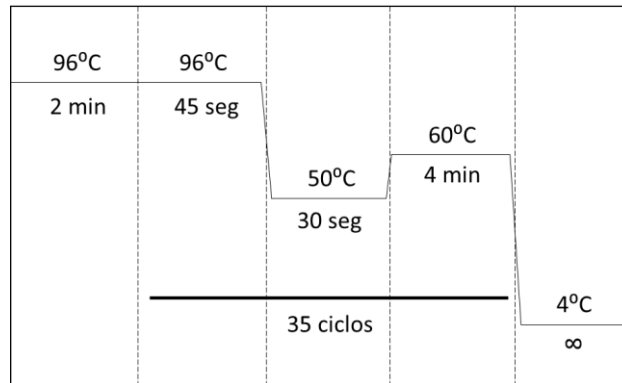
Fragmentos de DNA foram recuperados do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), segundo instruções do fabricante.

### **Preparação de DNA para Sequenciamento**

O DNA plasmidial extraído de *E. Coli* por meio do kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) foi sequenciado utilizando-se o kit *BigDye terminator V3.1 Cycle Sequencing* (AB-applied biosystems), segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados 2,5 pmol de primer e 300 a 600 ng de vetor como molde da reação de 35

ciclos de: desnaturação à 96°C por 45 segundos, hibridização à 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. A figura 6 ilustra a reação de sequenciamento.

### Reação de Sequenciamento



**Figura 6. Esquema representativo da reação de sequenciamento.** O esquema representa as temperaturas e o tempo de cada uma das etapas da reação de sequenciamento feito.

A etapa final de corrida das amostras de sequenciamento foi feita pela Central Analítica do Instituto de Química – USP.

### Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e condições de crescimento utilizadas neste trabalho.

O crescimento das cepas de levedura foi realizado em meio rico (YPD) ou em meio mínimo (YNB). Quando em meio mínimo, o crescimento foi suplementado com os aminoácidos necessários (2009).

**Tabela 5. Meios de cultura de levedura**

Meio	Componentes
YPD (meio rico)	1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose; 2% ágar
YNB (meio mínimo)	0,7% YNB ( <i>yeast nitrogen base</i> ); 2% glicose/galactose; 2% ágar; suplementado com bases nitrogenadas e aminoácidos necessários

<b>aminoácidos</b>	<b>Concentração</b>
<b>Leucina</b>	100 mg/L
<b>Lisina</b>	30 mg/L
<b>Histidina</b>	20 mg/L
<b>Metionina</b>	20 mg/L
<b>Adenina</b>	20 mg/L
<b>Triptofano</b>	20 mg/L
<b>Uracila</b>	20 mg/L

As cepas de *S. cerevisiae*, utilizadas nas análises de localização, western blot e de interação, estão listadas na Tabela 3.

**Tabela 6. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho**

<b>nome</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Referência</b>
<b><i>SKI6/RRP41 (YGR195W)</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RRP41-TAP-HIS3</i>	Ghaemmaghami, et al., 2003
<b><i>RRP6 (YOR001W)</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RRP6-TAP-HIS3</i>	Ghaemmaghami, et al., 2003
<b><i>RRP43 (YCR035C)</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RRP43-TAP-HIS3</i>	Ghaemmaghami, et al., 2003
<b><i>RPA190-Mcherry</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPA190-mCherry-URA3(KI)</i>	Dez, não publicado
<b><i>BY4742</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<b><i>Nup57 tDimer</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 NUP57-tDimer-LEU2</i>	Este trabalho
<b><i>Rrp6-GFP</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp6 GFP-URA3</i>	Este trabalho
<b><i>Rrp6-mCherry</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp6 mCherry-URA3</i>	Este trabalho
<b><i>Rrp41-GFP</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp41 GFP-URA3</i>	Este trabalho
<b><i>Rrp41-mCherry</i></b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp41 mCherry-URA3</i>	Este trabalho

<b>Rrp43-GFP</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp43 GFP-URA3</i>	Este trabalho
<b>Rrp43-mCherry</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp43 mCherry-URA3</i>	Este trabalho
<b>Rrp44-GFP</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp44 GFP-URA3</i>	Este trabalho
<b>Rrp44-mCherry</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp44 mCherry-URA3</i>	Este trabalho
<b>Rrp6-GFP RPA190mCherry</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp6 GFP-URA3 RPA190mCherry- HIS3</i>	Este trabalho
<b>Rrp41-GFP RPA190mCherry</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp41 GFP-URA3 RPA190mCherry- HIS3</i>	Este trabalho
<b>Rrp43-GFP RPA190mCherry</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp43 GFP-URA3 RPA190mCherry- HIS3</i>	Este trabalho
<b>Rrp44-GFP RPA190mCherry</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp44 GFP-URA3 RPA190mCherry- HIS3</i>	Este trabalho
<b>BY4741</b>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
<b>Δsrp1</b>	<i>YNL189w::kanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; Ycplac33-GAL-A-SRP1</i>	Gonzales, 2017
<b>Δkap95</b>	<i>YLR347c::kanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; Ycplac33-GAL-A- KAP95</i>	Gonzales, 2017
<b>Δrrp6</b>	<i>BY4742; Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YOR001w::kanMX4</i>	EUROSCARF
<b>Δrrp44</b>	<i>BY4743; MATa/MATα; ura3Δ0/ura3Δ0; leu2Δ0/leu2Δ0; his3Δ1/his3Δ1; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; YOL021c/YOL021c::kanMX4</i>	EUROSCARF

<b><math>\Delta rrp44</math> -A-RRP44</b>	BY4743; MATa/MAT $\alpha$ ; <i>ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YOL021c/YOL021c::kanMX5</i> <i>YCplac33-GAL-A-RRP44</i>	Okuda, 2020
<b><math>\Delta sxm1</math></b>	BY4742; <i>Mat a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YDR395w::kanMX4</i>	EUROSCARF
<b><math>\Delta kap123</math></b>	BY4742; <i>Mat a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YER110C::kanMX4</i>	EUROSCARF
<b><math>\Delta kap114</math></b>	BY4742 ; <i>Mat a</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>YGL241w::kanMX4</i>	EUROSCARF
<b><math>\Delta kap104</math></b>	<i>CEN.ZI5-3B</i> ; <i>CEN.PK</i> ; <i>Mat a</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2-3_112</i> ; <i>trp1-289</i> ; <i>YBR017c::URA3</i>	EUROSCARF

Os *tags* GFP e mCherry foram inseridos no genoma de levedura, mais especificamente no C-terminal de genes de interesse deste estudo. Primeiramente, um cassete contendo o gene *URA3* de *K. lactis* (marca de seleção) e o *tag* de GFP ou mCherry foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pFA6-GFP(S65T)-KIURA3 ou pFA6a-mCherry-KIURA3, respectivamente. O fragmento de PCR foi inserido a jusante de cada ORF contendo o *TAP-tag* (Ghaemmaghami et al., 2003), através do método Swap-tag (Sung et al., 2008). Os transformantes foram selecionados por prototrofia a uracila, checados por PCR genômico e por microscopia de fluorescência. A cepa BY4742 contendo RRP44 fusionada a GFP ou mCherry também foi construída como descrito anteriormente.

O gene *RPA190* foi fusionado a mCherry nas cepas que já continham as subunidades do exossomo fusionadas a GFP e na cepa BY4742. A mesma estratégia

foi utilizada para construção do clone: primeiro o plasmídeo pFA6-mCherry-HIS3 foi amplificado, depois o cassete foi inserido por recombinação homóloga e selecionado para prototrofia a histidina, checado por PCR e por microscopia de fluorescência.

Para construir a cepa Nup57 t-dimer marcada no genoma, o plasmídeo pRS305-Nup57-tDimer foi linearizado com a enzima de restrição BglII e foi inserido por recombinação homóloga na cepa BY4742. A nova cepa foi selecionada para prototrofia a leucina e checada por microscopia de fluorescência.

Para as análises dos mutantes de deleção de Rrp44, os plasmídeos expressando GFP fusionado a cada um dos mutantes foi transformado nas cepas BY4742 e  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$ . Para as análises de localização de GFP-Rrp44 selvagem, as cepas mutantes de carioferinas  $\Delta srp1/GAL::SRP1$ ,  $\Delta kap95/GAL::KAP95$ ,  $\Delta kap104$ ,  $\Delta kap123$ ,  $\Delta kap114$  e  $\Delta sxm1$  foram transformadas com o plasmídeo pUG34-Rrp44.

### **Transformação de levedura de alta eficiência.**

Uma colônia isolada de levedura foi inoculada em 10 ml de meio seletivo ou rico (para a cepa selvagem), e a cultura foi incubada a 30°C. Após atingir uma OD<sub>600</sub> próxima a 0,8, foram coletados 6 ml da suspensão de células a 4000 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas com 2 ml de água estéril por agitação no vórtex por 1 minuto. As células foram coletadas novamente, e resuspendidas em 200 µl de solução 0,1 M LiOAc em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH=8,0; 1 mM EDTA pH=8,0). Foram separados 100 µl e, a essa suspensão de células, foram adicionados 5 µg de DNA plasmidial e 200 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado (Gibco). Em seguida foram adicionados 600 µl de solução de transformação (0,1 M LiOAc; 50% PEG<sub>3500</sub> em TE) e a reação foi incubada a 30°C por 30 minutos. As células foram então



submetidas a choque térmico por incubação a 42°C por 15 minutos, coletadas por centrifugação, resuspendidas e tampão TE e plaqueadas em meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por 2 dias ou até o aparecimento de colônias.

### **Transformação rápida de levedura.**

Uma colônia isolada foi incubada em 2 ml overnight. No dia seguinte, 200 µl de cultura em OD<sub>600</sub>~1,0 foram coletadas por centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto, lavadas com 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH=8,0; 1 mM EDTA, pH=8). As células foram centrifugadas novamente e resuspendidas em 100 µl de solução de transformação (0,2 M LiOAc; 4% PEG; 100 mM DTT). Após a adição de 2 a 5 µg de DNA plasmidial, as células foram submetidas a um choque térmico por 30 minutos a 42°C. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio seletivo por dois a três dias.

### **Teste de complementação.**

A fim de testar a complementação dos mutantes de deleção de Rrp44, a cepa *Δrrp44/A-Rrp44* foi transformada com cada um dos mutantes de deleção. Primeiramente, todas as células foram crescidas em galactose, normalizadas para uma OD<sub>600</sub>~0,1 e diluídas em série em água autoclavada. As células foram plaqueadas em três diferentes meios: YNB galactose (+Met); YNB galactose (- Met); e YNB glucose (-Met), e foram incubadas a 30°C. Cada uma das condições levou a expressão (gal) ou queda na expressão (glu) de Rrp44 selvagem, assim como maior níveis de expressão (-Met) ou menores níveis de expressão (+Met) dos mutantes de Rrp44. A tabela 7 resume as diferentes condições de expressão analisadas.

**Tabela 7. Condição de crescimento do teste de complementação**

<b>Meio</b>	<b>Suplementação aminoácidos</b>	<b>com</b>	<b>Expressão/Inibição</b>
<b>YNB Galactose</b>	Leucina, lisina e metionina		Expressão de Rrp44 selvagem/Inibição dos mutantes de deleção
<b>YNB Galactose</b>	Leucina e lisina		Expressão de Rrp44 selvagem/Expressão dos mutantes de deleção
<b>YNB Glicose</b>	Leucina e lisina		Inibição de Rrp44 selvagem/ Expressão dos mutantes de deleção

### **Microscopia de Fluorescência.**

As células cresceram overnight em meio seletivo. No dia seguinte, foram coletadas o equivalente a 1 ml de cultura de levedura numa  $OD_{600} = 0,6$ . As leveduras foram fixadas em metanol 70%, sendo primeiramente ressuspensas em 30  $\mu$ l de PBS, seguidos dos 70  $\mu$ l de metanol gelado. As células permaneceram no gelo por 15 minutos, e foram então centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos. Em seguida, as leveduras foram lavadas com PBS gelado (sem ressuspender) e tratadas com 100 mg de RNase por 30 minutos. As leveduras foram lavadas com PBS novamente, e ressuspensas em 10  $\mu$ l de PBS. Para montagem da lâmina foram utilizados 4  $\mu$ l de suspensão de células. O núcleo foi marcado com VECTASHIELD Medium with DAPI (VECTOR), diretamente na lâmina, sem necessidade de lavagem. As lâminas foram observadas usando o microscópio Nikon Eclipse Ti equipado com filtros para fluorescência verde (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) e fluorescência azul (DAPI-1160A-000-ZERO, Semrock). O tempo de exposição variou de 1 a 3 segundos. As imagens foram processadas através do programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

As células foram tratadas da mesma forma quando analisadas no microscópio confocal. As leveduras foram observadas no formato 1024 x 1024-pixel, usando o

microscópio Zeiss LSM 780 confocal laser-scanning inverted microscope (Carl Zeiss, Germany) localizado no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP-USP). Para cada imagem final, foram obtidas 6 imagens no eixo Z, capturadas com uma objetiva alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 oil differential interference contrast M27 (Carl Zeiss), aplicando-se um fator de zoom de 1.5. Intervalos ao longo do eixo Z foram de 200 a 250 nm. O processamento da imagem foi feito utilizando-se zen 2011 software (versão 11.00.190; Carl Zeiss).

### **Contagem dos Mutantes de Rrp44.**

A contagem das células que apresentavam diferentes fenótipos foi feita analisando imagens de microscopia de fluorescência obtidas em diferentes dias. As imagens foram importadas no programa ImageJ e foi feita a sobreposição do sinal dos mutantes de deleção com seus respectivos núcleos. As células as quais não apresentavam sinal detectável foram descartadas da contagem e utilizadas como referência do background celular. Foram feitos gráficos do perfil do sinal de GFP e DAPI, e os gráficos foram utilizados para definição do fenótipo de cada célula. Para cada mutantes, houve uma contagem diferente no número total de células (Okuda et al., 2020).

### **Microscopia Confocal Spinning-Disk.**

Uma colônia foi inoculada overnight em meio rico (para as cepas sem plasmídeos) ou em meio seletivo (para manutenção de determinados plasmídeos). No dia seguinte, as células foram diluídas para  $OD_{600} \sim 0,1$  e crescidas até atingirem  $OD_{600}$  de 0,5 até 0,8. As células foram centrifugadas, e a levedura foi ressuspensas em meio mínimo (DIFCO) mais aminoácidos. As lâminas foram montadas e

observadas no microscópio de fluorescência. O ágar *pad*, feito para observação das leveduras, foi feito com 2% de agarose dissolvida no mesmo meio no qual as leveduras foram ressuspendidas.

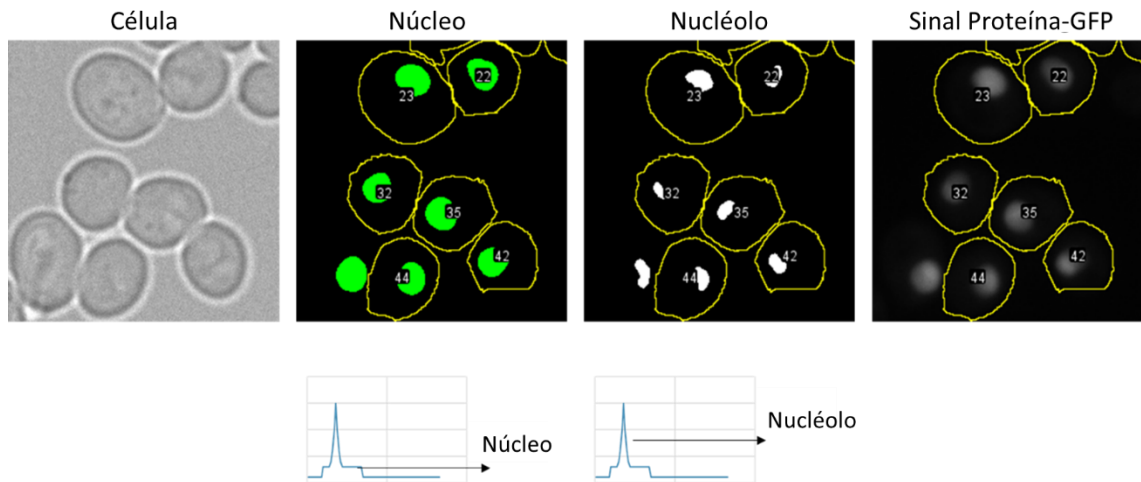
A microscopia confocal foi feita utilizando-se o sistema confocal *Nipkow-disk* (*Revolution; Andor*), instalado em um microscópio *Olympus* (IX-81), contendo uma unidade confocal *Spinning disk* (CSY22; *Yokogawa*), e uma câmera *cooled electron multiplying charged-coupled* (DU 888; *Andor*). O sistema era controlado usando-se o software IQ2 (*Andor*). Imagens foram adquiridas utilizando-se a objetiva *100x Plan Apo 1.4 NA oil immersion* e uma lente *twofold* no caminho ótico. Os lasers utilizados foram *diode-pumped solid-state lasers*, capazes de excitar a fluorescência de GFP em 488 nm (50 mW; *Coherent*) e a fluorescência de mCherry a 561 nm (50 mW; *Cobolt jive*), foi utilizado o espelho dicróico Di01-T405/488/568/647-13x15x0,5; *Semrock* foi utilizado como filtro de emissão *bi-bandpass* (FF01-512/630-25; *Semrock*), permitindo a detecção da fluorescência verde e vermelha. Nas nossas condições, o tamanho do pixel foi de 65 nm. Para quantificação do volume nucleolar, foram obtidas 40 secções no eixo Z com 200 nm entre cada uma das secções. Os tempos de exposição variaram de 0,1 a 1 segundo. As imagens foram processadas utilizando-se o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD - <https://imagej.nih.gov/ij/>).

### **Análise de imagem e Quantificação do Sinal do Exossomo.**

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência foram importadas no programa ImageJ. A intensidade das proteínas fusionadas ao GFP foi medida e sua localização subnuclear foi analisada utilizando-se *pipeline* dedicada a análise de

imagens (ImageJ Macro) desenvolvida pelo técnico de microscopia confocal Sylvain Cantaloube (da Universidade de Toulouse), descrita abaixo:

- i. A área da célula foi determinada baseado na imagem obtida da luz visível graças aos seguintes passos: remoção do background (*subtracting Gaussian Blur image – sigma = 40*); segmentação das células utilizando o algoritmo do ImageJ *Moments threshold*; determinação do objeto correspondente a célula com *Analyze Particle* (função do ImageJ); separação das células em contato com o Plugin *Adjustable Watershed* ([https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:segmentation:adjustable\\_watershed:start](https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:segmentation:adjustable_watershed:start)).
- ii. A segmentação nuclear e nucleolar foi feita a partir do sinal de Rpa190 fusionada ao mCherry. A proteína Rpa190 é a maior subunidade da RNA polimerase I, encontrando-se enriquecida no nucléolo, com um sinal mais sutil detectado no núcleo. Primeiramente, aplicou-se *Sum Z-projection* à imagem inicial de Rpa190-mCherry. Então, para determinar a área do nucléolo de cada célula, foi utilizado *Wavelet filter* e, finalmente, a segmentação foi feita por meio do algoritmo *Yen threshold*. Para determinar a área do núcleo, foi segmentado diretamente na imagem projetada em Z o algoritmo *Triangle threshold*.
- iii. As células foram subdivididas em nucléolo, nucleoplasma e citoplasma. O ImageJ macro quantificou o sinal de cada compartimento.



**Figura 7. Resultado obtido pelo programa ImageJ Macro.** O programa Macro desenvolvido por Sylvain Cantaloube utilizava as delimitações da célula observáveis nas imagens de contraste de fase para determinar a área da célula (identificado pelos círculos amarelos nos seguintes quadrantes da figura). A área correspondente ao núcleo e ao nucléolo foi determinada por meio do sinal proveniente de Rpa190-mCherry, identificadas de verde e branco respectivamente. Após ter a área de cada compartimento, foi possível quantificar o sinal das proteínas fusionadas ao GFP no nucléolo, no núcleo e em toda a célula. Os gráficos abaixo das imagens do núcleo e do nucléolo representam o sinal de Rpa190 em cada um dos compartimentos utilizados para segmentá-los.

Todas as quantificações foram feitas relativas a uma célula controle, que não expressava GFP. Para calcular o enriquecimento das subunidades do exossomo, calculou-se a intensidade média por unidade de área de determinado compartimento e, então, comparou-se esse valor à intensidade média por unidade de área da célula inteira para cada uma das células. Para calcular a porcentagem do sinal de GFP em cada compartimento celular, primeiro o sinal de cada compartimento foi obtido (nucléolo, nucleoplasma e citoplasma) e somado para cada célula. O sinal de GFP de cada compartimento foi, então, dividido pela soma do sinal total de GFP de cada célula, e a porcentagem foi calculada.

## Microscopia Eletrônica.

Com o intuito de analisar morfológica e funcionalmente o nucléolo, as leveduras cresceram em meio rico *overnight*, e diluídas na manhã seguinte. Após atingirem a fase logarítmica de crescimento, as leveduras foram coletadas e criofixadas por congelamento por alta pressurização (EMPACT; Leica) e criosubstituídas com 0,1% de acetato de uranila em acetona por 72 horas no sistema de criosubstituição EM ASF2 (Leica), assim como descrito em (Normand et al., 2016). As células foram, então, embebidas em uma resina Lowicrul (HM-20), polimerizada a -50°C. O processo de criosubstituição está descrito na tabela abaixo (Normand et al., 2016):

<b>48h</b>	0,1% acetato de uranila em acetona	-90°C
<b>10h</b>	Acetona	Aumento gradual da temperatura de -90°C até -50°C
<b>24h</b>	HM20 30% em acetona	-50°C
<b>24h</b>	HM20 70% em acetona	-50°C
<b>12h</b>	HM20 100%	-50°C
<b>8h</b>	HM20 100%	-50°C
<b>48h</b>	HM20 100%	-50°C com polimerização por UV
<b>20h</b>	HM20 100%	Aumento da temperatura de -50°C para 20°C (3,5°/h) com UV
<b>24h</b>	HM20 100%	20°C com UV

Depois de terminado o processo de criosubstituição, a resina foi seccionada em fatias de 100 nm, que foram depositadas em *grids* de níquel cobertas com colódio. As *grids* contendo os cortes da resina foram primeiramente lavadas 5 minutos em água autoclavada a temperatura ambiente, seguido por uma lavagem em TBS, pH=7,8 por 5 minutos. As *grids* foram bloqueadas em NH<sub>4</sub>Cl 500 M em TBS por 15 minutos, e em seguida, bloqueadas em TBS/BSA 2%, duas vezes, por 10 minutos. Anticorpo

policlonal anti-GFP foi produzido em coelho e sua especificidade testada por western blot (gentilmente cedido pelo Professor Gleizes, CBI - Toulouse/França). Duas diluições diferentes (1/50 e 1/300 em TVS/BSA 2%) foram utilizadas para incubação das *grids* por duas horas a temperatura ambiente. As *grids* foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em TBS/BSA 2%, e 3 vezes por 5 minutos em TBS/BSA 1%. Todas as lavagens foram feitas a temperatura ambiente. As *grids* foram, então, incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário (1/80 em TBS/BSA 1%) IgG anti-coelho conjugado com partículas de ouro de 10 nm (British-Biocell BBIInternational). As *grids* passaram por seguidas lavagens como mostrado na tabela abaixo.

**Tabela 9. Lavagens das *grids* após incubação com anticorpo**

<b>Repetições</b>	<b>Tempo</b>	<b>Solução</b>	<b>Temperatura</b>
2	5 minutos	TBS/BSA 1%	Temperatura ambiente
4	5 minutos	TBS	
3	3 imersões	Água MilliQ	

As *grids* foram, então, cobertas por uma camada de 5 nm de carbono e analisadas com um microscópio eletrônico 1,200 X (Jeol JEM-1400).

### **Preparação de Extrato Celular por Hidróxido de Sódio.**

O equivalente a 1 ml de cultura celular numa  $OD_{600} = 0,6$  foi coletado por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em 400  $\mu$ l de água autoclavada, e em seguida, foram adicionados 400  $\mu$ l de NaOH 0,2 M, sendo incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A suspensão de células foram, então, centrifugadas a 12000rpm por 5 minutos e ressuscitadas em 10  $\mu$ l de tampão de amostra 4x (0,06 M Tris-HCl, pH = 6,8; 5% glicerol; 5% SDS; 4% de 2 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol; 0,0025% azul de Bromofenol) e aquecido a 95°C por 5 minutos.



## **Quantificação de Proteínas pelo Método do Ácido Binciconínico (BCA).**

A quantificação de proteína total em extratos celulares foi feita de acordo com o método colorimétrico descrito por Smith *et al.* 1985. Ao extrato total, foi adicionado 1 ml de solução 5mM de  $\text{CuSO}_4$  em BCA (*bicinchoninic acid solution, Sigma*). A reação foi, então, incubada a 37°C por 30 minutos. Foi medida a absorvância em 562 nm e a concentração de proteínas no extrato foi determinada por comparação com uma curva padrão feita para BSA (*bovine seru albumin*).

## **Separação de proteínas por SDS-PAGE**

Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em gel de poli-acrilamida, como descrito por Sambrook et a. (1989). O gel de empacotamento era composto de: bis-acrilamida (29:1) 5% pH = 6,8; 0,1% SDS; 0,1% persulfato de amônio; 1  $\mu$ /ml de TEMED. O gel de separação era composto de: bis-acrilamida (29:1) 10 ou 8%; 380 mM Tris-HCl pH=8; 0,1% persulfato de amônio; 0,4  $\mu$ l/ml de TEMED. O gel foi submetido a uma voltagem de 100 V em tampão de corrida Tris-glicina 1X (25 mM Tris-HCl ; 250 mM glicina ; 0,1% SDS).

## **Coloração por “coomassie Blue”**

Os géis de poli-acrilamida os quais foram feitos para checagem de expressão proteica, foram incubados em solução de Coomassie Blue R 0,25% em metanol 45% ácido acético 10% por 1 horas e descorados em solução de etanol 50% e ácido acético 10%.

## Experimentos de Imunoblot

Amostras proteicas foram separadas em géis de SDS-PAGE. Foram utilizadas duas concentrações finais de poliacrilamida para formação dos géis: 8% para visualizar as proteínas de maior tamanho, e 10% para visualizar as proteínas de tamanho menor. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) ou nitrocelulose (NC) (*GE Healthcare*). A membrana foi incubada por 1 hora com 10 ml de solução 5% leite em pó desnatado (*Molico*) em tampão PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 7,4), lavada por 3 vezes por incubação de 10 minutos com 10ml de tampão PBS. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em solução 0,1% leite em pó em PBS, *overnight* a 4°C, com agitação. No dia seguinte, a membrana foi novamente lavada como descrita acima, seguido de uma incubação com anticorpo secundário diluído em PBS por no máximo 2 horas e lavada novamente com PBS.

As membranas foram incubadas em anticorpo primeiro contra GST (*Sigma-Aldrich*), histidine (*Sigma-Aldrich*), GFP (*Sigma-Aldrich*), ou PGK1 (*abcam*) em tampão fosfato-salino (PBS)/Tween 20/leite em pó. Os anticorpos secundário usados foram anti-coelho (IRDye 680RD) ou anti-camundongo (IRDye 800CW) conjugados com fluoróforo (Licor). A revelação das membranas foi feita no equipamento Odyssey® Imaging Systems.

## Teste de expressão em pequena escala.

Para realizar teste de expressão em pequena escala, as células foram transformadas conforme descrito na Seção “Transformação de células competentes (BL21)” e inoculadas em 2 ml de meio LB, com 50 µg/ml de cloranfenicol, a 37°C

*overnight*. Para células transformadas com o vetor pGEX foram adicionados ao meio 100 µg/ml de ampicilina e para células transformadas com pET foram adicionados 20 µg/ml de canamicina. A partir desta cultura, 100 µL foram diluídos em 10 mL de meio 2YT suplementado conforme descrito acima e a cultura foi incubada até OD<sub>600</sub>~ 0,6. Após coleta de células de 1 mL de cultura para comparação posterior (centrifugação por 12000 rpm por 1 minuto), foi induzida a expressão da proteína recombinante por adição de 0,5 mM IPTG (isopropil-β -D-tiogalactopiranosídeo). Foram coletadas células em intervalos de uma, quatro, seis horas após a indução e crescimento *overnight*. As células coletadas foram ressuspensas em 50 µl de tampão de amostra para proteína, fervidas a 95°C por 5 minutos e 5 µl destas amostras foram aplicados em SDS-PAGE. A expressão da proteína recombinante foi identificada por coloração com Comassie Blue, através de comparação com as bandas do extrato total de células não induzidas e o tempo ótimo de incubação foi determinado.

### **Expressão em grande escala.**

Para a expressão de proteína em larga escala, após a transformação das células BL21, as células cresceram em uma cultura de 5 mL em LB com os antibióticos necessários, *overnight* a 37°C. A cultura de 5 mL foi diluída em 500 mL de 2YT e incubada até atingir OD<sub>600</sub>~ 0,6. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida de acordo com as condições ótimas determinadas e a expressão foi checada por SDS-PAGE conforme descrito para o teste de expressão em pequena escala. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C e congeladas.

### Ensaio de interação proteica direta (*pull-down*).

A cepa bacteriana BL21 foi transformada com os plasmídeos pGEX-RRP44, pET28-KAP95 e pET29-SRP1, e cada uma das proteínas recombinantes foi expressa de acordo com a sua condição ótima representada na tabela 7. O extrato total do *tag* GST, utilizado como controle, foi cedido pela aluna de doutorado Leidy Paola Paes Cepeda.

**Tabela 10. Condição de expressão das proteínas recombinantes**

plasmídeo	Condição de expressão
pGEX-RRP44	0,5mM IPTG, overnight à 18°C
pET28-KAP95	0,5mM IPTG, por 2 horas à 37°C
pET29-SRP1	0,5mM IPTG, por 2 horas à 37°C

O pellet bacteriano foi ressuspenso no seguinte tampão: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,8% Nonidet, 1 mM DTT (Gonzales-Zubiate et al., 2017). As células foram, então, lisadas no equipamento emulsiFlex-C3 (Avestin), centrifugada à 10 mil rpm, e o sobrenadante foi coletado e aliquoteado.

Para o *pull-down* com carioferinas incubadas ao mesmo tempo, o equivalente a 60 µg de GST e GST-Rrp44, provenientes do extrato total lisado, foram incubados, separadamente, por duas horas a 4°C com 60 µl de glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare), e o excesso proteico foi lavado. As beads foram então incubadas com uma mistura dos extratos celular de His-Srp1 e His-Kap95, contendo o equivalente a 120 µg His-Srp1 e 120 µg His-Kap95. O excesso de proteína foi lavado. As proteínas ligadas à resina foram eluídas com 50mM Tris, pH8 e 10 mM de glutathione reduzida.

Para o pull-down com carioferinas incubadas separadamente, o tampão foi trocado por: 20 mM TrisHCl, pH = 8; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8% Nonidet, 1 mM DTT. (Adaptado de (Cassany and Gerace, 2009). O equivalente a 60 µg de GST e GST-Rrp44, foram incubados, separadamente, por duas horas a 4°C com 60 µl de glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare), e o excesso proteico foi lavado. As beads foram então incubadas com extrato celular contendo o equivalente à 120 µg His-Srp1 ou 120 µg His-Kap95, e o excesso de proteína foi lavado. As proteínas ligadas à resina foram eluidas com 50 mM Tris, pH = 8 e 10 mM de glutathione reduzida. O experimento foi analisado por western blot.

### **Coimunoprecipitação.**

Interação indireta das carioferinas essenciais Srp1 e Kap95 com Rrp44 foi realizada utilizando-se as cepas  $\Delta$ kap95 e  $\Delta$ srp1 transformadas com pUG34 e pUG34-Rrp44. Para cada cepa, dois litros de células foram crescidos até OD<sub>600</sub>~1, e coletadas no tampão Co-IP (0,1% NP40, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH = 7,5, 0,5x Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) (Bakhrat, 2006). O extrato total celular foi obtido lisando as células com o equipamento Ball Mill (Retsch, Mixer Mill MM 200 ou Mixer Mill PM 100) e centrifugando à 40mil rpm (CP80NX Hitachi), por uma hora a 4°C.

O extrato proteico foi quantificado, e o equivalente à 50 mg de proteína, de cada extrato, foi incubado por duas horas à 4°C com IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão Co-IP. A resina foi lavada seis vezes com 500 µl de tampão Co-IP, lavada mais duas vezes com solução aquosa de 100mM de acetato de amônia, 0,1 M de cloreto de magnésio. A eluição foi feita

incubando a resina duas vezes, com 500 mM de hidróxido de amônia por 20 minutos (Ohmayer, 2013). O experimento foi analisado por western blot.

## Resultados

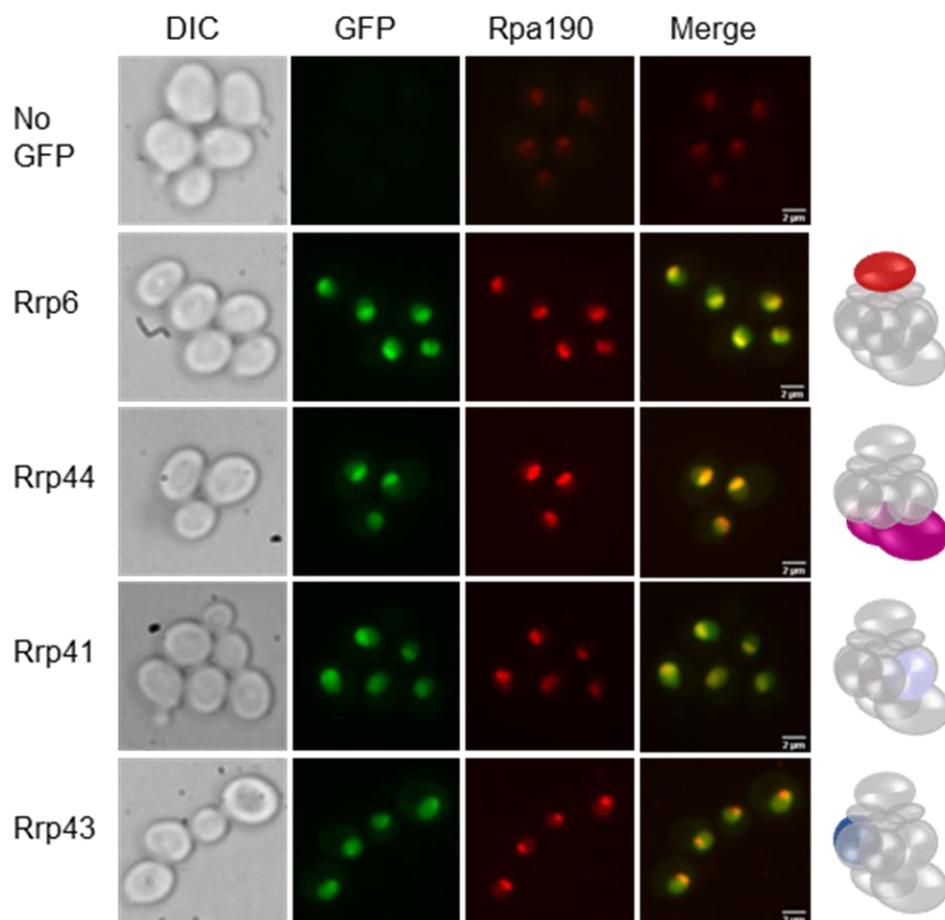
### **O complexo exossomo está concentrado no nucléolo.**

Apesar do grande número de estudos envolvendo o complexo exossomo em diversos organismos, pouco se sabe sobre a localização subcelular e a montagem do complexo. Para melhor entendermos o exossomo e a correlação de sua função com sua localização, avaliamos a localização de quatro subunidades do exossomo por meio de fusão com GFP. GFP foi inserido no genoma da levedura, em fusão com a *ORF* da subunidade escolhida. Assim, quando determinada subunidade do exossomo fosse expressa sob controle de seu promotor endógeno, ela estaria fusionada a GFP em seu C-terminal. Foram escolhidas duas subunidades do core do complexo, Rrp41 e Rrp43, e as duas subunidades catalíticas, Rrp6 e Rrp44. Teste de microscopia e de PCR foram feitos para confirmar a inserção do *tag*, assim como testes de crescimento foram feitos para analisar a possível toxicidade da fusão com GFP (dados não mostrados).

Como marcador nucleolar e nuclear, a subunidade da RNA polimerase I Rpa190 endógena foi fusionada ao mCherry no seu C-terminal. Esta proteína encontra-se concentrada no nucléolo mas também está presente no nucleoplasma da levedura (Dauban et al., 2019). Essa dupla localização, com diferença de concentração, nos permitiu usar uma única proteína para distinguir nucléolo, nucleoplasma e citoplasma.

As imagens de microscopia foram obtidas com um microscópio confocal Spinning disk, que resultou em quarenta secções da célula no eixo Z. Para avaliar a localização do exossomo, as secções em Z foram sobrepostas através do *plugin* “Z projection” do *ImageJ* e o sinal como um todo foi analisado.

Todas as quatro subunidades analisadas aqui apresentaram um fenótipo nuclear (Fig. 8). Além da localização nuclear, é possível afirmar que o exossomo está concentrado no nucléolo, e o sinal citoplasmático do complexo é quase indetectável, estando muito próximo ao *background*. Para melhor avaliar se o sinal do exossomo citoplasmático observado nas imagens de microscopia era válido ou não, decidimos quantificar o sinal detectável para estimar a concentração dessas quatro subunidades nos diferentes compartimentos celulares. As quantificações do sinal das subunidades fusionadas ao GFP foram feitas utilizando-se o canal específico para o GFP, e o sinal total da célula foi dividido em nucléolo, nucleoplasma e citoplasma.

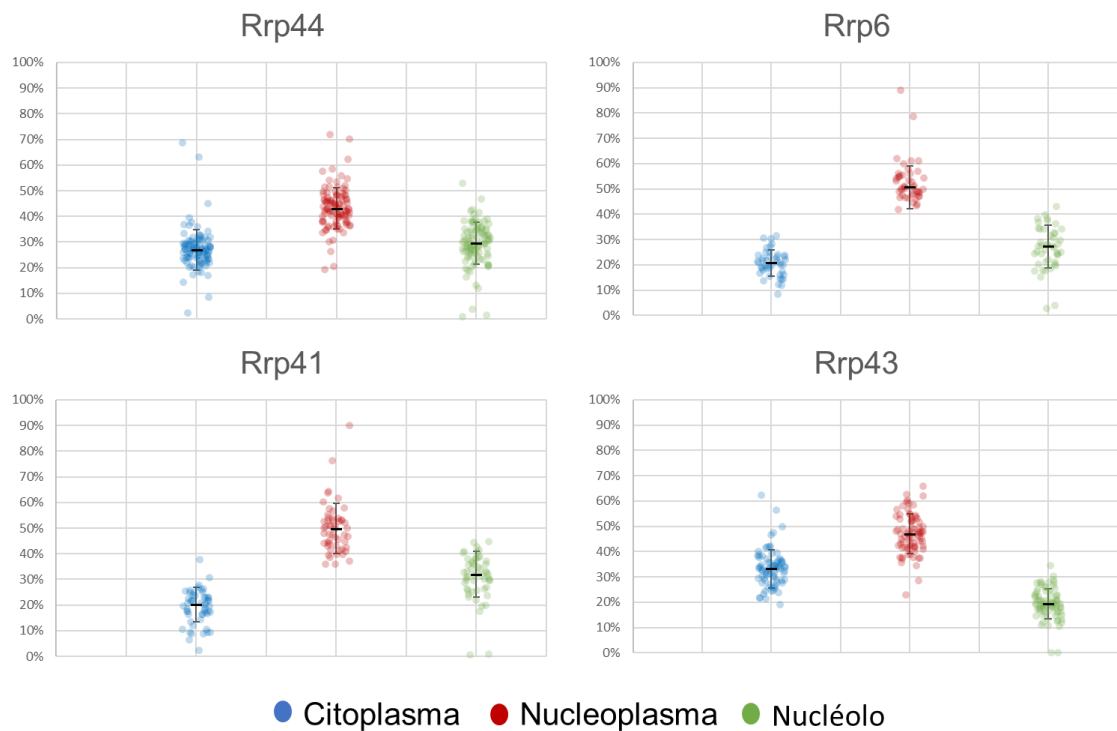


**Figura 8. Subunidades do exossomo fusionadas ao GFP expressas endogenamente localizam no nucléolo.** As imagens obtidas no microscópio confocal Spinning-disk laser scanning foram



projetadas em Z, e a localização das subunidades do exossomo fusionadas ao GFP foi avaliada. O sinal de Rpa190-mCherry (maior subunidade da Poll) foi utilizada como marcador nucleolar.

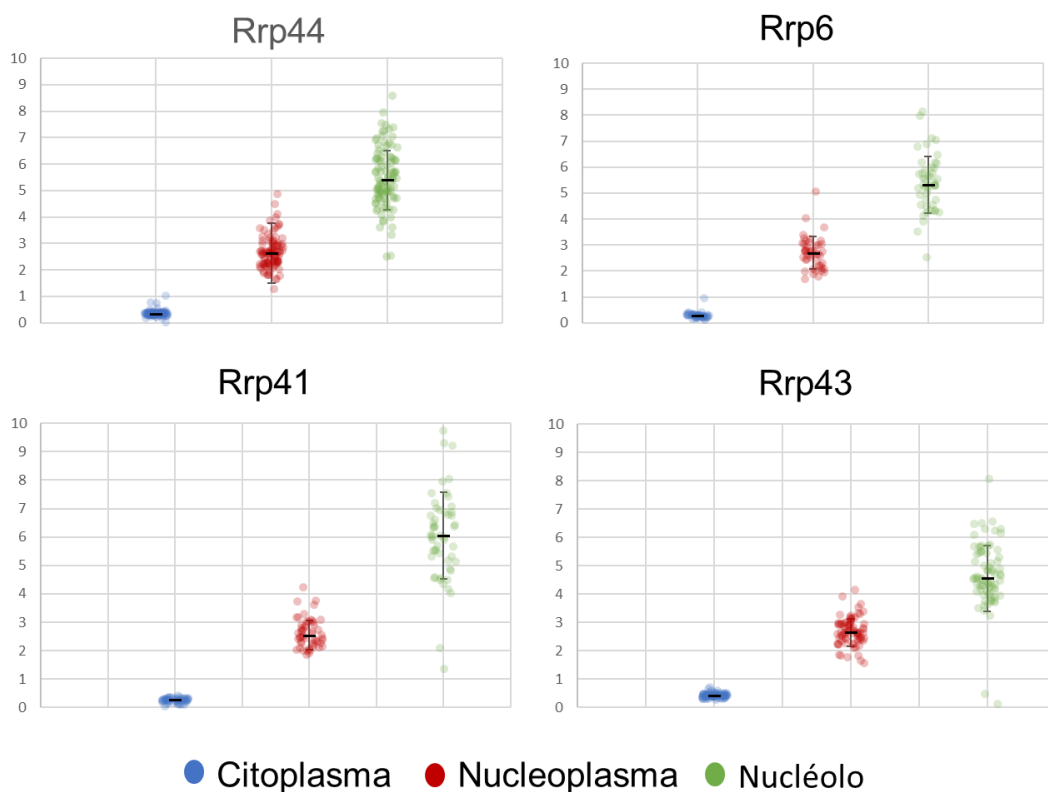
Para avaliarmos a abundância das proteínas fusionadas a GFP, utilizamos uma correlação linear entre a intensidade do sinal de GFP e a quantidade delas em levedura (Ghaemmaghami et al., 2003; Huh et al., 2003). A quantificação foi feita por meio de um *Macro* do *ImageJ*, desenvolvido pelo especialista em microscopia Sylvain Cantaloube (CBI – Toulouse). O programa utilizou as imagens de contraste de fase para segmentar a área da célula e o sinal de Rpa190-mCherry para segmentar a área do núcleo e do nucléolo. As unidades de intensidade e de área são unidades arbitrárias e a intensidade foi calculada por cada pixel. A intensidade de cada subunidade foi obtida por meio da intensidade do sinal, fornecido pelo *Macro*, subtraído do *background*. O valor referente ao *background* do canal de GFP foi obtido nas mesmas condições que o sinal das subunidades fusionadas ao GFP, contudo, utilizamos uma cepa expressando Rpa190-mCherry sem nenhuma proteína fusionada ao GFP. Após a remoção do *background*, calculamos a intensidade total do sinal de cada subunidade em diferentes compartimentos celulares (Fig. 9). O gráfico abaixo mostra que, aproximadamente, 80% do sinal do exossomo está no núcleo, sendo que 30% do sinal total está no nucléolo e 50%, no nucleoplasma.



**Figura 9. Porcentagem do sinal das subunidades do exossomo em diferentes compartimentos.** O sinal das subunidades do exossomo fusionadas ao GFP foi quantificado em toda a célula e separado de acordo com o compartimento (citoplasma, nucleoplasma ou nucléolo). A porcentagem do sinal do exossomo-GFP foi calculada para cada um dos compartimentos relativos ao sinal total obtido por célula. O sinal total apresentado no citoplasma é por volta de 20-30% do sinal total da subunidade fusionada ao GFP, enquanto que de 70-80% do sinal da subunidade GFP-exossomo está presente no núcleo.

Entretanto, A figura 9 mostra a porcentagem dos valores absolutos da intensidade do exossomo. Para entendermos melhor a relação entre a intensidade obtida e a área correspondente a cada compartimento, uma vez que a área do citoplasma é muito maior que a área do nucleoplasma, que por sua vez é maior que a área do nucléolo, calculamos a intensidade média para cada compartimento. Subtraímos, então, o *background* e calculamos a intensidade média da célula como um todo. Para calcularmos o enriquecimento do exossomo nos diferentes compartimentos celulares, comparamos a intensidade média de cada compartimento em relação a intensidade média da célula toda. A figura 10 mostra que o exossomo

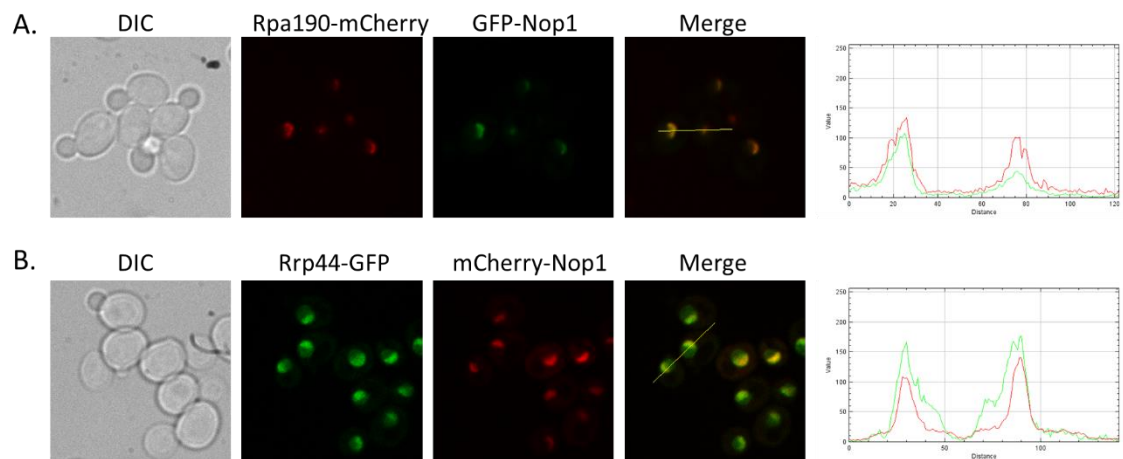
está presente no núcleo como um todo, mas mais concentrado no nucléolo, cinco a seis vezes mais concentrado que a média da intensidade celular. Esse dado está de acordo com as figuras obtidas na microscopia de fluorescência, que mostram o exossomo mais concentrado no nucléolo. Além disso, os dados de quantificação ajudam a confirmar a presença do complexo no citoplasma, informação que não pode ser obtida apenas observando as imagens de microscopia.



**Figura 10. Enriquecimento do sinal das subunidades do exossomo fusionadas ao GFP.** Nós calculamos o enriquecimento do sinal das subunidades do exossomo em cada compartimento sobre o valor do sinal celular distribuído homogeneamente da respectiva subunidade. Para tal, nós calculamos a intensidade média de cada subunidade em cada compartimento e dividimos esse valor pela intensidade média de cada subunidade considerando a célula toda. Os pontos em azul representam o enriquecimento no citoplasma, em vermelho, no nucleoplasma, e em verde, no nucléolo.

Nós também comparamos a localização de Nop1-GFP com Rpa190-mCherry e de Rrp44-GFP com Nop1-mCherry para validar a localização nucleolar, uma vez que a proteína Nop1 é nucleolar (Tollervey et al., 1991), e bastante utilizada como

marcador deste subcompartimento (Fig. 11). Como já esperado, o pico de maior intensidade de Rpa190-mCherry colocaliza com o sinal de GFP-Nop1, comprovando o sinal nucleolar de Rpa190. Além disso, o sinal de Rrp44 encontra-se concentrado na mesma região de mCherry-Nop1, comprovando que o enriquecimento do exossomo é de fato nucleolar.

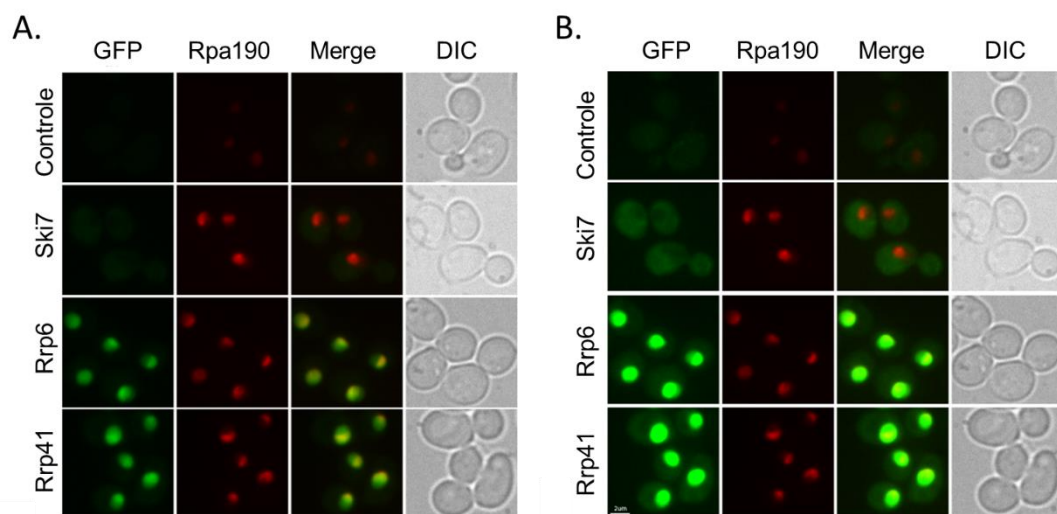


**Figura 11. Validação da localização nucleolar de Rpa190 em comparação com Nop1.** A. Localização de Nop1-GFP comparada à Rpa190-mCherry mostra que as proteínas colocalizam, validando a localização nucleolar de Rpa190. B. Localização de Rrp44-GFP referente à mCherry-Nop1 para validar a localização nucleolar de Rrp44-GFP referente a Rpa190-mCherry.

### O exossomo está presente em baixos níveis no citoplasma.

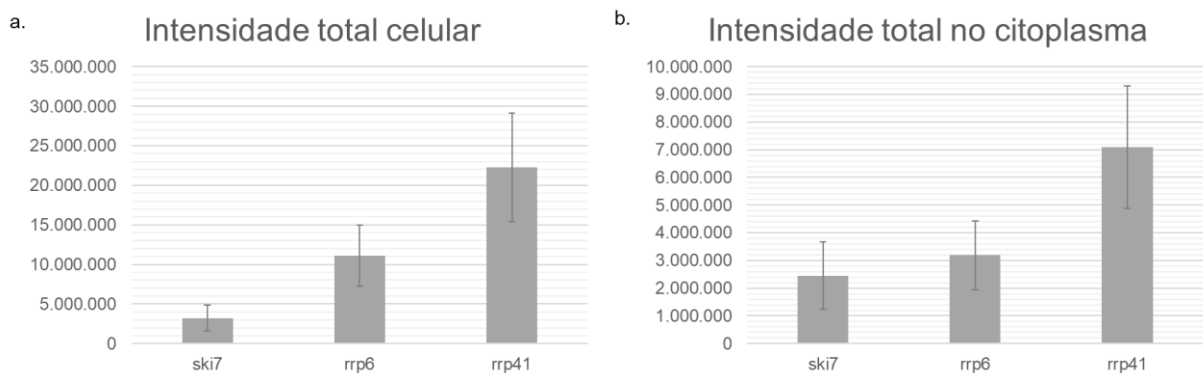
O exossomo é um complexo descrito como nuclear e citoplasmático. Os dados obtidos da microscopia das quatro subunidades Rrp6, Rrp44, Rrp41 e Rrp43 mostraram a possível existência desse complexo no citoplasma. A subunidade Rrp6 é a única subunidade considerada exclusivamente nuclear (Allmang et al., 1999), mas apresentou sinal citoplasmático nas células que foram quantificadas. Para avaliarmos se existe a possibilidade da presença de Rrp6 no citoplasma, realizamos ensaios de microscopia utilizando como controle um cofator do exossomo já caracterizado como citoplasmático, Ski7 (Houseley et al., 2006).

Para tal análise, utilizamos outra subunidade do exossomo (Rrp41) como parâmetro, uma vez que essa subunidade é descrita como nuclear e citoplasmática. A mesma condição experimental foi utilizada para todas as cepas, e todas foram editadas da mesma forma no programa *ImageJ*. Na figura 12A, as imagens foram editadas adequando a edição ao sinal nuclear das subunidades do exossomo. Nessa condição, quase não é possível detectar o sinal proveniente de Ski7-GFP. A fim de visualizar o sinal proveniente de Ski7-GFP, editamos as mesmas figuras aumentando o contraste. O sinal fraco de Ski7 pode ser visto apenas no citoplasma, confirmando sua localização citoplasmática. Já o sinal das subunidades do exossomo saturaram no núcleo, e o sinal citoplasmático das mesmas pode ser visto fracamente (Fig. 12).



**Figura 12. Localização citoplasmática das subunidades Rrp6 e Rrp41 comparadas ao cofator citoplasmático Ski7.** A localização de Rrp6, Rrp41 e Ski7 foi analisada pelo microscópio confocal Spinning-disk. Todas as imagens foram obtidas e editadas juntas. Rpa190-mCherry foi utilizada como marcador nuclear e nucleolar. A cepa selvagem expressando apenas Rpa190-mCherry foi utilizada como controle para determinação do sinal de background. A. As imagens foram editadas respeitando a intensidade nuclear das subunidades do exossomo, o que torna o sinal de Ski7 quase não detectável aos olhos. B. As imagens foram editadas levando-se em consideração o sinal de Ski7, o que faz com que o sinal nuclear das subunidades do exossomo saturem, mas que seu sinal citoplasmático seja visível.

Com o intuito de obter dados mais precisos em relação a possível presença de Rrp6 no citoplasma, analisamos as imagens pelo programa *Macro* do *ImageJ*. O *background*, obtido do canal verde de uma célula que não expressa o GFP, foi subtraído das quantificações obtidas. Primeiro obtivemos a intensidade do sinal de Ski7, Rrp6 e Rrp41. Os dados mostram que Ski7 é muito menos expressa que Rrp6, que por sua vez, é menos expressa que Rrp41 (Fig. 13A). Quando separamos a intensidade do citoplasma do restante da intensidade da célula, é possível observar que Ski7 possui a mesma intensidade citoplasmática que Rrp6, enquanto a intensidade de Rrp41 é aproximadamente o dobro (Fig. 13B). Assim sendo, nossos dados mostram haver a possibilidade de uma pequena quantidade de Rrp6 permanecer no citoplasma. Contudo, os dados de microscopia ainda são preliminares e estudos mais profundos seriam necessários para afirmar a existência de Rrp6 no citoplasma.

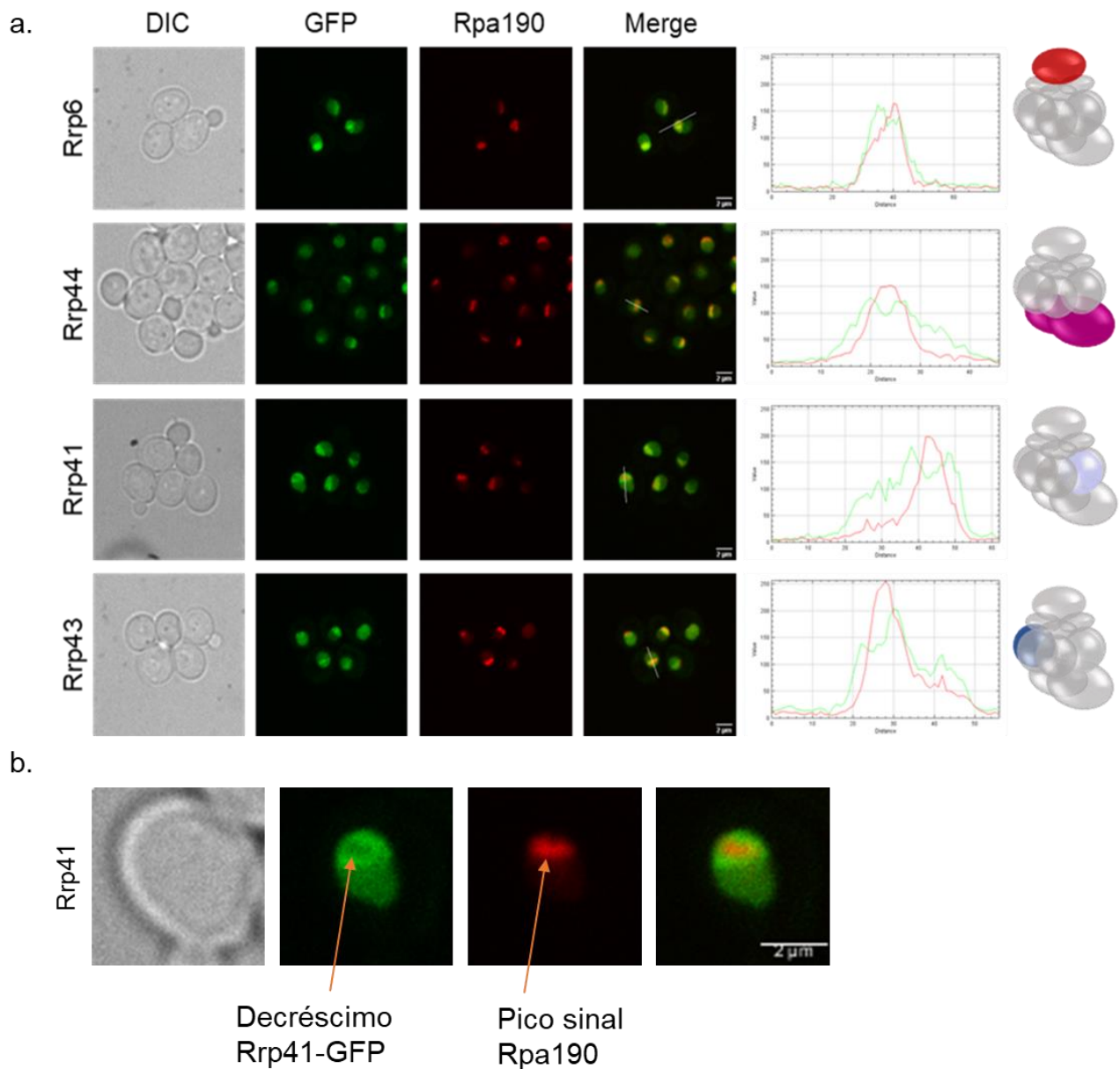


**Figura 13. Quantificação do sinal das subunidades Rrp6 e Rrp41 comparadas ao cofator citoplasmático Ski7.** As imagens de microscopia de fluorescência obtidas no microscópio confocal Spinning-disk foram sujeitas ao programa Macro do ImageJ, foi calculada a mediana das intensidades obtidas e os dados foram plotados no gráfico (valor arbitrário de unidades de intensidade). A. A intensidade total (considerando toda a área da célula) do sinal obtido de GFP-Ski7, GFP-Rrp6 e GFP-Rrp41 mostra a diferença na expressão de cada proteína. B. A intensidade citoplasmática de GFP-Ski7, GFP-Rrp6 e GFP-Rrp41 mostra a proximidade na quantificação do sinal citoplasmático de Ski7 e de Rrp6, diferentemente de Rrp41, a qual apresenta uma quantificação do sinal citoplasmático quase duas vezes maior que de Ski7.

### **O exossomo está concentrado em um subcompartimento do nucléolo.**

Os dados originais obtidos com o microscópio confocal Spinning Disk são arquivos contendo quarenta secções no eixo Z para o campo escolhido. Cada uma dessas secções tem menor intensidade e, ao mesmo tempo, mostram com um pouco mais de detalhe a localização do exossomo.

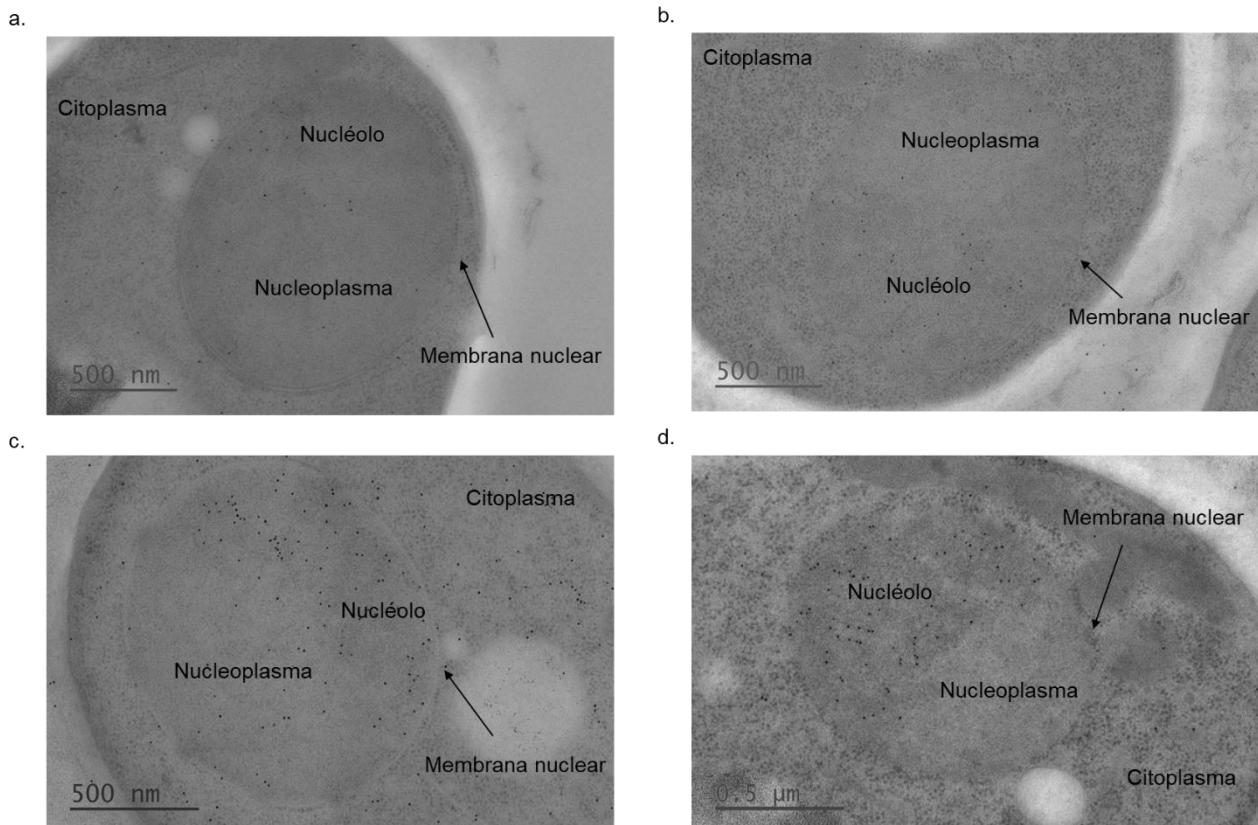
Quando cada uma das secções é observada individualmente, é possível notar, dependendo do ângulo da célula observada, que os sinais das subunidades do exossomo fusionadas ao GFP não se sobrepõem exatamente ao sinal de Rpa190-mCherry (Fig. 14). O sinal do exossomo-GFP pode ser visto no nucléolo, entretanto em algumas células observamos uma pequena região na qual o sinal de GFP é um pouco mais fraco, e é exatamente o local no qual o sinal de Rpa190-mCherry é mais forte.



**Figura 14. As subunidades do exossomo não colocam exatamente com a subunidade Rpa190 da RNA polimerase I.** a. Imagens das secções em Z das células expressando as subunidades do exossomo fusionadas ao GFP mostram que as subunidades do exossomo apresentam uma pequena diferença na localização quando comparadas à Rpa190-mCherry, a qual foi utilizada como marcador nucleolar. Comparação entre exossomo-GFP e Rpa190-mCherry foi feita pelo programa ImageJ e está ilustrada à direita. As linhas verdes representam as subunidades do exossomo fusionadas ao GFP, e as linhas em vermelho representam Rpa190-mCherry. b. Amplificação da célula expressando Rrp41-GFP e Rpa90-mCherry para melhor visualização do subcompartimento existente no nucléolo.



Na tentativa de observar essa localização com mais detalhes, realizamos experimentos de imunolocalização por meio da técnica de microscopia eletrônica. Para este experimento, utilizamos as mesmas cepas dos experimentos de microscopia de fluorescência, Rrp6-GFP e Rrp44-GFP com expressão endógena, que foram crio-fixados, imobilizados em uma resina e seccionados em cortes de 100 nm. Os cortes foram, então, tratados com o anticorpo primário anti-GFP, seguido pelo anticorpo secundário anti-coelho fusionados a partículas de ouro de 10 nm e levados ao microscópio eletrônico. Como controle negativo utilizamos a cepa BY4741 (com nenhuma proteína fusionada ao *tag* de GFP). Como controle positivo, utilizamos o anticorpo primário anti-Nhp2 na cepa Rrp44-GFP. Esse anticorpo reconhece a proteína Nhp2, a qual está envolvida nas etapas iniciais do processamento do pre-rRNA e é conhecida por estar concentrada no nucléolo (Henras et al., 1998; Watkins et al., 1998).



**Figura 15. Imunolocalização de Rrp44-GFP e Rrp6-GFP por microscopia eletrônica.** Imagens da microscopia eletrônica mostram não haver diferença na concentração nucleolar de partícula de ouro quando comparadas à cepa selvagem. O experimento foi feito utilizando-se o anticorpo anti-GFP como anticorpo primário das imagens a, b e c. A imunolocalização foi feita utilizando-se anti-Nhp2 como anticorpo primário para imagem d. O anticorpo secundário anti-coelho fusionado a partículas de ouro de 10 nm, diluído 1/80 em TBS/BSA 1%, foi utilizado em todos os casos. a. Imagem referente, ao controle negativo BY4741 sem nenhuma proteína fusionada ao tag de GFP. b. Cepa expressando Rrp44-GFP. c. Cepa expressando Rrp6-GFP. d. Cepa expressando Rrp44-GFP com anticorpo primário, neste caso anti-Nhp2 (controle positivo).

Para testarmos a eficiência dos anticorpos, utilizamos diferentes diluições. As secções de Rrp44-GFP foram tratadas com anti-GFP diluído 1/300, assim como o controle negativo com a cepa BY4741, e Rrp6-GFP foi tratada com anti-GFP diluído 1/50. As secções de Rrp44-GFP utilizadas como controle positivo foram tratadas com o anticorpo primário anti-Nhp2 diluído 1/50. O anticorpo secundário anti-coelho foi utilizado numa concentração 1/80.

As imagens obtidas mostram que existe uma maior concentração de partículas de ouro no nucléolo das células expressando Rrp44-GFP (Fig. 15A) e Rrp6-GFP (Fig. 15B) quando comparadas ao seu próprio nucleoplasma. Quando analisamos o controle negativo, também é possível notar uma maior concentração de partículas de ouro no nucléolo da cepa BY4742 quando comparada ao seu próprio nucleoplasma (Fig. 15C). Quando comparamos o nucléolo dessas três cepas em relação ao seu próprio nucleoplasma e citoplasma, e levando em conta as diferentes diluições de anticorpos primários feitas, não é possível ver uma diferença na concentração de partículas de ouro no nucléolo de Rrp44-GFP, Rrp6-GFP e BY4742. Por outro lado, quando comparamos o nucléolo dessas três cepas com o controle positivo, é notável a concentração de Nhp2 no nucléolo (Fig. 15D).

Apesar dos dados de microscopia eletrônica das subunidades do exossomo serem preliminares e pouco conclusivos, é possível afirmar a existência de um subcompartimento no nucléolo da levedura quando analisamos os resultados de

microscopia de fluorescência. A proximidade de ambos os sinais do exossomo e de Rpa190 é coerente considerando a participação do exossomo no processamento de pré-rRNA.

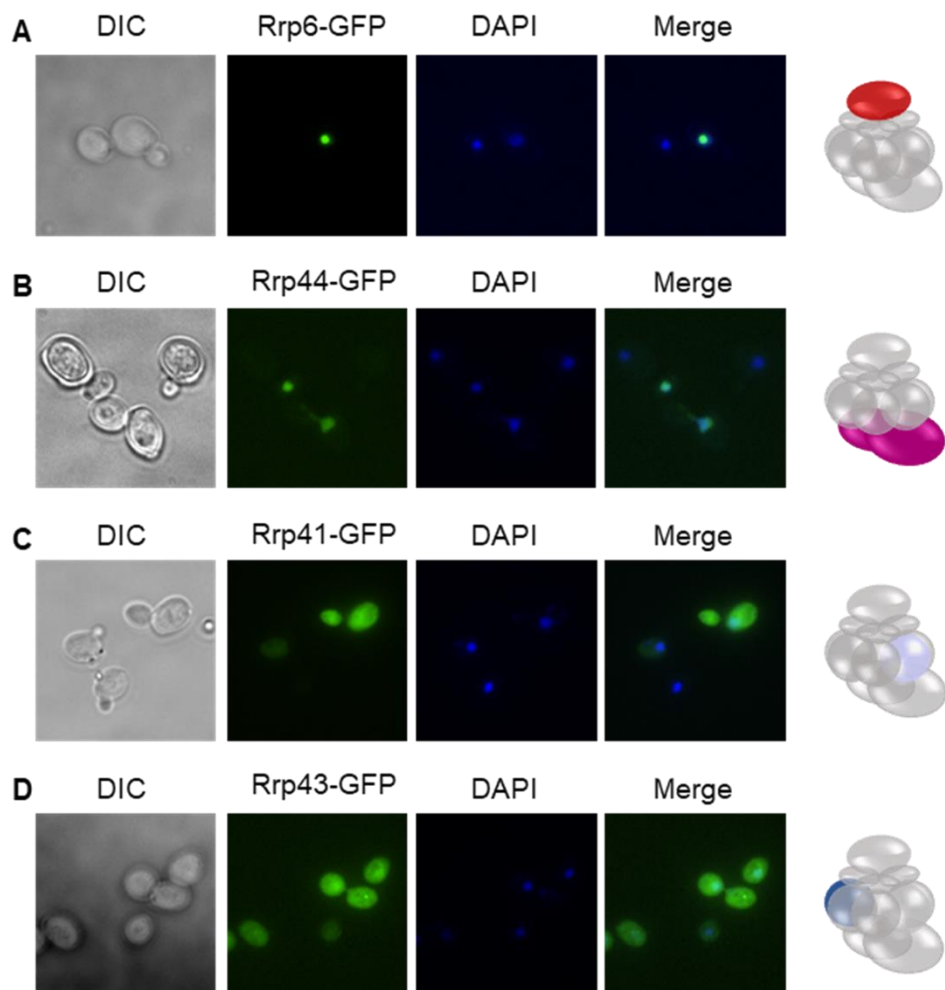
### **A subunidade Rrp44 provavelmente possui seu próprio NLS.**

Os resultados anteriores nos mostraram que, a nível endógeno, o exossomo está concentrado no nucléolo, mas ainda não sabemos qual subunidade seria a responsável pelo transporte nuclear do complexo, e se o complexo é transportado já montado ou na forma de subcomplexos. Nosso grupo já mostrou que a subunidade Rrp6 possui seu próprio NLS e é transportada para o núcleo de forma independente do *core* do exossomo (Gonzales-Zubiate et al., 2017).

Para entendermos mais a fundo a localização e o transporte das demais subunidades do exossomo, a cepa selvagem *BY4742* foi transformada com plasmídeos *pUG34* contendo as subunidades Rrp6, Rrp44, Rrp41 ou Rrp43 fusionadas a GFP no seu N-terminal e sob controle do promotor *MET25*. Os plasmídeos foram construídos previamente pelo pós-doutorando Fernando Gonzales. O promotor *MET25* responde à presença/ausência de metionina no meio, com maior nível de expressão na ausência da metionina. Após a transformação, a localização das subunidades do exossomo foi avaliada no microscópio de fluorescência. O marcador DAPI foi utilizado como referência nuclear.

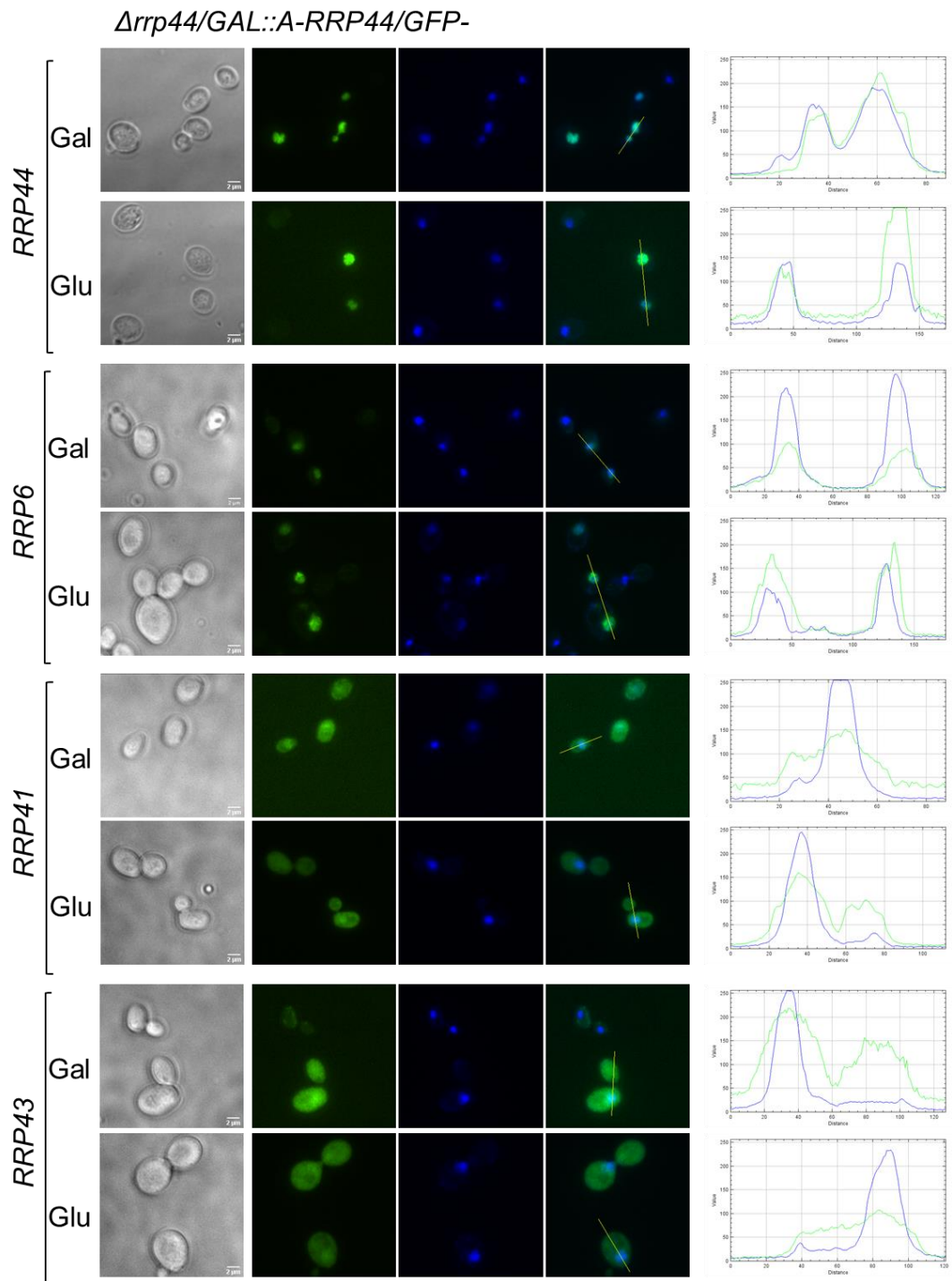
Surpreendentemente, as subunidades do exossomo apresentaram dois fenótipos diferentes: as subunidades catalíticas, Rrp6 e Rrp44, apresentaram uma localização nuclear, e as subunidades do *core*, Rrp41 e Rrp43, apresentaram uma localização tanto nuclear quanto citoplasmática (Fig. 16). Devido a estudos prévios, nós já sabíamos que Rrp6 localizava-se no núcleo quando superexpressa (Gonzales-

Zubiate et al., 2017). Como mostrado aqui, Rrp44, a outra subunidade catalítica do complexo, também apresenta fenótipo nuclear. Por outro lado, as duas subunidades do *core* apresentaram uma localização bastante diferente quando superexpressas. Tanto Rrp41 quanto Rrp43 apresentam um leve acúmulo no núcleo, e seu sinal citoplasmático é quase tão forte quanto seu sinal nuclear, sendo que em algumas células, Rrp43 apresenta grânulos citoplasmáticos.



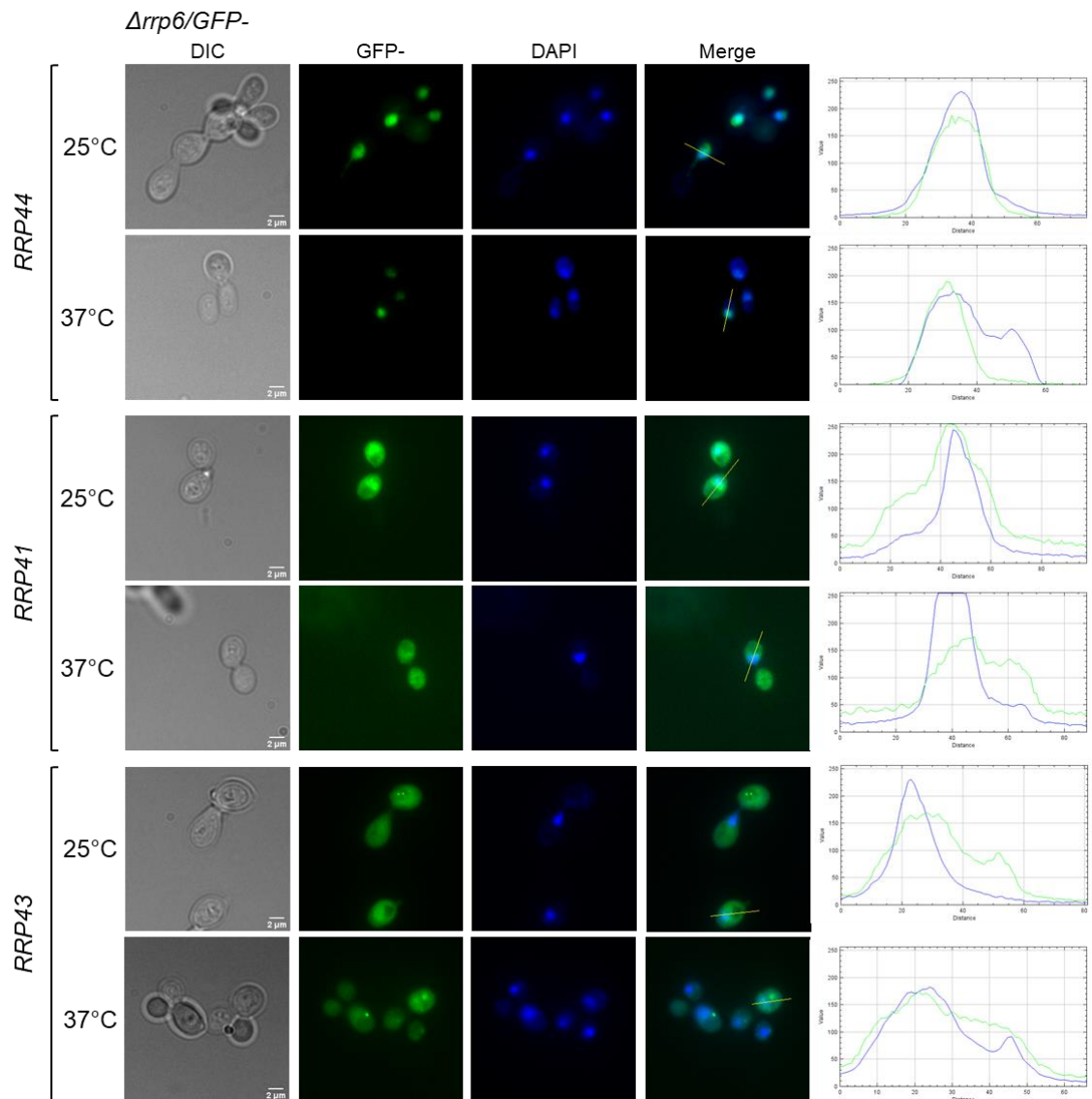
**Figura 16. Super expressão das subunidades episomais do exossomo altera sua localização.** Análise da localização subcelular das subunidades episomais super expressas fusionadas ao GFP na cepa selvagem BY4742. Quando super expressas, Rrp6 (A) e Rrp44 (B) localizam no núcleo, mas não é mais possível visualizar seu enriquecimento nucleolar. As subunidades Rrp41 (C) e Rrp43 (D) apresentam forte sinal citoplasmático além do sinal nuclear.

Considerando que ambas as subunidades catalíticas apresentaram fenótipo nuclear, decidimos testar a importância de Rrp6 e Rrp44 no transporte nuclear de Rrp41 e Rrp43. Para testarmos a importância de Rrp44, utilizamos a cepa  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$  (ver materiais e métodos), a qual possui um plasmídeo que contém a sequência que codifica a cópia selvagem de Rrp44 sob controle do promotor *GAL1*. Essa cepa foi transformada com os plasmídeos contendo GFP-Rrp6, GFP-Rrp44, GFP-Rrp41 e GFP-Rrp43, e a localização das subunidades foi avaliada na presença (crescimento em galactose) e em baixos níveis (crescimento em glicose) de Rrp44. O uso de um promotor condicional se faz necessário, uma vez que Rrp44 é essencial para viabilidade da célula e não é possível depletá-la completamente da célula. Os resultados mostram que, assim como na cepa *BY4742*, as subunidades catalíticas continuam concentradas no núcleo, e as subunidades do core ainda apresentam forte sinal citoplasmático e um leve acúmulo no núcleo, tanto na presença quanto em baixos níveis de Rrp44 (Fig. 17).



**Figura 17. Deleção de Rrp44 não afeta a localização subcelular das subunidades do core Rrp41 e Rrp43.** A cepa *Δrrp44/GAL::A-RRP44/GFP-* foi transformada com os plasmídeos expressando as subunidades Rrp44, Rrp6, Rrp41 e Rrp43 em fusão com o GFP, e incubadas em meio contendo ou galactose (expressão de RRP44) ou glicose (repressão de Rrp44). Todas as quatro subunidades estão concentradas no núcleo, entretanto o sinal citoplasmático de Rrp41 e Rrp43 também é visível. As imagens foram adquiridas e editadas separadamente. O sinal das proteínas fusionadas ao GFP foi comparado ao sinal de DAPI utilizando-se o programa ImageJ. Linha verde representam GFP e linha azul, DAPI.

Para avaliar a importância de Rrp6 no transporte nuclear das demais subunidades, utilizamos a cepa  $\Delta rrp6$  (ver materiais e métodos). Essa cepa é termossensível, ou seja, ela cresce bem em temperaturas mais baixas, como 25°C, mas não cresce bem em temperaturas mais altas, como 37°C. A cepa  $\Delta rrp6$  foi transformada com os mesmos plasmídeos *pUG34* contendo as subunidades do exossomo, crescida em ambas as temperaturas listadas anteriormente, e então, analisadas por microscopia de fluorescência. Assim como visto com a cepa  $\Delta rrp44/GAL::RRRP44$ , a subunidade catalítica Rrp44 continua concentrada fortemente no núcleo, e as subunidades do core apresentam sinal citoplasmático, apresentando um sinal levemente mais forte no núcleo (Fig. 18). Deixar mais claro que o core vá talvez em conjunto, e que elas não conseguem ir sozinho.



**Figura 18. Localização das subunidades do exossomo na cepa *Δrrp6*.** Localização das subunidades episomais Rrp44, Rrp41 e Rrp43 fusionadas ao GFP na cepa *Δrrp6* crescidas à 25°C (temperatura permissiva), ou à 37°C (temperatura restritiva). Todas as imagens foram obtidas e editadas separadamente. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. O sinal das proteínas fusionadas ao GFP relativo ao sinal de DAPI está ilustrado a direita. Linhas verdes representam GFP e linhas azuis, DAPI.

A condição de superexpressão nos mostrou que, mesmo em altos níveis de expressão, Rrp44 continua concentrada no núcleo. Esse dado nos sugere que essa subunidade possivelmente contém seu próprio NLS, e por isso é capaz de ser transportada para o núcleo e se concentrar nesse compartimento. Já a



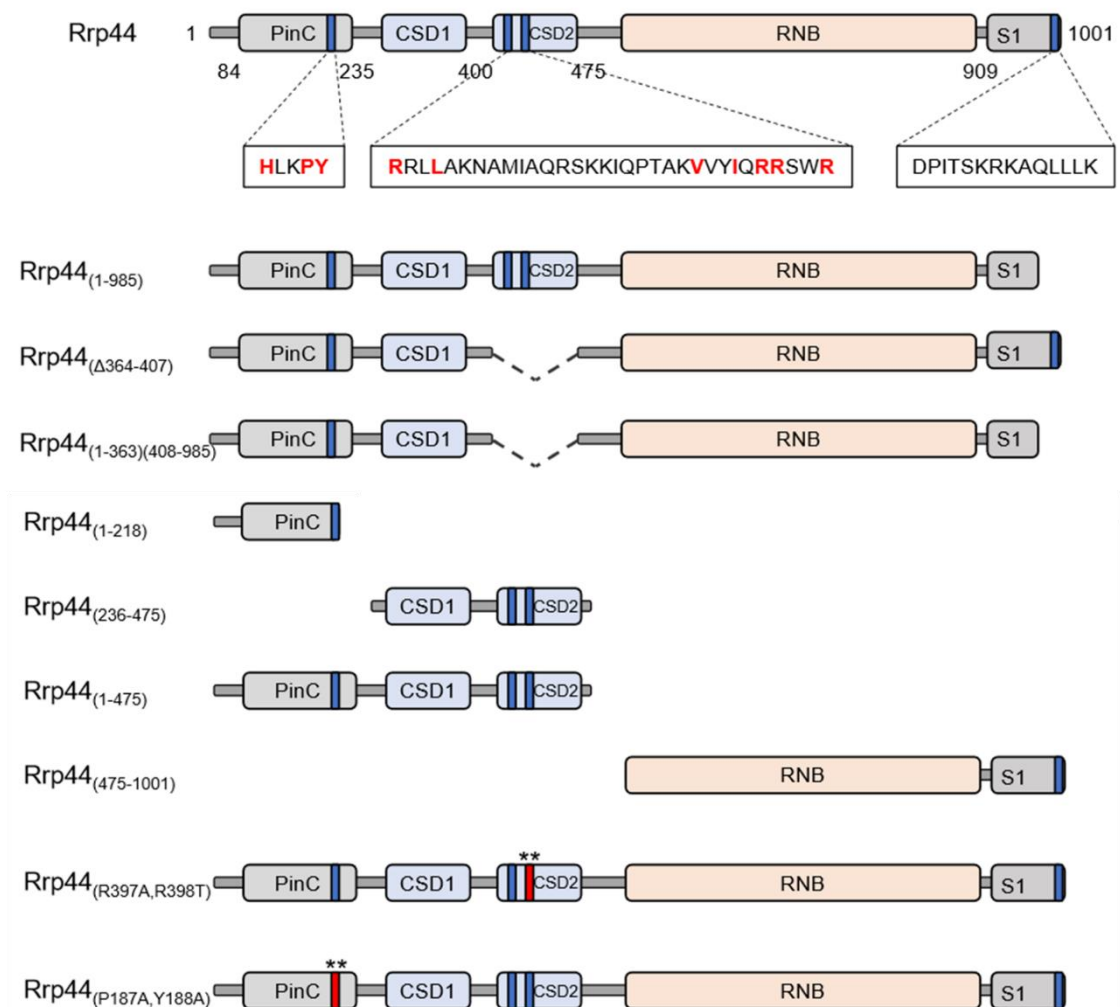
superexpressão de Rrp41 e Rrp43 nos mostrou que, apesar do forte sinal proveniente do citoplasma, essas subunidades continuam indo para o núcleo. Muito provavelmente, as duas subunidades do core analisadas aqui precisam de outras subunidades do exossomo para que possam ser transportadas para o núcleo ou até para se manterem estáveis no núcleo. Ainda assim, mais testes são necessários para compreendermos de forma mais completa o transporte nuclear do complexo.

### **O N-terminal de Rrp44 é responsável por sua localização nuclear.**

Os nossos resultados anteriores mostraram que, quando expressa em níveis endógenos, Rrp44 encontra-se concentrada no nucléolo. Quando analisamos a localização de GFP-Rrp44 em elevados níveis de expressão, GFP-Rrp44 se mostra capaz de acumular no núcleo. Os resultados obtidos sugerem que Rrp44 possua seu próprio NLS. Na tentativa de encontrar sequências consenso de NLSs, a sequência da Rrp44 selvagem foi analisada em um programa preditor de NLSs pelo pós-doutorando Fernando Gonzales (Okuda et al., 2020), além disso a sequência da Rrp44 de levedura foi comparada com as de outras espécies. Foram encontrados três possíveis sinais de endereçamento nuclear (ver materiais e métodos) em diferentes regiões da proteína.

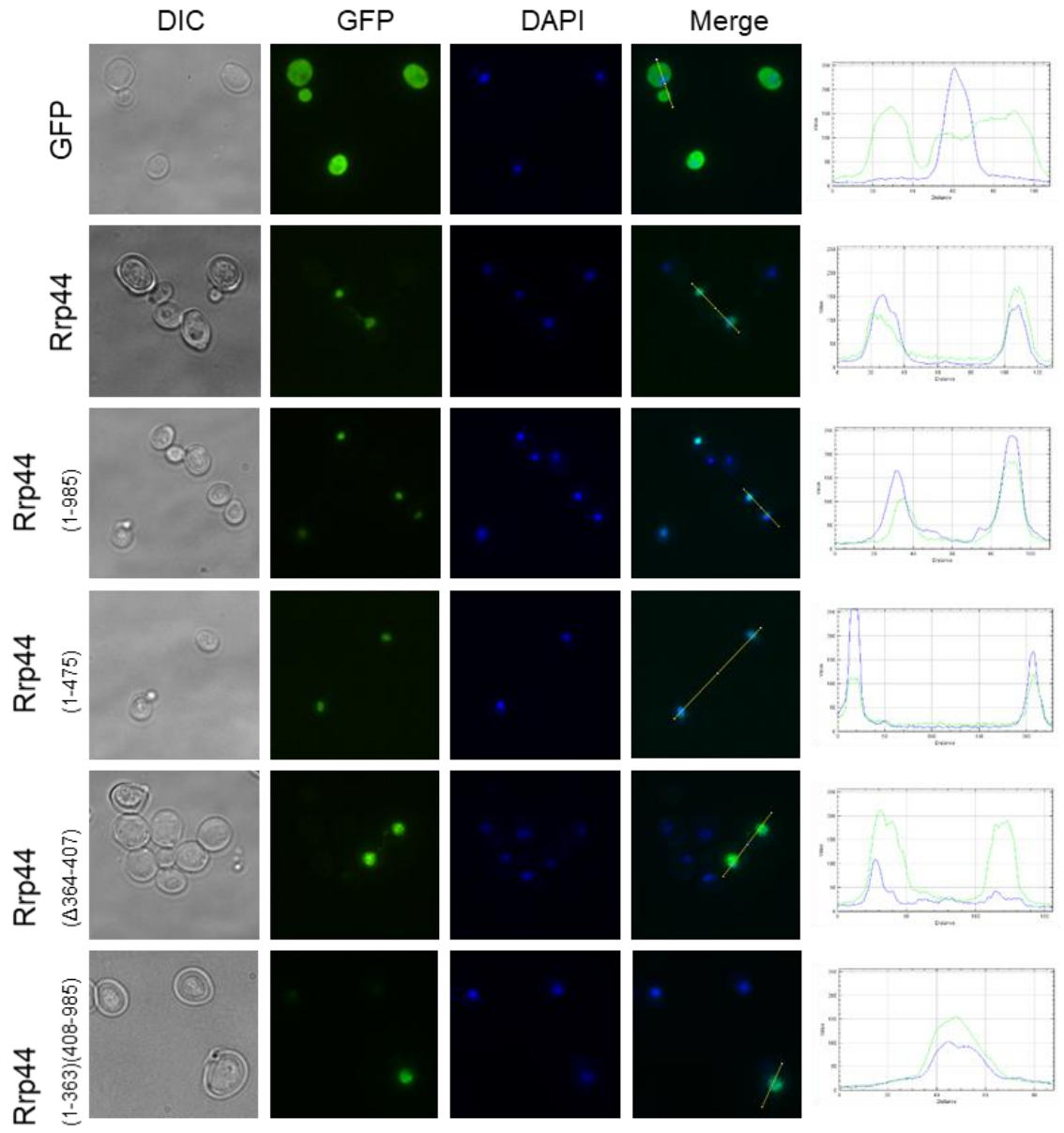
O primeiro NLS putativo (NLS1) está dentro do domínio PIN de Rrp44, sendo bastante similar aos PY-NLSs. O segundo NLS putativo (NLS2) está dentro do domínio CSD2, e a sua sequência foi encontrada por um programa preditor de sinais de localização nuclear. O terceiro NLS putativo (NLS3) está dentro do domínio S1, e foi caracterizado como o principal NLS da subunidade Rrp44 em *D. melanogaster* (Mamolen et al., 2010).

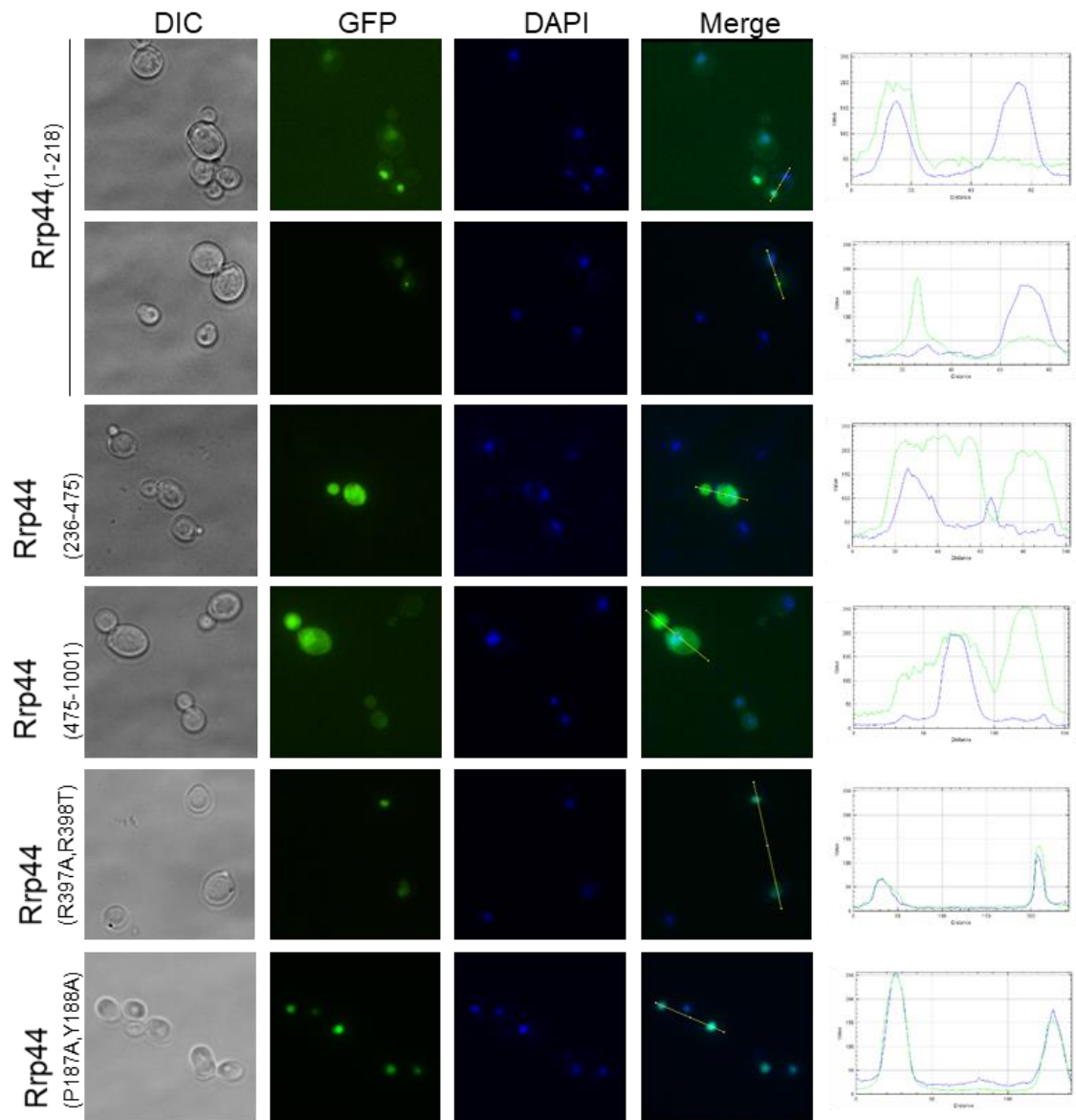
Para avaliarmos a importância de cada um dos domínios de Rrp44 e dos possíveis NLS na localização nuclear dessa subunidade, construímos diferentes mutantes de deleção e mutantes pontuais para as sequências putativas de NLSs. Na figura 19 temos, primeiramente, a subunidade Rrp44 completa, com os três NLSs putativos representados pelas barras azul marinho dentro de seus respectivos domínios, e as sequências consenso estão identificadas em vermelho. Abaixo temos os diferentes mutantes de deleção e mutantes pontuais construídos por mim e por Fernando Gonzales (Okuda et al., 2020).



**Figura 19. Representação esquemática dos mutantes de deleção e mutantes pontuais de Rrp44.** O domínio de atividade endonucleolítica chamado de PinC está representado em cinza, o domínio de atividade exonucleolítica RNB está representado em laranja. Os demais domínios de interação com RNA (CSD1, CSD2 e S1) estão representados no esquema. A posição dos NLS putativos está representada em azul escuro, e sua sequência consenso está reforçada em vermelho. Os asteriscos sobre as barras vermelhas dos NLS indicam a posição dos mutantes pontuais.

Os diferentes mutantes de deleção e pontuais de Rrp44 foram clonados no plasmídeo *pUG34*, fusionados a GFP no seu N-terminal, sob controle do promotor *MET25*. Esse plasmídeo foi transformado na cepa *BY4742* e a localização de cada um dos mutantes foi avaliada por microscopia de fluorescência. A figura 20 mostra a localização de cada um dos mutantes de deleção. A sequência de Rrp44 selvagem foi utilizada como controle positivo, e o plasmídeo vazio, expressando GFP foi usado como controle. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. É possível observar que alguns mutantes de deleção, como Rrp44<sub>(1-985)</sub>, Rrp44<sub>(1-475)</sub>, Rrp44<sub>(Δ364-407)</sub>, Rrp44<sub>(1-363)(408-985)</sub> e os mutantes pontuais Rrp44<sub>(R397A,R398T)</sub> e Rrp44<sub>(P187A,Y188A)</sub> apresentam fenótipo nuclear, assim como visto no controle positivo. Por outro lado, os mutantes Rrp44<sub>(236-475)</sub> e Rrp44<sub>(475-1001)</sub> apresentaram fenótipo citoplasmático, mais parecido com o que é visto no controle negativo. Um dos mutantes, Rrp44<sub>(1-218)</sub>, possui dois fenótipos diferentes: tanto concentrado no núcleo quanto em grânulos muito próximos ao marcador nuclear.



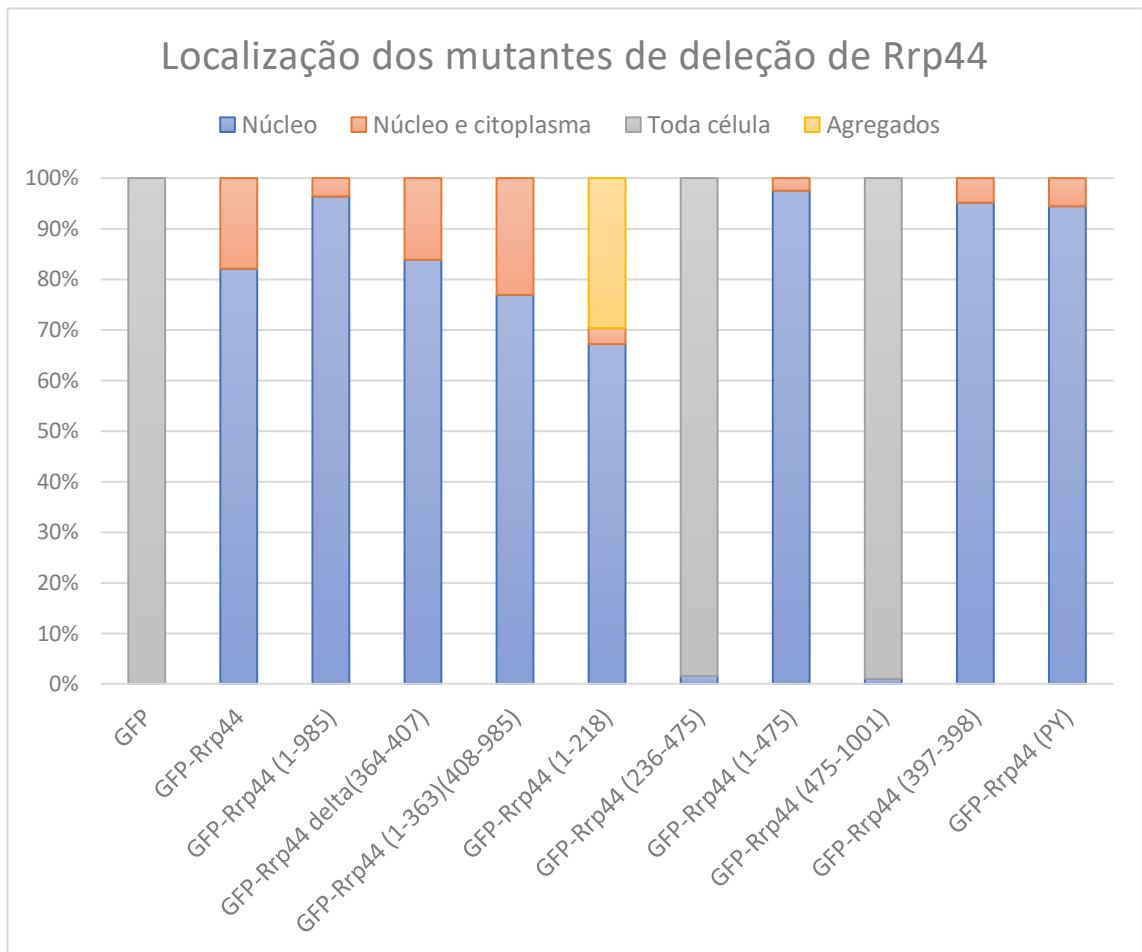


**Figura 20. Localização dos mutantes de Rrp44 mostram que o NLS1 é o mais importante para localização nuclear de Rrp44.** A microscopia de fluorescência mostra a localização subcelular dos mutantes de Rrp44 expressos em células selvagens. Análise de GFP-Rrp44 relativa a DAPI utilizando-se o programa ImageJ é mostrada à direita. As linhas em verde representam o sinal de GFP, e as linhas em azul, DAPI. Células expressão Rrp44<sub>(1-218)</sub> apresentou dois fenótipos, ambos representados aqui.

Como houve variação dos fenótipos dos mutantes de Rrp44, nós fizemos a contagem da localização de cada célula expressando cada um dos mutantes analisados por meio da microscopia de fluorescência. Como a expressão pelo plasmidial é bastante heterogênea, selecionamos apenas as células que expressam o GFP fusionado a proteína, e a localização foi feita de forma comparativa, utilizando-

se células que não apresentavam sinal como parâmetro para remoção do background. Para a contagem, foram utilizados vários campos de experimentos de 3 dias diferentes, seguido pelo cálculo da porcentagem de cada fenótipo. A figura 21 mostra a porcentagem de cada fenótipo referente aos diferentes mutantes, o que nos permite correlacionar os fenótipos vistos na microscopia de fluorescência (Fig. 20) com a população celular. O gráfico da porcentagem nos mostra que a maior parte (de 80% a 90%) das células expressando a proteína selvagem e os mutantes Rrp44<sub>(1-985)</sub>, Rrp44<sub>(1-475)</sub>, Rrp44<sub>(Δ364-407)</sub>, Rrp44<sub>(1-363)(408-985)</sub> e os mutantes pontuais Rrp44<sub>(R397A,R398T)</sub> e Rrp44<sub>(P187A,Y188A)</sub> tem sinal nuclear. No caso de Rrp44<sub>(1-218)</sub>, mais de 60% das células apresentavam fenótipo nuclear, e mais de 30% apresentavam fenótipo granular. Além disso, os mutantes Rrp44<sub>(236-475)</sub> e Rrp44<sub>(475-1001)</sub> tem quase todas as suas células (aproximadamente 98%) com um sinal espalhado por toda a área celular, sem apresentar uma maior concentração no núcleo.

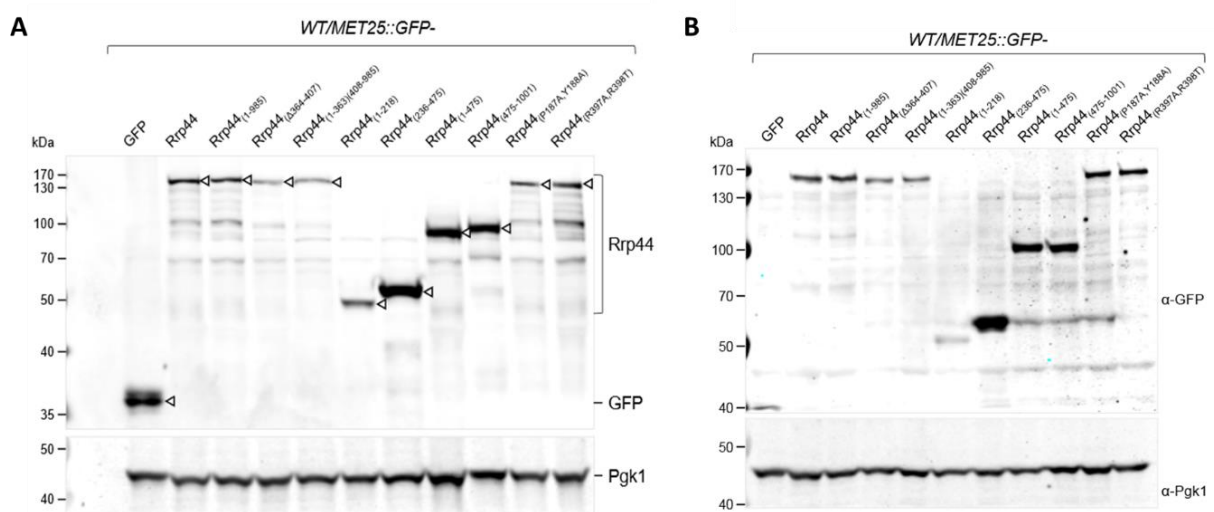
Os resultados de microscopia, suportados pela contagem celular mostram que o N-terminal é responsável pela localização nuclear de Rrp44, uma vez que os mutantes contendo no mínimo a região dos aminoácidos 1-218 têm localização nuclear.



**Figura 21. Análise quantitativa das células expressando os mutantes episomais de Rrp44 fusionados ao GFP.** A porcentagem de células que apresentaram sinal da fusão GFP-mutantes Rrp44 concentrada no núcleo está representada em azul; células que apresentaram a GFP-mutante Rrp44 concentrada no núcleo mas com um sinal citoplasmático estão representado em laranja; células que apresentaram a GFP-mutante Rrp44 por toda a célula estão em cinza; em amarelo estão representados os agregados.

A expressão de cada um dos mutantes foi confirmada pelo ensaio de *western blot*. Utilizamos duas porcentagens diferentes de acrilamida (10% e 8%) levando em consideração o tamanho dos diferentes mutantes. As proteínas foram identificadas utilizando o anticorpo anti-GFP. O anticorpo anti-Pgk1, que reconhece a fosfoglicerato quinase, foi utilizado como controle interno da quantidade proteica de cada extrato. Na figura 22A, correspondente ao gel de 10% de acrilamida, podemos confirmar a

expressão do GFP vazio e dos mutantes de menor tamanho, como Rrp44<sub>(1-218)</sub>, Rrp44<sub>(236-475)</sub>, Rrp44<sub>(1-475)</sub> e Rrp44<sub>(475-1001)</sub>. Já na figura 22B, além de confirmar a expressão de Rrp44 selvagem, é possível identificar os mutantes Rrp44<sub>(1-985)</sub>, Rrp44<sub>(P187A,Y188A)</sub> e Rrp44<sub>(R397A,R398T)</sub>, os quais apresentam bandas do mesmo tamanho da banda da proteína selvagem; e os mutantes Rrp44<sub>(Δ364-407)</sub> e Rrp44<sub>(1-363)(408-985)</sub>, que apresentam bandas um pouco menores quando comparadas à de Rrp44 *full-length*. Além disso, os resultados nos mostraram que todos os mutantes foram clonados corretamente em fusão com GFP e, de forma geral, todos são expressos nos mesmos níveis, com exceção de Rrp44<sub>(236-475)</sub>, que apresenta um sinal um pouco mais forte. O sinal do controle (Pgk1) mostra que os extratos tinham, mais ou menos, a mesma quantidade de proteína total.



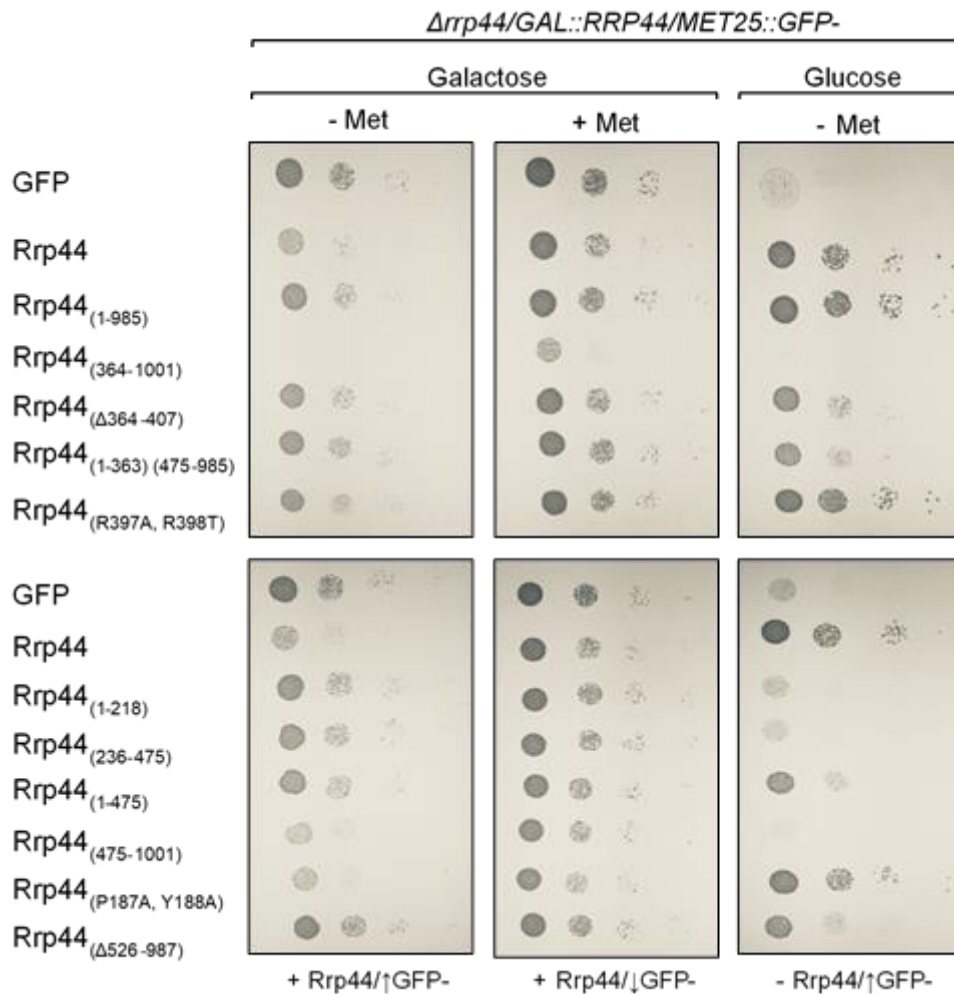
**Figura 22. Expressão epissomal dos mutantes GFP-Rrp44 na cepa selvagem.** O ensaio de western blot foi feito para determinar os níveis de expressão dos mutantes. O extrato celular total foi separado por SDS-PAGE e analisado por western blot com anticorpos contra GFP e Pgk1, utilizado como controle interno da quantidade proteica de cada extrato. A. Western blot utilizando-se gel 10% de poliacrilamida. B. Western blot utilizando-se gel 8% de poliacrilamida.



Para verificar a capacidade dos mutantes construídos de complementar a função de Rrp44, utilizamos a cepa  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$ . Esta cepa não possui o gene endógeno de Rrp44, mas possui um plasmídeo capaz de expressar a cópia selvagem de Rrp44 sob controle do promotor *GAL 1*. Essa cepa foi transformada com os mesmos plasmídeos contendo os mutantes de Rrp44, e realizamos testes de complementação do crescimento em três condições diferentes. As células foram incubadas overnight em meio mínimo, contendo galactose, suplementado com os aminoácidos necessários ao crescimento e metionina, que inibe a expressão do mutante de deleção. As culturas de leveduras foram, então, normalizadas para  $OD_{600} \sim 0,1$ , diluídas em série em água MilliQ autoclavada e plaqueadas. Utilizamos duas fontes de carbono diferentes para que as células crescessem na presença (Gal) ou em baixos níveis (Gli) da cópia selvagem de Rrp44, e expressando mais (-met) ou menos (+met) o mutante fusionado a GFP.

Rrp44 *full-length* epissomal, assim como os mutantes Rrp44<sub>(1-985)</sub>, Rrp44<sub>(P187A,Y188A)</sub> e Rrp44<sub>(R397A,R398T)</sub>, complementaram o crescimento. Alguns outros mutantes complementaram parcialmente o crescimento, como no caso de Rrp44<sub>( $\Delta$ 364-407)</sub>, Rrp44<sub>(1-363)(475-985)</sub> e Rrp44<sub>(1-475)</sub>. Todos esses mutantes, que complementaram total ou parcialmente o crescimento da cepa  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$ , apresentaram fenótipo nuclear quando analisados na microscopia, o que corrobora os resultados descritos acima. O mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub>, apesar de se encontrar no núcleo, não é capaz de complementar o crescimento da levedura, assim como os mutantes Rrp44<sub>(236-475)</sub> e Rrp44<sub>(475-1001)</sub>, os quais foram encontrados espalhados por toda célula nos ensaios de microscopia. Os mutantes Rrp44<sub>(364-1001)</sub> e Rrp44<sub>( $\Delta$ 526-987)</sub> apresentados neste experimento não foram utilizados como mutantes válidos pois não apresentaram sinal no western blot, ou possuíam localizações ambíguas. De forma interessante,

quando Rrp44 está expressa em altos níveis (+Gal -Met), o crescimento das células é afetado negativamente. Provavelmente, a superexpressão desta subunidade catalítica afeta o metabolismo de RNA, inibindo no crescimento da célula.

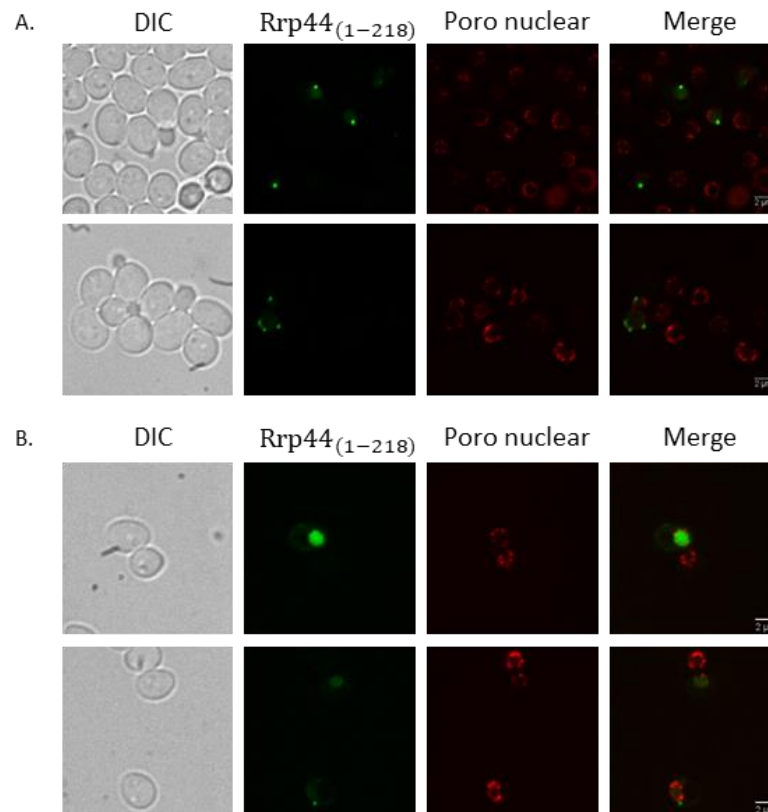


**Figura 23. Análise da complementação dos mutantes de Rrp44 na cepa  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$ .** A cepa condicional  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$  foi transformada com o plasmídeo contendo os mutantes de Rrp44 sob controle do promotor MET25, e incubado em meio contendo galactose (expressão de Rrp44 selvagem) ou glicose (baixos níveis de Rrp44 selvagem), na presença ou ausência de metionina (baixos ou altos níveis de expressão dos mutantes, respectivamente). Os mutantes Rrp44 $_{\Delta(364-407)}$  e Rrp44 $_{(1-363)(408-985)}$  complementam parcialmente o crescimento em glicose, já os mutantes Rrp44 $_{(1-985)}$ , Rrp44 $_{R397A, R398T}$  e Rrp44 $_{P187A, Y188A}$  complementam totalmente o crescimento em glicose, apesar da superexpressão de Rrp44 $_{P187A, Y188A}$  inibir o crescimento em galactose. Os mutantes Rrp44 $_{(\Delta 526-987)}$  e Rrp44 $_{(364-1001)}$  não apresentaram sinal no ensaio de western blot, ou apresentaram localização ambígua e por isso não foram mais estudados.

O fato da maioria dos mutantes de Rrp44 que localizam no núcleo complementarem total ou parcialmente o crescimento da levedura reforça a importância da função do exossomo no nucléolo, participando da maturação do RNA ribossomal (Okuda *et al.*, 2020), sugerindo que essa seja a principal função do complexo na célula. O mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> não complementa o crescimento de Rrp44, porque este mutante não possui o domínio RNB, que é essencial para a função de Rrp44. Por outro lado, o mutante Rrp44<sub>(1-475)</sub> nos chamou atenção, uma vez que esse mutante está localizado no núcleo, complementa parcialmente a função, porém também não possui o domínio RNB. Uma das hipóteses para explicar essa complementação parcial do crescimento é a de que Rrp44<sub>(1-475)</sub> estaria se ligando ao core do complexo exossomo, e poderia influenciar positivamente a atividade de Rrp6, que por sua vez, poderia estar exercendo parte da função de Rrp44.

Os resultados de microscopia anteriores mostraram que aproximadamente 30% das células do mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> apresentam agregados muito próximos ao sinal de marcador nuclear Dapi. A fim de determinar se o mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> estava acumulando dentro do núcleo, clonamos o t-dimer (dois RFPs em sequência) no C-terminal de Nup57, uma proteína do poro nuclear, e inserimos o plasmídeo *pUG34-Rrp44<sub>(1-218)</sub>*, o mesmo utilizado nos experimentos anteriores. Na figura 24A é possível observar o fenótipo de agregados formado por esse mutante. Os agregados estão muito próximo ao marcador do poro nuclear, entretanto, quando observamos com cuidado, é possível afirmar que estão localizados na parte mais externa ao núcleo, o que nos permite inferir que o mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> não está acumulando dentro do núcleo. Entretanto, quando esse mutante não forma agregados (Fig. 24B), é possível detectar seu sinal nuclear. Portanto, apesar de em alguns casos (~30%) esse mutante

se acumular em grânulos do lado de fora do núcleo, na maioria das vezes (~65%), o mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> é capaz de ser transportado e se localizar dentro do núcleo.



**Figura 24. Análise da localização do mutante GFP-Rrp44<sub>(1-218)</sub> por microscopia spinning-disk.** A. Os agregados de Rrp44<sub>(1-218)</sub> aparecem próximos a membrana nuclear, mas do lado citoplasmático. B. O mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> aparece concentrado no núcleo. A proteína Nup57 foi utilizada como marcador do poro nuclear para distinguir o limite da região entre o núcleo e o citoplasma.

Como os dados de microscopia obtidos dos mutantes de deleção de Rrp44 é possível afirmar que, apesar de não complementar totalmente a função da proteína selvagem, o N-terminal de Rrp44 é transportado para o núcleo. Portanto, o NLS1 parece ser o mais importante para o transporte nuclear de Rrp44. Alguns estudos com

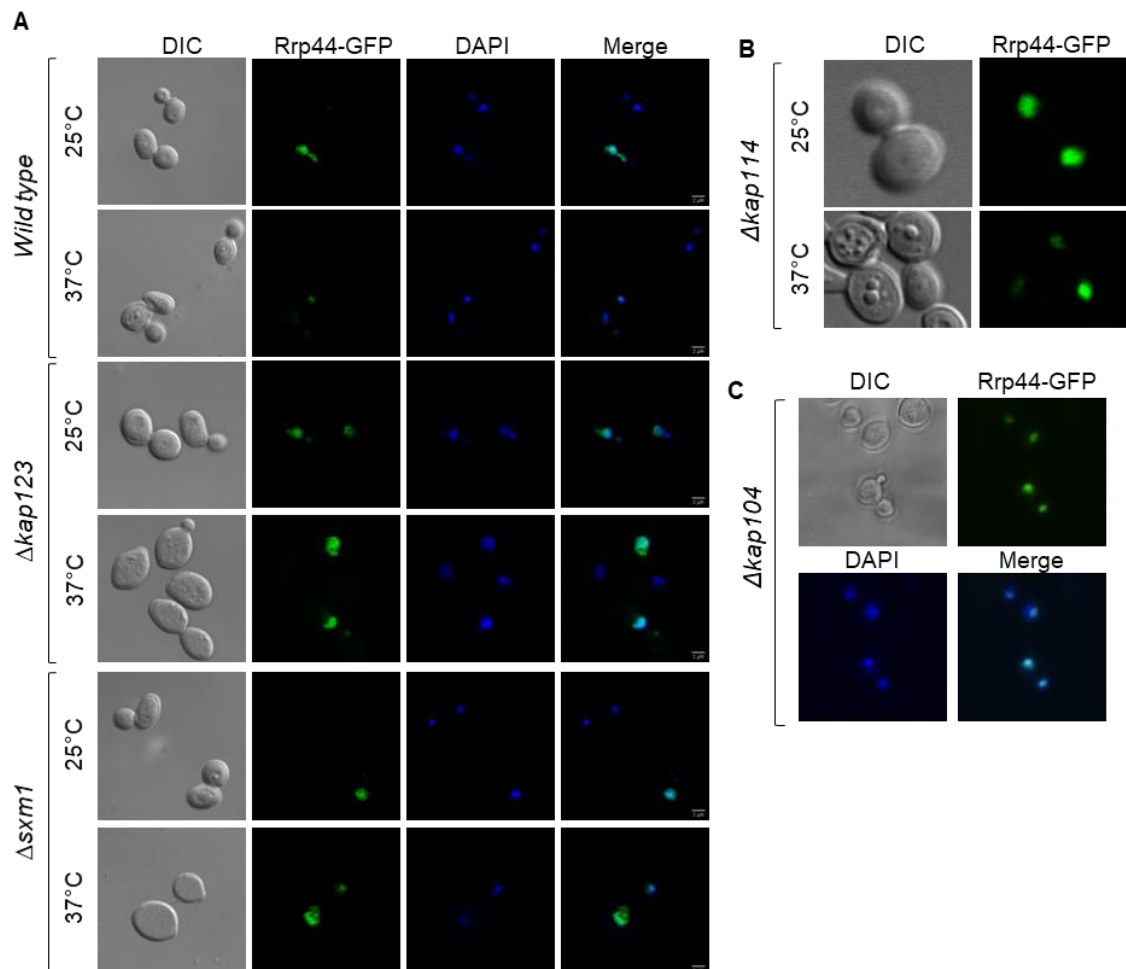
relação à sequência do NLS ainda são necessários para comprovar a importância do NLS1 no transporte nuclear de Rrp44.

### **As carioferinas Srp1 e Kap95 são responsáveis pelo transporte nuclear de Rrp44.**

Nossos dados mostram que Rrp44 possui seu próprio sinal de endereçamento nuclear, uma vez que essa encontra-se concentrada no núcleo, sendo seu N-terminal a região responsável por sua localização nuclear. Para entendermos um pouco mais sobre o mecanismo de transporte nuclear de Rrp44 em levedura, decidimos avaliar qual seriam as carioferinas importantes para localização nuclear de Rrp44. Para tal, decidimos utilizar algumas carioferinas importantes para o transporte de proteínas da via de maturação do RNA ribossomal, além das carioferinas responsáveis pelo transporte nuclear da subunidade Rrp6, e carioferinas específicas para sequência de NLSs específicos, como o PY-NLS.

A fim de avaliar quais carioferinas seriam importantes para o transporte nuclear de Rrp44, os mutantes de deleção das carioferinas não essenciais Kap104, Kap114, Kap123 e Sxm1 foram transformados com o plasmídeo *pUG34-Rrp44*. A cepa selvagem BY4742 transformada com o mesmo plasmídeo foi utilizada como controle. As cepas foram crescidas inicialmente a 30°C, e depois reinoculadas em para crescimento a 25°C (temperatura permissiva) e a 37°C (temperatura restritiva), por aproximadamente 15h. A localização de GFP-Rrp44 nesses mutantes de deleção foi, então, avaliada por microscopia de fluorescência confocal. DAPI foi utilizado como marcador nuclear.

A localização de GFP-Rrp44 nos mutantes  $\Delta kap123$  e  $\Delta sxm1$ , tanto a 25°C quanto a 37°C, é nuclear (Fig. 25A). Apesar de não possuímos a marcação nuclear na cepa  $\Delta kap114$ , é possível observar que Rrp44 está concentrada em uma única região, sugerindo que essa se encontra concentrada no núcleo (Fig. 25B). No caso da  $\Delta Kap104$ , a localização de GFP-Rrp44 foi analisada apenas a 30°C em um microscópio de fluorescência convencional. Nessa condição, o fenótipo de GFP-Rrp44 se manteve nuclear (Fig. 25C). Portanto, a ausência das carioferinas analisadas não interfere na localização de Rrp44, o que nos sugere que nenhuma dessas carioferinas seja a principal rota de importação da subunidade Rrp44.



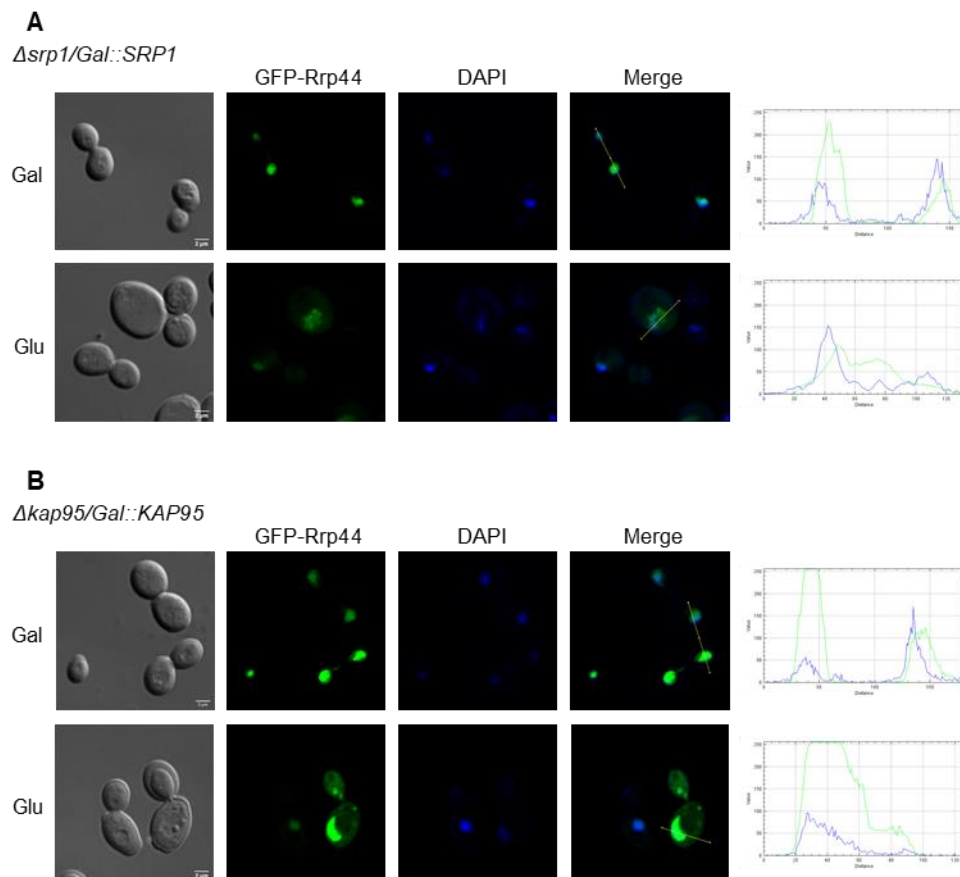
**Figura 25. Localização de GFP-Rrp44 não é afetada em mutantes das carioferinas Kap114, Kap123, Kap104 e Sxm1.** A. A deleção das carioferinas não essenciais Kap123 ou Sxm1 não afeta a localização de GFP-Rrp44. As células foram crescidas à 25°C ou 37°C pois as cepas são termosensíveis. A localização de GFP-Rrp44 foi analisada por microscopia confocal Laser scanning. A cepa selvagem foi utilizada como controle da localização. B. Análise da localização de GFP-Rrp44 na cepa  $\Delta kap114$ . Apesar da marcação nuclear não ter sido eficiente, é possível ver o sinal de GFP-Rrp44 concentrado em uma única região, o que não é alterado mesmo na mudança de temperatura. C. Localização de GFP-Rrp44 na cepa  $\Delta kap104$  à 30°C mostra que em condições normais, a ausência de Kap104 não afeta a localização de GFP-Rrp44.

Para avaliarmos a importância das carioferinas essenciais Srp1 e Kap95, as quais se mostraram importantes para o transporte nuclear da subunidade Rrp6 (Gonzales-Zubiate et al., 2017), nós utilizamos as cepas  $\Delta srp1/GAL::SRP1$  e  $\Delta kap95/GAL::KAP95$  (ver materiais e métodos) e as transformamos com o plasmídeo *pUG34-Rrp44*. Como essas duas carioferinas são essenciais para o crescimento da célula, os mutantes possuem a ORF da carioferina correspondente clonada no plasmídeo *YCplac33*, sob controle do promotor de galactose e em fusão com Proteína A. Assim sendo, quando galactose era a fonte de carbono, o gene da carioferina era expresso, e inibido quando utilizamos glicose como fonte de carbono.

Inicialmente,  $\Delta srp1/GAL::SRP1$  e  $\Delta kap95/GAL::KAP95$ , transformadas com *pUG34-Rrp44*, cresceram overnight em meio contendo galactose e aminoácidos necessários. No dia seguinte as células foram reinoculadas em galactose e glicose mais aminoácidos necessários, e cresceram de 14h a 16h. As células foram coletadas, fixadas com metanol 70% e analisadas por microscopia de fluorescência.

A figura 26A mostra a localização de GFP-Rrp44 na presença (gal) e em baixos níveis (gli) de Srp1. Quando comparamos as duas condições, é possível ver que o sinal de GFP-Rrp44 é nuclear quando Srp1 está bem expressa. Contudo, quando a carioferina Srp1 encontra-se em baixos níveis nas células, a localização de GFP-Rrp44 continua nuclear, mas é possível detectar o sinal da proteína no citoplasma, o que sugere que Srp1 seja importante para a localização nuclear de Rrp44. Já o

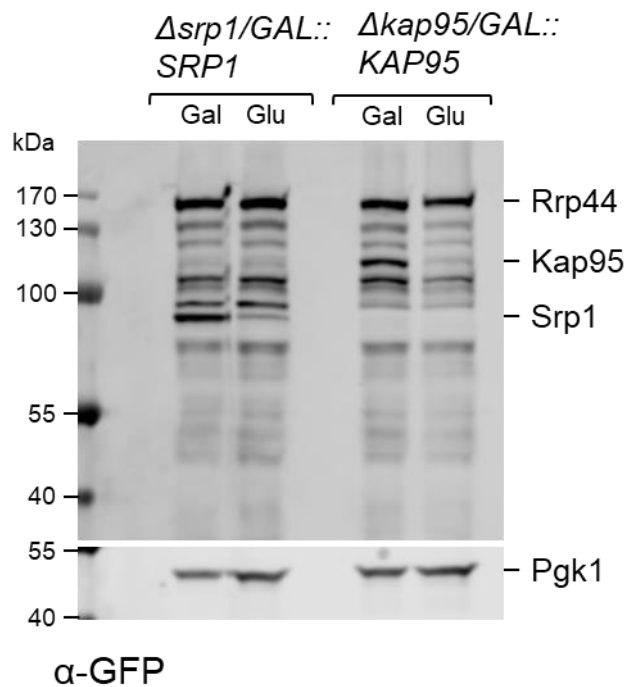
mutante de carioferina Kap95, quando crescido em galactose, condição na qual Kap95 é expressa, apresenta um sinal quase que exclusivamente nuclear de GFP-Rrp44. Entretanto, em baixos níveis de expressão de Kap95 (crescimento em glicose), é possível detectar o sinal citoplasmático de GFP-Rrp44, mostrando que a carioferina  $\beta$  Kap95 tem papel importante na localização nuclear de Rrp44 (Fig. 26B).



**Figura 26. Inibição da expressão das carioferinas afeta na localização subcelular de GFP-Rrp44.** Imagens obtidas em um Microscópio confocal Laser scanning mostram a localização subcelular de GFP-Rrp44 em altos (gal) e baixos (glu) níveis das carioferinas essenciais. O sinal de GFP-Rrp44 relativo ao sinal de DAPI foi analisado pelo programa ImageJ e está representado nos gráficos a direita. Em verde temos a intensidade/comprimento analisada de GFP. Em azul temos a intensidade/comprimento analisada de DAPI. A. Localização de GFP-Rrp44 na cepa  $\Delta$ srp1/GAL::SRP1. B. Localização de GFP-Rrp44 na cepa  $\Delta$ kap95/GAL::KAP95.



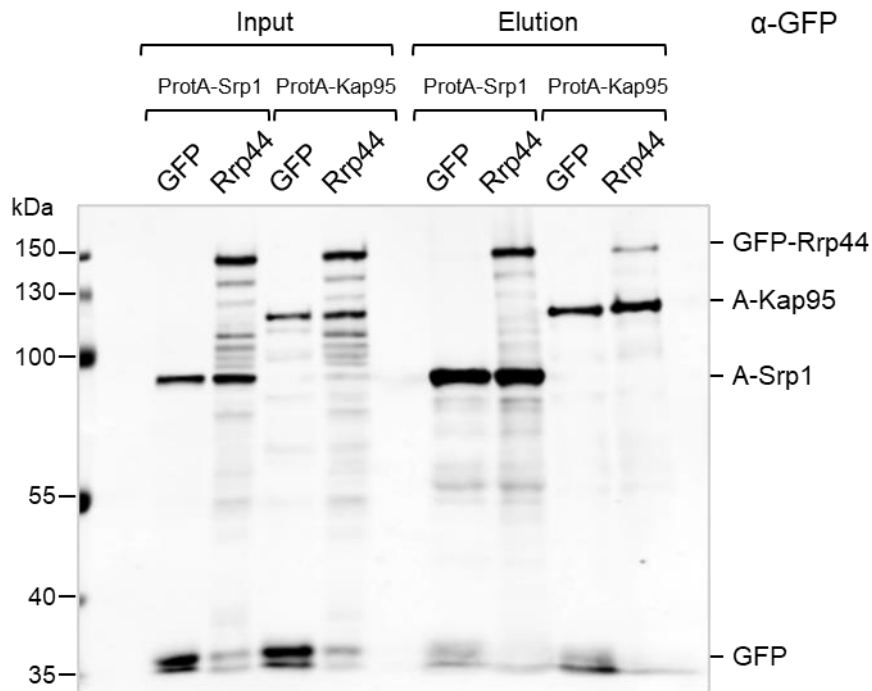
Ensaio de *western blot* foram feitos para confirmar a expressão de GFP-Rrp44 nos mutantes de carioferinas, utilizando-se anticorpo anti-GFP para identificação. As carioferinas Srp1 e Kap95 estavam clonadas em fusão com a proteína A, reconhecida por IgG. Então, para confirmar a queda da expressão de Srp1 e Kap95, comparamos o extrato total das células que cresceram em galactose com as células crescidas em glicose (Fig. 27). Podemos afirmar que o crescimento em glicose diminuiu notavelmente a expressão das carioferinas, o que corrobora nossos resultados de alteração na localização de GFP-Rrp44 nas cepas mutantes de carioferinas quando crescidas em glicose. O anticorpo anti-Pgk1 foi utilizado como controle interno da quantidade proteica de cada extrato.



**Figura 27. Western blot mostrando os níveis de expressão de GFP-Rrp44 e das carioferinas Srp1 e Kap95.** O western blot mostra o baixo nível de expressão das carioferinas quando crescem em glicose (Glu). O anticorpo anti-Pgk1 foi utilizado para controle interno da quantidade proteica de cada extrato.

A fim de confirmar a importância de Srp1 e Kap95 no transporte nuclear de Rrp44, realizamos o experimento de coimunoprecipitação. As mesmas cepas usadas anteriormente,  $\Delta Srp1/GAL::SRP1$  e  $\Delta Kap95/GAL::KAP95$ , agora contendo ou o plasmídeo *pUG34-Rrp44* ou o plasmídeo *pUG34* vazio, foram crescidas em meio contendo galactose mais aminoácidos necessários. O plasmídeo *pUG34-Rrp44* expressa a Rrp44 fusionada ao GFP, e o plasmídeo *pUG34* expressa GFP, e por isso, o último foi utilizado como controle negativo. As carioferinas episomais estavam fusionadas a proteína A, que além de permitir a identificação dessas proteínas por *western blot*, também possui afinidade pela resina de IgG sepharose, o que permitiu a utilização dessas proteínas como isca no ensaio de coimunoprecipitação.

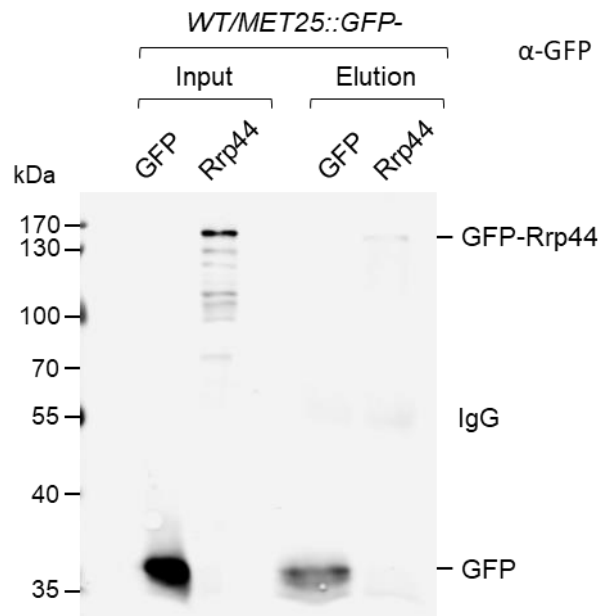
Após crescimento até a fase exponencial, as células foram lisadas e os extratos foram incubados em IgG sepharose por 2 horas. A resina foi, então, lavada, as proteínas foram eluídas, e foi feito o ensaio de *western blot*. A figura 28 mostra o *Input* e a eluição de cada uma das cepas mutantes de carioferina com expressão de GFP ou de GFP-Rrp44. Podemos observar que a subunidade do exossomo Rrp44 é coimunoprecipitada com ambas as carioferinas, sendo que o sinal de GFP-Rrp44 aparece mais fortemente na eluição com a carioferina Srp1, quando comparado ao seu sinal na eluição com Kap95.



**Figura 28. Interação indireta de Rrp44 com as carioferinas Srp1 e Kap95.** GFP-Rrp44 é coimunoprecipitada com ProtA-Srp1 e ProtA-Kap95. Cepas de levedura expressando ProtA-Srp1 ou ProtA-Kap95, e GFP ou GFP-Rrp44 foram utilizadas nos experimentos de coimunoprecipitação. ProtA-Srp1 e ProtA-Kap95 foram imobilizadas em *beads* de IgG-sepharose, e as proteínas coimunoprecipitadas foram analisadas por western blot com anticorpo anti-GFP. Apenas o *Input* e as eluições são mostradas.

A proteína GFP sozinha também é capaz de coimunoprecipitar com as duas carioferinas, mas com um sinal muito mais fraco. Para testar, então, se GFP estava de fato interagindo com as carioferinas ou se estava se ligando a própria resina de forma inespecífica, nós fizemos novamente o ensaio de coimunoprecipitação, desta vez utilizando a cepa selvagem *BY4742*. A cepa selvagem foi transformada com os mesmos plasmídeos contendo GFP e GFP-Rrp44. As células foram crescidas, desta vez em glicose, lisadas e o ensaio de coimunoprecipitação foi feito. A figura 29 mostra o *Input* e a eluição do ensaio. Podemos ver tanto a banda de GFP quanto de GFP-Rrp44 no *Input*. Quando analisamos a eluição, podemos ver que a banda de GFP permanece forte, sendo detectável assim como é na coimunoprecipitação na presença das carioferinas. Já a banda de GFP-Rrp44 quase não é visível na eluição, bem

diferente do que é visto com as carioferinas. Portanto, GFP está interagindo de forma inespecífica com a resina. Além disso, apesar de GFP-Rrp44 apresentar um fraco sinal quando coimunoprecipitada sem as carioferinas, seu sinal é muito mais forte quando GFP-Rrp44 está na presença das carioferinas Srp1 e Kap95, mostrando que GFP-Rrp44 está, de fato, coimunoprecipitando com ambas as carioferinas.

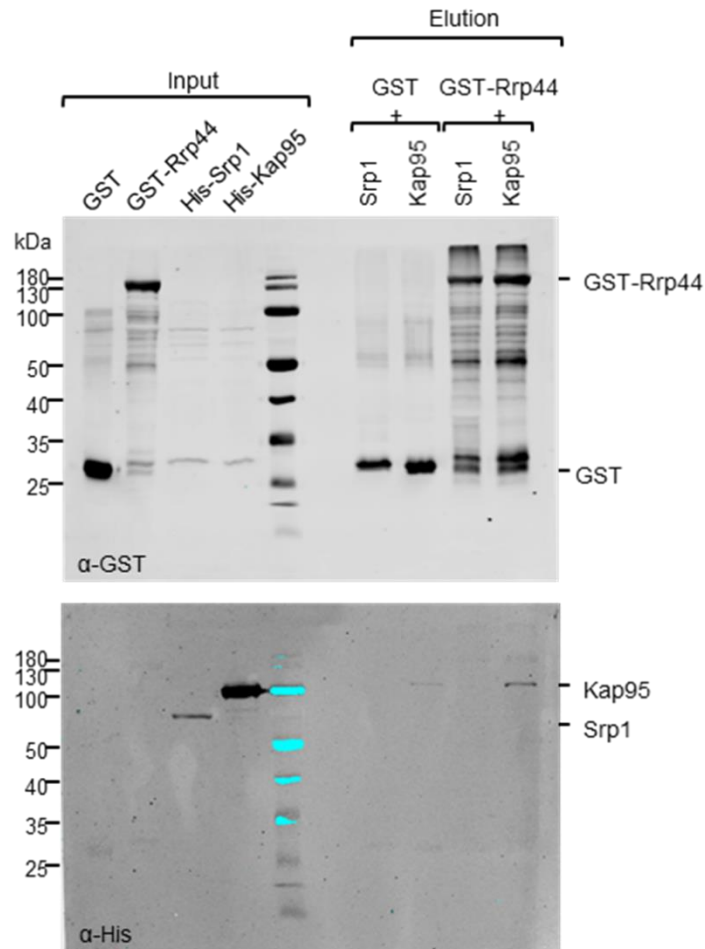


**Figura 29. GFP interage inespecificamente com a resina IgG sepharose.** Extratos totais de leveduras expressando GFP ou GFP-Rrp44 foram incubadas com *beads* de IgG-sepharose, e após lavagem, as proteínas eluidas foram analisadas por western blot com anticorpo Anti-GFP. Apenas o Input e a eluição são mostrados acima. GFP se liga de forma inespecífica à IgG-sepharose, com uma afinidade maior quando comparada à GFP-Rrp44.

Para avaliarmos a interação direta de Rrp44 com Srp1 e Kap95, decidimos realizar o experimento de *pull-down*. O plasmídeo *pGEX-Rrp44*, expressando Rrp44 fusionada ao *tag* de GST, foi transformado na cepa BL21 de *E. coli* e sua expressão induzida com IPTG. Como controle negativo, utilizamos o *pGEX* vazio, expressando o *tag* de GST. A mesma cepa foi utilizada para a expressão de Srp1 e Kap95, ambas

fusionadas ao *tag* de histidina. Após a indução, as células foram lisadas, os extratos quantificados e o experimento de *pull-down* iniciado. Nós utilizamos a resina de glutationa sepharose, incubando primeiramente os extratos totais de GST e de GST-Rrp44. O GST tem afinidade pela resina de escolha, o que faz com que o GST e o GST-Rrp44 fiquem retidos na sepharose. Após lavarmos, os extratos totais de His-Srp1 e His-kap95 foram incubados, seguido pela lavagem e eluição. O Input e eluição foram, então, analisados por *western blot*. Para a identificação de GST e GST-Rrp44, foi utilizado anticorpo anti-GST; para a identificação de His-Srp1 e His-Kap95, foi utilizado anticorpo anti-His.

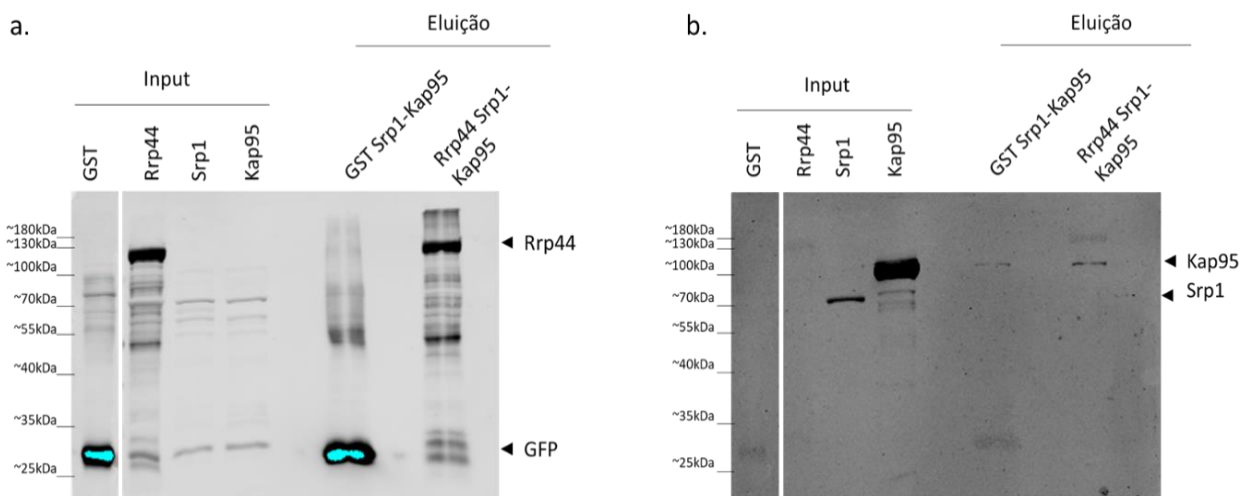
A figura 30A mostra western do *input* e eluição com o anticorpo anti-GST. Podemos observar que GST e GST-Rrp44 estavam presentes no *input*, e ligaram corretamente na resina, uma vez que aparecem com sinal forte na eluição. Além disso, é possível notar que a proteína Rrp44 apresenta vários produtos de degradação, apresentando várias bandas de tamanhos menores quando comparada à banda correspondente à proteína inteira. A figura 30B mostra a mesma membrana, agora incubada com anticorpo anti-His. Podemos observar as bandas tanto de Srp1 quanto de Kap95 no *input*, entretanto a banda de Srp1 não está presente nas eluições. A ausência de Srp1 nas canaletas da eluição nos mostra que, apesar de coimunoprecipitar fortemente com Rrp44, as duas proteínas não se ligam diretamente. Quando observamos as eluições contendo Kap95, é possível notar que essa carioferina, ao contrário de Srp1, está presente na eluição do controle negativo (GST) e na eluição de GST-Rrp44. Contudo, a banda de Kap95 é notavelmente mais forte na interação com GST-Rrp44 do que com GST (controle negativo).



**Figura 30. Interação direta de Rrp44 com carioferinas.** GST-Rrp44 é capaz de interagir diretamente com Kap95. GST e GST-Rrp44 expressas em *E. coli* foram ligadas à resina da glutationa-sepharose e incubadas com extratos totais de *E. coli* contendo His-Srp1 ou His-kap95. Depois da lavagem, as proteínas ligadas a resina foram eluidas com glutationa reduzida e analisadas por western blot. A mesma membrana foi incubada com os anticorpos anti-GST (membrana superior) e anti-His (membrana inferior).

Para entendermos melhor quantas vezes mais forte o sinal de Kap95 é em GST-Rrp44 em comparação com GST sozinha, quantificamos o sinal proveniente da membrana. Para tal, utilizamos o programa *ImageJ*, delimitando a área das bandas e as comparando. O resultado da quantificação mostra que o sinal de His-Kap95 é 6,6 vezes mais forte com GST-Rrp44 quando comparado ao sinal apenas com GST, indicando que a interação entre Rrp44 e Kap95 seja direta.

A fim de testar se a interação de Srp1 com Rrp44 é dependente da presença de Kap95, nós misturamos os extratos totais de *E. coli* expressando as duas carioferinas, e realizamos o experimento de *pull-down*. Na figura 31A, o western blot com anti-GST nos mostra o *input* e a eluição, sendo possível ver as bandas tanto do controle negativo (GST) quanto GST-Rrp44. Podemos afirmar que ambas ligaram bem à resina, uma vez que saem na eluição. A figura 31B nos mostra a mesma membrana, desta vez com anticorpo anti-His. O resultado nos mostra que Srp1 e Kap95 estavam no *Input*, além disso, Kap95 continua interagindo com Rrp44 e, mais fracamente, com a glutathiona sepharose (Fig. 31). Entretanto, a banda de Srp1 não aparece em nenhuma eluição, indicando que a carioferina  $\beta$  Kap95 não é responsável pela interação indireta entre Srp1 e Rrp44.



**Figura 31. Interação direta de Rrp44 não é dependente da formação do dímero carioferina  $\alpha$ -carioferina  $\beta$ .** GST-Rrp44 não é capaz de interagir diretamente com Srp1 mesmo na presença de Kap95. GST e GST-Rrp44 expressas em *E. coli* foram ligadas à resina da glutathiona-sepharose e incubadas com a mistura de extratos totais de *E. coli* contendo His-Srp1 e His-kap95. Depois da lavagem, as proteínas ligadas a resina foram eluídas com glutathiona reduzida e analisadas por western blot. A mesma membrana foi incubada com os anticorpos anti-GST (esquerda) e anti-His (direita).

Dessa forma, entendemos que apesar de Rrp44 não possuir a sequência de um NLS clássico, é possível dizer que Srp1, a única carioferina  $\alpha$  da levedura, influencia no transporte de Rrp44. É possível que, em alguns momentos, Rrp44 esteja acoplada à alguma proteína que seja reconhecida por Srp1, sendo transportada para o núcleo. Além de Srp1, a carioferina  $\beta$  Kap95, que na via clássica de importação nuclear forma dímero com Srp1, também influencia no transporte nuclear de Rrp44. Sua ausência leva a uma alteração forte no fenótipo de localização de GFP-Rrp44. A carioferina Kap95, além de coimunoprecipitar com Rrp44, é capaz de interagir diretamente com essa subunidade, o que nos sugere uma via direta de importação de Rrp44 através de Kap95.



## Discussão

Como já descrito na literatura, o complexo exossomo de levedura é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma (Allmang et al., 1999; Houseley et al., 2006; Zinder and Lima, 2017). Nos nossos estudos, nós observamos que as subunidades do exossomo Rrp41, Rrp43, Rrp44 e Rrp6, quando expressas em níveis endógenos, apresentavam uma localização quase que exclusivamente nuclear, estando concentradas principalmente no nucléolo. Apesar do exossomo estar relacionado a várias vias de maturação e de degradação de RNAs, o fato desse complexo se encontrar concentrado no nucléolo enfatiza a importância do complexo na maturação do RNA ribossomal (Klinge and Woolford, 2019; Kressler et al., 2017; Zinder and Lima, 2017).

Quando observamos os resultados das secções em Z das imagens de microscopia de fluorescência, é possível observar que o sinal do exossomo-GFP não colocaliza exatamente com o sinal de Rpa190-mCherry (a maior subunidade da Polimerase I). A existência de subcompartimentos nucleolares em levedura já era conhecida. Os subcompartimentos nucleolares foram descritos primeiramente utilizando-se microscopia eletrônica (Léger-Silvestre et al., 1999; Strom and Brangwynne, 2019), mais recentemente, com as melhorias implementadas na microscopia de fluorescência, foi possível observar a existência desses subcompartimentos nucleolares em eucariotos superiores por meio da fluorescência (Feric et al., 2016; Yao et al., 2019). Nossos resultados corroboram com a existência de um subcompartimento no nucléolo, que separaria a síntese do RNA ribossomal de algumas etapas do seu processamento. Somando-se a isso, a separação espacial entre a síntese do rRNA e a sua maturação por RNases é lógica considerando o poder

de degradação do exossomo, uma vez que se o complexo se encontrasse exatamente no mesmo local do início da síntese do rRNA, aumentaria a chance de degradá-lo indevidamente.

Os dados de quantificação confirmam o visto nas imagens de microscopia de fluorescência, mostrando que o exossomo está concentrado no nucléolo. Entretanto, como os dados de enriquecimento do exossomo mostram quase não haver sinal do exossomo considerando-se a área do citoplasma, decidimos observar os dados de sinal absoluto por compartimento, sem considerar a área em unidade de cada compartimento. Neste caso, podemos observar o sinal de cada subunidade fusionada ao GFP proveniente de cada compartimento analisado, mostrando que aproximadamente 20-30% do sinal do exossomo está presente no citoplasma. Sua observação se torna mais difícil considerando a área do citoplasma, que é muito maior que a do núcleo. Contudo, o sinal nuclear ainda é o predominante (de 70-80%, sendo 20-30% proveniente do nucléolo).

Os dados referentes ao sinal de Rrp6 nos intrigaram, uma vez que essa subunidade é descrita como exclusivamente nuclear e apresentou a mesma porcentagem de sinal citoplasmática das demais subunidades (Allmang et al., 1999; Briggs et al., 1998). Nós decidimos analisar as subunidades Rrp6, Rrp41 e o cofator citoplasmático Ski7 por meio de microscopia de fluorescência e quantificação do sinal. Devido ao forte sinal nuclear de Rrp6 e Rrp41, torna-se complicado concluir apenas com base nas imagens de microscopia de fluorescência. Quando avaliamos a quantificação do sinal absoluto das subunidades considerando a célula inteira, é possível confirmar que Rrp41 é mais expressa que Rrp6 (Ghaemmaghami et al., 2003), que por sua vez, é mais expressa que Ski7. Contudo, quando olhamos apenas para a quantificação do sinal absoluto proveniente do citoplasma, podemos afirmar

que a expressão de Ski7 e de Rrp6 é equivalente nesse compartimento. Esse dado é muito intrigante pois a subunidade Rrp6 foi caracterizada como exclusivamente nuclear (Allmang et al., 1999). Seria possível a existência de dois *pools* de exossomo, um interagindo com Rrp6 e outro com Ski7? Para podermos concluir sobre esses dados, futuros estudos serão necessários.

Sabendo que quando expressas em nível endógeno, as subunidades do exossomo se concentram no nucléolo, decidimos avaliar como o complexo seria transportado para o núcleo. Para tal, as *ORFs* das subunidades Rrp6, Rrp41, Rrp43 e Rrp44 foram inseridas no plasmídeo *pUG34*, sob controle do promotor *MET25*, fusionadas ao GFP no seu N-terminal pelo pós-doutorado Fernando Gonzales-Zubiate. Os plasmídeos foram transformados nas cepas *BY4742*,  $\Delta rrp6$  e  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$ . Quando avaliamos a localização das subunidades, podemos observar que as subunidades catalíticas Rrp6 e Rrp44 apresentam uma localização nuclear, enquanto as subunidades do *core* Rrp41 e Rrp43 apresentam sinal citoplasmático marcante e um sinal nuclear um pouco mais forte que seu sinal citoplasmático. Nós já sabíamos que Rrp6 encontrava-se concentrada no núcleo (Gonzales-Zubiate et al., 2017), e que esta subunidade, provavelmente não seria a responsável pela localização do complexo exossomo, considerando que ela não é essencial para levedura (Zinder and Lima, 2017).

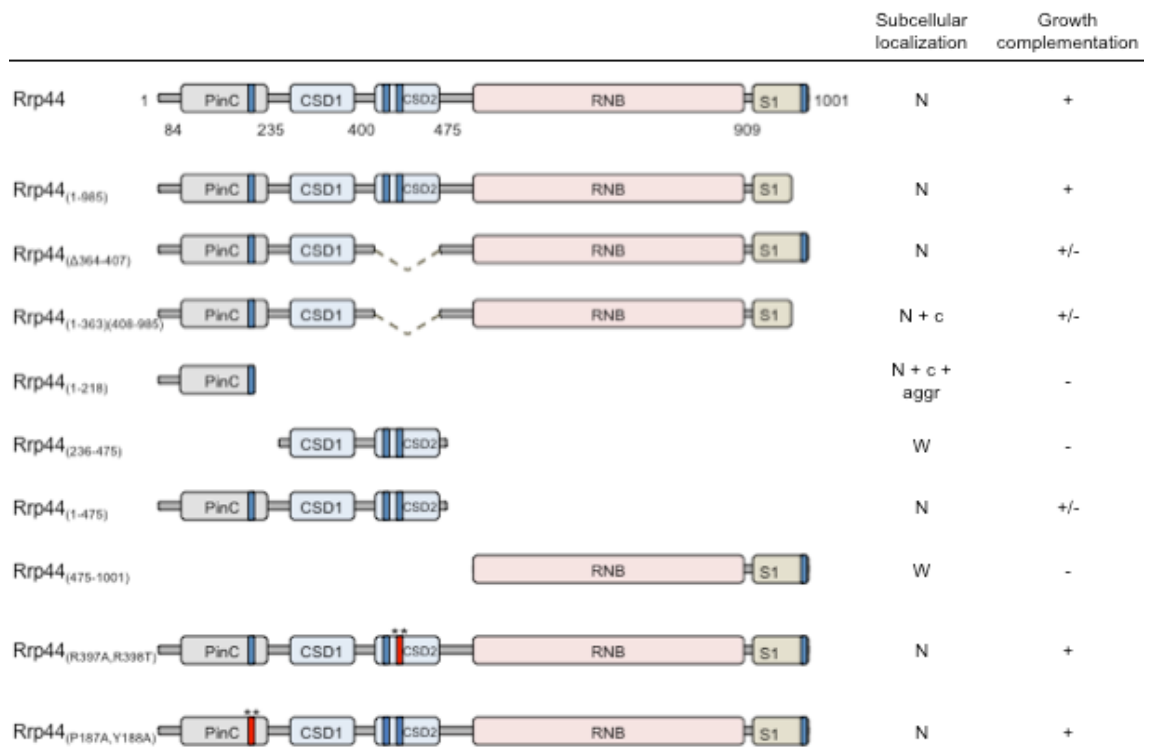
O mais intrigante dos resultados é a localização nuclear apresentada por Rrp44 quando superexpressa, localização que não é obtida pelas outras subunidades analisadas. Isso nos mostra que Rrp44 é capaz de localizar no núcleo de forma independente do complexo exossomo e que, muito provavelmente, Rrp44 possui seu próprio sinal de localização nuclear e está sendo transportada individualmente, uma vez que a sua ausência não alterou a localização de Rrp41 e Rrp43 superexpressas.

Ademais, a localização heterogênea entre as subunidades levantou algumas hipóteses em relação a existência de subcomplexos do exossomo e a sua montagem final ocorrendo no próprio núcleo. Já haviam sido observados subcomplexos do exossomo por meio de espectrometria de massas (Hernández et al., 2006), mostrando diferenças nas forças de interação de cada subunidade. Além disso, diversos estudos vem mostrando a importância individual de subunidades em processos celulares e em diversos tipos de doenças (Morton et al., 2018; Slavotinek et al., 2020; Snee et al., 2016; Wang et al., 2020; Weißbach et al., 2015). O fato de diferentes subunidades terem importância variada de acordo com o processo celular, com o tecido, e também com doenças distintas mostra a importância individual de cada subunidade do complexo. Os nossos dados de localização obtidos, nos dão indícios da existência de subcomplexos, e de rotas de transporte nuclear independentes.

Para avaliarmos a capacidade de Rrp44 ser transportada para o núcleo de forma independente, nós construímos diversos mutantes de deleção e mutantes pontuais fusionados ao GFP, e avaliamos sua localização. Nossos resultados mostraram que o N-terminal de Rrp44 é a região mais importante para seu transporte nuclear, sendo que o mutante Rrp44<sub>(1-475)</sub> foi o menor mutante que apresentou fenótipo semelhante ao selvagem (em mais de 80% das células analisadas essa proteína encontrava-se concentrada no núcleo). O mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub> também apresentou fenótipo nuclear em cerca de 65% das células analisadas, o que nos dá indícios de que a região responsável pela localização nuclear de Rrp44 esteja nessa região, entretanto o NLS não seria o PY-NLS uma vez que o mutante pontual continua a localizar no núcleo. Mais estudos são necessários para entendermos mais profundamente a importância do NLS1 no transporte nuclear de Rrp44. A figura 32

mostra o resumo dos dados obtidos nos diferentes experimentos com os mutantes de Rrp44.

Quando observamos os fenótipos apresentados pelo mutante Rrp44<sub>(1-218)</sub>, pudemos observar que 30% das células expressando esse mutante, apresentaram grânulos citoplasmáticos. Levando-se em consideração o fato de que o mutante de deleção representa apenas uma porção da proteína, e isso poderia levar a um mal enovelamento da mesma, os grânulos observados poderiam ser grânulos de degradação. Porém, para concluir que esses seriam grânulos de degradação, precisaríamos de um estudo mais aprofundado e marcadores específicos para o proteossomo.



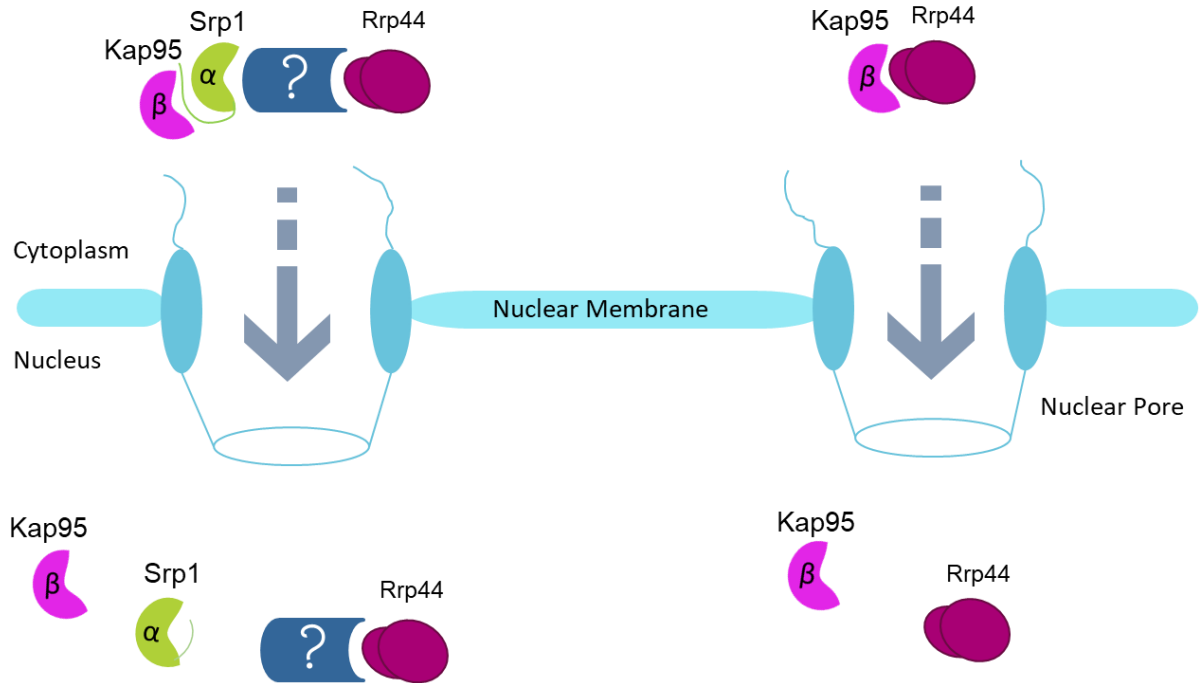
**Figura 32. Resumo dos dados obtidos dos mutantes de deleção de Rrp44.** Cada um dos mutantes de deleção de Rrp44 está representado acima, e os dados obtidos da localização e de crescimento encontram-se resumidos à direita. “N” significa Núcleo, “c” significa citoplasma, “aggr” significa agregados e “w” significa espalhado pela célula.

Uma vez que sabíamos que o N-terminal de Rrp44 é a região mais importante para sua localização nuclear, avaliamos a importância de diferentes carioferinas no transporte nuclear da subunidade Rrp44. Para tal, utilizamos mutantes de deleção de carioferinas essenciais e não essenciais para a célula. Assim como observado para Rrp6 (Gonzales-Zubiate et al., 2017), a ausência das carioferinas essenciais Srp1 e Kap95 influenciava na localização nuclear de Rrp44, contudo a carioferina Sxm1, que se mostrou importante no transporte nuclear de Rrp6, não teve efeito na localização de Rrp44.

Para confirmar a importância de Srp1 e Kap95 na localização nuclear de Rrp44, realizamos o ensaio de coimunoprecipitação, o qual mostrou Rrp44 coimunoprecipitando com ambas as carioferinas. Para avaliar se essa interação entre Rrp44 e as carioferinas poderia ser direta, realizamos o ensaio de *pull-down*. Este ensaio nos mostrou que Rrp44 é capaz de interagir diretamente com Kap95, de forma independente de Srp1. Por outro lado, apesar da forte interação nos ensaios de coimunoprecipitação, Rrp44 não foi capaz de interagir diretamente com Srp1 no ensaio de *pull-down*.

Os resultados são coerentes com o fato de Srp1 ser uma carioferina  $\alpha$ , sendo que as carioferinas  $\alpha$  são capazes de reconhecer NLS clássicos, e Rrp44 não possui nenhum NLS clássico em sua sequência (Lange et al., 2007; Stewart, 2007). Portanto, a subunidade Rrp44 precisaria estar interagindo com algum intermediário que fosse reconhecido pela carioferina  $\alpha$  para que o transporte nuclear fosse possível (Fig. 33). Já no caso de Kap95, como Rrp44 interage diretamente com essa carioferina  $\beta$ , essa poderia ser uma via alternativa de transporte nuclear, na qual Kap95 reconheceria diretamente Rrp44 e a levasse para o núcleo. A existência de vias alternativas para o transporte das mesmas proteínas já foi demonstrada (Chook and Süel, 2011), e

também foi vista com a subunidade Rrp6 do exossomo (Gonzales-Zubiate et al., 2017).



**Figura 33. Modelo do transporte nuclear de Rrp44.** Nossos dados mostram duas vias pelas quais Rrp44 é transportada. Em uma delas, Rrp44 estaria possivelmente interagindo com uma proteína desconhecida que possui um NLS clássico, e depois sendo transportada para o núcleo. Na outra via, Rrp44 seria reconhecida diretamente por Kap95, e sendo transportada para o núcleo.

## Conclusão

O exossomo de levedura é descrito na literatura como estando presente no núcleo e no citoplasma, apesar de evidências de que algumas subunidades estejam concentradas no núcleo. Neste trabalho, identificamos os possíveis sinais de localização nuclear em Rrp44, mostrando que o N-terminal de Rrp44 é importante para seu transporte nuclear. Além disso, identificamos as carioferinas responsáveis por esse transporte nuclear, mostrando a importância de Srp1 e Kap95. Analisamos também a localização subcelular das subunidades do *core* do exossomo, Rrp41 e Rrp43, e demonstramos que apesar de estarem presentes no citoplasma, estão concentradas no núcleo, e principalmente no nucléolo. O mesmo acontece com as subunidades catalíticas deste complexo, Rrp6 e Rrp44. Todas as quatro subunidades apresentaram uma localização subnucleolar diferente da observada para a RNA Pol I. Estes dados são de alta relevância para o entendimento da função do exossomo, já que este participa do processamento e controle de qualidade do pré-rRNA. Com os resultados obtidos aqui, mostramos que o exossomo deve ser recrutado para o nucléolo durante as etapas iniciais de processamento do pré-rRNA, mas permanecendo em um subcompartimento separado da síntese do rRNA.



## Referências

- Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2012). The yeast nuclear pore complex and transport through it. *Genetics* 190, 855–883.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148–2158.
- Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Müller, C.W., and Bork, P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* 309, 1–18.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* 273, 13255–13263.
- Burkard, K.T., and Butler, J.S. (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 20, 604–616.
- Cassany, A., and Gerace, L. (2009). Reconstitution of nuclear import in permeabilized cells. *Methods Mol. Biol.* 464, 181–205.
- Chook, Y.M., and Süel, K.E. (2011). Nuclear import by karyopherin-βs: recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1593–1606.
- Dauban, L., Kamgoué, A., Wang, R., Léger-Silvestre, I., Beckouët, F., Cantaloube, S., and Gadal, O. (2019). Quantification of the dynamic behaviour of ribosomal DNA genes and nucleolus during yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Struct. Biol.* 208, 152–164.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., and Brangwynne, C.P. (2016). Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell* 165, 1686–1697.
- Fiserova, J., and Goldberg, M.W. (2010). Nucleocytoplasmic transport in yeast: a few roles for many actors. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 273–277.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.
- Gonzales-Zubiate, F.A., Okuda, E.K., Da Cunha, J.P.C., and Oliveira, C.C. (2017). Identification of karyopherins involved in the nuclear import of RNA exosome subunit Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 292, 12267–12284.
- Graham, A.C., Kiss, D.L., and Andrulis, E.D. (2006). Differential distribution of exosome subunits at the nuclear lamina and in cytoplasmic foci. *Mol. Biol. Cell* 17, 1399–1409.
- Harigaya, Y., and Parker, R. (2010). No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1, 132–141.

- Henras, A., Henry, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gélugne, J.P., and Caizergues-Ferrer, M. (1998). Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* *17*, 7078–7090.
- Hernández, H., Dziembowski, A., Taverner, T., Séraphin, B., and Robinson, C.V. (2006). Subunit architecture of multimeric complexes isolated directly from cells. *EMBO Rep.* *7*, 605–610.
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 529–539.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O’Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686–691.
- Januszyk, K., and Lima, C.D. (2014). The eukaryotic RNA exosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *24*, 132–140.
- Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 227–239.
- Kim, Y.H., Han, M.-E., and Oh, S.-O. (2017). The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anat. Cell Biol.* *50*, 77–85.
- Kinoshita, N., Goebel, M., and Yanagida, M. (1991). The fission yeast *dis3+* gene encodes a 110-kDa essential protein implicated in mitotic control. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 5839–5847.
- Klinge, S., and Woolford, J.L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 116–131.
- Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2017). A puzzle of life: crafting ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 640–654.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* *282*, 5101–5105.
- Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* *108*, 103–113.
- Lingaraju, M., Schuller, J.M., Falk, S., Gerlach, P., Bonneau, F., Basquin, J., Benda, C., and Conti, E. (2020). To process or to decay: A mechanistic view of the nuclear RNA exosome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*
- Makino, D.L., Baumgärtner, M., and Conti, E. (2013). Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* *495*, 70–75.
- Mamolen, M., Smith, A., and Andrulis, E.D. (2010). *Drosophila melanogaster* Dis3 N-terminal domains are required for ribonuclease activities, nuclear localization and exosome interactions. *Nucleic Acids Res.* *38*, 5507–5517.

- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J.J., Mehdi, A.M., Saunders, N.F.W., Curmi, P.M., Forwood, J.K., Bodén, M., and Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1562–1577.
- Morton, D.J., Kuiper, E.G., Jones, S.K., Leung, S.W., Corbett, A.H., and Fasken, M.B. (2018). The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *RNA* 24, 127–142.
- Normand, C., Berthaud, M., Gadai, O., and Léger-Silvestre, I. (2016). Correlative Light and Electron Microscopy of Nucleolar Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 1455, 29–40.
- Ogami, K., Chen, Y., and Manley, J.L. (2018). RNA surveillance by the nuclear RNA exosome: mechanisms and significance. *Noncoding RNA* 4.
- Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T., and Yanagida, M. (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* *dis* genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.* 7, 1465–1473.
- Okuda, E.K., Gonzales-Zubiate, F.A., Gadai, O., and Oliveira, C.C. (2020). Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function. *J. Biol. Chem.* 295, 11195–11213.
- Slavotinek, A., Misceo, D., Htun, S., Mathisen, L., Frengen, E., Foreman, M., Hurtig, J.E., Enyenihi, L., Sterrett, M.C., Leung, S.W., et al. (2020). Biallelic variants in the RNA exosome gene *EXOSC5* are associated with developmental delays, short stature, cerebellar hypoplasia and motor weakness. *BioRxiv*.
- Snee, M.J., Wilson, W.C., Zhu, Y., Chen, S.-Y., Wilson, B.A., Kseib, C., O’Neal, J., Mahajan, N., Tomasson, M.H., Arur, S., et al. (2016). Collaborative control of cell cycle progression by the RNA exonuclease *dis3* and *ras* is conserved across species. *Genetics* 203, 749–762.
- Soniat, M., and Chook, Y.M. (2015). Nuclear localization signals for four distinct karyopherin- $\beta$  nuclear import systems. *Biochem. J.* 468, 353–362.
- Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 195–208.
- Strom, A.R., and Brangwynne, C.P. (2019). The liquid nucleome - phase transitions in the nucleus at a glance. *J. Cell Sci.* 132.
- Synowsky, S.A., van Wijk, M., Raijmakers, R., and Heck, A.J.R. (2009). Comparative multiplexed mass spectrometric analyses of endogenously expressed yeast nuclear and cytoplasmic exosomes. *J. Mol. Biol.* 385, 1300–1313.
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., and Coates, J.C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* 20, 470–481.

- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., and Hurt, E.C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* 10, 573–583.
- Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepien, P.P., et al. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* 29, 2342–2357.
- Wang, C., Liu, Y., DeMario, S.M., Mandric, I., Gonzalez-Figueroa, C., and Chanfreau, G.F. (2020). Rrp6 Moonlights in an RNA Exosome-Independent Manner to Promote Cell Survival and Gene Expression during Stress. *Cell Rep.* 31, 107754.
- Wasmuth, E.V., and Lima, C.D. (2012). Structure and Activities of the Eukaryotic RNA Exosome. *Enzymes* 31, 53–75.
- Watkins, N.J., Gottschalk, A., Neubauer, G., Kastner, B., Fabrizio, P., Mann, M., and Lührmann, R. (1998). Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA* 4, 1549–1568.
- Weißbach, S., Langer, C., Puppe, B., Nedeva, T., Bach, E., Kull, M., Bargou, R., Einsele, H., Rosenwald, A., Knop, S., et al. (2015). The molecular spectrum and clinical impact of DIS3 mutations in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 169, 57–70.
- Wendler, P., and Enenkel, C. (2019). Nuclear transport of yeast proteasomes. *Front. Mol. Biosci.* 6, 34.
- Wente, S.R., and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000562.
- Wilson, K.L., and Dawson, S.C. (2011). Evolution: functional evolution of nuclear structure. *J. Cell Biol.* 195, 171–181.
- Yano, R., Oakes, M.L., Tabb, M.M., and Nomura, M. (1994). Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6880–6884.
- Yao, R.-W., Xu, G., Wang, Y., Shan, L., Luan, P.-F., Wang, Y., Wu, M., Yang, L.-Z., Xing, Y.-H., Yang, L., et al. (2019). Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense Fibrillar Components in the Human Nucleolus. *Mol. Cell* 76, 767–783.e11.
- Yoshimura, S.H., and Hirano, T. (2016). HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments? *J. Cell Sci.* 129, 3963–3970.
- Zanchin, N.I., and Goldfarb, D.S. (1999). Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1518–1525.

Zinder, J.C., and Lima, C.D. (2017). Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev.* 31, 88–100.

(2009). *Yeast Protocols Handbook* .

## Anexo

### Anexo A – SÚMULA CURRICULAR

Ellen Kazumi Okuda  
 Brasileira, solteira, 26 anos  
 Rua Paulo de Avelar, 66, apartamento 12  
 Parada Inglesa, São Paulo – SP  
 CEP: 02243-010  
 E-mail: ellen.okuda@usp.br

#### FORMAÇÃO ACADÊMICA:

- IQ-USP (Instituto de Química da Universidade de São Paulo): Mestrado em bioquímica. Previsão de conclusão: outubro/2020;
- LBME-Biotoul (Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote – Université Toulouse III): Estágio em Biologia Molecular. Fevereiro-Julho/2019;
- ICB-USP (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo): Bacharelado em Ciências Biomédicas. Concluído em Julho/2017.

#### EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- **Instituto de Química – Universidade de São Paulo: agosto/2017 até atual**  
Cargo: Aluna de mestrado (bolsista CNPq e FAPESP). Área: Bioquímica e Biologia Molecular. Projeto: Estudo dos mecanismos de transporte celular de subunidades do complexo exossomo em *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote – Université Toulouse III (Paul Sabatier): fevereiro a agosto/2019**  
Cargo: Estagiária (bolsista FAPESP e CNRS). Área: Biologia Molecular. Projeto: Study of the cellular transport mechanism of the RNA Exosome subunit Rrp44 in *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Instituto de Química – Universidade de São Paulo: março/2016 a julho/2017**  
Cargo: Iniciação científica (bolsista FAPESP). Área: Biologia Molecular. Projeto: Estudo dos mecanismos de transporte celular da Subunidade Rrp44 do complexo exossomo em *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo: fevereiro/2014 a fevereiro/2016**  
Cargo: Iniciação científica (bolsista FAPESP). Área: Biologia Molecular. Projeto: Papel do pequeno RNA CCNA\_R0074 na regulação da síntese translesão em *Caulobacter crescentus*.

## FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- **Faculdade de Economia e Administração/USP**. Fevereiro a julho/2016  
Natureza: Curso teórico “Gestão em Operações em Saúde” (Carga Horária: 30h)
- **XV Congresso Brasileiro de Biomedicina & III Congresso internacional de Biomedicina**. 19 a 22 de outubro de 2016.  
Natureza: Curso teórico “Desvendando o PCR em Tempo Real” (Carga horária: 4h)
- **XV Congresso Brasileiro de Biomedicina & III Congresso internacional de Biomedicina**. 19 a 22 de outubro de 2016  
Natureza: Curso teórico “Diagnóstico laboratorial das anemias e leucemias” (Carga horária: 4h)
- **IV Curso de Inverno - Respostas a danos no DNA: Implicações em envelhecimento e câncer**. 27 a 31 de julho de 2015.  
Natureza: Curso teórico (Carga horária: 50h)
- **Web Conferência de Análises Instrumentais – WEBCONAI**. 03 a 05 de agosto de 2020.  
Natureza: Congresso teórico online (Carga horária: 40h)

## RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

- Okuda, E. K.; Gonzales, F. A., Oliveira, C. C. **Cellular transport studies of exosome subunit Rrp44 in Saccharomyces cerevisiae**. XV Brazilian Congress of Biomedicine & III International Congress of Biomedicine. De 19 a 22 de outubro de 2016. Bento Gonçalves, Brasil.
- Okuda, E. K.; Gonzales, F. A., Oliveira, C. C. **Cellular transport studies of exosome subunit Rrp44 in Saccharomyces cerevisiae**. PeruScientist2016: I Meeting of Peruvian Scientist in America Latin. Em 17 de novembro de 2016. São Paulo, Brasil.
- Okuda, E. K.; Gonzales, F. A., Oliveira, C. C. **IDENTIFICATION OF THE KARYOPHERINS RESPONSIBLE FOR THE NUCLEAR TRANSPORT OF THE EXOSOME SUBUNIT RRP44 IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE**. 46 Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. De 27 a 30 de julho de 2017. Águas de Lindóia, Brasil.
- Gonzales-Zubiate, F.; Okuda, E.; Cunha, J.; Oliveira, C. **Identification of Karypherins involved in the nuclear import of RNA exosome subunit Rrp6 in Saccharomyces cerevisiae**. De 30 de maio a 3 de junho de 2017. Praga, República Tcheca.
- Okuda, E. K.; Gonzales, F. A., Oliveira, C. C. **STUDY OF THE CELLULAR TRANSPORT MECHANISM OF THE EXOSOME SUBUNITS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE**. 47 Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. De 26 a 29 Maio de 2018. Joinville, Brasil.
- Okuda, E. K.; Gonzales, F. A., Oliveira, C. C. **STUDY OF THE NUCLEAR TRANSPORT OF THE EXOSOME SUBUNIT Rrp44 IN Saccharomyces cerevisiae**. XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. De 18 a 21 de julho de 2018. São Paulo, Brasil.

## ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 
- Gonzales-Zubiate, Fernando; Okuda, Ellen; Da Cunha, Julia; Oliveira, Carla. (2017). Identification of Karyopherins involved in the nuclear import of RNA exosome subunit Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. JBC v. 292, p. jbc.M116.772376-12284.
  - Okuda, E.K., Gonzales-Zubiate, F.A., Gadal, O., and Oliveira, C.C. (2020). Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function. J. Biol. Chem.



## **Anexo B – ARTIGO CIENTÍFICO**

Okuda, E.K., Gonzales-Zubiate, F.A., Gadal, O., and Oliveira, C.C. (2020). Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function. *J. Biol. Chem.*



# Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function

Received for publication, March 24, 2020, and in revised form, June 12, 2020. Published, Papers in Press, June 17, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA120.013589

Ellen K. Okuda<sup>1</sup>, Fernando A. Gonzales-Zubiarte<sup>1</sup> , Olivier Gadad<sup>2</sup> , and Carla C. Oliveira<sup>1\*</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and the <sup>2</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

Edited by Craig E. Cameron

The RNA exosome is a multisubunit protein complex involved in RNA surveillance of all classes of RNA, and is essential for pre-rRNA processing. The exosome is conserved throughout evolution, present in archaea and eukaryotes from yeast to humans, where it localizes to the nucleus and cytoplasm. The catalytically active subunit Rrp44/Dis3 of the exosome in budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is considered a protein present in these two subcellular compartments, and here we report that it not only localizes mainly to the nucleus, but is concentrated in the nucleolus, where the early pre-rRNA processing reactions take place. Moreover, we show by confocal microscopy analysis that the core exosome subunits Rrp41 and Rrp43 also localize largely to the nucleus and strongly accumulate in the nucleolus. These results shown here shed additional light on the localization of the yeast exosome and have implications regarding the main function of this RNase complex, which seems to be primarily in early pre-rRNA processing and surveillance.

The RNA exosome is a protein complex that participates in processing and degradation of all classes of RNA in eukaryotes (1, 2). In *Saccharomyces cerevisiae*, the exosome is composed of a nine-subunit core (Exo9) that contains a heterohexameric ring formed by the subunits Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, and Mtr3, and a heterotrimeric “cap” formed by the subunits Rrp4, Rrp40, and Csl4. Although the structure of the exosome core is conserved from archaea to eukaryotes, it has no catalytic activity in the latter (3). In yeast, Exo9 interacts with Rrp44/Dis3 in the nucleus and cytoplasm to form a 10-subunit complex (Exo10). Rrp44 is an RNase II family member, and has two catalytic sites, one with endoribonucleolytic activity (PIN) and a second with processive 3'-to-5' exoribonucleolytic activity (RNB) (4–6). In yeast, the nuclear exosome contains Rrp6 (forming Exo11), an extra catalytic subunit with a distributive 3'-to-5' exoribonuclease activity that binds to the trimeric cap and upper portion of the hexameric ring, opposite to the Rrp44-binding site. Rrp6 is the only nonessential exosome subunit, although the deletion of its gene results in a slow growth phenotype, temperature sensitivity, filamentous growth, and RNA processing defects (7–12).

Ribosome biogenesis involves the coordinated transcription, surveillance, modification, and processing of precursor rRNAs, which undergo modifications and several exo- and endonucleolytic cleavage reactions during its maturation process (13, 14). In the canonical pre-rRNA maturation pathway, the RNA exosome complex is responsible for the degradation of the spacer sequence 5'-ETS after cleavage at A<sub>0</sub>, and for the 3'-5' end processing of 7S pre-rRNA to the mature 5.8S rRNA (Fig. S1A) (8, 15). The 5'-ETS is released co-transcriptionally and completely degraded by the exosome, while SSU processome is formed by association of U3 snoRNP and other factors to the pre-rRNA being transcribed (16). Later during pre-rRNA processing, endonucleolytic cleavage at the C2 site in ITS2 of pre-rRNA 27S separates pre-rRNAs 7S (5.8S + 5' region of ITS2) and 26S (3' region of ITS2 plus 25S) (17), which undergo exonucleolytic processing by the exosome and Rat1/Rai1, respectively, to generate mature rRNAs 5.8S and 25S (17, 18). Mtr4 and the RNA exosome are essential for the ITS2 processing of 7S after cleavage at C2 (18), when the exosome subunit Rrp44 shortens 7S to the intermediate 5.8S + 30, which is then handed over to Rrp6 that trims it to 6S pre-rRNA, which gives rise to the mature 5.8S rRNA after further processing in the cytoplasm (19). Exosome is also involved in quality control steps of rRNA processing, targeting 23S rRNA generated by direct cleavage at the A3 site for degradation, and unprocessed <sup>35</sup>S rRNA (Fig. S1B) (20–22). Interestingly, despite the direct involvement of the exosome in 7S pre-rRNA processing and quality control, 60S subunits bearing 7S have been identified in polysomes of exosome cofactors mutants (23).

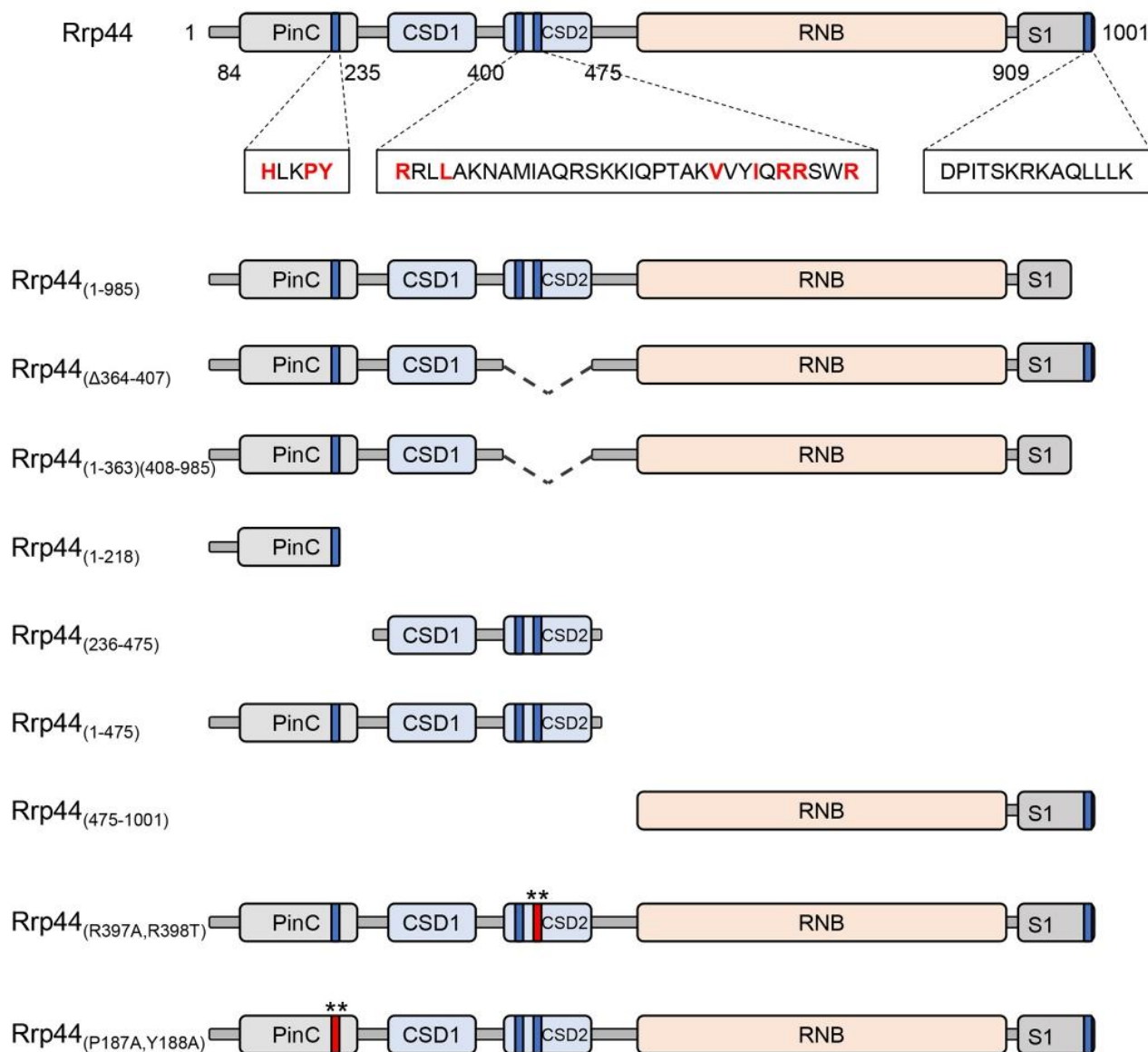
Although the structure and function of the exosome has been extensively studied in recent years, detailed information on the mechanisms responsible for the subcellular localization of its different forms is still lacking. Despite the identification of some of the yeast exosome subunits in the nucleolus (24), the core subunits of this complex are regarded as mainly present in nucleus and cytoplasm (3, 9, 24, 25). Rrp4 and Rrp6 have been reported to be present in nucleus and nucleolus, in addition to the cytoplasm in the case of Rrp4 (9). We have recently identified the nuclear import mechanisms for Rrp6 and shown that this exclusively nuclear subunit has multiple transport pathways, being bound by the  $\alpha$ -importin Srp1 and  $\beta$ -importins Kap95 and Sxm1 (12). To gather more information on the transport of the exosome to the nucleus, we investigated the nuclear import pathway of the other exosome catalytically

This article contains supporting information.

\*For correspondence: Carla C. Oliveira, ccoliv@iq.usp.br.

Present address for Fernando A. Gonzales-Zubiarte: School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Ecuador.

### Exosome is concentrated in the yeast nucleolus



**Figure 1. Schematic representation of the deletion and point mutants of Rrp44.** Structural and catalytic domains of Rrp44 are shown. Positions of putative NLS are shown in blue and their sequences are highlighted. Asterisks over NLS in red indicate the positions of the point mutations.

active subunit, Rrp44, and show here that importins Srp1 ( $\alpha$ ) and Kap95 ( $\beta$ ), respectively, are responsible for this transport, which occurs independently of Rrp6. Furthermore, we show that the exosome complex is highly concentrated in the nucleus, and more specifically in the nucleolus, where pre-rRNA is transcribed and where the early processing reactions take place.

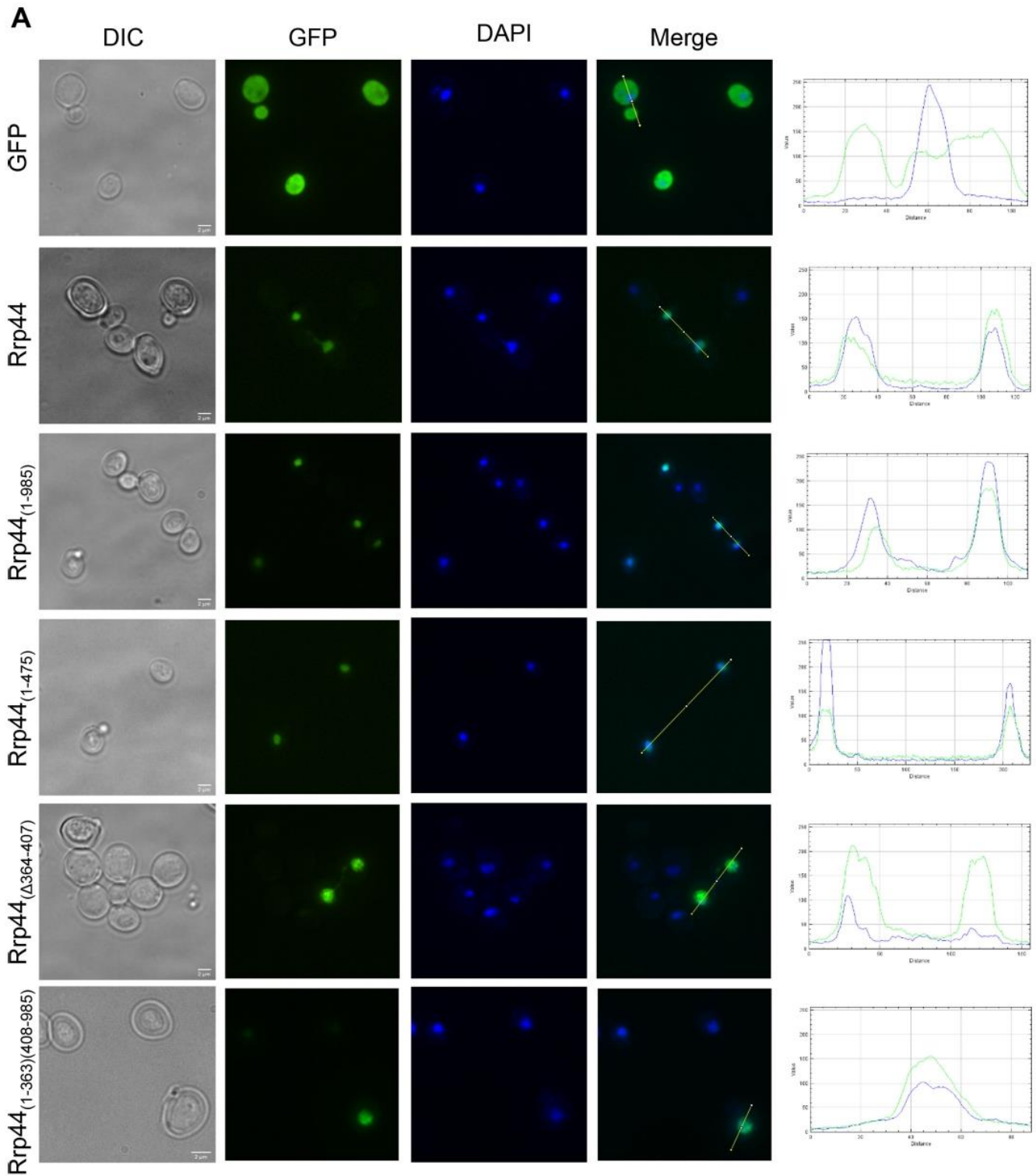
### Results

One of the essential functions of the exosome in yeast is the processing of pre-rRNA in the nucleus, which underlines the relevance of uncovering the mechanism of nuclear import that allows this protein complex to enter the nucleus. We have previously shown that one of the exosome active subunits, Rrp6, is transported to the nucleus by the karyopherins Srp1/Kap95 or Sxm1 (12), but information on the other catalytically active

exosome subunit, Rrp44/Dis3, nuclear transport is lacking. Rrp44 has five distinct structural domains: an endonuclease PinC N-terminal domain, two CSD cold shock domains, an essential exoribonuclease domain, RNB, and an RNA-binding domain S1 (6). Based on software analyses (see "Experimental procedures"), we identified the presence of three putative nuclear localization signals (NLSs) in the amino acid sequence of Rrp44 (named here NLS1, NLS2, and NLS3), each overlapping one of the functional domains, PinC, CSD2, and S1, respectively (Fig. 1).

NLS1 is a nuclear localization signal known as the PY-NLS, located in the PinC domain of Rrp44 between residues 172 and 188 (<sup>172</sup>RAIRKTCQWYSEHLKPY<sup>188</sup>). A weak consensus motif composed of an N-terminal hydrophobic or basic motif and a C-terminal R/H/KX<sub>2-5</sub>PY recognized by importins Kap104, Sxm1/Kap108, Kap121, Kap114, Nmd5/Kap119, and Kap95 (26–28).

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus



**Figure 2. NLS1 is the most important region for Rrp44 nuclear import.** Fluorescence microscopy images show the subcellular localization of the Rrp44 mutants expressed in WT cells. *A*, GFP, GFP-Rrp44, Rrp44<sub>1-985</sub>, Rrp44<sub>1-475</sub>, Rrp44<sub>Δ364-407</sub>, and Rrp44<sub>(1-363)(408-985)</sub>. *B*, Rrp44<sub>1-218</sub>, Rrp44<sub>236-475</sub>, Rrp44<sub>475-1001</sub>, Rrp44<sub>R397A,R398A</sub>, and Rrp44<sub>P187A,Y188A</sub>. Analysis of GFP-Rrp44 relative to DAPI using ImageJ is shown on the *right*. Cells expressing Rrp44<sub>1-218</sub> show two phenotypes, both depicted here, with this mutant localized to the nucleus of 67% of cells, and present in aggregates in 30% of cells. GFP-Rrp44 relative to DAPI by using ImageJ is shown on the *right*. *Green lines* represent GFP and *blue lines* represent DAPI. Images were acquired and edited separately. Quantification of different phenotypes is shown in Fig. S3.

### Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

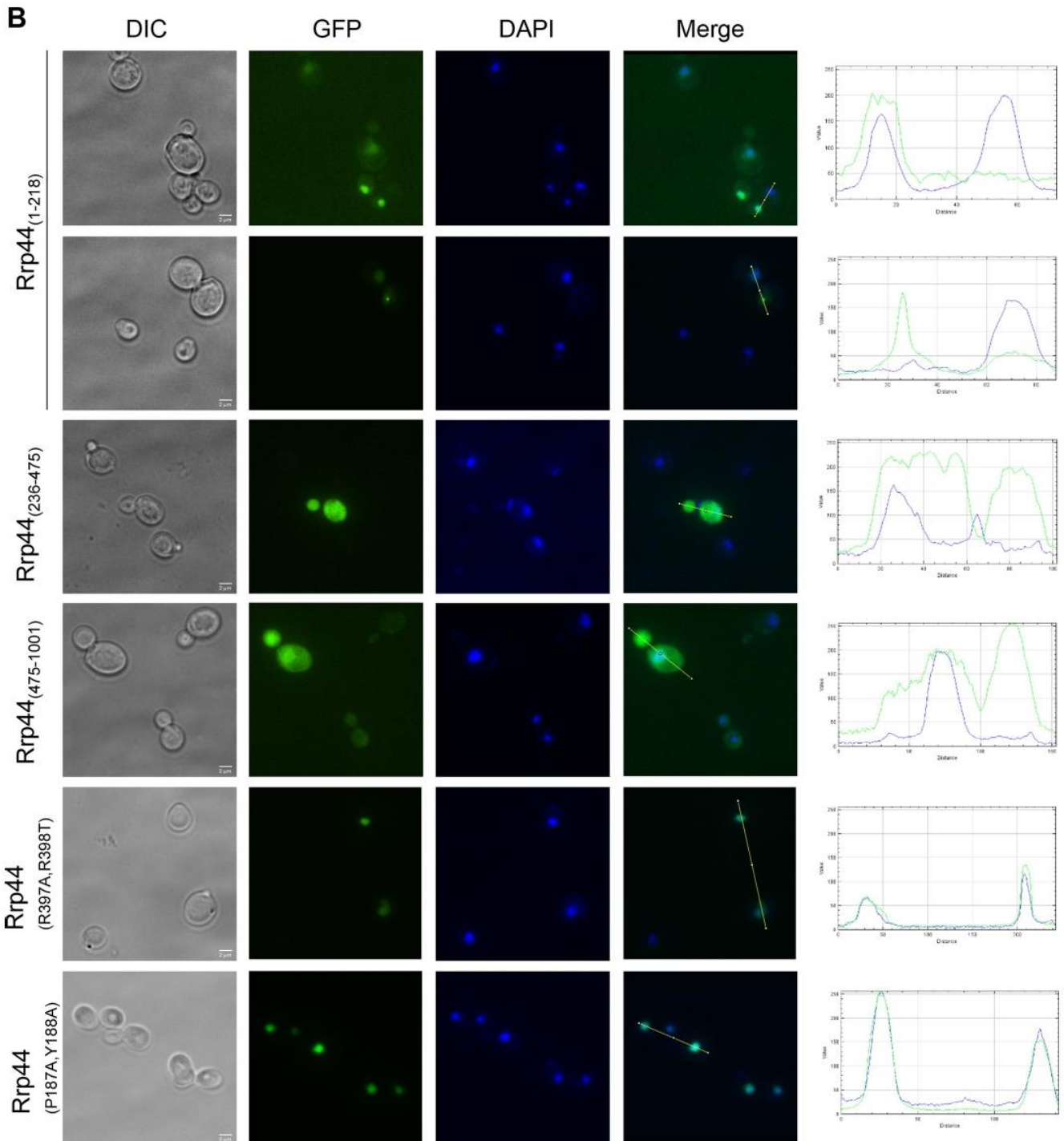


Figure 2—continued

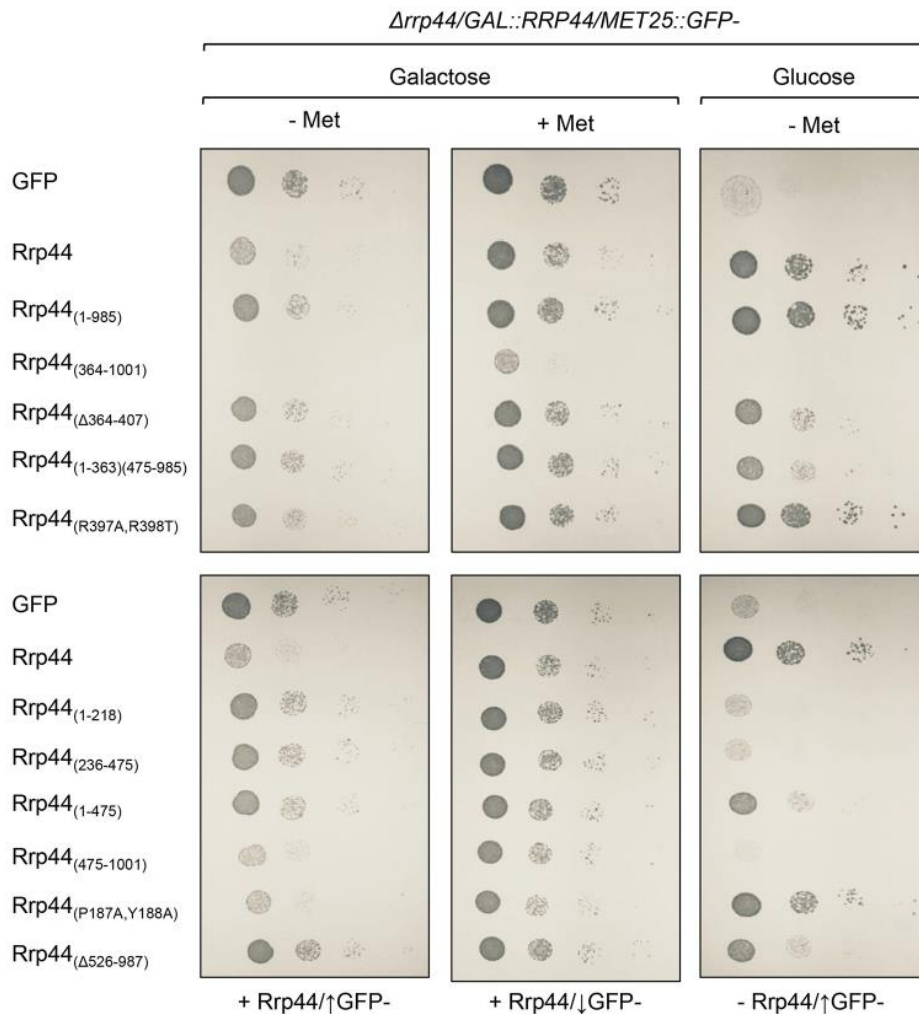
NLS2 is located in the CSD2 domain between residues 370 and 401 (<sup>370</sup>RRLAKDAMIAQRSKKIQPTAKV<sup>401</sup>VYIQR<sup>401</sup>SWR) and contains the consensus NLS, R/KX<sub>2</sub>LX<sub>n</sub>V/YX<sub>2</sub>V/IXK/RX<sub>3</sub>K/R, recognized by the importins Kap114, Kap95, Kap123, Pse1, and Kap104 (29). NLS3 is located at the C terminus of Rrp44 between residues 988 and 1001 (<sup>988</sup>DPITSKRKAELLK<sup>1001</sup>). The prediction of this NLS is based on its similarity to the *Drosophila* Rrp44 (dDis3), which is recognized by importin

$\alpha 3$  (30, 31). These findings suggest that Rrp44 could be transported to the nucleus independently of other exosome subunits.

#### NLS1 is essential for nuclear import

To explore the importance of each of Rrp44 NLSs for its nuclear import, we constructed plasmids for episomal expression

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

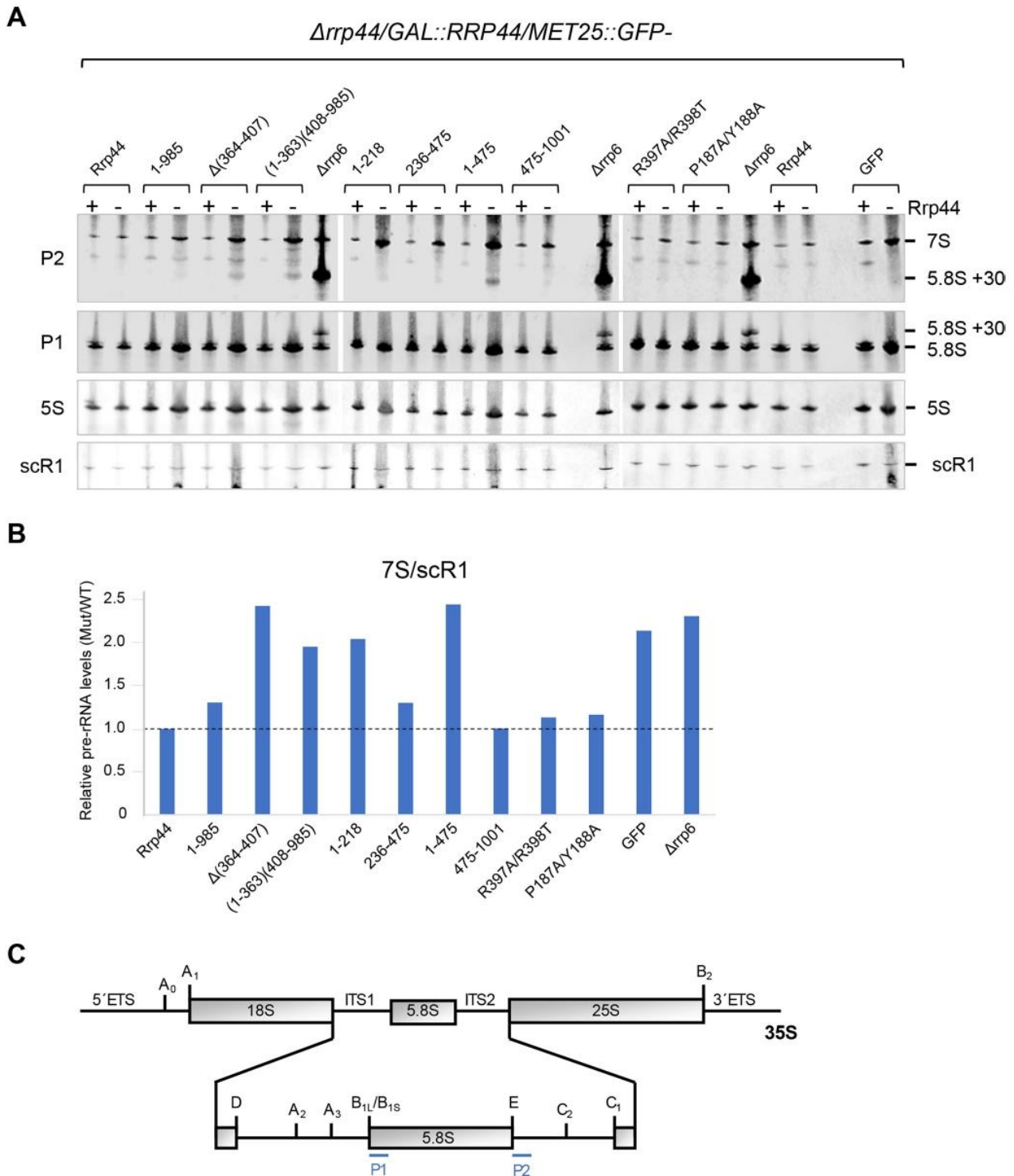


**Figure 4. Analysis of growth of conditional strain *Δrrp44/GAL::RRP44* expressing Rrp44 mutants.** Conditional strain was transformed with plasmids containing the Rrp44 mutants under control of *MET25* promoter, and incubated in galactose (expression of WT Rrp44) or glucose (expression of Rrp44 mutants) medium, in the presence or absence of methionine (lower and higher levels of the mutants, respectively). Mutants Rrp44<sub>Δ364-407</sub> and Rrp44<sub>(1-363)(408-985)</sub> partially complement growth in glucose, whereas Rrp44<sub>1-985</sub>, Rrp44<sub>R397A,R398A</sub>, and Rrp44<sub>P187A,Y188A</sub> fully complement growth in glucose, although overexpression of the latter inhibits growth in galactose.

Rrp44<sub>1-985</sub>, which lacks NLS3, but localizes to the nucleus, also complements growth. These results reinforce those presented above, that the Rrp44 mutants transported to the nucleus are functional. Confirming the results of protein localization, mutants Rrp44<sub>Δ364-407</sub> and Rrp44<sub>(1-363)(408-985)</sub> partially complement growth of *Δrrp44/GAL::RRP44* on glucose. Despite being transported to the nucleus, mutants with further deletions in Rrp44 sequence, resulted in nonfunctional proteins (Fig. 4). Interestingly, co-expression of GFP-Rrp44 at high levels (Gal) and functional Rrp44 mutants (-Met) led to slow growth, contrary to what was seen on glucose (Fig. 4). Addition of methionine to the medium alleviates this effect, increasing growth. These results suggest that high levels of Rrp44, combined with high levels of GFP-Rrp44, are deleterious to the cells. Mutant Rrp44<sub>364-1001</sub>, which showed dominant-negative effects, strongly inhibiting growth in all conditions, and displayed various localization phenotypes (Fig. 4 and data not shown), and mutant Rrp44<sub>Δ526-987</sub>, which was not detected by Western blotting, were therefore not further analyzed.

These growth complementation results are consistent with the analysis of pre-rRNA processing on glucose, when GFP-tagged Rrp44 variants are expressed in the absence of WT Rrp44. As a control, rRNA processing was analyzed in the presence of WT Rrp44 (galactose). In the absence of Rrp44, 7S rRNA accumulates, without accumulation of detectable 5.8S + 30 species. In the absence of Rrp6, 7S processing by Rrp44 leads to strong accumulation of 5.8S + 30 rRNA (detected with both probes P1 and P2). Point mutants Rrp44<sub>P187A,Y188A</sub> and Rrp44<sub>R397A,R398T</sub> fully complement the depletion of WT Rrp44, visualized by the efficient processing of 7S pre-rRNA and formation of mature 5.8S rRNA (Fig. 5 and Fig. S9). Expression of the mutants Rrp44<sub>1-218</sub> (PIN domain), Rrp44<sub>236-475</sub> (CSD1 + CSD2), or Rrp44<sub>1-475</sub> (PIN + CSD1 + CSD2) leads to processing defects, with accumulation of pre-rRNA 7S and consequent decreased levels of mature 5.8S rRNA. Interestingly, mutant Rrp44<sub>1-475</sub> accumulates at low level and intermediate very similar to 5.8S + 30, which is a characteristic of strains lacking Rrp6 (Fig. 5). Note that such rRNA species are better detected with

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

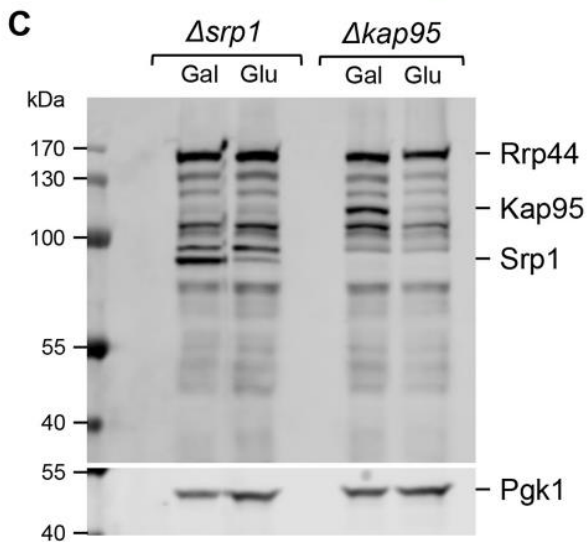
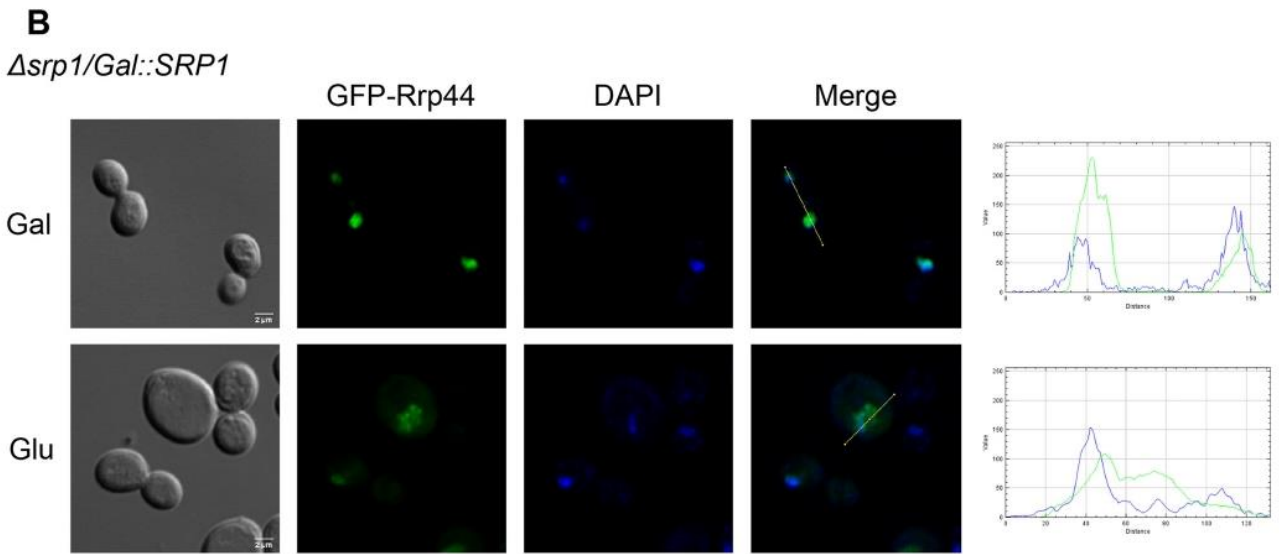
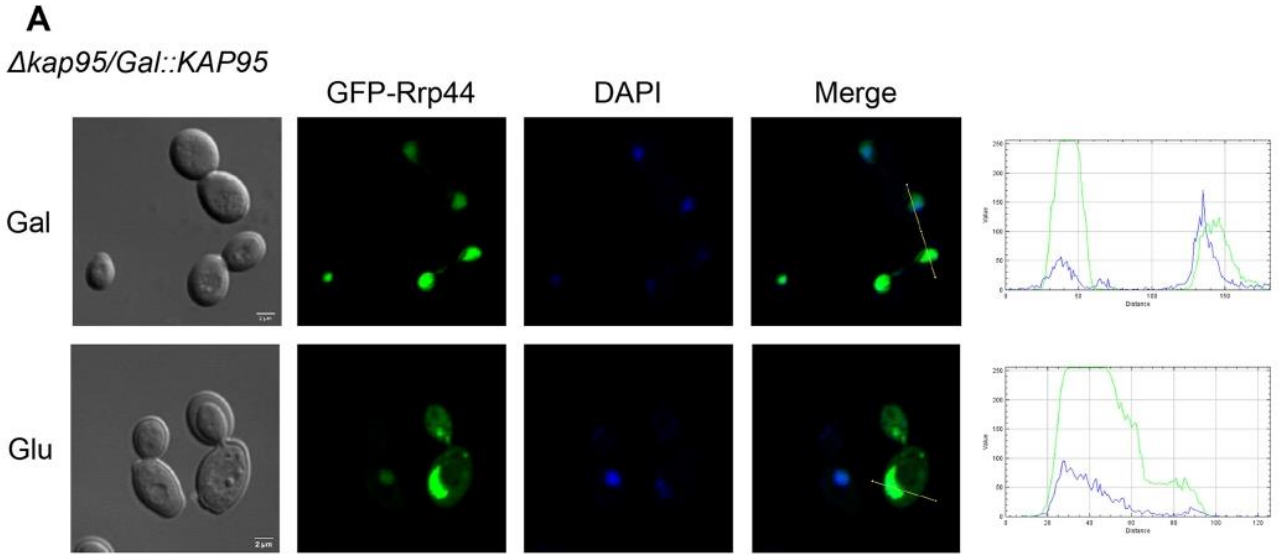


**Figure 5. Analysis pre-rRNA processing in Rrp44 mutants.** Northern hybridization of total RNA extracted from  $\Delta rrp44/GAL::RRP44/MET25::GFP^-$  strains growing either in galactose (+ WT Rrp44) or glucose (-WT Rrp44) medium, and separated by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gels. Precursor and mature rRNAs detected with the different probes are indicated on the right. 5S rRNA and scR1 were used as controls of RNAs not processed by the exosome. A representative of three independent experiments is shown. B, quantification of the bands detected by Northern hybridization. Signals of pre-rRNA 7S were corrected for scR1 signals and the plot shows the levels of 7S in the mutants relative to Rrp44 growing in glucose. C, schematic representation of the yeast  $^{35}S$  pre-rRNA indicating the hybridizing positions of the probes.

P2, which hybridizes to the ITS2 region. In addition to 5.8S + 30, mutants Rrp44 $\Delta_{364-407}$  and Rrp44 $_{(1-363)(408-985)}$  also accumulate intermediates longer than 5.8S + 30 (Fig. 5). Mutant

Rrp44 $_{475-1001}$  (RNB + S1 domains), on the other hand, shows lower levels of pre-rRNA 7S and mature 5.8S (Fig. 5). These results suggest that Rrp44 $_{475-1001}$  may not associate stably with

*Exosome is concentrated in the yeast nucleolus*





the exosome core, decreasing the efficiency of 7S processing, but may be free to degrade RNAs, leading to the decreased levels of both precursor and mature rRNAs. An overview of the phenotypes of the Rrp44 mutants relative to WT is shown in Fig. S5.

#### **Rrp44 is transported to the nucleus by karyopherins Kap95 and Srp1**

To better understand the nuclear import pathway of Rrp44 and identify the karyopherins involved in this process, GFP-Rrp44 was expressed in strains with mutated karyopherin genes, chosen based on the putative NLSs present in the Rrp44 sequence. Deletion mutants of the nonessential karyopherins Sxm1, Kap123, and Kap114 were transformed with a plasmid coding for GFP-Rrp44 and subcellular localization of this protein was analyzed by fluorescence and confocal microscopy. The results show that none of these karyopherins affects Rrp44 localization (Fig. S6 and data not shown). Lowering levels of Srp1 or Kap95 by incubating strains  $\Delta srp1/GAL::SRP1$  and  $\Delta kap95/GAL::KAP95$  on glucose medium, on the other hand, strongly affects GFP-Rrp44 localization, leading to partial mislocalization of this protein to the cytoplasm, despite still being concentrated in the nucleus (Fig. 6). These results indicate that Kap95 and Srp1 are the main karyopherins involved in nuclear import of Rrp44.

Because Srp1 and Kap95 affected Rrp44 localization, physical interaction between these proteins was analyzed by co-immunoprecipitation after expression of GFP-Rrp44 and protein A-tagged karyopherins in yeast. The results show that both A-Srp1 and A-Kap95 co-immunoprecipitate GFP-Rrp44 (Fig. 7A), confirming the interaction between these proteins and the involvement of Srp1 and Kap95 in the nuclear transport of Rrp44. Because the GFP tag alone was also detectable in the elution fractions, to exclude that interaction was due to GFP, an additional experiment was performed, in which extracts from yeast cells expressing GFP or GFP-Rrp44 were incubated with IgG-Sepharose without previous incubation with the karyopherins. After extensive washing, eluted proteins were analyzed by Western blotting, which shows that GFP binds unspecifically the resin with much higher affinity than GFP-Rrp44 (Fig. S4B), accounting for the background binding detected in the co-immunoprecipitation experiments (Fig. 7A). These results are in agreement with global protein interaction data that indicated protein complexes containing both Rrp44 and Srp1 (33, 34).

To determine whether Srp1 and Kap95 were capable of interacting directly with Rrp44 *in vitro*, protein pull-down assays were performed. Recombinant GST-Rrp44 was immobilized on GSH-Sepharose beads and then incubated with His-Kap95 or His-Srp1. Fractions were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting with antibodies against the His and GST tags. The results show the direct interaction between

#### **Exosome is concentrated in the yeast nucleolus**

GST-Rrp44 and His-Kap95 (Fig. 7B). Although His-Kap95 is also pulled down with GST, it binds GST-Rrp44 more efficiently, as indicated by the intensity of the bands detected in elution fractions. His-Srp1, however, was not detected in the elution (Fig. 7B, lower panel). These results suggest that Kap95 binds Rrp44 NLS, being responsible for its nuclear transport. Srp1 may indirectly interact with Rrp44, depending on  $\beta$ -importins such as Kap95 to recognize this cargo protein. Combined, the results shown here strongly indicate that Rrp44 is transported to the nucleus by a Kap95-dependent import pathway, either by itself, complexed with Srp1, or with another  $\beta$ -karyopherin.

#### **Nuclear transport of the exosome complex**

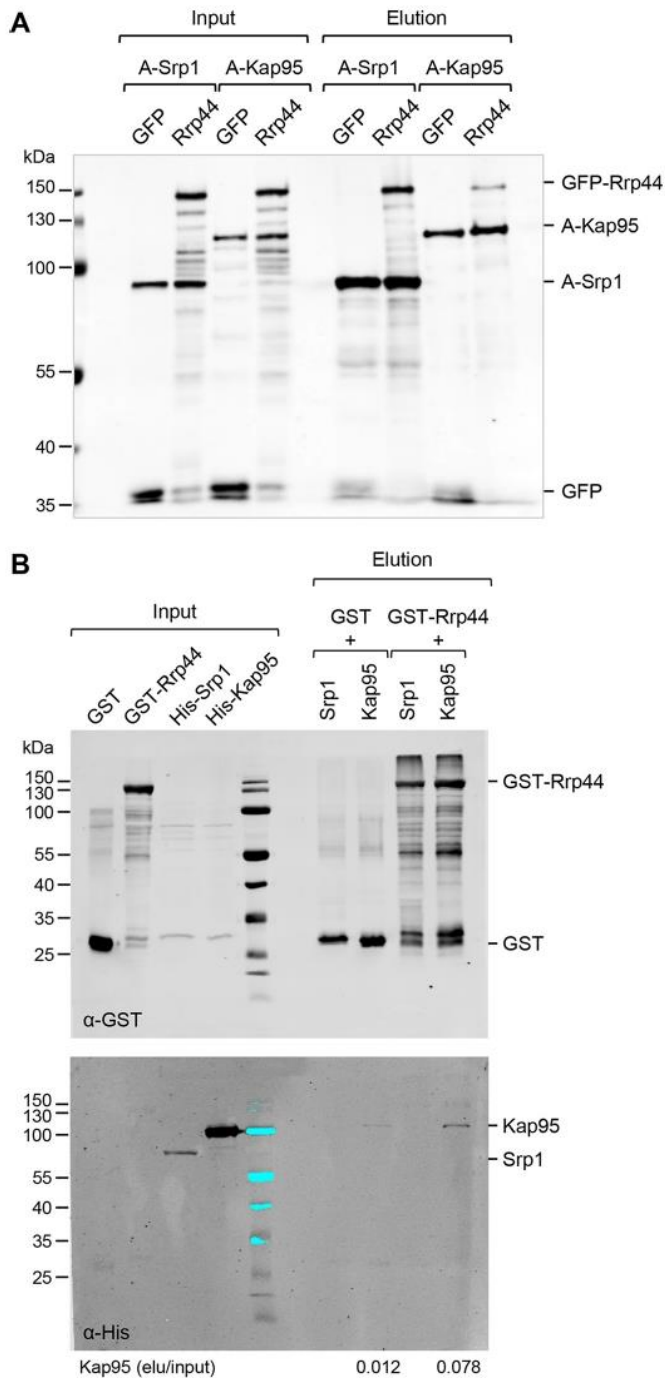
Although Rrp6 has been shown to have multiple NLS and transport pathways (12), it is generally not considered to be responsible for the nuclear import of other exosome subunits because it is not an essential yeast protein. The lack of effect of Rrp6 on nuclear transport of core exosome subunits was confirmed here upon analysis of subcellular localization of Rrp44, Rrp41, and Rrp43 in  $\Delta rrp6$  cells (Fig. S7). Upon identifying NLS in Rrp44, we analyzed whether this essential exosome subunit influences the nuclear import of other exosome subunits. The episomal GFP-fused exosome subunits Rrp6, Rrp41, and Rrp43 were expressed in  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$  either in the presence (Gal) or upon depletion of Rrp44 (Glu). Contrary to Rrp6 and Rrp44, Rrp41 and Rrp43, expressed under the strong *MET25* promoter, are present in both nucleus and cytoplasm. Depletion of Rrp44 does not significantly affect the localization of these exosome subunits (Fig. 8), suggesting independent nuclear transport pathways. The nonaffected GFP-Rrp6 localization in the absence of Rrp44 was expected given the already described nuclear import pathways of Rrp6 (12). Control experiments in WT cells confirm that when overexpressed using episomal genes under control of *MET25* promoter, Rrp41 and Rrp43 localize to the nucleus and cytoplasm (Fig. S8). Overexpressed Rrp44 and Rrp6, on the other hand, show nuclear localization (Fig. S8).

#### **Exosome subcellular localization**

Curiously, as shown here, Rrp44 is mainly nuclear, whereas the exosome RNase PH ring subunits Rrp41 and Rrp43 show a nuclear and cytoplasmic localization. To determine whether this phenotype is due to the overexpression of the exosome subunits coded in multicopy plasmid under control of the strong *MET25* promoter, chromosomal C terminally tagged GFP-fused exosome subunits genes, under control of their endogenous promoters, were constructed for Rrp44, Rrp6, Rrp41, and Rrp43. No growth defect was observed, showing that C terminally tagged proteins expressed at endogenous levels remain functional. Although the subunits of Exo10 are considered to be present both in nucleus and cytoplasm (9), the results shown

**Figure 6. Inhibition of karyopherins expression affects the subcellular localization of GFP-Rrp44.** A, laser scanning confocal microscope images show the subcellular localization of GFP-Rrp44 after inhibition of Kap95 expression in glucose medium in  $\Delta kap95/GAL::KAP95$  cells. GFP-Rrp44 relative to DAPI by using ImageJ is shown on the right. Green lines represent GFP and blue lines represent DAPI. B, analysis of the subcellular localization of GFP-Rrp44 after inhibition of Srp1 expression in glucose medium in  $\Delta srp1/GAL::SRP1$  cells. GFP-Rrp44 relative to DAPI is shown on the right. C, Western blotting showing the repressed expression of the karyopherins in glucose medium.

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus



**Figure 7. Interaction of Rrp44 with karyopherins.** A, GFP-Rrp44 co-immunoprecipitates with A-Srp1 and A-Kap95. Yeast strains expressing ProtA-Srp1 or ProtA-Kap95, and GFP or GFP-Rrp44 were used in co-immunoprecipitation experiments. ProtA-Kap95 and ProtA-Srp1 were immobilized on IgG-Sepharose beads, and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting with antibody against GFP. Input and elution fractions are shown. GFP-Rrp44 is co-immunoprecipitated with both karyopherins. B, GST-Rrp44 pulls down His-Kap95. *E. coli* expressed GST and GST-Rrp44 bound to GSH-Sepharose beads, and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting. Numbers below indicate the quantification of the Kap95 signal in the elution fractions relative to the input. The same membrane was incubated with antibodies against GST and His tags. Saturated marker signals appear as bluish bands at 800 nm (lower panel). The figure shown is representative of three independent experiments.

here demonstrate that core subunits Rrp41 and Rrp43, and the catalytically active subunits Rrp44 and Rrp6 are all concentrated in the nucleus (Fig. 9). These proteins expressed at endogenous levels are visible almost exclusively in the nucleus, and more strikingly, are concentrated in the nucleolus (Fig. 9). Importantly, analyses using confocal microscopy and quantification of the sum of fluorescent signal, followed by projection along the *z* axis of all acquired confocal images and calculation of enrichment of the exosome signal in each cellular compartment (see “Experimental procedures”), corroborates the nucleolar localization of the exosome. Exosome concentration in the nucleoplasm is 6 to 9 times higher than in the cytoplasm, whereas nucleolar exosome concentration is 10 to 20 times higher than in the cytoplasm (Fig. 9). Quantification of the signal of these exosome subunits in each of the subcellular compartments (nucleolus, nucleus and cytoplasm) relative to the total signal in the cells shows that 70–80% of the exosome signal is in the nucleus (Fig. S10).

Careful inspection of individual *z* sections of the acquired fluorescent images, however, shows that despite being concentrated in the nucleolus, exosome subunits localization is slightly different from that of RNA polymerase I (Rpa190), as if in a different subnucleolar compartment (Fig. 10). These results strongly suggest that in the nucleolus, nascent rRNAs are exposed to a high concentration of exosome in a “processing compartment” adjacent, but distinct from RNA polymerase I, for processing and quality control of pre-rRNAs.

## Discussion

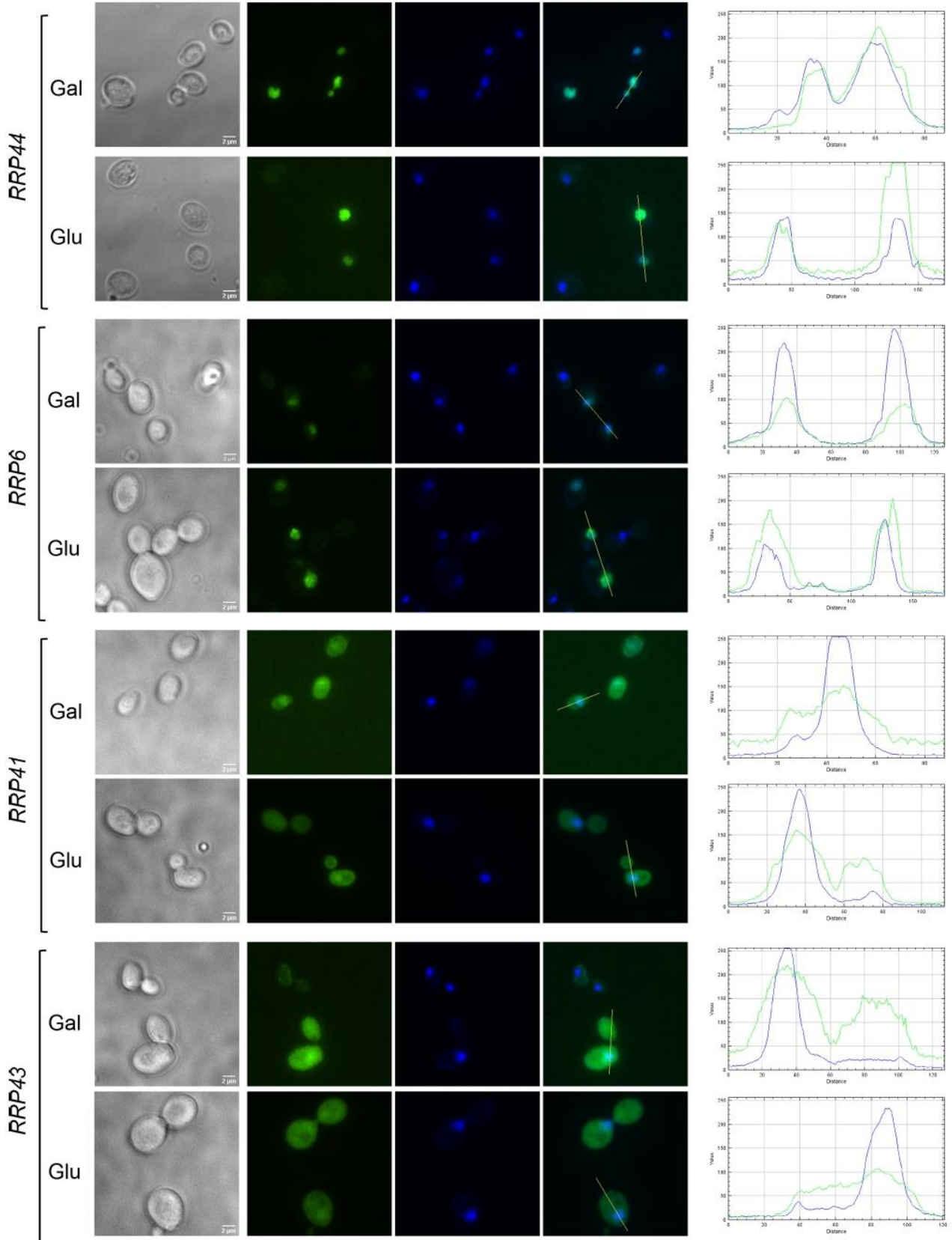
The RNA exosome was first identified in *S. cerevisiae* as an RNase involved in maturation and quality control of stable RNAs (8, 15). In the subsequent studies, it became clear that the exosome is a protein complex conserved throughout evolution, which is present in the nucleus and cytoplasm of eukaryotic cells, where it interacts with many cofactors and participates in different RNA processing and degradation pathways (3, 35, 36).

In yeast, Exo10, composed of the exosome core and Rrp44, is considered to be present both in nucleus and cytoplasm, participating in different reactions in each of these subcellular compartments (32). We have previously identified the nuclear import pathways of Rrp6 and shown that this nuclear exosome subunit has redundant mechanisms of transport to the nucleus, directly interacting with  $\alpha$ -importin Srp1 and  $\beta$ -importins Kap95 and Sxm1 (12). To better understand the mechanism of exosome assembly and transport to the nucleus, where this complex participates in the essential process of ribosome maturation, we investigated here the nuclear import pathway of the other catalytically active exosome subunit, Rrp44.

We identified three putative NLSs in the primary sequence of Rrp44 and constructed deletion and point mutants to determine the Rrp44 sequences mediating its transport to the nucleus. We show evidence that NLS1 is the most important sequence, but not the only NLS, for the nuclear import of Rrp44, which suggests that different karyopherins may bind Rrp44 for directing it to the nucleus. Depletion of Kap95 strongly affects the nuclear localization of Rrp44, and accordingly, NLS1

*Exosome is concentrated in the yeast nucleolus*

$\Delta rrp44/GAL::A\text{-}RRP44/GFP\text{-}$



Downloaded from <http://www.jbc.org/> by Carla Oliveira on August 18, 2020

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

contains the consensus sequence for Kap95 binding, a PY-NLS (37). However, point mutant Rrp44<sup>P187A,Y188A</sup> still localizes to the nucleus, suggesting that additional signals are recognized by Kap95. Although Srp1 also affects Rrp44 transport to the nucleus, a classical NLS was not found in the Rrp44 sequence, suggesting that Srp1 could recognize a nonconsensus NLS, or that the transport is mediated by the Kap95/Srp1 heterodimer upon recognition of the NLS by Kap95, or by an additional  $\beta$ -karyopherin.

Rrp44 has endo- and exonucleolytic activities (5, 38), and is involved in pre-rRNA processing in nucleus and nucleolus (8). The mutants that contain the exonuclease domain of Rrp44 and at least two of the putative NLSs, localize to the nucleus and complement growth of the  $\Delta$ rrp44/GAL::A-RRP44 strain. Analysis of pre-rRNA processing in the mutants show that the mutants that do not localize to the nucleus, or that do not contain the RNB domain, display a defective pre-rRNA processing phenotype, with accumulation of intermediates with sizes in the range between pre-rRNAs 7S and 5.8S + 30. Importantly, these intermediates are not substrates for Rrp6, which process the product of the Rrp44 reaction, 5.8S + 30 (7). The intermediates accumulating in the presence of nonfunctional Rrp44 mutants have longer extensions at the 3' end than 5.8S + 30, and have also been observed in mutants of core exosome subunits (8). Interestingly, mutant Rrp44<sup>475-1001</sup> (containing RNB + S1 domains, but lacking PIN and CSD domains) shows decreased levels of both precursor and mature rRNAs. These results are in agreement with Rrp44 structural data showing that PIN and CSD domains are responsible for the stable interaction between Rrp44 and the RNase PH ring of the exosome (39). Rrp44 lacking these domains may not associate stably with the exosome, decreasing the efficient processing of 7S, but instead, may be free and more active to degrade RNAs (40, 41).

As shown here, depletion of Rrp44 does not affect nuclear localization of Rrp6, as expected, given that Rrp6 has its own NLSs (12), and does not directly interact with Rrp44 (39, 41). Interestingly, depletion of Rrp44 does not affect localization of episomal core exosome subunits either, suggesting a different mechanism of transport for the remaining subunits of this complex.

The most striking results coming from the analyses described here are the very low concentration in the cytoplasm of all the exosome subunits analyzed. Exosome is not only concentrated in the nucleus, but specifically in the nucleolus. This information is relevant in light of the function of the yeast exosome. In the cytoplasm, the exosome participates in the minor pathway of mRNA decay, degrading 3'-5' deadenylated mRNAs (42–44). The major pathway of cytoplasmic mRNA degradation in yeast does not involve the exosome, and starts with deadenylation of mRNAs by the Ccr4-Not complex (42, 45, 46), followed by decapping by Dcp1 (47, 48) and 5'-3' degradation by Xrn1 (49, 50). Pre-rRNA processing and surveillance, on the other hand, starts in the nucleolus and continues to the nucleoplasm, as the

pre-ribosomal particles are concomitantly transported toward the cytoplasm (51).

As soon as 5'-ETS is released after co-transcriptional cleavage of pre-rRNA at sites A<sub>0</sub>-A<sub>1</sub>, the exosome can degrade it in the nucleolus, after being recruited there by SSU processome factors (51–54). The results shown here reinforces the importance of the exosome for pre-rRNA processing and quality control, by showing that the exosome is mainly concentrated in the nucleolus. The concentration of the exosome in the nucleolus also corroborate recent data showing the interaction of exosome subunits with pre-ribosomal particles 90S, pre-40S, and pre-60S, interactions that were stabilized by the inhibition of pre-rRNA processing by the depletion of pre-60S factor Nop53 (55).

As we also show here, the nucleolar concentration of the exosome subunits can only be appreciated when the GFP-fused proteins are expressed at endogenous levels. Overexpression of these proteins in plasmid-based systems lead to the visualization of weak signals in the cytoplasm and very strong nuclear signals, overshadowing the nucleolus.

Not only were the exosome subunits concentrated in the nucleolus, but careful high-resolution analysis of protein localization showed that when compared to RNA polymerase I subunit Rpa190 on individual z sections of spinning disk confocal microscopy, the exosome subunits do not exactly overlap Rpa190, suggesting a slightly different localization. Interestingly, recent data on mammalian cells show that the box C/D snoRNP subunit fibrillarin, which is also part of the SSU processome, does not exactly colocalize with RPA194, but rather shows a phase separation between rRNA transcription and processing (56). Our results could suggest that transcribed rRNA is co-transcriptionally processed in an associated compartment containing the exosome.

In summary, here we show that the exosome catalytic subunit Rrp44 is transported to the nucleus independently of other subunits. Importantly, we show that the yeast exosome is concentrated in the nucleolus, in a subcompartment flanking but different from RNA polymerase I, placing the exosome in the early phases of pre-rRNA processing.

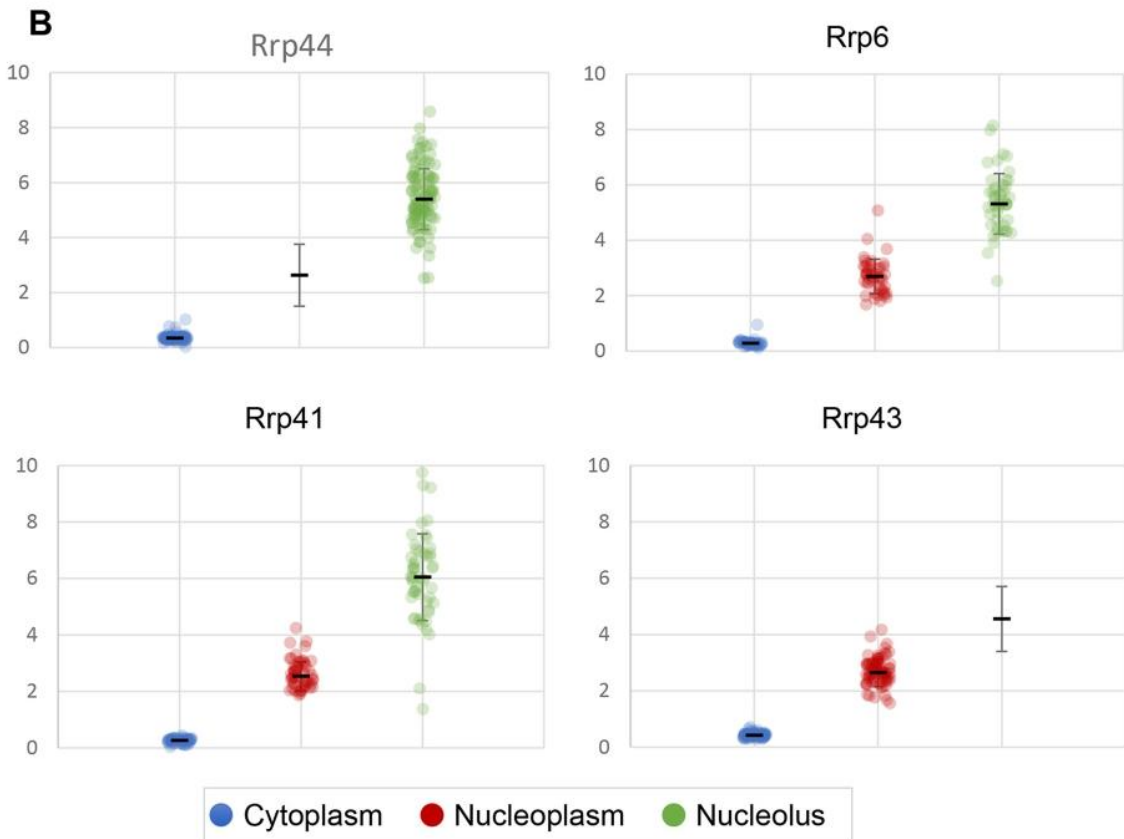
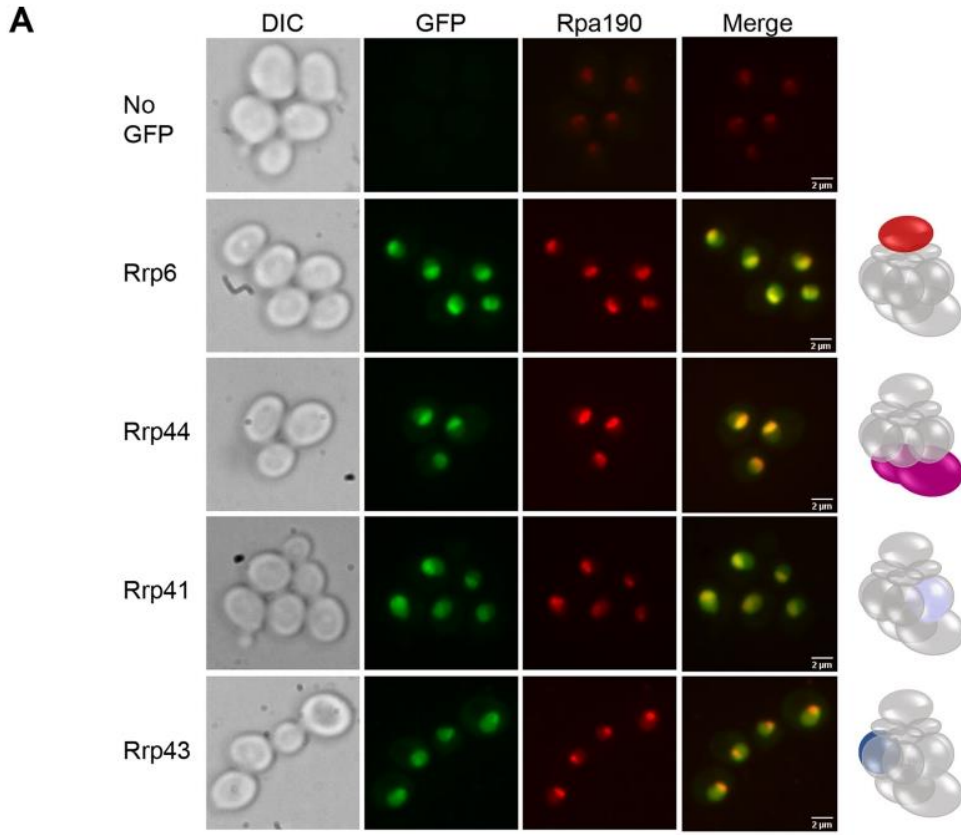
## Experimental procedures

### Construction of strains and yeast growth condition

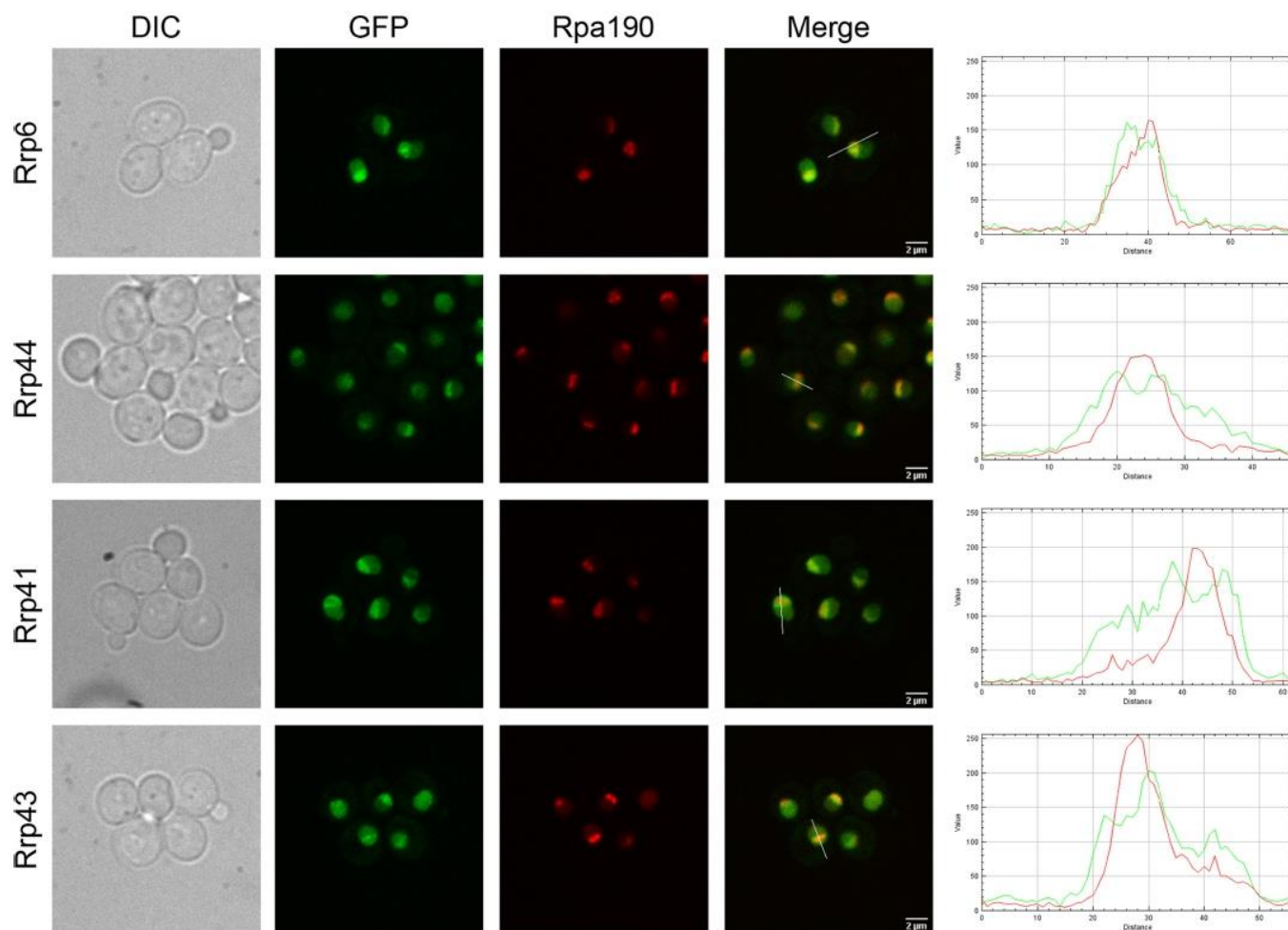
Yeast maintenance and growth was performed in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose), or YNB medium (0.67% yeast nitrogen base, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 2% glucose or galactose) supplemented with the required amino acids. Plasmids constructed in this study, described in Table 1, were built according to standard cloning techniques and sequenced by the Big Dye method (PerkinElmer Life Sciences). Plasmids expressing the GFP fusions in yeast were constructed by inserting DNA fragments into pUG34 plasmid (57) using oligonucleotides with specific restriction sites

**Figure 8. Depletion of Rrp44 does not affect subcellular localization of core exosome subunits Rrp41 and Rrp43.**  $\Delta$ rrp44/GAL::RRP44 was transformed with plasmids expressing GFP-fused exosome subunits Rrp44, Rrp6, Rrp41, and Rrp43 and incubated in media containing either galactose (Rrp44 expression) or glucose (Rrp44 repression). All four exosome subunits are concentrated in the nucleus, although Rrp41 and Rrp43 are also visible in the cytoplasm. Images were acquired and edited separately. GFP-fused proteins relative to DAPI by using ImageJ is shown on the right. Green lines represent GFP and blue lines represent DAPI.

*Exosome is concentrated in the yeast nucleolus*



### Exosome is concentrated in the yeast nucleolus



**Figure 10. Exosome subunits do not co-localize exactly with nucleolar RNA polymerase I subunit Rpa190.** GFP-tagged images obtained by Z section of spinning disk confocal microscope shows that exosome subunits have slightly different localization from Rpa190-mCherry, used as nucleolar marker. Note that single Z step images are different from Z-projected images, which shows the sum of all detected signal of cells.

(sequences available upon request). Expression of these GFP fusions was regulated by *MET25* promoter. Rrp44 point mutations were obtained by site-directed mutagenesis (Stratagene or In-Fusion-Takara) using plasmid pUG34-RRP44 as template and oligonucleotides containing the respective mutations. Plasmid pRS305-NUP57-tDimerRFP (58) was constructed as follows. NUP57 was amplified as two overlapping PCR fragments (primer pairs 1568/1570 and 1569/1571-matrix strain BY4741). The two PCR fragments were mixed and used as matrix with primers 1568/1571 to amplify full-length NUP57 with an internal BglII site. The NUP57-containing fragment was cloned in pRS305-NUP2-tDimerRFP (59) as a NotI-BamHI fragment. To construct a Nup57 t-dimer genomic-tagged strain, plasmid pRS305-Nup57-tDimer was linearized with BglII and inserted by homologous recombination in a BY4742 strain. It was selected for leucine prototrophy,

and checked by fluorescence microscopy. Plasmid pFA6-mCherry-KIURA3 was constructed by cloning into pFA6-GST-KIURA3 PacI-AscI mCherry a fragment from pFA6-mCherry-HIS3.

Haploid strain  $\Delta rrp44/YCplac33-GAL::A-RRP44$  was obtained after sporulation of the diploid strain  $RRP44/\Delta rrp44$  previously transformed with plasmid  $YCplac33-GAL::A-RRP44$  (Table 2). Strains bearing genomic insertion of GFP or mCherry were constructed by amplifying a PCR cassette containing the *URA3* gene from *Kluyveromyces lactis* as a selectable marker and GFP tag or mCherry tag sequence from plasmids pFA6-GFP(S65T)-KIURA3 or pFA6-mCherry-KIURA3, respectively. The PCR fragment was inserted by homologous recombination downstream from each protein gene bearing a TAP-tag (60) using the Swap-tag method (61). Transformants were selected for uracil prototrophy and checked by PCR of the targeted

**Figure 9. Endogenously expressed GFP-fused exosome subunits localize to the nucleolus.** A, Z-projection of high resolution spinning-disk laser scanning confocal microscope images show the subcellular localization of GFP-tagged exosome subunits. Rpa190-mCherry was used as nucleolar marker. B, exosome subunits enrichment in different cell compartments. We calculated the enrichment of the GFP-tagged exosome subunits signals in each compartment over an homogeneous distribution of the cellular signal. For that, we calculated the mean intensity of each compartment and divided this value by the computed mean intensity (total cell signal/total cell surface). Blue dots represent cytoplasm enrichment, red dots represent nucleoplasm, and green dots represent nucleolus.

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

**Table 1**  
Plasmids

Name	Characteristics/markers	Reference
pFA6-mCherry-HIS3	Used for cloning pFA6-mCherry-KIURA3	67
pFA6-GST-KIURA3	Used for cloning pFA6-mCherry-KIURA3	61
pFA6-GFP(S65T)-KIURA3	URA3, integrative, C-term GFP	61
pRS305-Nup2-tDimer	LEU2, integrative, Nup57-RFP	59
pRS305-Nup57-tDimer	LEU2, integrative, Nup57-RFP	58
pFA6-mCherry-KIURA3	URA3, integrative, C-term mCherry	This work
pUN-GFP-Nop1	LEU2, CEN/ARS, GFP-NOP1	68
pUN100-mCherry-Nop1	LEU2, CEN/ARS, mCherry-NOP1	69
pUG34	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3	57
pUG34-Rrp6	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-RRP6	12
pUG34-Rrp41	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-RRP41	This work
pUG34-Rrp43	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-RRP43	This work
pUG34-Rrp44	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-RRP44	This work
pUG34-rrp44(1-985)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(1-985)	This work
pUG34-rrp44(1-475)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(1-475)	This work
pUG34-rrp44Δ(364-407)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44Δ(364-407)	This work
pUG34(1-363)(408-895)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(1-363)(408-895)	This work
pUG34-rrp44(1-218)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(1-218)	This work
pUG34-rrp44(263-475)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(263-475)	This work
pUG34-rrp44(475-1001)	HIS3, ARS/CEN/ PMET25::yEGFP3-rrp44(475-1001)	This work
pUG34-rrp44(R397A,R398T)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(R397A,R398T)	This work
pUG34-rrp44(P187A,Y188A)	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3-rrp44(P187A,Y188A)	This work
YCplac33-GAL-A-RRP44	URA3,ARS/CEN/ PGAL1::ProtA-RRP44	This work
pGEX4T1	GST, AmpR	GE Healthcare
pET28-KAP95	His::KAP95, KanR	12
pET29-SRP1	His::SRP1, KanR	12
pGEX-RRP44	GST::RRP44, AmpR	Bagatelli and Oliveira, unpublished data
pGEMT-easy	lacZ	Promega

**Table 2**  
Yeast strains

Name	Genotype	Reference
RRP41-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	60
RRP6-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	60
RRP43-TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	60
RPA190-mCherry (OGT8-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPA190-mCherry-URA3(KI)</i>	This work
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4742-Nup57 tDimer (yEO4-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 NUP57-tDimer-LEU2</i>	This work
Rrp6-GFP (yEO9-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp6 GFP-URA3</i>	This work
Rrp6-mCherry (yOE10-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp6 mCherry-URA3</i>	This work
Rrp41-GFP (yOE11-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp41 GFP-URA3</i>	This work
Rrp41-mCherry (yOE12-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp41 mCherry-URA3</i>	This work
Rrp43-GFP (yOE13-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp43 GFP-URA3</i>	This work
Rrp43-mCherry (yOE14-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp43 mCherry-URA3</i>	This work
Rrp44-GFP (yOE15-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp44 GFP-URA3</i>	This work
Rrp44-mCherry (yOE16-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp44 mCherry-URA3</i>	This work
Rrp6-GFP-RPA190mCherry (yOE17-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp6 GFP-URA3 RPA190mCherry-HIS3</i>	This work
Rrp41-GFP RPA190mCherry (yOE18-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp41 GFP-URA3 RPA190mCherry-HIS4</i>	This work
Rrp43-GFP RPA190mCherry (yOE19-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp43 GFP-URA3 RPA190mCherry-HIS5</i>	This work
Rrp44-GFP RPA190mCherry (yOE20-1a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Rrp44 GFP-URA3 RPA190mCherry-HIS6</i>	This work
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
Δsrp1 (FGY-41)	<i>YNL189w::kanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; Ycplac33-GAL-A-SRP1</i>	12
ΔΔap95 (FGY-53)	<i>YLR347c::kanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; Ycplac33-GAL-A-KAP95</i>	12
Δrrp6 (FGY-88)	<i>BY4742; Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YOR001w::kanMX4</i>	EUROSCARF
Δrrp44 (2n) (FGY-62)	<i>BY4743; MATa/MATα; ura3Δ0/ura3Δ0; leu2Δ0/leu2Δ0; his3Δ1/his3Δ1; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; YOL021c/YOL021c::kanMX4</i>	EUROSCARF
Δrrp44/YCplac33-GAL::A-RRP44 (FGY-90)	<i>ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; YOL021c::kanMX5 YCplac33-GAL-A-RRP44</i>	This work
BY4742 (FGY-76)	<i>Mato; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
Δxmi1 (FGY-86)	<i>BY4742; Mata; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YDR395w::kanMX4</i>	EUROSCARF
Δkap114 (FGY-60)	<i>BY4742; Mata; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YGL241w::kanMX4</i>	EUROSCARF
Δkap123 (FGY-61)	<i>BY4742; Mata; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YER110C::kanMX4</i>	EUROSCARF

genomic loci, and analyzed by fluorescence microscopy. BY4742 strains bearing Rrp44 fused to GFP or mCherry were constructed as described (62). Similarly, Rpa190 fused to mCherry was constructed as described (62).

RPA190 was also genomic tagged with mCherry in exosome GFP-tagged strains and BY4742 strain. The same strategy was used by first amplifying the plasmid pFA6-mCherry-HIS3, then

inserting it in the genome by homologous recombination and selecting for histidine prototrophy.

**Nuclear localization signal identification**

The software packages PSORT II Prediction (RRID:SCR\_018772), cNLS Mapper (70), and NLStradamus (63) were used

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

to predict the presence of NLSs in the amino acidic sequence of Rrp44.

### Fluorescence microscopy on fixed cells

For protein depletion based on *GALI* promoter, cells were inoculated either in selective galactose or glucose medium and incubated for 14 to 16 h to exponential phase. For microscopy analysis, cells were fixed in 70% methanol for 15 min, rinsed with cold PBS, and then treated with 1 mg/ml of RNase for 30 min. Cells were observed using a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with filters for green fluorescence (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) and red fluorescence (Texas Red BrightLine set, TXRED4040-B, Semrock). The exposure times varied from 1 to 3 s. Images were processed and analyzed using the programs Nis Elements (version 3.07; Nikon) and ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Confocal images were captured in a 1024 × 1024-pixel format using a Zeiss LSM 780 confocal laser-scanning inverted microscope (Carl Zeiss, Germany) at the Research Facility Center (CEFAP-USP). Image stacks comprised eight images captured with a  $\alpha$ Plan-Apochromat ×100/1.46 oil differential interference contrast M27 objective (Carl Zeiss), applying a zoom factor of 1.5. Step intervals along the *z* axis ranged from 200 to 250 nm. Image processing was performed using Zen 2011 software (version 11.00.190; Carl Zeiss).

### Fluorescence microscopy on living cells

Exponentially growing yeast were collected, resuspended in synthetic complete medium (DIFCO), and observed in the fluorescence microscope. Confocal microscopy was performed using a Nipkow-disk confocal system (Revolution; Andor) installed on an Olympus microscope (IX-81), featuring a confocal spinning disk unit (CSU22; Yokogawa) and a cooled electron multiplying charge-coupled device camera (DU 888; Andor). The system was controlled using IQ 2 software (Andor). Images were acquired using a ×100 Plan Apo 1.4 NA oil immersion objective and a 2-fold lens in the optical path. Single laser lines used for excitation were diode-pumped solid-state lasers exciting GFP fluorescence at 488 nm (50 milliwatt; Coherent) and mCherry fluorescence at 561 nm (50 milliwatt; Cobolt jive), and a Dichroic mirror Di01-T405/488/568/647-13x15x0,5 was used; Semrock was used and a bi-bandpass emission filter (FF01-512/630-25; Semrock) allowed collection of the green and red fluorescence. In our conditions, pixel size was 65 nm. For quantification of nucleolar volume, *z* stacks of 40 images with a 200-nm *z* step were used. Exposure times varied from 0.1 to 1 s. Digital pictures were processed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (RRID:SCR\_003070).

### Image analysis and quantification

Confocal images were imported into ImageJ, signal intensities of GFP-tagged proteins were measured and their subnuclear localizations were analyzed using a dedicated image analysis pipeline (ImageJ Macro). Cell area was determined based on transmission light thanks to the following steps: background removal (subtracting Gaussian Blur image –  $\sigma = 40$ ); segmentation of the cells with Moments threshold algorithm; determina-

tion of the objects corresponding to the cells with Analyze Particle (ImageJ function); and separation of the cells in contact with Adjustable Watershed Plugin. Nucleolar and nuclear segmentation was achieved using the largest RNA polymerase I subunit Rpa190 tagged with mCherry, strongly enriched in the nucleolus, and detectable in the nucleoplasm. First, we applied a Sum Z-Projection to the initial mCherry Image. Then, to determine the nucleolus area in each cell, we used a Wavelet filter and finally segmented with a Yen threshold algorithm. To determine the nucleus area, we directly segmented on the *Z*-projected image a Triangle threshold algorithm. Cells were then divided in the nucleolus, nucleoplasm, and cytoplasm. ImageJ macro was used to quantify the GFP signal in each compartment. All quantifications were performed relative to background fluorescence, measured using control cells with Rpa190 tagged with mCherry, but with no GFP expression.

To quantify exosome signal enrichment in each compartment, the mean signal of the entire cell was calculated: ((intensity of gray level in the cell – background)/cell surface area). The mean cellular signal was used as a proxy to a homogeneous concentration in the entire cell. Each compartment mean signal measure was then divided by the mean cellular signal in each cell. The concentration ratio shows the enrichment of exosome signal per compartment, all relative to the mean signal of the entire cell.

### Protein pulldown

Cellular extracts (generated in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.8% Nonidet, 1 mM DTT) of *Escherichia coli* cells expressing either GST or GST-Rrp44 were incubated for 2 h at 4 °C with 60  $\mu$ l of GSH-Sepharose beads (GE Healthcare), the unbound material was collected and the beads washed with the same buffer. Beads were then incubated with cellular extracts containing His-Srp1 or His-Kap95, flow-through was collected, and beads were washed with the same buffer. Bound proteins were eluted with 50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM reduced GSH.

### Co-immunoprecipitation

Interaction of karyopherins Srp1 and kap95 with Rrp44 was tested by co-immunoprecipitation using strains  $\Delta$ kap95/*GAL::A-KAP95* and  $\Delta$ srp1/*GAL::A-SRP1* transformed with pUG34 or pUG34-Rrp44. For each strain, 2 liters of cells were grown to an OD600 ~1.0, and collected in co-IP buffer (0.1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5× Halt Protease Inhibitor mixture (Thermo Scientific) (modified from Ref. 64). Total yeast extracts were obtained with a Ball Mill device (Retsch, Mixer Mill MM 200 or Mixer Mill PM 100), and cleared by centrifugation at 40,000 rpm for 1 h at 4 °C. Supernatant was then incubated for 2 h at 4 °C with IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) previously equilibrated with co-IP buffer. The resin was washed four times with 500  $\mu$ l of co-IP buffer (twice with 150 mM NaCl and twice with 250 mM NaCl), followed by a further wash with 100 mM ammonia acetate, 0.1 M magnesium chloride. Elution of the specific karyopherin was performed by incubation with 500 mM ammonium hydroxide for 20 min (65).



## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

### Immunoblotting experiments

Protein samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were incubated with primary antibodies against GST (Sigma-Aldrich), His tag (Sigma-Aldrich), GFP (Sigma-Aldrich), or Pgk1 (Abcam) in PBS (PBS)/Tween 20/nonfat milk. Secondary antibodies used were anti-rabbit (IRDye 680RD) or anti-mouse IgG (IRDye 800CW) conjugated to fluorophore (Licor). Western blots were developed using Odyssey<sup>®</sup> Imaging Systems.

### Northern hybridization

Total RNA was isolated from yeast cells by a modified hot phenol method (66). The RNA extract was quantified and 6  $\mu$ g of denatured total RNA was loaded on gel. RNAs were separated by electrophoresis on 7% denaturing polyacrylamide gel, and transferred to Hybond nylon membrane (GE Healthcare). Hybridization was performed using biotin-labeled or fluorescent probes specific to rRNAs. 5S rRNA and scR1 were used as controls. Quantification of bands from Northern hybridizations was performed with ImageJ software.

### Data availability

All data are contained within the manuscript.

**Acknowledgments**—We are grateful to all members of the Oliveira laboratory for help, reagents, and discussion, especially L. P. P. Cepeda. We thank Frederico Gueiros Filho and members of his laboratory for the use of the fluorescence microscope. We also thank Mario Costa Cruz from CEFAP-USP for help with confocal microscopy and discussion. We are very grateful to Sylvain Cantaloube from the LITC imaging platform of Toulouse TRI and Image processing platform for his assistance and development of the image analysis pipeline. We acknowledge members of the Gadal's lab for help, advice and discussion, especially Isabelle Leger-Silvestre, Christophe Dez, and Lise Dauban.

**Author contributions**—E. K. O., F. A. G.-Z., and C. C. O. conceptualization; E. K. O. and O. G. resources; E. K. O., F. A. G.-Z., O. G., and C. C. O. formal analysis; E. K. O. and F. A. G.-Z. validation; E. K. O. investigation; E. K. O., F. A. G.-Z., O. G., and C. C. O. writing-original draft; O. G. software; O. G. and C. C. O. funding acquisition; C. C. O. supervision.

**Funding and additional information**—This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant- 15/06477-9 (to C. C. O.), and the Centre de Biologie Integrative, Toulouse (to O. G.). E. K. O. was supported by CNPq and FAPESP Fellowship Master's 17/17777-9, Research Internships Abroad Grant 18/19451-6, and the Centre National de la Recherche Scientifique). F. A. G.-Z. was supported by FAPESP postdoctoral fellowship 12/50196-6.

**Conflict of interest**—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Abbreviations**—The abbreviations used are: snoRNA, small nucleolar RNA; NLS, nuclear localization signal; DIC, differential interfer-

ence contrast; IP, immunoprecipitation; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

### References

- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T. H., and Dziembowski, A. (2013) RNA decay machines: the exosome. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 552–560 CrossRef Medline
- Schneider, C., and Tollervey, D. (2013) Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 485–493 CrossRef Medline
- Januszyn, K., and Lima, C. D. (2014) The eukaryotic RNA exosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 132–140 CrossRef Medline
- Liu, Q., Greimann, J. C., and Lima, C. D. (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**, 1223–1237 CrossRef Medline
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Séraphin, B. (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 15–22 CrossRef Medline
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**, 993–996 CrossRef Medline
- Briggs, M. W., Burkard, K. T., and Butler, J. S. (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 13255–13263 CrossRef Medline
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**, 5399–5410 CrossRef Medline
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'  $\rightarrow$  5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**, 2148–2158 CrossRef Medline
- Burkard, K. T., and Butler, J. S. (2000) A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Mol. Cell Biol.* **20**, 604–616 CrossRef Medline
- Jin, R., Dobry, C. J., McCown, P. J., and Kumar, A. (2008) Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol. Biol. Cell* **19**, 284–296 CrossRef Medline
- Gonzales-Zubiate, F. A., Okuda, E. K., Da Cunha, J. P. C., and Oliveira, C. C. (2017) Identification of karyopherins involved in the nuclear import of RNA exosome subunit Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **292**, 12267–12284 CrossRef Medline
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002) Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 313–318 CrossRef Medline
- Kressler, D., Linder, P., and de La Cruz, J. (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7897–7912 CrossRef Medline
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' $\rightarrow$ 5' exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466 CrossRef Medline
- Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S., and Ye, K. (2016) Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes Dev.* **30**, 718–732 CrossRef Medline
- Gasse, L., Flemming, D., and Hurt, E. (2015) Coordinated ribosomal ITS2 RNA processing by the Las1 complex integrating endonuclease, polynucleotide kinase, and exonuclease activities. *Mol. Cell* **60**, 808–815 CrossRef Medline
- Konikkat, S., and Woolford, J. L., Jr. (2017) Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem. J.* **474**, 195–214 CrossRef Medline
- Fromm, L., Falk, S., Flemming, D., Schuller, J. M., Thoms, M., Conti, E., and Hurt, E. (2017) Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome. *Nat. Commun.* **8**, 1787 CrossRef Medline
- Dez, C., Houseley, J., and Tollervey, D. (2006) Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **25**, 1534–1546 CrossRef Medline

## Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

21. Choque, E., Schneider, C., Gadal, O., and Dez, C. (2018) Turnover of aberrant pre-40S pre-ribosomal particles is initiated by a novel endonucleolytic decay pathway. *Nucleic Acids Res.* **46**, 4699–4714 CrossRef Medline
22. Darrière, T., Pils, M., Sarthou, M. K., Chauvier, A., Genty, T., Audibert, S., Dez, C., Léger-Silvestre, I., Normand, C., Henras, A. K., Kwapisz, M., Calvo, O., Fernández-Tornero, C., Tschochner, H., and Gadal, O. (2019) Genetic analyses led to the discovery of a super-active mutant of the RNA polymerase I. *PLoS Genet.* **15**, e1008157 CrossRef Medline
23. Rodríguez-Galán, O., García-Gómez, J. J., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2015) Immature large ribosomal subunits containing the 7S pre-rRNA can engage in translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.* **12**, 838–846 CrossRef Medline
24. Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O’Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 CrossRef Medline
25. Zanchin, N. L., and Goldfarb, D. S. (1999) Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1518–1525 CrossRef Medline
26. Süel, K. E., Gu, H., and Chook, Y. M. (2008) Modular organization and combinatorial energetics of proline-tyrosine nuclear localization signals. *PLoS Biol.* **6**, e137 CrossRef Medline
27. Lee, C., Hodgins, D. C., Calvert, J. G., Welch, S. K., Jolie, R., and Yoo, D. (2006) The nuclear localization signal of the PRRS virus nucleocapsid protein viral replication *in vitro* and antibody response *in vivo*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 145–148 CrossRef Medline
28. Süel, K. E., and Chook, Y. M. (2009) Kap104p imports the PY-NLS-containing transcription factor Tfg2p into the nucleus. *J. Biol. Chem.* **284**, 15416–15424 CrossRef Medline
29. Fries, T., Betz, C., Sohn, K., Caesar, S., Schlenstedt, G., and Bailer, S. M. (2007) A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins. *J. Biol. Chem.* **282**, 19292–19301 CrossRef Medline
30. Graham, A. C., Davis, S. M., and Andrusis, E. D. (2009) Interdependent nucleocytoplasmic trafficking and interactions of Dis3 with Rrp6, the core exosome and importin- $\alpha$ 3. *Traffic* **10**, 499–513 CrossRef Medline
31. Mamolen, M., Smith, A., and Andrusis, E. D. (2010) *Drosophila melanogaster* Dis3 N-terminal domains are required for ribonuclease activities, nuclear localization and exosome interactions. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5507–5517 CrossRef Medline
32. Houseley, J., LaCava, J., and Tollervy, D. (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 529–539 CrossRef Medline
33. Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., et al. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180–183 CrossRef Medline
34. Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J. M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., et al. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637–643 CrossRef Medline
35. Aloy, P., Ciccarelli, F. D., Leutwein, C., Gavin, A. C., Superti-Furga, G., Bork, P., Bottcher, B., and Russell, R. B. (2002) A complex prediction: three-dimensional model of the yeast exosome. *EMBO Rep.* **3**, 628–635 CrossRef Medline
36. Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016) The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 227–239 CrossRef Medline
37. Tran, E. J., King, M. C., and Corbett, A. H. (2014) Macromolecular transport between the nucleus and the cytoplasm: advances in mechanism and emerging links to disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2784–2795 CrossRef Medline
38. Drazkowska, K., Tomecki, R., Stodus, K., Kowalska, K., Czarnocki-Cieciura, M., and Dziembowski, A. (2013) The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3845–3858 CrossRef Medline
39. Makino, D. L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **524**, 54–58 CrossRef Medline
40. Wang, H. W., Wang, J., Ding, F., Callahan, K., Bratkowski, M. A., Butler, J. S., Nogales, E., and Ke, A. (2007) Architecture of the yeast Rrp44 exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3’ end processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16844–16849 CrossRef Medline
41. Zinder, J. C., Wasmuth, E. V., and Lima, C. D. (2016) Nuclear RNA exosome at 3.1 Å reveals substrate specificities, RNA paths, and allosteric inhibition of Rrp44/Dis3. *Mol. Cell* **64**, 734–745 CrossRef Medline
42. Das, B., Butler, J. S., and Sherman, F. (2003) Degradation of normal mRNA in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5502–5515 CrossRef Medline
43. Oliveira, C. C., Gonzales, F. A., and Zanchin, N. I. (2002) Temperature-sensitive mutants of the exosome subunit Rrp43p show a deficiency in mRNA degradation and no longer interact with the exosome. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4186–4198 CrossRef Medline
44. Zhang, E., Khanna, V., Dacheux, E., Namane, A., Doyen, A., Gomard, M., Turcotte, B., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2019) A specialised SKI complex assists the cytoplasmic RNA exosome in the absence of direct association with ribosomes. *EMBO J.* **38**, e100640 CrossRef Medline
45. Collart, M. A. (2003) Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene* **313**, 1–16 CrossRef Medline
46. Azzouz, N., Panasencko, O. O., Colau, G., and Collart, M. A. (2009) The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome. *PLoS ONE* **4**, e6760 CrossRef Medline
47. Beelman, C. A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T. E., Hatfield, L., Fortner, D. M., and Parker, R. (1996) An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **382**, 642–646 CrossRef Medline
48. Boeck, R., Lapeyre, B., Brown, C. E., and Sachs, A. B. (1998) Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast *spb8-2* mutant. *Mol. Cell Biol.* **18**, 5062–5072 CrossRef Medline
49. Hsu, C. L., and Stevens, A. (1993) Yeast cells lacking 5’–3’ exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5’ cap structure. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4826–4835 CrossRef Medline
50. Rajmakers, R., Schilders, G., and Pruijn, G. J. (2004) The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 175–183 CrossRef Medline
51. Klinge, S., and Woolford, J. L., Jr. (2019) Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 116–131 CrossRef Medline
52. Kornprobst, M., Turk, M., Kellner, N., Cheng, J., Flemming, D., Koß-Braun, I., Kos, M., Thoms, M., Berninghausen, O., Beckmann, R., and Hurt, E. (2016) Architecture of the 90S Pre-ribosome: a structural view on the birth of the eukaryotic ribosome. *Cell* **166**, 380–393 CrossRef Medline
53. Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2018) Assembly and structure of the SSU processome: a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **49**, 85–93 CrossRef Medline
54. Thoms, M., Thomson, E., Baëler, J., Gnädig, M., Griesel, S., and Hurt, E. (2015) The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell* **162**, 1029–1038 CrossRef Medline
55. Cepeda, L. P. P., Bagatelli, F. F. M., Santos, R. M., Santos, M. D. M., Nogueira, F. C. S., and Oliveira, C. C. (2019) The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast. *J. Biol. Chem.* **294**, 19365–19380 CrossRef Medline
56. Yao, R. W., Xu, G., Wang, Y., Shan, L., Luan, P. F., Wang, Y., Wu, M., Yang, L. Z., Xing, Y. H., Yang, L., and Chen, L. L. (2019) Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus. *Mol. Cell* **76**, 767–783.e11 CrossRef Medline
57. Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., and Hegemann, J. H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**, 773–786 CrossRef Medline
58. Wang, R., Kamgoue, A., Normand, C., Léger-Silvestre, I., Mangeat, T., and Gadal, O. (2016) High resolution microscopy reveals the nuclear shape of budding yeast during cell cycle and in various biological states. *J. Cell Sci.* **129**, 4480–4495 CrossRef Medline

59. Laporte, D., Courtout, F., Tollis, S., and Sagot, I. (2016) Quiescent *Saccharomyces cerevisiae* forms telomere hyperclusters at the nuclear membrane vicinity through a multifaceted mechanism involving Esc1, the Sir complex, and chromatin condensation. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1875–1884 CrossRef Medline
60. Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741 CrossRef Medline
61. Sung, M. K., Ha, C. W., and Huh, W. K. (2008) A vector system for efficient and economical switching of C-terminal epitope tags in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**, 301–311 CrossRef Medline
62. Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961 CrossRef
63. Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., and Moses, A. M. (2009) NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 202 CrossRef Medline
64. Bakhrat, A., Baranes, K., Krichevsky, O., Rom, I., Schlenstedt, G., Pietrovski, S., and Raveh, D. (2006) Nuclear import of ho endonuclease utilizes two nuclear localization signals and four importins of the ribosomal import system. *J. Biol. Chem.* **281**, 12218–12226 CrossRef Medline
65. Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linnemann, J., Hiermeier, T., Perez-Fernandez, J., Kumcuoglu, B., Leger-Silvestre, I., Faubladiar, M., Griesenbeck, J., Woolford, J., Tschochner, H., and Milkerit, P. (2013) Studies on the assembly characteristics of large subunit ribosomal proteins in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE* **8**, e68412 CrossRef Medline
66. Gonzales, F. A., Zanchin, N. I., Luz, J. S., and Oliveira, C. C. (2005) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in Pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* **346**, 437–455 CrossRef Medline
67. Bachellier-Bassi, S., Gadal, O., Bourout, G., and Nehrbass, U. (2008) Cell cycle-dependent kinetochore localization of condensin complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Struct. Biol.* **162**, 248–259 CrossRef Medline
68. Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Kunzler, M., Hurt, E., and Simos, G. (1998) Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell Biol.* **18**, 6374–6386 CrossRef Medline
69. Berger, A. B., Cabal, G. G., Fabre, E., Duong, T., Buc, H., Nehrbass, U., Olivo-Marin, J. C., Gadal, O., and Zimmer, C. (2008) High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat. Methods* **5**, 1031–1037 CrossRef Medline
70. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagaqwa, H. (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 10171–10176 CrossRef Medline

### Exosome is concentrated in the yeast nucleolus

**Nucleolar localization of the yeast RNA exosome subunit Rrp44 hints at early pre-rRNA processing as its main function**

Ellen K. Okuda, Fernando A. Gonzales-Zubiate, Olivier Gadal and Carla C. Oliveira

*J. Biol. Chem.* 2020, 295:11195-11213.

doi: 10.1074/jbc.RA120.013589 originally published online June 17, 2020

---

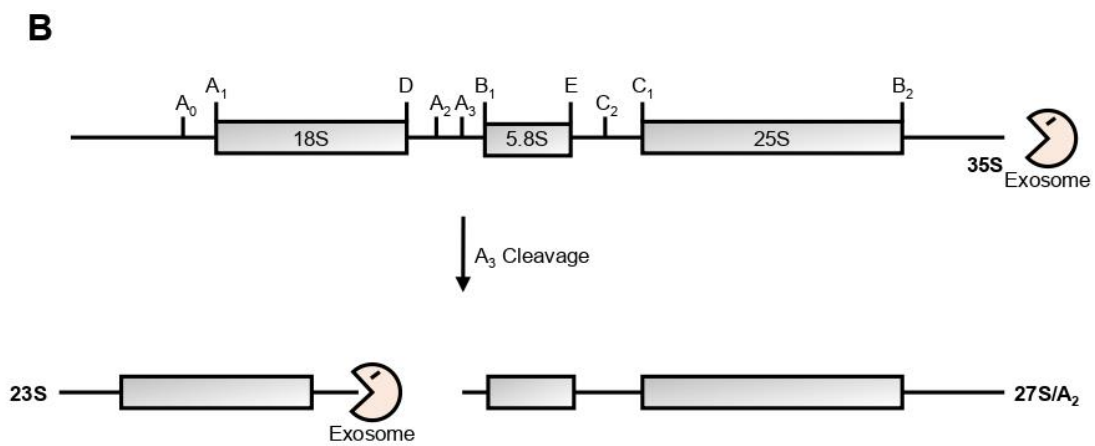
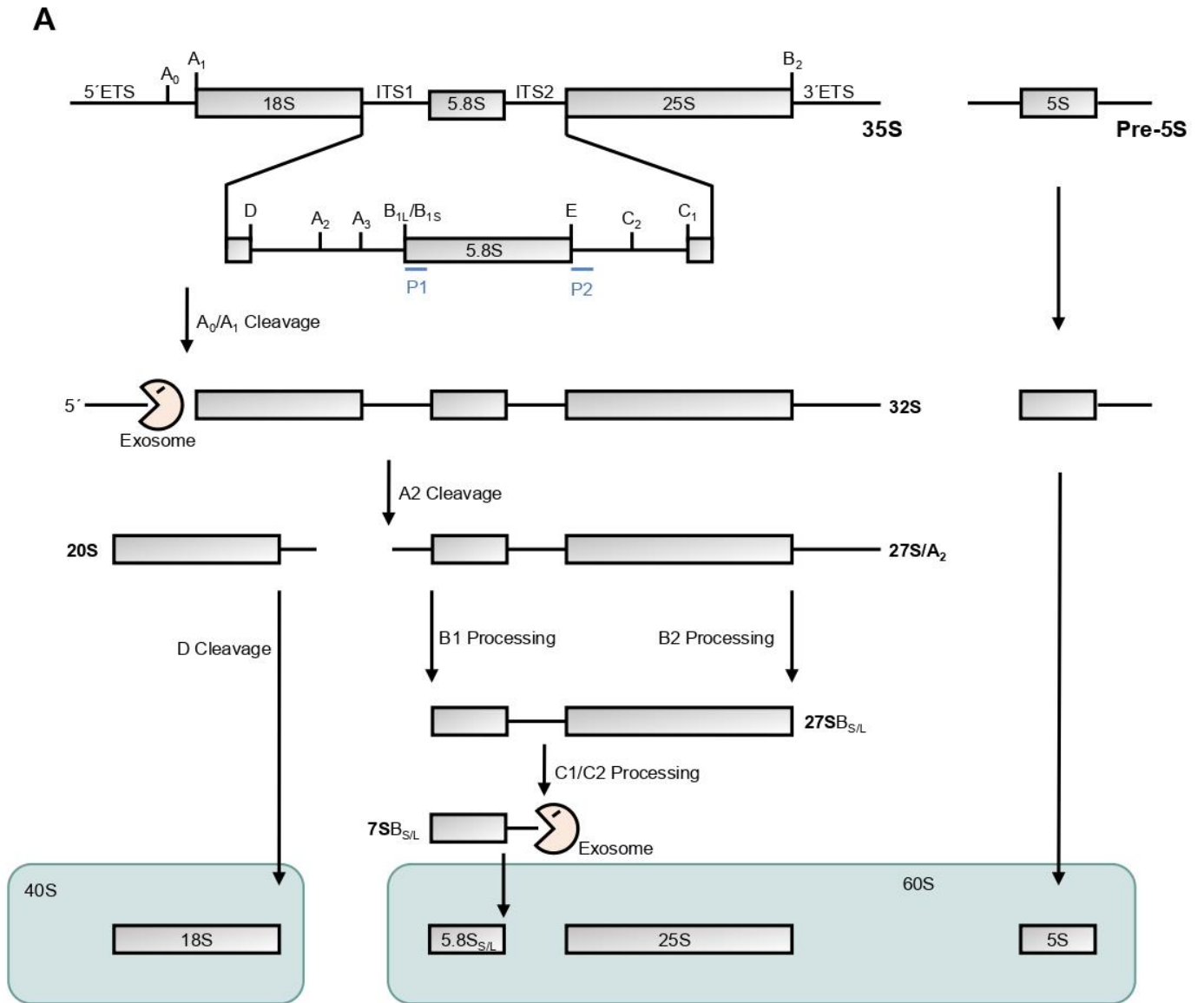
Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.RA120.013589](https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013589)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

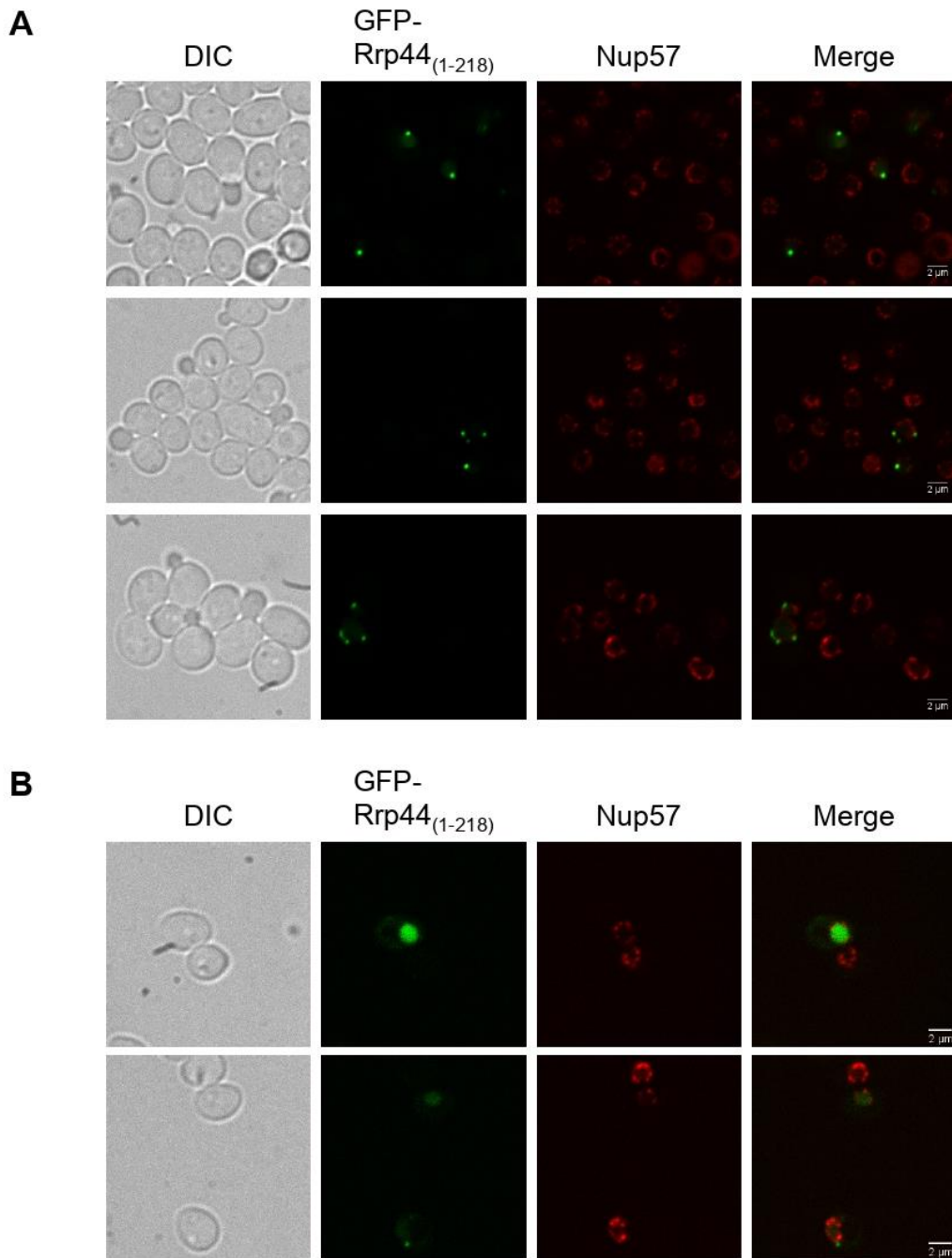
[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 70 references, 24 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/295/32/11195.full.html#ref-list-1>



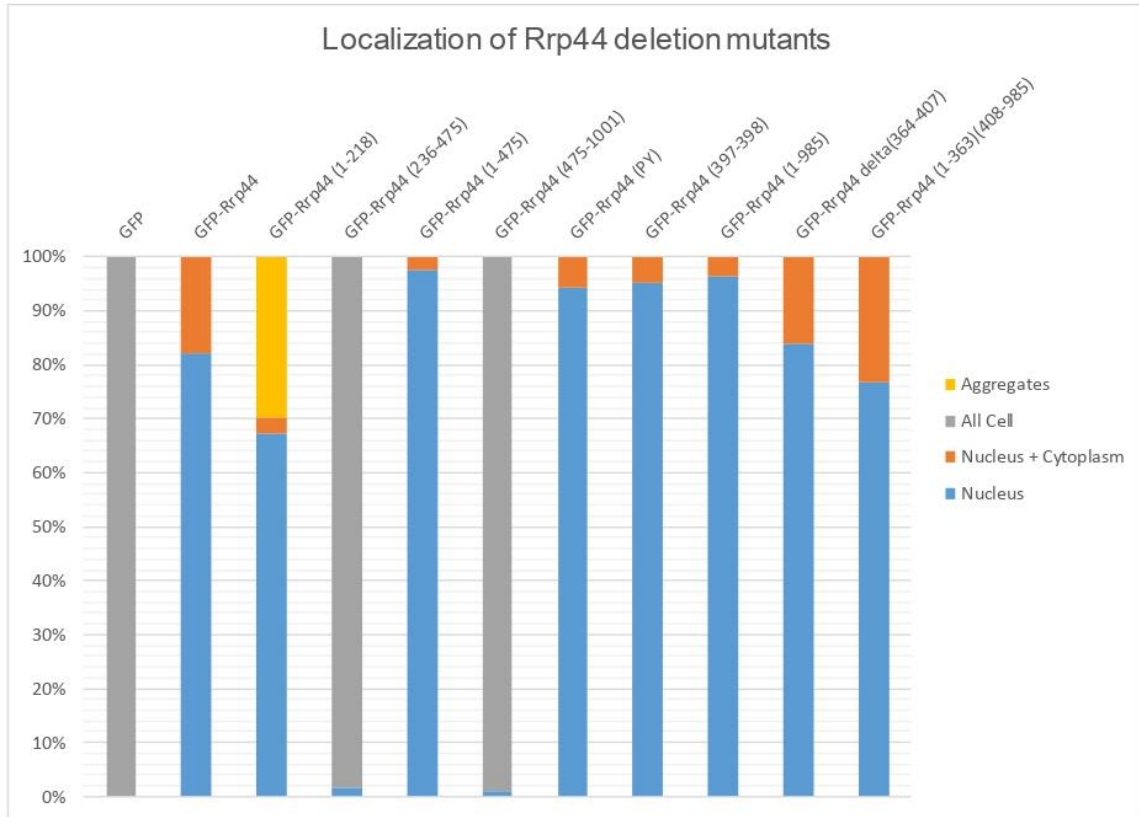
**Supp. Figure S1**

Schematics of the structure of the 35S pre-rRNA and major intermediates of the rRNA processing pathway in *S. cerevisiae*. **(A)** Processing of 35S pre-rRNA starts with endonucleolytic cleavages at sites A0 and A1 in the 5'-ETS, generating 32S pre-rRNA. The subsequent cleavage at site A2 in ITS1, generates the 20S and 27SA<sub>2</sub> pre-rRNAs. The 20S pre-rRNA is then processed at site D to the mature 18S rRNA. The major processing pathway of the 27SA<sub>2</sub> pre-rRNA involves cleavage at site A<sub>3</sub>, producing 27 SA<sub>3</sub>, which is digested quickly by exonucleases to generate the 27SBs (27SB short) pre-rRNA. The subsequent processing step occurs at site B<sub>2</sub>, at the 3'-end of the mature 25S rRNA. Processing at sites C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> separates the mature 25S rRNA from the 7S<sub>S</sub> pre-rRNA. This pre-rRNA is subsequently processed exonucleolytically to generate the mature 5.8S<sub>S</sub> rRNAs. A fraction of the 27SA<sub>2</sub> pre-rRNA is processed at the 5'-end by a different mechanism and, following processing at the remaining sites, gives rise to the 5.8S<sub>L</sub> (5.8 S long) rRNA, which is 6–8 nucleotides longer than the 5.8S<sub>S</sub> rRNA at the 5'-end. The intermediates processed by the exosome are indicated. **(B)** Exosome associates with pre-ribosomal particles for quality control of rRNA, so that aberrant intermediates, such as 23S, and unprocessed 35S can be targeted for degradation.



**Supp. Figure S2**

Analysis of GFP-Rrp44<sub>1-218</sub> localization by spinning-disk microscopy. Cells expressing GFP-Rrp44<sub>1-218</sub> showed two different phenotypes. **(A)** Rrp44<sub>1-218</sub> aggregates appear close to the nuclear membrane, but at its cytoplasmic side. **(B)** Rrp44<sub>1-218</sub> appears concentrated in the nucleus. Nup57 was used as nuclear pore marker to distinguish nuclear from cytoplasmic aggregates.

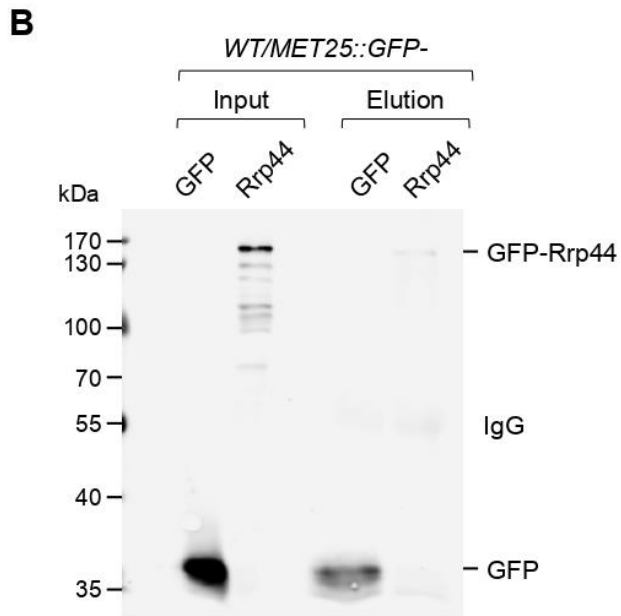
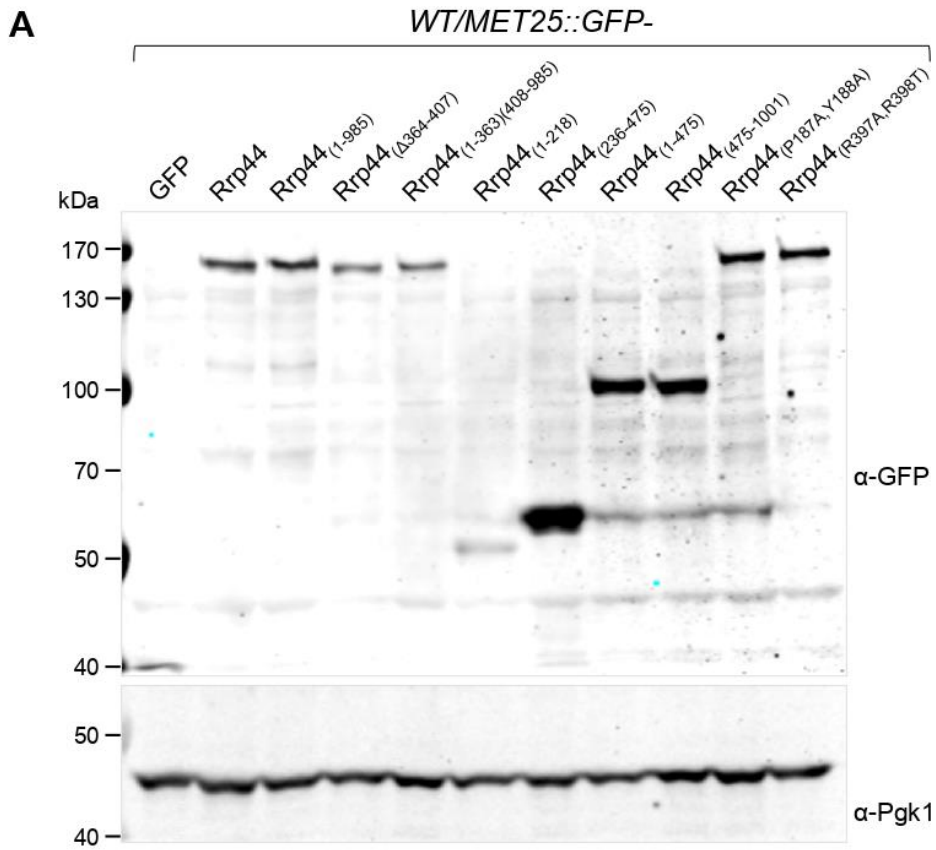
**A****B**

Protein	Number of cells				Total
	Nucleus	Nucleus+Cytoplasm	Whole cell	Aggregates	
GFP	0	0	45	0	45
GFP-Rrp44	55	12	0	0	67
GFP-Rrp44(1-218)	43	2	0	19	64
GFP-Rrp44(236-475)	1	0	63	0	64
GFP-Rrp44(1-475)	79	2	0	0	81
GFP-Rrp44(475-1001)	1	0	101	0	102
GFP-Rrp44(P187A,Y188A)	68	4	0	0	72
GFP-Rrp44(R397A,R398T)	59	3	0	0	62
GFP-Rrp44(1-985)	80	3	0	0	83
GFP-Rrp44( $\Delta$ 364-407)	52	10	0	0	62
GFP-Rrp44(1-363)(408-985)	50	15	0	0	65

**Supp. Figure S3**

Quantitative analysis of cells expressing episomal GFP-fused Rrp44 mutants, shown as the percentage of cells showing each phenotype (A). Percentage of cells showing proteins concentrated in the nucleus is shown in blue; cells showing proteins concentrated in the nucleus, but also present in cytoplasm are shown in orange; proteins present throughout cells are depicted in grey; yellow represents aggregates. (B) Total number of cells analyzed expressing each Rrp44 mutant, with the number of cells displaying the respective phenotypes.





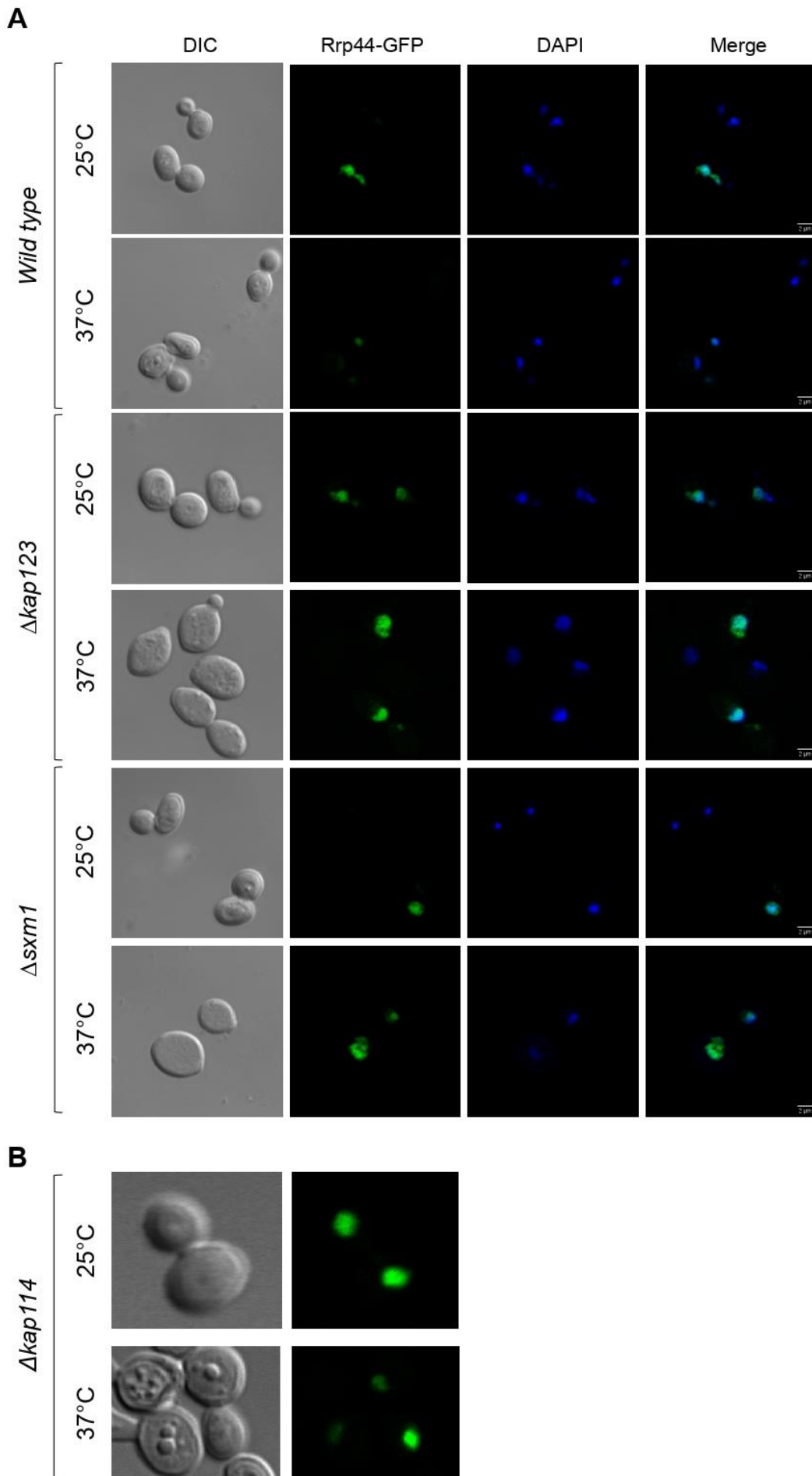
**Supp. Figure S4**

(A) Expression of Rrp44 mutants in wild type cells. Same samples shown in Fig. 3, but in a different gel to allow better separation of the bands. Western blot for the determination of the expression levels of the GFP-Rrp44 mutants in BY4741 strain. Total cell extracts were separated by SDS-PAGE and subjected to western blot with antibodies against GFP and Pgk1, used here as an internal control. This 8% acrylamide gel allows the visualization of the small size difference between Rrp44 and mutants ( $\Delta$ 364-407) and (1-363)(408-985). (B) Control of experiment shown in Fig. 7. Extracts from yeast cells expressing GFP or GFP-Rrp44 were incubated with IgG-sepharose beads, and after extensive wash, eluted proteins were analyzed by western blot with antibody against GFP. Input and elution fractions are shown. GFP binds unspecifically to IgG-sepharose with much higher affinity than GFP-Rrp44.

				Subcellular localization	Growth complementation	7S pre-rRNA Accumulation (Mut/WT)
Rrp44		1	1001	N	+	1.0
Rrp44 <sub>(1-985)</sub>				N	+	1.2
Rrp44 <sub>(Δ364-407)</sub>				N	+/-	2.2
Rrp44 <sub>(1-363)(408-985)</sub>				N + c	+/-	2.0
Rrp44 <sub>(1-218)</sub>				N + c + aggr	-	2.0
Rrp44 <sub>(236-475)</sub>				W	-	1.2
Rrp44 <sub>(1-475)</sub>				N	+/-	2.2
Rrp44 <sub>(475-1001)</sub>				W	-	1.0
Rrp44 <sub>(R397A,R398T)</sub>				N	+	1.0
Rrp44 <sub>(P187A,Y188A)</sub>				N	+	1.0

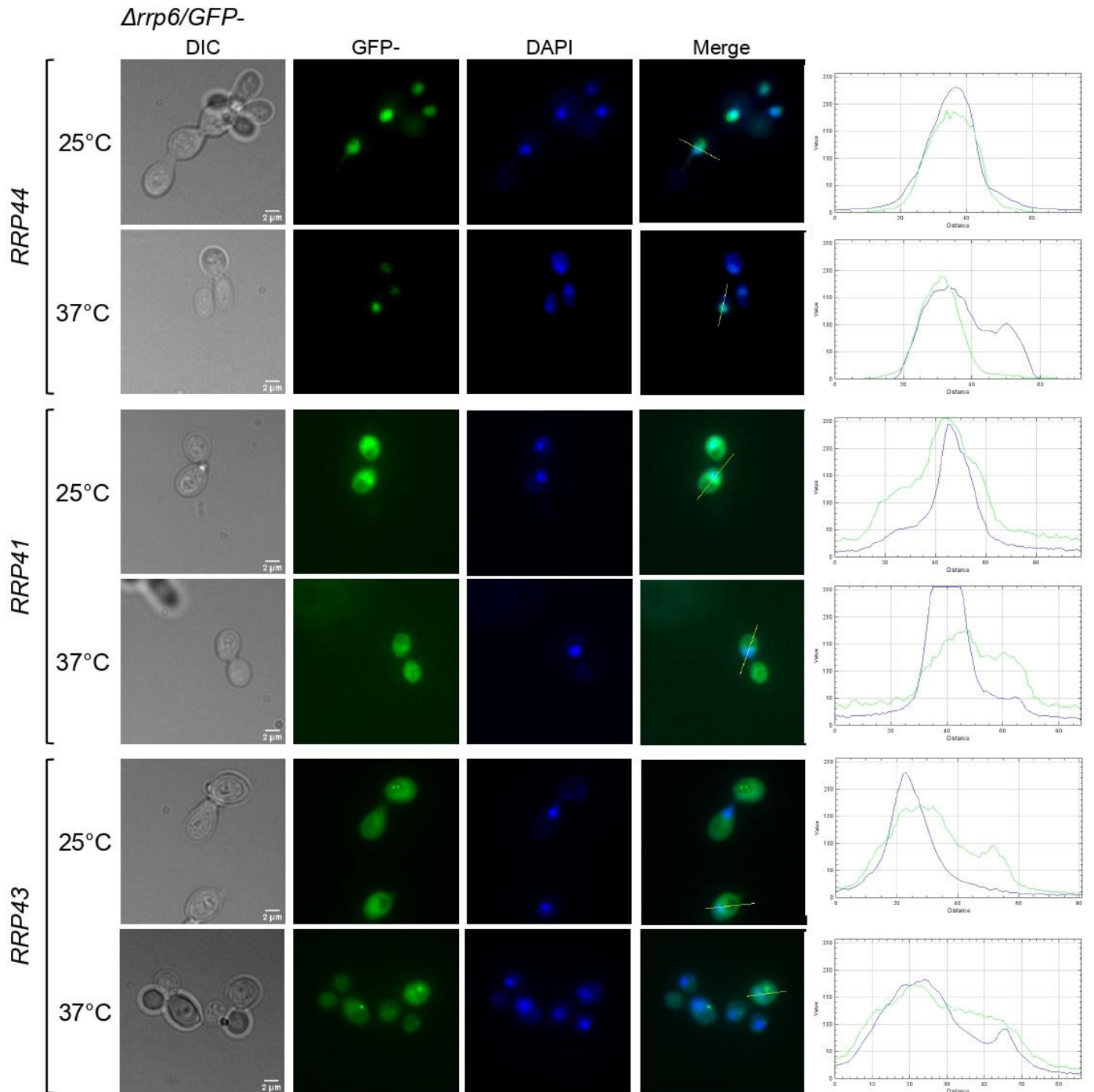
**Figure S5**

Overview of the phenotypes of the Rrp44 deletion and point mutants relative to subcellular compartment localization, growth complementation of strain  $\Delta rrp44/GAL::RRP44$  in glucose medium, and pre-rRNA 7S processing relative to wildtype. Subcellular localization: N, nuclear accumulation; N + c; nuclear concentration, but also visible in cytoplasm; N + c + aggr, in addition to nucleus and cytoplasm, visible also in aggregates. Growth complementation: +, growth in glucose medium; +/- partial growth complementation; -, no growth. 7S processing: numbers indicate rate of 7S in mutants relative to wild type.

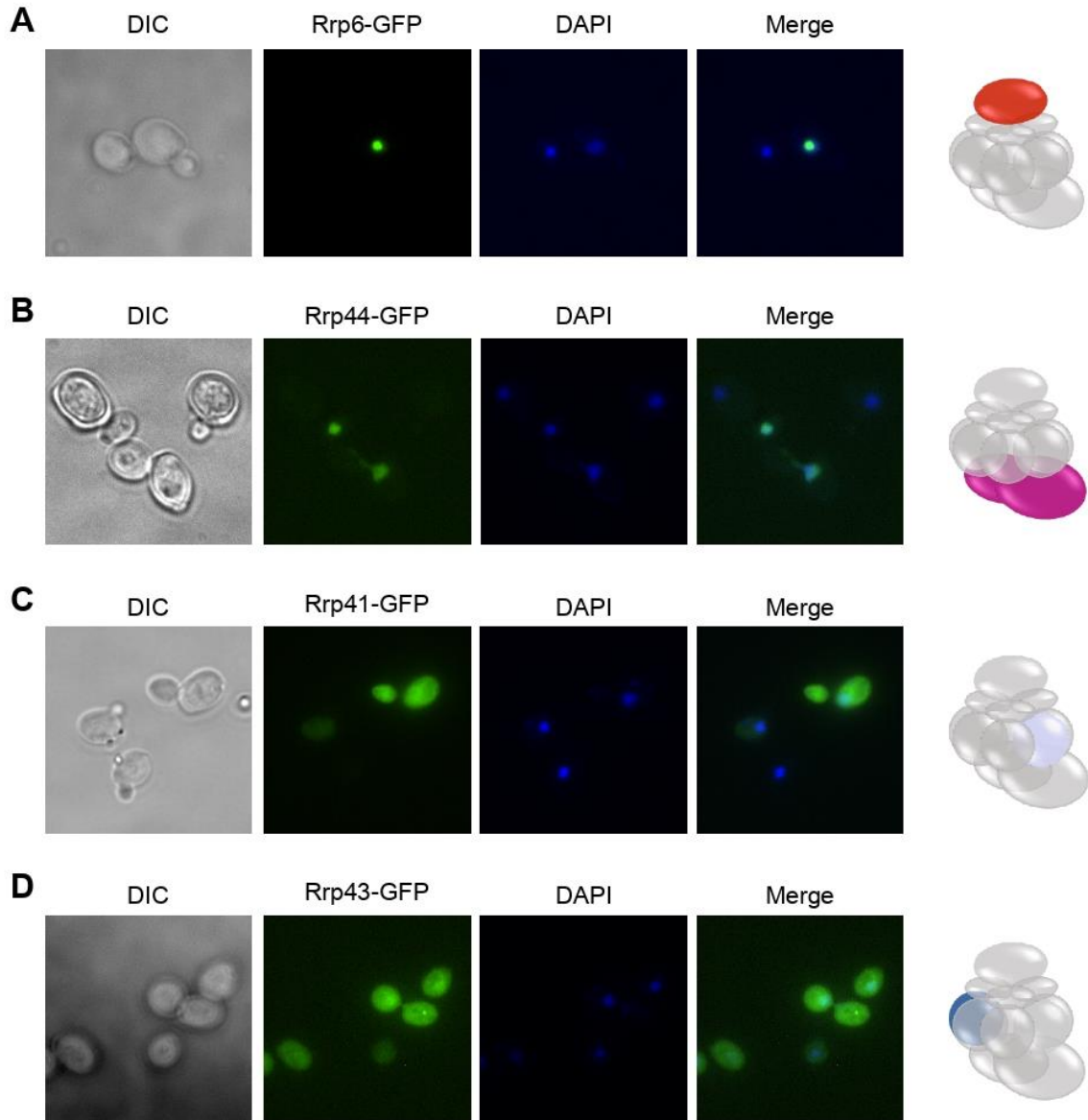


**Supp. Fig. S6**

Depletion of non-essential karyopherins Kap123, Sxm1, or Kap114 does not affect the subcellular localization of GFP-Rrp44. Cells were grown at 25°C or 37°C because these strains are stress-sensitive. **(A)** Laser scanning confocal microscope images show the subcellular localization of GFP-Rrp44 in wild type cells, or in strains depleted of Kap123, or Sxm1 **(B)** Analysis of the subcellular localization of GFP-Rrp44 after inhibition in Kap114 depleted cells.

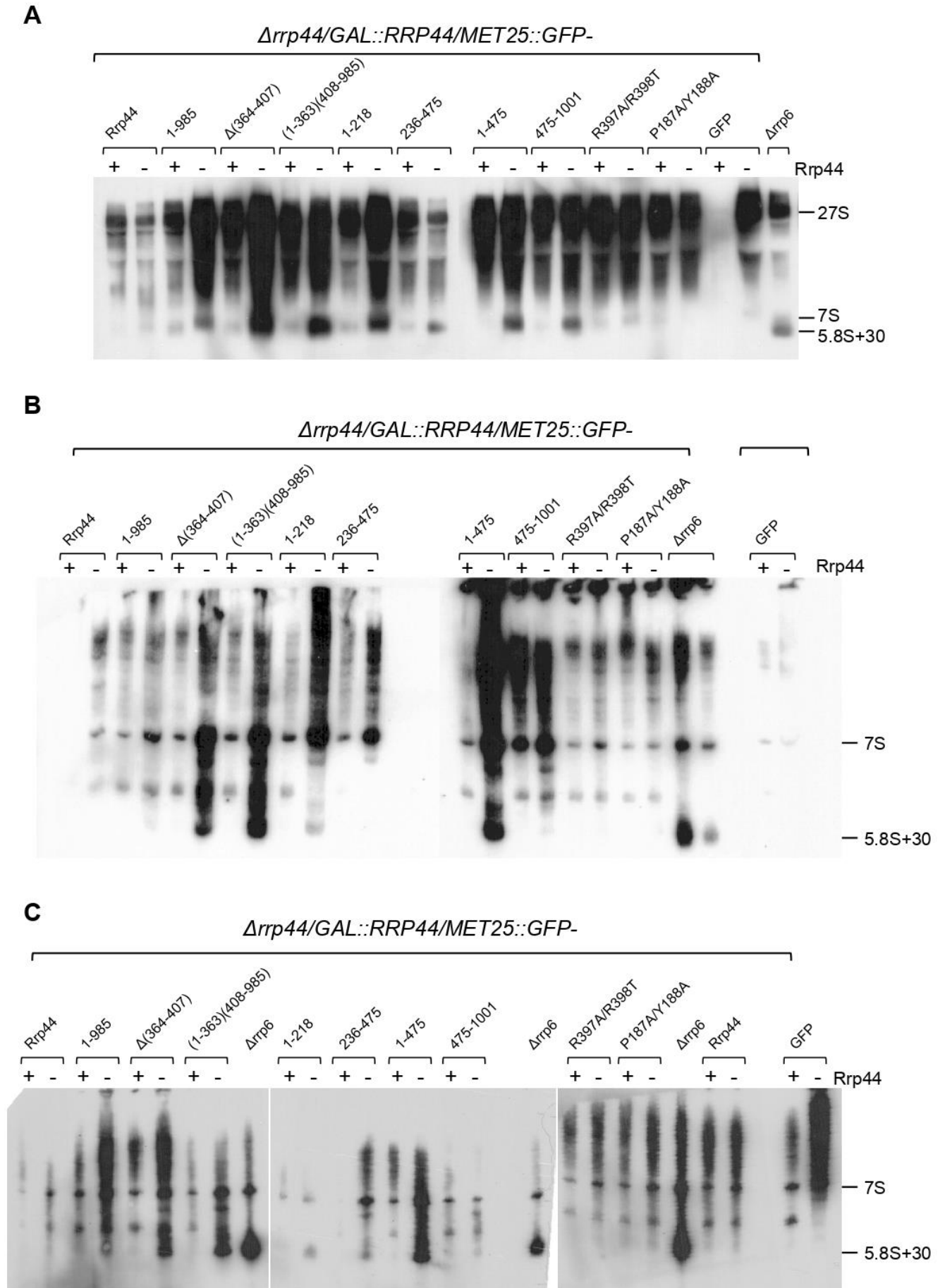
**Supp. Fig. S7**

Exosome subunits localization in *Δrrp6* strain. Localization of episomal GFP-tagged exosome subunits Rrp44, Rrp41 and Rrp43 expressed in *Δrrp6* strain and grown at 25°C (permissive temperature), or at 37°C (restrictive temperature). All the images were edited individually. DAPI was used as nuclear marker. GFP-fused proteins relative to DAPI by using ImageJ is shown on the right. Green lines represent GFP and blue lines represent DAPI.



**Supp. Fig. S8**

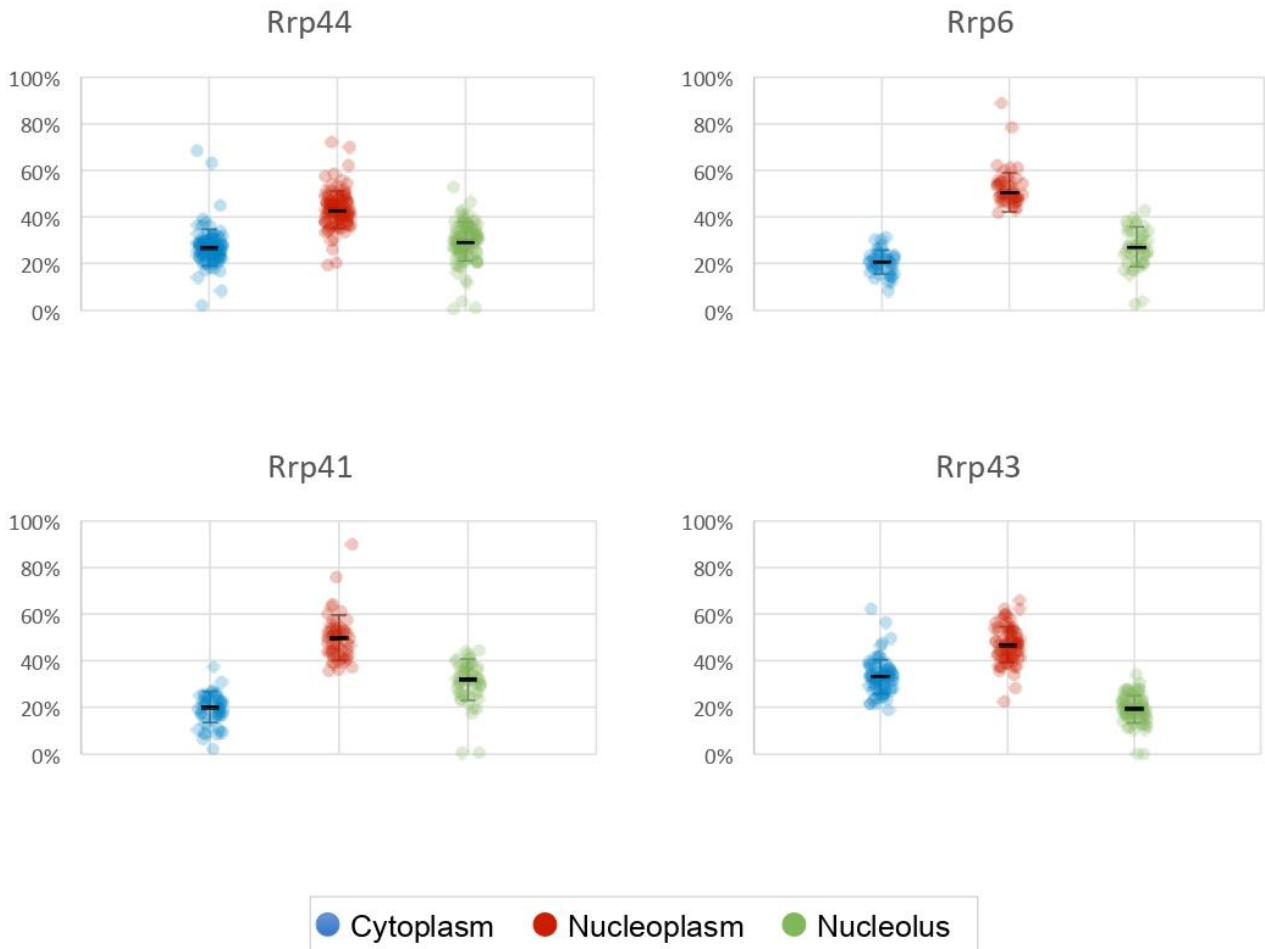
Overexpression of exosome subunits leads to partial mislocalization. Analysis of the subcellular localization of episomal GFP-fused exosome subunits overexpressed in strain BY4742. When overexpressed, Rrp6 (A) and Rrp44 (B) localize to the nucleus, but it is no longer possible to detect their concentration in the nucleolus (Rrp6 and Rrp44). Rrp41 (C) and Rrp43 (D) show strong signal in cytoplasm in addition to the nuclear signal.





**Supp. Figure S9**

Total RNA from biological replicates were used in northern hybridizations to analyze pre-RNA processing in Rrp44 mutant strains with a biotinylated probe specific for 5'-end of ITS1, which detects the pre-rRNAs 27S, 7S and 5.8S+30, but not mature 5.8S rRNA. **(A)** RNAs were separated on agarose gels, which allows the visualization of 27S pre-rRNA band, but does not separate well 7S from 5.8S+30. **(B)** and **(C)** Independent experiments of hybridizations after separation of RNAs on denaturing polyacrylamide gels. The method used for detection of bands requires exposing films to membranes on developing solution, which is often not uniformly distributed, resulting in lighter or darker regions on the films, making quantitation of the bands not very accurate. The results, however, are in agreement with those shown in Fig. 5.



### Supp. Figure S10

Percentage of exosome signal in different cell compartments. Signal of exosome-GFP subunits was quantified in the whole cells and separated according to each compartment (cytoplasm, nucleoplasm or nucleolus). The percentage of exosome-GFP signal of each compartment was calculated relative to the total. The total signal of the cytoplasm is around 20-30% of total exosome-GFP signal, whereas 70-80% of the signal is from the nucleus of the cell.