

TESE DE DOUTORADO

**Caracterização da função da proteína Nop53p
de *Saccharomyces cerevisiae***

Aluna: Daniela Campos Granato

Orientadora: Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

**Universidade de São Paulo
Instituto de Química, Departamento de Bioquímica**

**São Paulo
30/10/2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente na minha vida.

À Professora Carla Oliveira, por ter me dado à oportunidade de fazer o doutorado e por ter se demonstrado uma excelente orientadora. Muito obrigada pelas discussões e sugestões que me deu durante todo esse período. Acima de tudo, agradeço por ter sido de fato uma professora dedicada, e sempre presente. Ensinou a persistir no experimento, a me planejar e me organizar. Aprendi muito mais do que técnicas mais uma forma de trabalhar no laboratório. Quando finalmente aprendi sobre a sua disponibilidade de conversar, a qualquer dúvida, percebi que essa era uma dádiva para a nossa aprendizagem.

À minha família, que sempre me estimula e me dá garra para continuar nos projetos da vida. Ao meu pai, quem admiro muito, me ensinou muita coisa, e é o exemplo de dedicação em tudo que faz. À minha mãe, pelo carinho incondicional, por sempre me dar à orientação devida e me acalmar nos momentos de ansiedade da pós-graduação. Ao meu irmão pela compreensão. Ao Fabiano pelo companherismo.

Aos meus colegas do laboratório. Agradeço ao Mauricio pelo incentivo, por compartilhar idéias da pesquisa e da vida, pelas piadas oportunas, pela ajuda nas estratégias de clonagem e sobre tudo por ter se tornado um grande amigo para a vida. Agradeço à Juliana, pela ajuda que me deu nos experimentos, especialmente pelas dicas na purificação de proteínas e pela convivência. À Márcia pelo tempo agradável no qual dividimos o espaço da bancada, e a Raphaela, que apesar do tempo de convivência ter sido menor, foi muito prazeroso. Agradeço aos membros antigos, que também foram muito importantes, José Roberto e Celso e, finalmente, ao Fernando que foi quem me ajudou muito nos experimentos e na adaptação inicial ao laboratório, além de ter sido um bom amigo. À Cristiane, Célia, Alessandra e, mais recentemente, Camile pela ajuda no laboratório.

Aos meus novos colegas do instituto de química, todas as pessoas com quem freqüentei disciplinas e que me ajudaram muito na caminhada. À minhas colegas de moradia.

À Secretaria de Pós-Graduação, a Secretaria de bioquímica, a biblioteca do instituto de química e a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, pela eficiência e dedicação. Aos professores e alunos do departamento de bioquímica que permitiram o uso de aparelhos e reagentes dos laboratórios.

À Professora Beatriz Castilho, por tornar disponível o equipamento para uso em experimentos de gradiente de polissomos e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Professor Nilson Zanchin, por permitir utilizar o microscópio de fluorescência e pelas discussões do trabalho. À Teresa Lima e Zildene Côrrea, pelas reações de sequenciamento.

À Professora Gláucia Santelli, pelo uso do microscópio confocal e pelo enorme auxílio dado durante o experimento.

Ao Professor Daniel Pimenta, pela disponibilidade do equipamento de espectrometria de massas e pela discussão dos dados obtidos.

Ao Professor Sandro Valentini, pela doação do anticorpo anti-RPL5.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante todo esse período.

Muito obrigada pela atenção e paciência de todos.

RESUMO

Granato, D.C. **Caracterização da função da proteína Nop53p de *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 137p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em eucariotos, o processamento de pré-rRNA depende de vários fatores como endonucleases, exonucleases, RNA helicases, enzimas modificadoras de rRNA e componentes de snoRNPs. Com o objetivo de caracterizar novas proteínas envolvidas no processamento de pré-rRNA, foi identificada a proteína Nop53p interagindo com a proteína nucleolar Nop17p a partir de uma varredura da biblioteca de cDNAs de *Saccharomyces cerevisiae*. A cepa condicional contendo a seqüência da ORF *NOP53* sob controle do promotor de galactose não cresce em meio contendo glicose, indicando que Nop53p seja uma proteína essencial para a viabilidade celular.

Os resultados deste trabalho demonstram que Nop53p está envolvida nas etapas iniciais de clivagem do pré-rRNA, assim como nas clivagens responsáveis pela formação dos rRNAs maduros 5.8S e 25S. Análise mais detalhada do processamento de pré-rRNA por Northern blot e “pulse-chase labeling”, revelou também que Nop53p afeta principalmente o processamento do rRNA intermediário 27S, que origina os rRNAs maduros 5.8S e 25S. Nop53p participa do processamento desses rRNAs afetando a poliadenilação dos precursores dos rRNAs 5.8S e 25S. Experimentos de co-immunoprecipitação de RNA com a proteína de fusão ProtA-Nop53p confirmaram o envolvimento de Nop53p no processamento do 27S rRNA, indicando que essa proteína possa ligar RNA diretamente. A capacidade de Nop53p de ligar RNA foi confirmada através de testes *in vitro*, enquanto que ensaios de co-immunoprecipitação de cromatina revelaram que Nop53p liga-se ao rRNA 5.8S durante a transcrição. Nop53p regula a função do exossomo através da sua interação direta com a subunidade exclusivamente nuclear deste complexo, Rrp6p.

Palavras-chave: processamento de rRNA, ribossomos, interação proteína-RNA, exossomo.

ABSTRACT

Granato, D.C. **Study of the function of the protein Nop53p in *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 137p. PhD Thesis. Graduate program in Biochemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

In eukaryotes, the rRNA processing depends on several factors, such as, endonucleases, exonucleases, RNA helicases, rRNA modifying enzymes and components of the snoRNPs. With the purpose of characterizing new proteins involved in pre-rRNA processing, Nop53p was identified interacting with the nucleolar protein Nop17p in a two hybrid assay. The conditional yeast strain containing the sequence of the ORF *NOP53* under the control of the galactose promoter cannot grow in medium containing glucose, indicating that the protein is essential for cell viability.

The results of this work demonstrate that Nop53p is involved in the initial steps of pre-rRNA processing and in the cleavages responsible for the formation of the mature rRNAs 5.8S and 25S. A more detailed analysis of the pre-rRNA processing, by Northern blot and pulse-chase labeling, revealed that Nop53p affects the processing of the 27S precursor, that originates the rRNAs 5.8S and 25S. Nop53p participates in the processing of these RNAs by affecting the polyadenylation of the precursors of the rRNAs 5.8S and 25S. RNA co-immunoprecipitation assays with the fusion protein A-Nop53p confirmed the involvement of Nop53p in the processing of the 27S pre-rRNA, indicating that the protein may interact directly with the RNA. The capacity of Nop53p to bind RNA was confirmed by *in vitro* assays, while chromatin immunoprecipitation assays demonstrated that Nop53p binds the 5.8S rRNA co-transcriptionally. Nop53p regulates the function of the exosome by interacting directly with the exclusively nuclear subunit of the complex, Rrp6p.

Keywords: rRNA processing, ribosomes, RNA-protein interaction, exosome.

ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
β-Gal	β-Galactosidase
μg	micrograma (s)
μl	microlitro
Ω	ohms
aa(s)	aminoácido (s)
AD	domínio de ativação
BCA	ácido bicinônico
BD	domínio de ligação ao DNA
BSA	albumina acetilada de soro bovino
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
C-terminal	carboxi-terminal
DAPI	4'-6'-diamino-2-fenilindol
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP)
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETS	seqüência espaçadora externa
GFP	proteína verde fluorescente
GST	glutaciona-S-transferase
HCl	ácido clorídrico
IPTG	isopropiltio-β-D-galactosideo
ITS	seqüência espaçadora interna
Kb	quilobase (s)
KCl	cloreto de potássio

kDa	quilodáton (s)
KOAc	acetato de potássio
kV	quilovolts
LB	meio luria-broth
LiOAc	acetato de lítio
LSU	large subunit (subunidade maior)
M	molar
mA	mili ampére (s)
MDa	megadalton
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mL	mililitro (s)
mM	milimolar
MnCl ₂	cloreto de manganês
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nt	nucleotídeos (s)
N-terminal	amino-terminal
OD	densidade óptica
ONPG	O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial de hidrogênio
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PNPase	polinucleotídeo fosforilase
Pré-rRNA	precursor de RNA ribossomal

ProtA	proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
rDNA	ácido desoxirribonucléico ribossomal
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
RNP	ribonucleoproteína
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
rRP	proteína de RNA ribossomal
S	coeficiente de sedimentação
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
snRNAs	small nuclear RNAs
snRNP	small nuclear ribonucleoproteína
snoRNAs	small nucleolar RNAs
snoRNPs	small nucleolar ribonucleoproteína
SSC	solução salina-citrato de sódio
SSPE	solução salina-fosfato de sódio-EDTA
SSU	small subunit (subunidade menor)
TAE	tris, acetato, EDTA
TBE	tris, borato, EDTA
TE	tris-EDTA
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletineldiamina
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
tRNA	RNA transportador
U	unidade enzimática
UTR	região não-traduzida do mRNA
V	volt
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosideo

ABREVIATURAS

YNB	yeast nitrogen base (meio mínimo de suplemento de nitrogênio para levedura)
YPD	yeast extract peptone dextrose (meio de extrato de levedura-peptona-dextrose)
YPGAL	yeast extract peptone galactose (meio de extrato de levedura-peptona-galactose)
2YT	meio duas vezes extrato de levedura-triptona

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do exossomo de <i>S.cerevisiae</i> e similaridade com proteínas de outros organismos.....	31
Tabela 2. Cepas de levedura utilizadas neste estudo.....	34
Tabela 3. Cepas de bactéria utilizadas neste estudo.....	35
Tabela 4. Plasmídeos utilizados neste estudo.....	36
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da biogênese e exportação das subunidades ribossomais 40S e 60S.....	19
Figura 2. Processamento de pré-rRNA.....	21
Figura 3. Associação co-transcricional de fatores protéicos na extremidade 5' do pré-rRNA 35S.....	23
Figura 4. Modelo da associação de fatores ribossomais e não-ribossomais ao rRNA.....	25
Figura 5. Estrutura e função do exossomo.....	32
Figura 6. Modelo de ativação da transcrição dos genes repórteres no sistema do duplo-híbrido.....	48
Figura 7. Modelo de esporulação e obtenção da cepa haploíde n $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$	56
Figura 8. Teste de interação de Nop53p com Nop17p e Nip7p.....	67
Figura 9. Localização subcelular de GFP-Nop53p.....	69
Figura 10. NOP53 é um gene essencial.....	72
Figura 11. Marcação de rRNA <i>in vivo</i>	76
Figura 12. Análise do processamento de pré-rRNA através de Northern blot.....	77
Figura 13. Análise do processamento de pré-rRNA através de primer extension.....	78
Figura 14. Co-imunoprecipitação de rRNA com A-Nop53p.....	80
Figura 15. Ligação de Nop53p ao rRNA 5.8S.....	81
Figura 16. Nop53p imunoprecipita cromatina do rRNA 5.8S e interage com fator de RNA pol I.....	83
Figura 17. Identificação de sítios de ligação de Nop53p no 5.8S rRNA.....	85
Figura 18. Ligação de Nop53p a oligos de RNA correspondendo a diferentes regiões do rRNA 5.8S.....	87
Figura 19. Ligação de Nop53p e Nip7p ao rRNA 5.8S.....	89
Figura 20. Ensaio de proteção do rRNA 5.8S+29 por Nop53p ou Nip7p à degradação com RNase H.....	91
Figura 21. Perfil polissomal da cepa $\Delta nop53/GAL::ANOP53$	93

Figura 22. Co-purificação de proteínas com A-Nop53p e identificação por espectrometria de massas.....	95
Figura 23. Domínios de interação de Nop53p com Nip7p e Nop17p.....	97
Figura 24. Co-imunoprecipitação de RNA com Nop53p ou suas porções N- e C-terminais.....	99
Figura 25. Ensaio de ligação de mutantes de Nop53p a RNA.....	100
Figura 26. Localização subcelular das proteínas truncadas GFP-N-Nop53p e GFP-C-Nop53p.....	102
Figura 27. Análise da complementação da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ por formas truncadas de Nop53p.....	104
Figura 28. Análise de poliadenilação de rRNA na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ e da interação de Nop53p com o exossomo.....	107
Figura 29. Análise do efeito de Nop53p na degradação de RNA pelo exossomo...109	
Figura 30. Alinhamento da sequência de Nop53p. Seqüência de Nop53p e de possíveis ortólogos em eucariotos foram alinhados.....	119
Figura 31. Diagrama das interações proteína-proteína observadas por duplo-híbrido, co-imunoprecipitação e/ou pull-down relatadas nesta tese.....	120
Figura 32. Modelo do papel de Nop53p no processamento de pré-rRNA.....	121

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	18
1.1. Processamento do pré-rRNA.....	18
1.2. Pré-ribossomo 90S e SSU processomo.....	22
1.3. Maturação da subunidade ribossomal 40S.....	26
1.4. Maturação da subunidade ribossomal 60S.....	26
1.5. O exossomo.....	28
2.OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivos gerais.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Cepas, plasmídeos e oligonucleotídeos.....	34
3.1.1. Cepas usadas neste trabalho.....	34
3.1.2. Plasmídeos usados neste trabalho.....	36
3.1.3. Oligonucleotídeos usados neste trabalho.....	37
3.1.4. Meios de cultura.....	40
3.2. Métodos.....	41
3.2.1. Manipulação de DNA.....	41
-Isolamento de DNA plasmidial de bactéria.....	41
-Isolamento de DNA plasmidial de levedura.....	41
-Isolamento de DNA genômico de levedura.....	42
-Análise de DNA e construção de plasmídeos.....	42
-Reações enzimáticas.....	43
-Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	43
-Extração de fragmentos de DNA em gel de agarose.....	43
-Amplificação de DNA por PCR.....	44
-Sequenciamento.....	44
3.2.2. Manipulação de bactérias.....	44
-Transformação de <i>E.coli</i> por choque térmico.....	44
-Transformação de <i>E.coli</i> por eletroporação.....	45
3.2.3. Manipulação de levedura.....	45

-Transformação com acetato de lítio e DNA carreador.....	46
-Transformação com acetato de lítio e DTT.....	46
-Eletroporação.....	46
-Esporulação de leveduras.....	46
3.2.4. Ensaio de duplo-híbrido para identificar proteínas que interagem com Nop53p.....	47
-Teste de atividade de β -galactosidase (Ensaio de X-Gal e O.N.P.G.).....	49
3.2.5. Co-imunoprecipitação de proteínas.....	50
3.2.6. Ensaio <i>in vitro</i> de interação proteína-proteína.....	52
3.2.7. Análise de proteínas.....	52
-Quantificação de proteínas.....	52
-Separação de proteínas por SDS-PAGE.....	53
-Coloração de proteínas por Coomassie blue e prata.....	53
-Western blotting.....	53
3.2.8. Produção e purificação de proteína recombinante.....	53
-Teste de indução de proteína recombinante.....	53
-Produção de proteína recombinante em larga escala.....	54
-Purificação da proteína Nop53p em fusão com cauda de histidina.....	54
-Purificação de proteína em fusão com cauda de GST.....	55
3.2.9. Obtenção da cepa mutante condicional $\Delta nop53/GAL;;ANOP53$	55
3.2.10. Análise do processamento de RNA através de Northern blot.....	57
-Extração de RNA total de <i>S.cerevisiae</i>	57
-Eletroforese de RNA.....	57
-Marcação radioativa e hibridização das sondas.....	57
3.2.11. <i>Marcação metabólica in vivo de RNA (“pulse-chase labeling”)</i>	57
3.3.12. Primer extension.....	58
3.2.13. Co-imunoprecipitação de RNAs.....	59
3.2.14. Ensaio de ligação a RNA <i>in vitro</i>	60
3.2.15. Localização subcelular com GFP-Nop53p.....	60
3.2.16. Imunoprecipitação de cromatina.....	61
3.2.17. RT-PCR.....	62

3.2.18. Ensaio de RNaseH.....	62
3.2.19. Ensaio de ATPase e helicase.....	62
3.2.20. Ensaio de RNase.....	63
3.2.21. Gradiente de polissomos.....	63
3.2.22. Purificação de RNA polyA.....	64
4.RESULTADOS.....	65
4.1. Análise da interação entre Nop53p e outros fatores envolvidos em processamento de rRNA.....	65
4.1.1. <i>Nop53p interage com proteínas envolvidas no processamento de pré-rRNA, Nop17p e Nip7p, através de duplo-híbrido e “pull-down”.....</i>	65
4.2. Análise da localização subcelular de Nop53p.....	68
4.2.1. GFP-Nop53p co-localiza com RFP-Nop1p no nucléolo.....	68
4.3. Obtenção e análise da cepa mutante condicional $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$.....	70
4.3.1. <i>NOP53 é um gene essencial.....</i>	70
4.3.2. <i>Análise da expressão de ProtA-Nop53p na cepa condicional.....</i>	70
4.4. Análise do processamento do pré-RNA ribossomal na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$.....	73
4.4.1. <i>$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ acumula os rRNAs intermediários 7S e 27S..</i>	73
4.5. Caracterização da ligação de Nop53p ao 5.8S rRNA.....	79
4.5.1. <i>Nop53p co-precipita rRNA e interage diretamente com o rRNA 5.8S in vitro.....</i>	79
4.5.2. <i>Nop53p é recrutada para o pré-rRNA co-transcricionalmente.....</i>	82
4.5.3. <i>Nop53p interage com duas regiões do 5.8S rRNA e protege uma região de 30 nucleotídeos.....</i>	84
4.5.4. <i>Fragmento do 5.8S rRNA, abrangendo os dois sítios de ligação, é necessário para a ligação de Nop53p.....</i>	86
4.5.5. <i>Interação de Nop53p e Nip7p com o rRNA 5.8S.....</i>	88
4.5.6. <i>Nop53p altera a estrutura secundária de 5.8S rRNA.....</i>	90
4.6. Análise da associação de Nop53p ao complexo do pré-60S.....	92
4.6.1. <i>Nop53p se associa a subunidade ribossomal 60S e a um complexo de alto peso molecular.....</i>	92

4.6.2. <i>Nop53p se associa a proteínas do pré-60S e 90S.....</i>	94
4.7. Análise da função das regiões N-terminal e C-terminal de Nop53p..	96
4.7.1. <i>Nip7p interage com Nop53p através do domínio PUA.....</i>	96
4.7.2. <i>Domínio carboxi-terminal de Nop53p interage com Nop17p.....</i>	96
4.7.3. <i>Nop53p liga-se ao rRNA 5.8S através de sua porção N-terminal.....</i>	98
4.7.4. <i>GFP-N-NOP53p e GFP-C-NOP53p são direcionadas ao nucléolo.....</i>	101
4.7.5. <i>N-Nop53p complementa parcialmente a cepa mutante condicional..</i>	103
4.8. Análise do efeito de Nop53p na atividade do exossomo.....	105
4.8.1. <i>Δnop53/GAL::A-NOP53 acumula formas poliadeniladas de pré-rRNA.....</i>	105
4.8.2. <i>Nop53p interage com a subunidade nuclear Rrp6p do exossomo.....</i>	105
4.8.3. <i>Nop53p estimula a atividade de RNase de Rrp6p e do exossomo in vitro.....</i>	108
5.DISSCUSSÃO.....	110
6.CONCLUSÃO.....	122
7.REFERÊNCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS.....	123
LISTA DE ANEXOS	
-curriculum vitae	
-Nop53p, na essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p is required for pré-rRNA processing in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . FEBS J. (2005). 272 (17):4450-63	
-Coltri, P.P., Guimarães, B.G., Granato, D.C., Silva, T.C.L., Luz, J.S., Oliveira, C.C and Zanchin, N.I.T. RNA interaction, structure analysis and complex formation by the ribosome biogenesis protein Nip7p. (no prelo).	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Processamento do pré-rRNA

Uma grande quantidade de dados gerados nos últimos anos tem demonstrado a importância das etapas co- ou pós-transcricionais no controle de expressão gênica em eucariotos. As etapas pós-transcricionais incluem a adição de “cap” na extremidade 5’, poliadenilação, e splicing de mRNAs, clivagem nas extremidades 5’ e 3’, modificação de nucleotídeos de tRNAs e processamento de rRNAs (Decker, 1998).

A função de ribossomos já é bem conhecida, porém, o papel dos rRNAs na tradução ficou mais claro desde a resolução da estrutura do ribossomo de *Haloarcula marismortui* (Nissen et al., 2000), que permite a classificação de ribossomos como ribozimas, já que o sítio de peptidil-transferase na subunidade 50S é formado exclusivamente por rRNA. Com isso, a importância do correto processamento dos rRNAs fica mais evidente. A síntese de ribossomos é um processo de alto gasto energético para a célula, e sua biogênese depende da coordenação de todos os eventos de processamento e, portanto, deve ser bem regulado para garantir sua eficiência e precisão (Warner, 1999).

Sabe-se que em eucariotos a maior parte das reações de síntese e processamento de rRNAs ocorrem no nucléolo, um subcompartimento nuclear (Kressler et al., 1999; Wu et al., 1998). No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, os quatro tipos de rRNAs são transcritos a partir da unidade repetida de rDNA (de 100 a 200 repetições), localizada no cromossomo XII. A RNA polimerase I transcreve uma longa molécula precursora, o pré-rRNA 35S (Fig. 1), que contém as seqüências dos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 25S separadas entre si por dois espaçadores internos (ITS1 e ITS2 - **I**nternal **T**ranscribed **S**pacer) e limitadas por espaçadores externos (5’-ETS e 3’-ETS - **E**xternal **T**ranscribed **S**pacer). A RNA polimerase III transcreve o 5S pré-rRNA, que contém uma extensão de 7 a 13 nucleotídeos na extremidade 3’ e é processado independentemente (Kressler et al., 1999; Piper et al., 1984; Raué and Planta, 1991; Venema and Tollervey, 1995; Fig. 1).

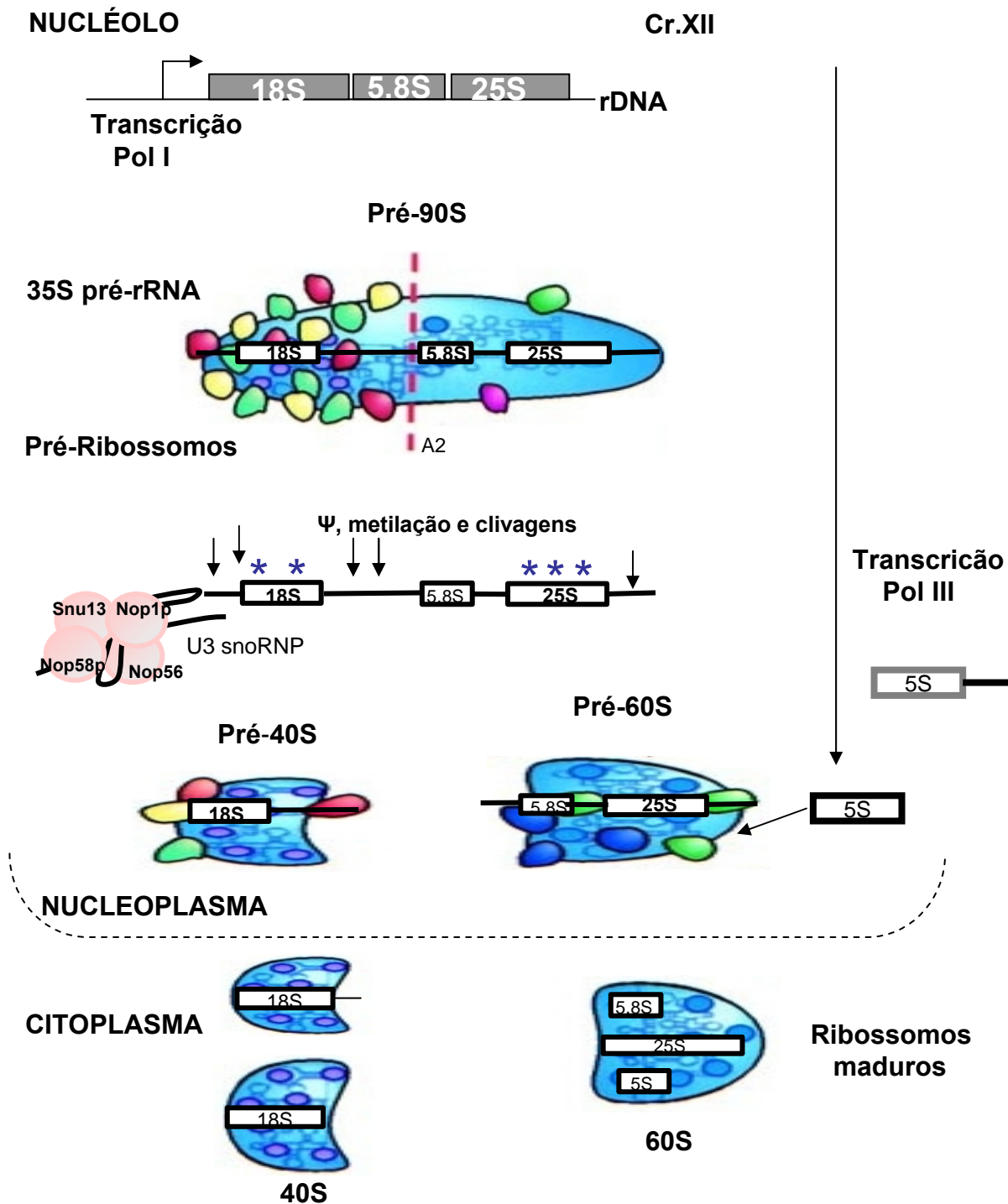


Figura 1. Modelo da biogênese e exportação de subunidades ribossômicas 40S e 60S. O pré-rRNA 35S é sintetizado pela RNA polimerase I, que juntamente com snoRNAs, proteínas ribossomais, e fatores não ribossomais forma a partícula pré-90S. Clivagem do pré-rRNA 35S gera o pré-40S e pré-60S. Após exportação para o citoplasma, através dos poros nucleares, os fatores não-ribossomais se dissociam das subunidades maduras. O rRNA 5S é transcrito pela RNA polimerase III e processado independentemente (adaptado de Nissan et al., 2002).

O processamento do pré-rRNA 35S envolve etapas de clivagem endo- e exonucleolíticas e modificações covalentes de nucleotídeos específicos, incluindo pseudouridinação (ψ), metilação de grupos 2'-O-ribose e de bases (Eichler and Craig, 1994; Grandi et al., 2002; Kressler et al., 1999; Maden, 1990; Venema and Tollervey, 1995; Venema and Tollervey, 1999). As três clivagens iniciais no pré-rRNA 35S, nos sítios A_0 , A_1 (localizados no 5'-ETS) e A_2 (localizado no ITS1), levam à formação dos pré-rRNAs 20S e 27S (Grandi et al., 2002; Wehner et al., 2002; Fig. 2), e separação dos precursores do rRNA que fará parte da subunidade ribossomal 40S daqueles da subunidade 60S (Baßler et al., 2001; Nissan et al., 2002). Essas etapas de processamento dependem da interação da molécula de pré-rRNA com proteínas ribossomais e não-ribossomais, que ocorre durante a transcrição e maturação dos rRNAs. O processamento de rRNAs requer mais de 180 fatores protéicos, que incluem 80 proteínas ribossomais, endonucleases, exonucleases, RNA helicases, GTPases, AAA-ATPases, enzimas modificadoras de nucleotídeos e snoRNPs (“small nucleolar ribonucleoprotein complex”; Kiss, 2002; Kressler et al., 1999; Tollervey, 1987). Alguns desses fatores se associam transitoriamente aos complexos, dependendo da etapa do processamento, enquanto outros acompanham os pré-ribossomos até a sua maturação final no citoplasma. A associação do pré-rRNA 35S com diversos fatores de processamento forma diferentes partículas pré-ribossômicas, sendo a primeira delas o complexo 90S (Warner et al., 1972), que contém o pré-rRNA de 35S, e as partículas 66S e 43S dele derivadas, precursoras das subunidades ribossomais 60S e 40S.

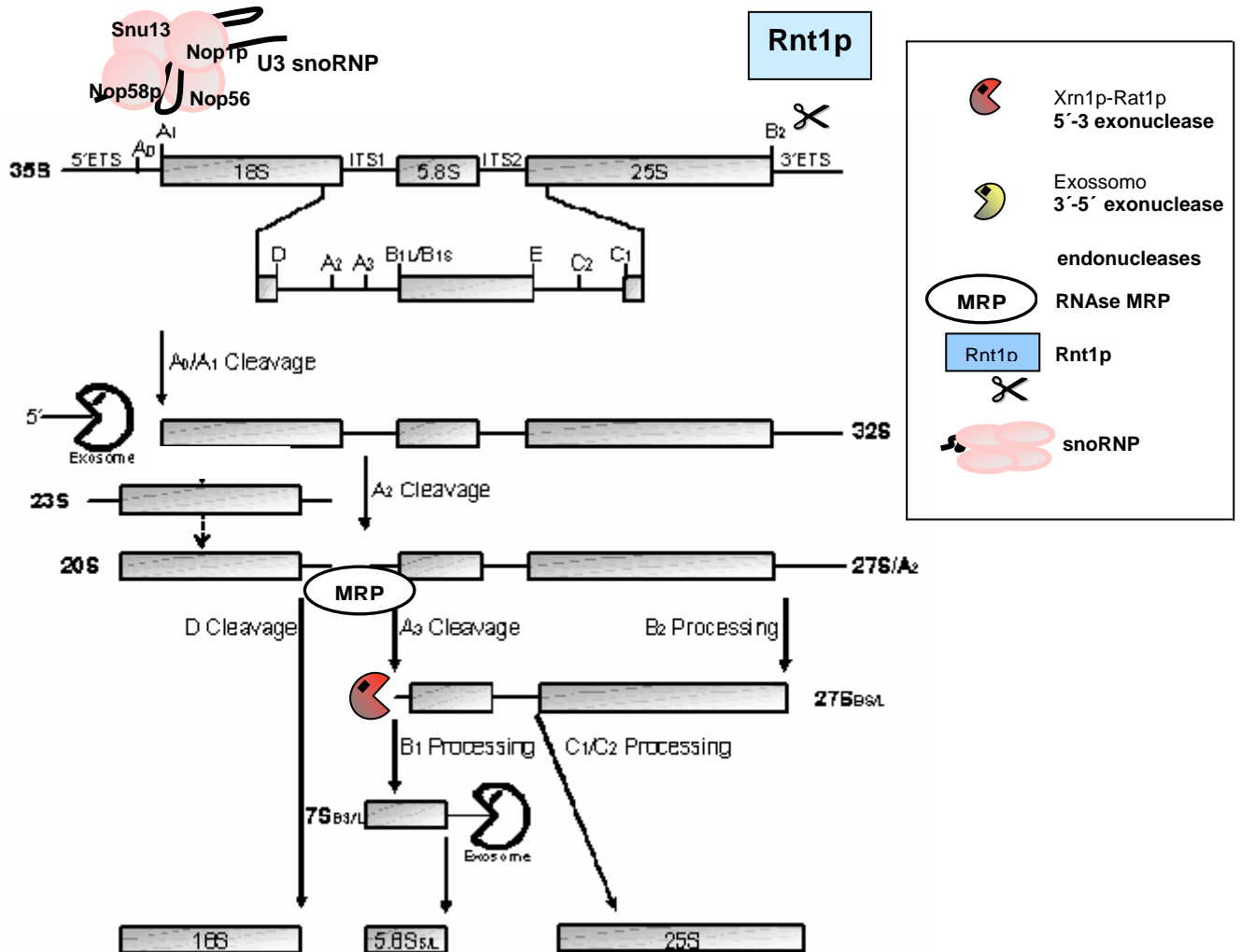


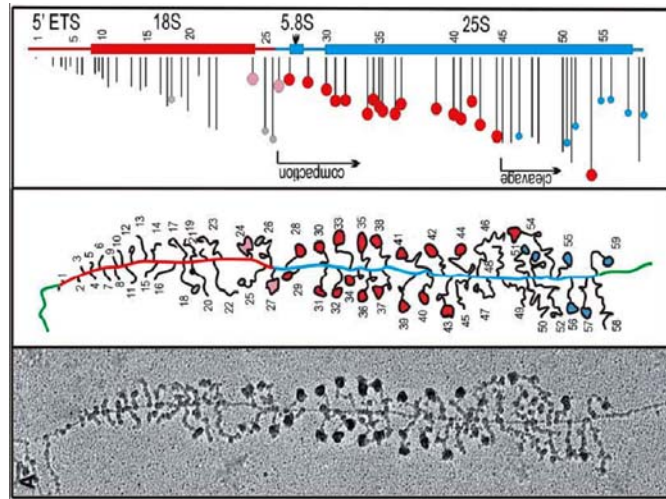
Figura 2. Processamento de Pré-rRNA. Transcrição do pré-rRNA 35S, seguido pelo processamento de rRNA e modificação de nucleotídeos, resultando em 25S/28S, 18S, 5.8S rRNA maduros. Processamento do pré-rRNA 35S inicia-se com clivagens endonucleolíticas nos sítios A0 e A1 no 5'-ETS, gerando o pré-rRNA 32S. A clivagem subsequente no sítio A2, em ITS1, gera os pré-rRNAs 20S e 27SA2. O pré-rRNA 20S é então processado no sítio D para gerar o rRNA 18S maduro. O caminho principal de processamento do 27SA2 envolve clivagem no sítio A3, produzindo 27SA3, cuja extremidade 5' é digerida rapidamente por exonucleases para gerar o 27SBs (27SB short). O passo de processamento subsequente ocorre no sítio B2, no 3' terminal do rRNA 25S maduro. Processamento nos sítios C1 e C2 separa o rRNA 25S maduro do 7S_s. Esse pré-rRNA é subsequentemente processado exonucleoliticamente para gerar o 5.8S_s maduro. A outra fração do 27SA2 é processada na extremidade 5' por um mecanismo diferente e, após processamento nos sítios remanescentes, gera o 5.8S_L (5.8S long), que é 6-8 nucleotídeos mais longo que o 5.8S_s na extremidade 5'.

1.2. Pré-ribossomo 90S e SSU processomo

A síntese de ribossomos requer uma interação precisa e eficiente entre os fatores que estão envolvidos no processo, sendo que a maquinaria de transcrição está fortemente associada aos fatores responsáveis pelas etapas iniciais de processamento do rRNA, modificação, enovelamento, e associação das proteínas ribossomais ao longo do rRNA. Vários experimentos sugerem que os fatores necessários para o processamento do rRNA se associam co-transcricionalmente a ele, que podem ser visualizados como “bolas terminais” na extremidade 5' de cada pré-rRNA sendo transcrito (Miller and Beatty, 1969; Mougey et al., 1993; Fig. 3A).

Essas bolas terminais são formadas por componentes que atuam nos passos iniciais do processamento de rRNA, como o snoRNP U3 e os fatores associados a ele (Dragon et al., 2002; Pérez-Fernández et al., 2007). Em mutantes de deleção do snoRNA U3 ou mutantes de proteínas específicas do snoRNP U3 observa-se o desaparecimento dessas bolas terminais (Dragon et al., 2002). Este complexo snoRNP U3 é de alto peso molecular (maior que 2 MDa), denominado de SSU (**S**mall **S**ubunit **P**rocessome) e contém 35 proteínas não-ribossomais que se ligam ao snoRNA U3 (Proteínas Utp 1-18, 20-22, Noc4p, Nop1p, Nop56p, Nop58p, Snu13p, Mpp10p, Imp3p, Imp4p, Dhr1p, Rrp9p, Rrp5p, Emg1p, e Krr1p), e 5 proteínas ribossomais (Rps4p, Rps6p, Rps7p, Rps9p, e Rps14p; Dragon et al., 2002). Dentre as proteínas Utps, algumas foram caracterizadas como t-Utps que se associam ao 5'-ETS co-transcricionalmente e são importantes para que o pré-rRNA seja transcrito, podendo atuar como fatores de transcrição da RNA Pol I (Gallagher et al., 2004; Fig.3B).

A



B

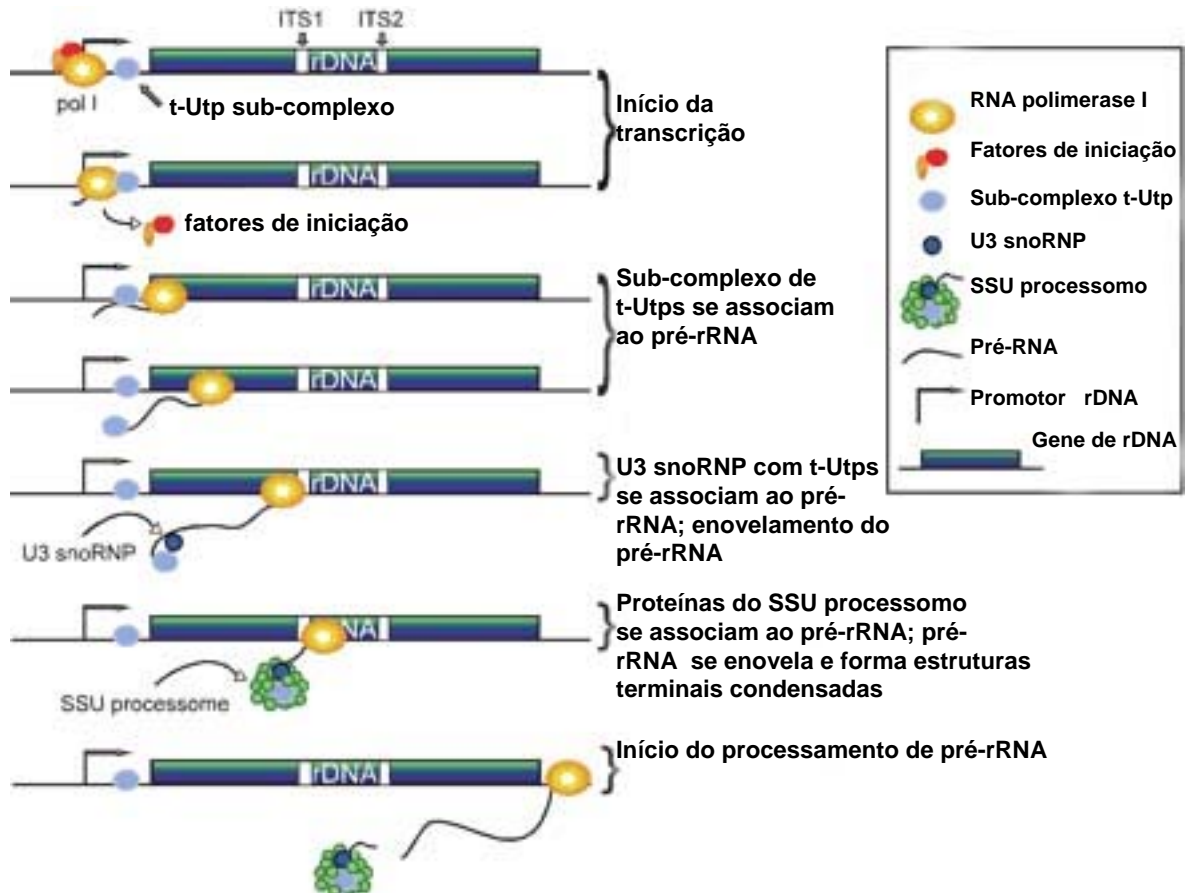


Figura 3. Associação co-transcricional de fatores protéicos na extremidade 5' do pré-rRNA 35S. (A) Visualização por microscopia eletrônica do pré-rRNA 35S nascente em *Saccharomyces cerevisiae* (extraído de Osheim et al., 2004). (B) Esquema da associação co-transcricional do snoRNP U3 e outros fatores do SSU processomo ao pré-rRNA (adaptado de Gallagher et al., 2004).

O pareamento de bases do snoRNA U3 na extremidade 5' do pré-rRNA 35S é necessário para que as clivagens iniciais ocorram (Beltrame and Tollervey, 1995; Hughes and Ares, 1991). Além do U3 snoRNP, o snoRNP de box C/D U14 e os snoRNPs de box H/ACA snR10 e snR30 também estão envolvidos nas reações iniciais de clivagem endonucleolítica do pré-rRNA 35S (Li et al., 1990; Morrisey and Tollervey, 1993; Tollervey, 1987).

Essas clivagens ocorrem rapidamente e iniciam a formação das subunidades maduras. Alguns fatores do 90S permanecem associados ao 20S, gerando o subcomplexo pré-40S, enquanto outros se associam ao 27S pré-rRNA, gerando o pré-60S (Baßler et al., 2001). Mutações em componentes presentes no complexo 90S levam a defeitos nos passos iniciais do processamento, inibindo especificamente a síntese, montagem e exportação da subunidade 40S, sem bloquear o processamento do pré-60S. Apenas alguns componentes identificados previamente nos pré-ribossomos 60S foram encontrados também na partícula 90S, o que indica que sua associação ao pré-rRNA ocorra muito antes das etapas de processamento do 60S, nas quais estão envolvidos (Nissan et al., 2002). Está claro, portanto, que os pré-ribossomos sofrem durante sua maturação uma extensiva mudança de composição com o tempo. À medida que as partículas pré-60S migram do nucléolo para o nucleoplasma seu conteúdo de fatores não-ribossomais se torna menor (Fatica et al., 2002a; Nissan et al., 2002). Isso permite concluir que os caminhos de síntese das subunidades 60S e 40S apresentam certa autonomia entre si (Grandi et al., 2002; Venema and Tollervey, 1995). Após a separação nítida das duas partículas, observa-se também a separação dos fatores que, em geral, atuam na maturação de só um dos complexos pré-ribossomais (Liang and Fournier, 1997; Trapman et al., 1975; Fig. 4).

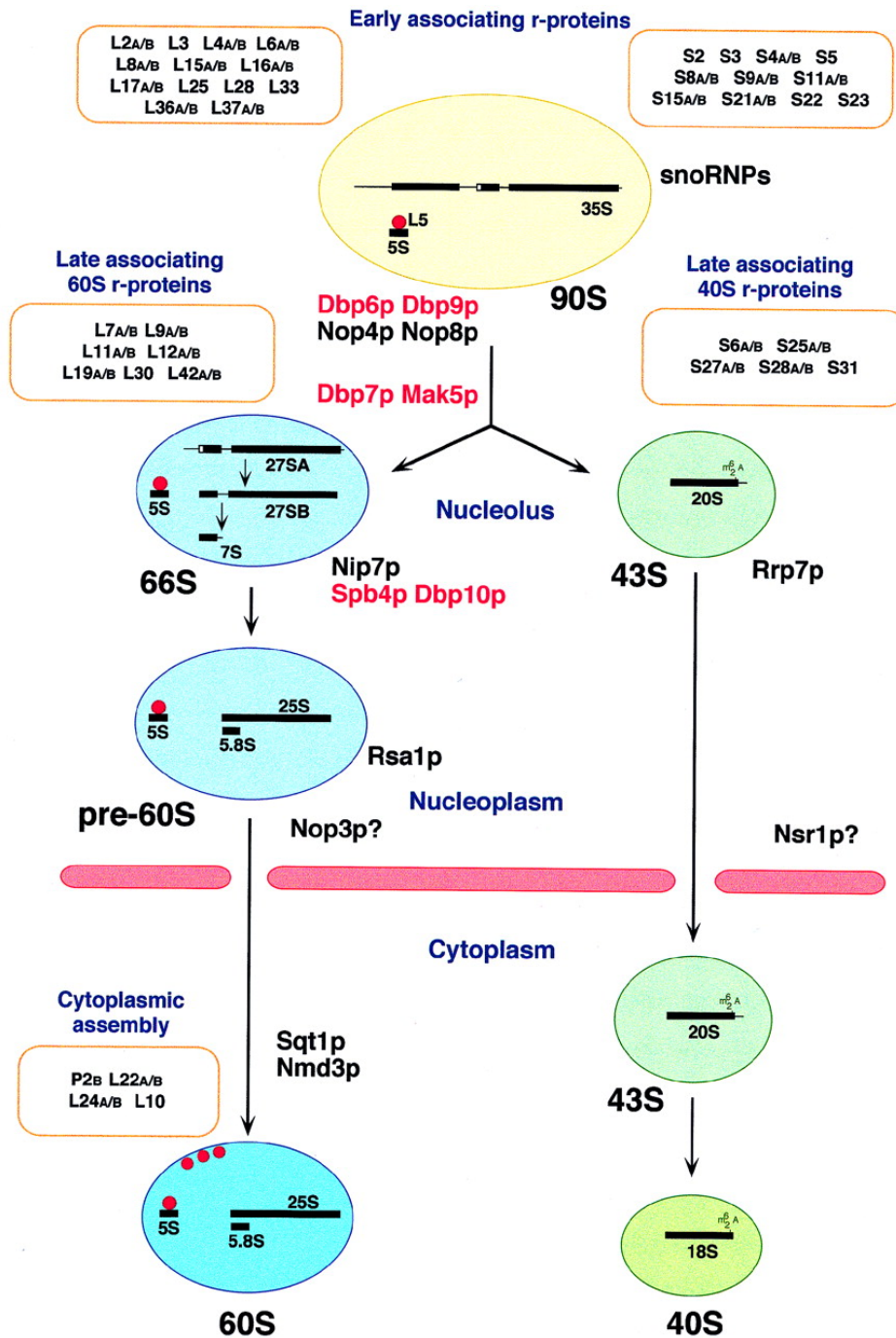


Figura 4. Modelo da associação de fatores ribossomais e não-ribossomais ao rRNA (extraído de Kressler et al., 1999).

1.3. Maturação da subunidade ribossomal 40S (pré-40S)

O complexo pré-40S contém fatores do processamento do rRNA 18S, como Dim2p e o SSU processomo, e algumas proteínas ribossomais da subunidade menor que se associam cedo ao pré-rRNA e também participam do processamento do pré-18S (Dragon et al., 2002; Ferreira-Cerca et al., 2005). Além desses, também fazem parte do pré-40S fatores que se associam ao pré-rRNA na fase de 90S, como Enp1p, Dim1p, Hrr25p, e Rrp21p, e fatores que se associam ao pré-40S posteriormente, depois das clivagens em A₀-A₂, como Nob1p, Rio2p e Trs1p (Grandi et al., 2002; Schafer et al., 2003). Dim1p é uma metil transferase que metila a extremidade 3' do pré-rRNA 20S, Trs1p está relacionada à GTPase Bms1p, e Rio2p, é um marcador do pré-40S citoplasmático, e a possível quinase importante na clivagem citoplasmática do 20S (Lafontaine et al., 1998; Vanrobays et al., 2003; 2004).

Ao contrário do pré-60S, o pré-40S parece não conter GTPases, e ATPases do tipo AAA, o que sugere que menos rearranjos estruturais ocorram no 40S, comparado à formação do 60S. Conseqüentemente, as subunidades 40S podem transitar para o nucleoplasma mais rapidamente. De fato, as partículas pré-40S não são detectadas no nucleoplasma, e através de microscopia eletrônica e fracionamento celular em levedura é possível observar que o 40S e o 60S passam pelos compartimentos nucleolar e nucleoplásmico com cinéticas diferentes (Gleizes et al., 2001; Udem and Warner, 1973).

1.4. Maturação da subunidade ribossomal 60S (pré-60S)

As primeiras partículas pré-ribossomais isoladas por TAP foram as do pré-60S (Babler et al., 2001; Fatica et al., 2002b; Harnpicharnchai et al., 2001; Saveanu et al., 2001). As partículas do pré-60S contêm o rRNA 27S, (precursor de 25S e 5.8S), várias proteínas da subunidade maior (L-ribossomais), e uma variedade de fatores não-ribossomais (Babler et al., 2001). Como algumas proteínas ribossomais se ligam no início da transcrição do pré-rRNA, também apresentam um papel importante no processamento deste. Por exemplo, Rpl3p e o complexo não-ribossomal IPI (*involved in processing of ITS2*, composto por três proteínas denominadas Ipi1p, Ipi2p, and Ipi3p), estão envolvidos nas clivagens em ITS2,

sendo que sua deleção leva ao acúmulo de pré-rRNAs 35S e 27S, e diminuição dos níveis de 25S maduro (Krogan et al., 2004; Rosado et al., 2007) .

Os fatores não-ribossomais associados aos complexos do pré-60S podem ser agrupados em cinco categorias:

1. Fatores que estão associados apenas com as partículas iniciais do pré-60S no nucléolo (como Cbf5p, Ssf1p, e Ssf2p), consistente com o papel em etapas iniciais do processamento de pré-rRNA incluindo clivagem, e modificação por pseudouridinação ou metilação (Nissan et al., 2002);
2. Fatores que se ligam ao pré-60S cedo no nucléolo e acompanham as subunidades pela passagem nos poros nucleares (inclui GTPases – Fuentes et al., 2007; Saveanu et al., 2003).
3. Fatores necessários para o transporte intranuclear (como é o caso de proteínas Noc – Milkereit et al., 2001);
4. Fatores que se associam aos ribossomos pré-60S em etapas tardias, no nucleoplasma (como a Rea1p – Galani et al., 2004), mas são liberadas das partículas antes da exportação para o citoplasma;
5. Possíveis fatores transportadores núcleo-citoplasmáticos (Nmd3p, Xpo1p, Mtr2p – Ho et al., 2000a,b), que se associam às complexos pré-60S imediatamente antes da passagem pelos poros nucleares.

O perfil de sedimentação em gradiente de sacarose e a identificação dos fatores envolvidos nas diferentes etapas de maturação da subunidade ribossomal maior, permitiram desenhar uma possível rota para o processamento da partícula:

1. Partículas nucleolares (presença dos fatores Nsa3p e Nop7p - Adams et al., 2002; Fatica et al., 2003);
2. Partículas nucleolares/nucleoplasmáticas (contêm Nug1p - Baßler et al., 2001);
3. Partículas nucleoplasmáticas (Rix1p e Sda1p - Dez et al., 2006; Gadai et al., 2001);
4. Partículas nucleoplasmáticas/citoplasmáticas (Arx1p - Demoinet et al., 2007; Hung and Johnson, 2006);
5. Partículas citoplasmáticas (Kre35p - Johnson et al., 2002; Nissan et al., 2002; Pertschy et al., 2007).

De forma interessante, a maioria dos fatores ditos do "core" do pré-60S, ou seja, que se associam ao pré-60S no nucléolo e o acompanham ao longo do processamento são proteínas que ligam nucleotídeos. É o caso das possíveis

GTPases como Nug1p, Nug2p, Nog1p e Kre35p ou membros da família AAA de ATPases (Rea1 e Rix7). A exportação do pré-60S por diferentes GTPases poderia ser uma forma de coordenar a maturação e o transporte de pré-ribossomos (Honma et al, 2006). Enquanto as AAA-ATPases podem apresentar atividade de chaperone, promovendo a dissociação de interações proteína-proteína, remodelando as subunidades do pré-60S, preparando-as para exportação para o citoplasma ou outros eventos, ou funcionar como motores moleculares para o processamento do pré-rRNA (Bleichert and Baserga, 2007; Vale, 2000).

Em resumo, cerca de 50 fatores não-ribossomais estão associados ao pré-60S no nucléolo e cerca de cinco fatores estão presentes no complexo após sua exportação para o citoplasma (Nissan et al., 2002). Portanto, fica evidente que os pré-ribossomos 60S sofrem um enorme rearranjo, com modificação do conteúdo de fatores, enquanto são transportados do nucléolo para o citoplasma.

1.5- O exossomo (complexo de 3'-5' exonucleases)

O complexo do exossomo desempenha um papel central no metabolismo de RNA, está envolvido em processamento de rRNAs e snoRNAs, degradação de mRNAs, e em controle de qualidade de todos os tipos de RNAs (Allmang et al., 1999a; Van Hoof et al., 2000a). É um complexo multienzimático com atividade exonucleolítica 3'-5' (Mitchell et al., 1997), que foi primeiro identificado em *Saccharomyces cerevisiae* e depois em vários outros organismos, de archaea a humanos. Há duas formas do exossomo em eucariotos, uma nuclear com onze subunidades e outra citoplasmática, com dez (Mitchell et al, 1997; Allmang et al., 1999a; Burkard and Butler, 2000). O exossomo citoplasmático atua no metabolismo de mRNAs, enquanto que o exossomo nuclear é responsável tanto pelo controle de qualidade e degradação de pré-mRNAs, pré-rRNAs e pré-tRNAs aberrantes, assim como também participa do processamento adequado da extensão 3' de mRNAs, alguns snoRNAs, snRNAs e do rRNA 5.8S (Allmang et al., 1999a; Van Hoof et al., 2000a).

As proteínas que fazem parte do complexo em levedura são: Rrp4p, Rrp40p, Rrp41p/Ski6p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p/Dis3p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p, Csl4p, e Rrp6p (Allmang et al., 1999a; Briggs et al., 1998; Mitchell et al., 1997; Fig. 5A). Várias das subunidades do exossomo apresentam domínios de ribonucleases

(Rrp6p, Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p, Rrp45p, Rrp46p e Mtr3p, enquanto que Rrp4p, Rrp40p e Csl4p têm domínios de ligação a RNA (Burkard and Butler, 2000; Mitchell et al., 1997; Tabela 1).

No processamento de pré-rRNA, o exossomo é responsável pela degradação do espaçador 5'-ETS e pela digestão exonucleolítica 3'-5' da extensão 3' do intermediário 7S, formando a extremidade 3' madura do 5.8S, processo no qual o complexo Rex também está envolvido (Mitchell et al., 1997; Van Hoof et al., 2000a). Mutantes de deleção de qualquer uma das subunidades do exossomo geram fenótipos semelhantes, com acúmulo de pré-rRNAs 35S, 27S e 7S (Allmang et al., 2000; Mitchell et al., 1997; Oliveira et al., 2002; Van Hoof et al., 2000a; Zanchin and Goldfarb, 1999b). Apesar disso, deleção de *RRP6* resulta em fenótipos um pouco diferentes. A depleção de Rrp6p não causa alteração nos níveis de 27S, mas somente o acúmulo do 5.8S com uma extensão de 30 nucleotídeos na extremidade 3' (Briggs et al., 1998), o que gerou o modelo de que o exossomo seja o responsável por processar o 5.8S rRNA até 30 nucleotídeos, e Rrp6p seja responsável pelo processamento a partir desse ponto (Allmang et al., 1999b).

Com dito acima, o exossomo apresenta dois tipos de substratos, um deles sendo processado em sua via de maturação, através da remoção de nucleotídeos até um determinado ponto, enquanto que o outro é submetido à rápida e completa degradação. Para que o exossomo possa distinguir esses dois tipos de substratos, são necessários sinais contidos nas seqüências dos RNAs, ou sua associação com proteínas específicas, ligadas aos RNAs (Houseley et al., 2006). Uma das proteínas que interagem com o exossomo é Rrp47p, que também participa do processamento 3'-5' de RNAs nucleares estáveis (Mitchell et al., 2003). O exossomo também se associa com o complexo nuclear TRAMP (recentemente caracterizado e composto pelos fatores Mtr4p-Air1/Air2p-Trf4p/Trf5p), responsável pela poliadenilação de RNAs que serão destinados à degradação pelo exossomo (Kadaba et al., 2004; LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wyers et al., 2005). Trf4p e Trf5p são poli(A) polimerases, Mtr4p é uma RNA helicase dependente de ATP, e Air1p ou Air2p são proteínas que ligam RNA através do seu motivo de zinco (LaCava et al., 2005). TRAMP é classificado como TRAMP4 ou TRAMP5, dependendo da presença de Trf4p ou Trf5p, que podem ser específicas para a poliadenilação de determinados RNAs (Dez et al., 2007). O modelo de associação exossomo-TRAMP sugere que TRAMP adicione uma cauda de poli-A a RNAs, formando uma extensão de fita

simples na extremidade 3', o que possibilita a degradação desses RNAs pelo exossomo (Schneider et al., 2007; Fig.5B).

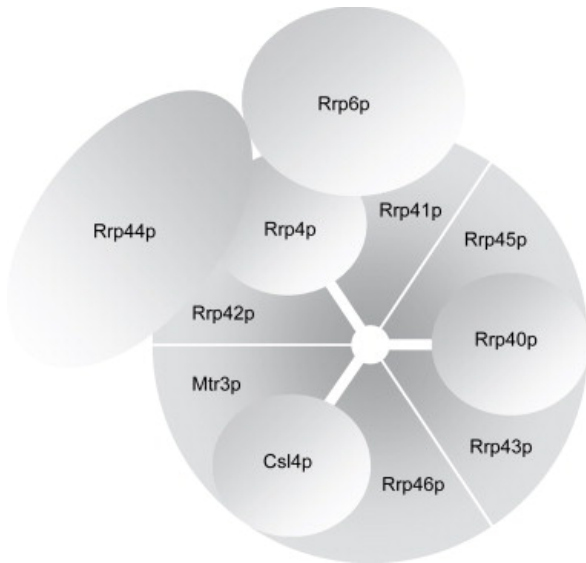
A identificação dos fatores que interagem com o exossomo é, portanto, extremamente importante para a determinação da regulação desse complexo. Além das interações listadas acima, outras foram identificadas, que são determinantes para o correto processamento de pré-rRNA e degradação de mRNAs. Dentre as interações já identificadas, o complexo nuclear Lsm, o complexo Rex, Mtr4p (Dob1p) e a proteína nucleolar Nip7p interagem com o exossomo e participam do processamento de rRNA, influenciando a formação do rRNA 5.8S maduro (Allmang et al., 2000; Kufel et al., 2003; van Hoof et al., 2000b; Zanchin et al., 1997; Zanchin and Goldfarb, 1999a). O complexo Ski, formado pelas proteínas Ski2p, Skip3p e Ski8p, é outro cofator do exossomo atuando na degradação 3'-5' de mRNAs citoplasmáticos (Brown et al., 2000; Wang et al., 2005).

A interação entre a subunidade do exossomo Rrp43p e a proteína nucleolar Nop17p foi identificada em nosso laboratório e a função dessa última foi caracterizada (Gonzales et al., 2005). Nop17p interage com a proteína Nop58p, subunidade do "core" de snoRNPs de box C/D, e atua na montagem e estabilização desses complexos, e portanto, afeta indiretamente o processamento de pré-rRNA (Gonzales et al., 2005). Em uma busca por outros fatores que interagem com Nop17p, foi identificada a nova proteína Nop53p, alvo deste estudo. Quando do início deste trabalho, as informações disponíveis sobre Nop53p indicavam que esta proteína estivesse presente nas partículas pré-60S (Baßler et al., 2001; Nissan et al., 2002). A partir dessas informações, este trabalho teve como objetivo a caracterização funcional de Nop53p. Nossos dados demonstram que Nop53p é uma proteína nucleolar essencial em *S. cerevisiae*, envolvida nas etapas finais de processamento de rRNA, que interage, além de Nop17p, com Nip7p e com a subunidade Rrp6p do exossomo e é um potencial fator estimulador do exossomo.

Tabela 1. Componentes do exossomo de *S.cerevisiae* e similaridade com proteínas de outros organismos (de acordo com Van Hoof et al., 1999)

Sub-unidades							
<i>S.cerevisiae</i>	Fenótipo	Similaridade	Atividade <i>in vitro</i>	Homólogos	Homólogos	Homólogos	Homólogos
		<i>E.coli</i>		<i>H.sapiens</i>	<i>T.brucei</i>	<i>A.Thaliana</i>	<i>Archae</i>
<u>“ core ”</u>							
Rrp4p	essencial	S1 RNA BP	3' exo hidrolase	hRrp4p	TbRrp4p	AtRrp4p	aRrp4p
Rrp40p	essencial	S1 RNA BP		hRrp40p	TbRrp40p	AtRrp40p	
Rrp41p-Ski6p	essencial	RNase PH	3' exofosforilase	hRrp41p	TbRrp41p	AtRrp41p	aRrp41p
Rrp42p	essencial	RNase PH		HRrp42p	TbEAP1p	AtRrp42p	aRrp42p
Rrp43p	essencial	RNase PH		OIP2	TbEAP2p	AtRrp43p	aRrp42p
Rrp44p-Dis3p	essencial	RNase II	3' exohidrolase	hDis3p	TbRrp44p		
Rrp45p	essencial	RNase PH		PMSci-75	TbRrp45p	AtRrp45p	aRrp41p
Rrp46p	essencial	RNase PH		hRrp46p	TbRrp41B	AtRrp46p	aRrp41p
Mtr3p	essencial	RNase PH		HMtr3p	TbEAP4p		aRrp42p
Csl4p	essencial	S1 RNA BP		CSL4	TbCsl4p		aCsl4p
<u>nuclear</u>							
Rrp6p	ts letal	RNase D	3' exohidrolase	PM-Sci100	TbRrp6p	AtRrp6p	
<u>co-fatores</u>							
Mtr4p		RNA helicase					
Ski2p		RNA helicase					
Ski3p		domínios TPR					
Ski8p		domínios WD					
Rrp47p		Interage com RNA					
Trf4p/Trf5p		PAP					

A



B

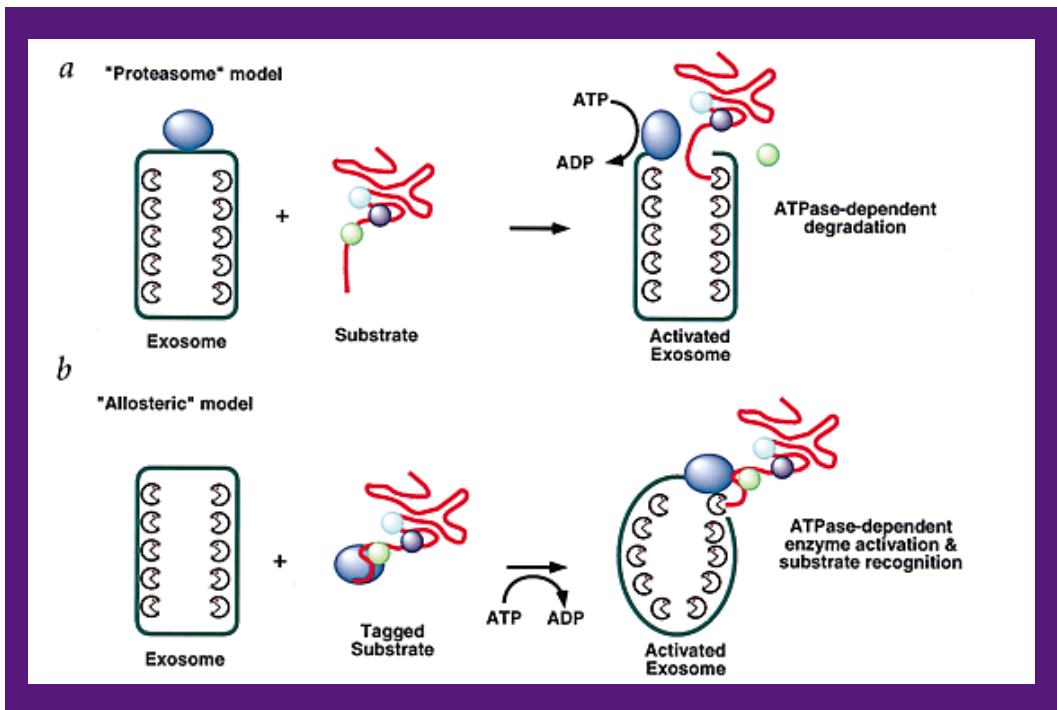


Figura 5. Estrutura e função do exossomo. (A) Modelo de interações entre a subunidades do exossomo obtido por análise de duplo-híbrido (extraído de Luz et al., 2007). **(B)** Modelo de atividade do exossomo auxiliado por co-fatores (extraído de Mitchell et al., 2001).

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Dados disponíveis no site de levedura SGD (Sacharomyces Genome Database) e aqueles mencionados acima indicavam que a proteína Nop53p estivesse envolvida em processamento de rRNA e/ou no transporte de ribossomos do núcleo para o citoplasma. Dados obtidos em nosso laboratório indicavam a interação entre Nop53p e outra proteína envolvida no processamento de rRNA, Nop17p. A partir dessas informações, este trabalho teve como objetivo a caracterização da função de Nop53p.

2.2. Objetivos específicos

- Identificação de proteínas que interagem com Nop53p e confirmação das interações detectadas por duplo-híbrido.
- Caracterização do papel de Nop53p no processamento de pré-rRNA.
- Análise da atividade de Nop53p *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas, plasmídeos e oligonucleotídeos

As cepas utilizadas neste trabalho estão descritas nas tabelas 2 e 3. Os plasmídeos utilizados estão descritos na tabela 4. A lista de oligonucleotídeos utilizados encontra-se na tabela 5.

3.1.1. Cepas de levedura e bactéria

•Tabela 2. Lista de cepas de levedura usadas neste estudo

Cepas	Características relevantes	Fonte de referência
<i>S.cerevisiae</i>		
NOP53	2n MATa/ α , his3 Δ 1/ his3 Δ 1 leu2 Δ 0/ leu2 Δ 0, lys2 Δ 0/LYS2 ura3 Δ 0/ ura3 Δ 0 met15 Δ 0/MET15 NOP53/NOP53	Euroscarf
Δ nop53 2n	MATa/ α , his3 Δ 1/ his3 Δ 1 leu2 Δ 0/ leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/LYS2 ura3 Δ 0/ ura3 Δ 0 MET15/met15 Δ 0 NOP53/NOP53::KAN ^R	Euroscarf
Δ nop53/GAL:: NOP53	n MATa, MET15 his3 Δ 1 leu2 Δ 0 ura3 Δ 0 NOP53::KAN ^R /YCpGAL-A-NOP53	Este estudo
BY4743	MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1ura3-1 can-100	Research Genetics
W303	MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-100	
L40	MATa his3d200 trp1-901 leu2-3,311 ade2 lys2-801am URA3::(<i>lexAop</i>)8-lacZ LYS2::(<i>lexAop</i>)4-HIS3	Vojtek and Hollenberg, 1995
L40-41	L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP8	Zanchin & Goldfarb, 1999a
L40-61	L40, pBTM-NIP7, pACT-RRP43	Zanchin & Goldfarb, 1999a
YDG-146	L40, pBTM-NOP53	Este estudo
YDG-147	L40, pBTM-NOP53, pGAD-NOP17	Este estudo
YDG-148	L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP53	Este estudo
YDG-149	Δ nop53, pGFP-N-FUS, pRS-GAL-His-NOP53	Este estudo
YDG-150	Δ nop53, pGFP-N-FUS-NOP53	Este estudo

YDG-151	$\Delta nop53$, YCp33GAL-A-NOP53	Este estudo
YDG-152	NOP53, YCp33GAL-A	Este estudo
YDG-153	NOP53, YCp33GAL-A-NOP53	Este estudo
YDG154	NOP53, YCp33GAL-A-N-NOP53	Este estudo
YDG155	NOP53, YCp33GAL-A-C-NOP53	Este estudo
YDG156	$\Delta nop53$, YCp33GAL-A-NOP53, pGAD-NOP53	Este estudo
YDG157	$\Delta nop53$, YCp33GAL-A-NOP53, pGAD-N NOP53	Este estudo
YDG158	$\Delta nop53$, YCp33GAL-A-NOP53, pGAD-C-NOP53	Este estudo
YDG159	$\Delta nop53$, YCp33GAL-A-NOP53, pGADC2	Este estudo
YDG160	NOP53, pGFP-N-NOP53, pRFP-NOP1	Este estudo
YDG161	NOP53, pGFP-C-NOP53, pRFP-NOP1	Este estudo
YDG162	L40, pBTM-NIP7, pGADC2-N-NOP53	Este estudo
YDG163	L40, pBTM-NIP7, pGADC2-C-NOP53	Este estudo
YDG164	L40, pBTM-N-NOP53, pACT-NOP17	Este estudo
YDG165	L40, pBTM-N-NOP53, pACT-N-NOP17	Este estudo
YDG166	L40, pBTM-N-NOP53, pACT-C-NOP17	Este estudo
YDG167	L40, pBTM-C-NOP53, pACT-NOP17	Este estudo
YDG168	L40, pBTM-C-NOP53, pACT-N-NOP17	Este estudo
YDG169	L40, pBTM-C-NOP53, pACT-C-NOP17	Este estudo
YFG-131	L40, pBTM-NOP17	Gonzales et al., 2005
YFG-247	L40, pBTM-NOP17, pACT-NOP53	Gonzales et al., 2005

•Tabela 3. Lista de cepas de bactéria usadas neste estudo

Cepas <i>E.coli</i>	Características relevantes	Fonte de referência
BNN132	ATCC 47059	Elledge et al., 1991
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\phi 80 lacZ \Delta M15$) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983
DH10B	<i>F mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Delta 80dlac$ $Z \Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR recA1 endA1 araΔ139</i> $\Delta(ara,leu)$ 7697 <i>galU galKl-rpsL nupG</i>	Grant et al., 1990
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mtl-1</i>	Bolívar & Backman, 1979
BI21 Codon-Plus (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>dcm+</i> Tet ^r gal I (DE3) <i>endA Hte</i> [argU ileY leuW Cam ^r]*	Stratagene

3.1.2. Plasmídeos

▪ **Tabela 4.** Lista de plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeos	Características relevantes	Fonte de referência
pACT-cDNA	<i>ADGAL4::cDNA</i> library, <i>LEU2</i> 2µm	ATCC, 87002
pACT-NOP8	<i>ADGAL4::NOP8</i> , <i>LEU2</i> 2µm	Zanchin & Goldfarb, 1999
pACT-NOP17	<i>ADGAL4::NOP17</i> , <i>LEU2</i> 2µm	Oliveira et al., 2002
pACT-NOP53	<i>ADGAL4::NOP53</i> , <i>LEU2</i> 2µm	Este estudo
pBTM-116	<i>BDIexA</i> , <i>TRP1</i> 2µm	Bartel & Fields, 1995
pBTM-NIP7	<i>BDIexA::NIP7</i> , <i>TRP1</i> 2µm	Zanchin & Goldfarb, 1999
pBTM-NOP17	<i>BDIexA::NOP17</i> , <i>TRP1</i> 2µm	Gonzales et al., 2005
pBTM-N-NOP17	<i>BDIexA::NOP17</i> 567-344, <i>LEU2</i> 2 µm	Este estudo
pBTM-C-NOP17	<i>BDIexA::NOP17</i> 1-549, <i>LEU2</i> 2 µm	Este estudo
pBTM-NOP53	<i>BDIexA::NOP53</i> , <i>TRP1</i> 2µm	Este estudo
pBTM-N-NOP53	<i>BDIexA::NOP53</i> 1-270, <i>LEU2</i> 2 µm	Este estudo
pBTM-C-NOP53	<i>BDIexA::NOP53</i> 270-456, <i>LEU2</i> 2 µm	Este estudo
pCFUS-A-NIP7	<i>MET25::A-NIP7</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pCFUS-A-NOP8	<i>MET25::A-NOP8</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pCFUS-A-RRP43	<i>MET25::A-RRP43</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	Este estudo
pET-28a	Kan ^R	Novagen
pET-28-MTR4	<i>His::MTR4</i> , Kan ^R	Este estudo
pET-28-NIP7	<i>His::NIP7</i> , Kan ^R	Coltri et al., submetido
pET-28-NOP17	<i>His::NOP53</i> , Kan ^R	Gonzales et al., 2005
pET-28-NOP53	<i>His::NOP53</i> , Kan ^R	Este estudo
pGADC2	<i>ADGAL4</i> , <i>LEU2</i> 2µm	James et al., 1996
pGAD-NOP17	<i>ADGAL4::NOP17</i> , <i>LEU2</i> 2µm	Gonzales et al., 2005
pGADC2-N-NOP17	<i>ADGAL4::NOP17</i> 567-344, <i>LEU2</i> 2 µm	Dados não publicados
pGADC2-C-NOP17	<i>ADGAL4::NOP17</i> 1-549, <i>LEU2</i> 2 µm	Dados não publicados
pGAD-NOP53	<i>ADGAL4::NOP53</i> , <i>LEU2</i> 2µm	Este estudo
pGADC2-N-NOP53	<i>ADGAL4::NOP53</i> 1-270, <i>LEU2</i> 2 µm	Dados não publicados
pGADC2-C-NOP53	<i>ADGAL4::NOP53</i> 270-456, <i>LEU2</i> 2 µm	Dados não publicados
pGEM-T-5.8S	Amp ^R	Granato et al., 2005
pGEX-4T	Amp ^R	GE Healthcare
pGEX-MTR3	<i>GST::MTR3</i> , Amp ^R	Tavares, 2004
pGEX-NOP17	<i>GST::NOP17</i> , Amp ^R	Gonzales et al., 2005
pGEX-C-NOP53	<i>GST::C-NOP53</i> , Amp ^R	Este estudo
pGEX-N-NOP53	<i>GST::N-NOP53</i> , Amp ^R	Este estudo
pGEX-RRN3	<i>GST::Rrn3</i> , Amp ^R	Este estudo

pGEX-RRP6	<i>GST::RRP6</i> , Amp ^R	Este estudo
pGFP-C-FUS	<i>MET25::GFP, URA3, CEN6</i>	Niedenthal et al., 1996
pGFP-N-FUS	<i>MET25::GFP, URA3, CEN6</i>	Niedenthal et al., 1996
pGFP-NOP53	<i>MET25::GFP-NOP53, URA3, CEN6</i>	Niedenthal et al., 1996
pGFP-C-NOP53	<i>MET25::GFP-C-NOP53, URA3, CEN6</i>	Este estudo
pGFP-N-NOP53	<i>MET25::GFP-N-NOP53, URA3, CEN6</i>	Este estudo
pGFP-RRP43	<i>MET25::GFP-RRP43, URA3, CEN6</i>	Zanchin & Goldfarb, 1999b
pKTM-116	<i>BdlexA, TRP1 2µm</i>	Zanchin, não publicado
pKTM-NOP53	<i>BdlexA::NOP53, TRP1 2µm</i>	Este estudo
pRFP-NOP1	<i>ADH1 ::RFP-NOP1, LEU2 2µm</i>	Gonzales et al, 2005
pRS313	pBluescript, <i>HIS3, CEN6, ARSH4</i>	Sikorski & Hieter, 1989
pRS-GAL-His-NOP53	<i>GAL1::His-NOP53, HIS3, CEN4</i>	Este estudo
YCplac33	pUC19-MCS, <i>URA3 CEN4</i>	Gietz & Sugino, 1988
YCplac33GAL-A	<i>GAL1::ProtA, URA3, CEN4</i>	Luz et al., 2007
YCp33GAL-A-NOP53	<i>GAL1::ProtA-NOP53, URA3, CEN4</i>	Este estudo
YCp33GAL-A-C-NOP53	<i>GAL1::ProtA-C-NOP53, URA3, CEN4</i>	Este estudo
YCp33GAL-A-N-NOP53	<i>GAL1::ProtA-N-NOP53, URA3, CEN4</i>	Este estudo
YCplac111	pUC19-MCS, <i>LEU2, CEN4</i>	Gietz & Sugino, 1988
YCplac111-His-NOP53	<i>GAL1::His-NOP53, LEU2, CEN4</i>	Este estudo

3.1.3. Oligonucleotídeos

▪ **Tabela 5.** Oligonucleotídeos de DNA usados em experimentos de hibridização de Northern blot, primer extension, RT-PCR ou PCR

Oligo	Sequência	Fonte de referência
UA0(P1)	5'-GGT CTC TCT GCT GCC GGA AAT G-3'	Zanchin et al., 1997
18S(P2)	5'-CAT GGC TTA ATC TTT GAG AC-3'	Fatica et al., 2002a
UA2(P3)	5'-GCT CTC ATG CTC TTG CCA AAA C-3'	Zanchin et al., 1997
5.8S(P4)	5'-CGT ATC GCA TTT CGC TGC GTT C-3'	Zanchin et al., 1997
DE-2(P5)	5'-CTC ACT ACC AAA CAG AAT GTT TGA GAA GG-3'	Oliveira et al., 2002
UC1(P6)	5'-GTT CGC CTA GAC GCT CTC TTC-3'	Zanchin et al., 1997

25S(P7)	5'-GCC GCT TCA CTC GCC GTT ACT AAG GC-3'	Gonzales et al., 2005
DA1U27	5'-TAA TCT TTG AGA CAA GCA TAT G-3'	Gonzales et al., 2005
DA-2	5'-TGT TAC CTC TGG GCC CCG-3'	Zanchin et al., 1997
DA-3	5'-CCA GTT ACG AAA ATT CTT G-3'	Zanchin et al., 1997
DA3-2	5'-AAT TTC CAG TTA CGA AAT TCT TGT TTT TGA C-3'	Zanchin et al., 1997
UC2	5'-GGC CAG CAA TTT CAA GTT AAC-3'	Zanchin et al., 1997
UA1	5'-CTT AAA AGA AGA AGC AAC AAG CAG-3'	Zanchin et al., 1997
3-ETS-21	5'- CCA CTT AGA AAG AAA TAA AAA ACA-3'	Zanchin et al., 1997
3-ETS-121	5'-CCC GGA TCA TAG AAT TCT TAA GAC-3'	Zanchin et al., 1997
5S	5'-GGT CAC CCA CTA CAC TAC TCG G-3'	Este estudo
Anti-U3	5'-ATG GGG CTC ATC AAC CAA GTT GG-3'	Oliveira & McCarthy, 1995
Anti-U14	5'-CTC AGA CAT CCT AGG AAG G-3'	Gonzales et al., 2005
Anti-snR11	5'-GAC GAA TCG TGA CTC TG-3'	Lanfontaine & Tollervey, 1999
Anti-snR37	5'-GAT AGT ATT AAC CAC TAC TG-3'	Lanfontaine & Tollervey, 1999
SEQ3GAD	5'-GAG GTT ACA TGG CCA AGA TTG-3'	Oliveira, não publicado
GALACTD	5'-TAC CAC TAC AAT GGA TC-3'	Oliveira, não publicado
pBTM SEQ3	5'-GTC ACT TTA AAA TTT GTA TAC AC-3'	Oliveira, não publicado
LEXASEQ	5'- CTT CGT CAG CAG AGC-3'	Oliveira, não publicado
T7TERMINADOR	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCGG-3'	Oliveira, não publicado
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Oliveira, não publicado
PL146 Bam	5'-GTT AAT <u>GGA TCC</u> TTT ATT TA-3'	Este estudo
PL146 Sal	5'-CTT GAT <u>GAG TCG ACG</u> TAT C-3'	Este estudo
146FOR	5'-ATG GCT CCAACTAATC TAAC-3'	Este estudo
146REV	5'-CTA TTT GAA GTC CTT ATG TGT CCA CTT T-3'	Este estudo
Bam146For600	5'- CGC <u>GGA TCC</u> TCA GAC CAA GTA C-3'	Este estudo

PstI146Rev640	5'- ACC CAC <u>TGC AGT</u> TAT GGC TCT ATA TC-3'	Este estudo
PstIRev60semter m	5'-AC CCA <u>CTG CAG</u> TGG CTC TAT ATC-3'	Este estudo
SallRev1443	5'- <u>GTC GAC</u> CTA CAA CTG GAT CTC ACG-3'	Este estudo
146Rev100	5'- CTA CGT CAG ATA AAT CG-3'	Este estudo
BamHIVRev965	5'- <u>GG ATC CCA</u> GCC TCC GGC CC-3'	Este estudo
PstIFor965	5'- <u>CTG CAG</u> GGG GAT GCC GAG GTC-3'	Este estudo
SallRev1443 (h146)	5'-CAA CGC <u>GTC GAC</u> CTA CAA CTG GAT CTC ACG-3'	Este estudo
Intergenic VII-1	5'-CCC ACC ACC GAT AAC GAC AAG-3'	Este estudo
Intergenic VII-2	5'-CCA ACA AAT GAG GCG GAA CC-3'	Este estudo
Intergenic V-1	5'-GGC TGT CAG AAT ATG GGG CCG TAG TA-3'	Este estudo
Intergenic V-2	5'-CAC CCC GAA GCT GCT TTC ACA ATA C-3'	Este estudo
CrVintergenicFor 9216	5'-GGA AAT GCG TAG GGA AGA CCA ATT TCA TGA CG-3'	Este estudo
CrVintergenicRev 9963	5'-GAT GCC TCT TTA GAA CAA GGT TAC AAA TCC TG- 3'	Este estudo
5S rRNA	5'- GGT CAC CCA CTA CAC TAC TCG G-3'	Este estudo
PL146For300	5'- GCA GCA CTA AAT CAC -3'	Este estudo
PL146For600	5'- CAG TCA GAC CAA GTA C-3'	Este estudo
PL146For900	5'- GGA TCT GAT AAG G-3'	Este estudo
PL146Rev1100	5' -CCT TGT TGC TAT C-3'	Este estudo
PL146REV518	5'- AAG GTA ATT TGA CCT TC-3'	Este estudo
PL146REV818	5' -CAT TGT CAT CTA AAG TT-3'	Este estudo
5'ETS For1	5'- ATG CGA AAG CAG TTG AAG AC- 3'	Este estudo
18S For 701	5' -TAT CTG GTT GAT CCT GCC AG-3'	Este estudo
ITS1 For2472	5' -CCG TAG GTG AAC CTG CGG AAG G -3'	Este estudo
5.8S For2865	5' - CTT TCA ACA ACG GAT CTC TTG G-3'	Este estudo
5.8S Rev 2945	5'- GAA TTC TGC AAT TCA CAT TA-3'	Este estudo
5.8SFor2865RNA	5'- CUU UCA ACA ACG GAU CUC UUG G-3'	Este estudo
5.8SFor2960RNA	5'- CUU UGA ACG CAC AUU GCG CCC-3'	Este estudo
ITS2 For 3020	5'-CCT TCT CAA ACA TTC TGT TTG G-3'	Este estudo
25S For 3252	5'-GTT TGA CCT CAA ATC AGG TAG G-3'	Este estudo
25S Rev3501	5'-CTC TTC GAA GCG ACT TTA CA-3'	Este estudo
Mut5.8SFor2940	5'-GAA TTC CGT GAA TCA TCG AAT ATT TTA AAT AAC ATT GCG CCC-3'	Este estudo

1RNaseH5.8S	5'-CCA AGA GAT CCG TTG TTG AAA G-3'	Este estudo
2RNaseH 5.8S	5'-GCG TTC TTC ATC GAT GCG AGA A-3'	Este estudo
3RNaseH5.8S	5'-ACA TTA CGT ATC GCA TTT CGC T-3'	Este estudo
4RNaseH5.8S	5'-GAT TCA CGG AAT TCT GCA ATT C-3	Este estudo
5RNaseH 5.8S	5'-AAT GTG CGT TCA AAG ATT CGA T-3'	Este estudo
6RNaseH5.8S	5'-CCC CTG GAA TAC CAA GGG GCG C-3'	Este estudo
7RNaseH5.8S	5'-AAA TGA CGC TCA AAC AGG CAT GC-3'	Este estudo
5.8SFor2865mut	5'-ATT TAA AAA ACG GAT CTC TTG GTT CTC GC-3'	Este estudo
5.8SFor2945	5'-GAA TTC CGT GAA TCA TCG AAT C-3'	Este estudo
5.8SRev2945	5'-GAA TTC TGC AAT TCA CAT TA-3'	Este estudo
SnR37For	5'-CCG ATT GGC AAA AAC-3'	Este estudo
SnR37Rev	5'-TGT TGG AGC ACA AGC AAG-3'	Este estudo
SnR74For	5'-GCT GCA GAA GAT GAAACA A-3'	Este estudo
SnR74Rev	5'-GCA TCA GAC ACT AAT TGC-3'	Este estudo
scR1Rev	5'-TCT AGC CGC GAG GAA GGA-3'	Baker & Parker, 2006

Os sítios de restrição inseridos na sequência dos oligonucleotídeos estão sublinhados.

3.1.4. Meios de cultura

Meios de cultura e soluções para bactérias foram preparados segundo protocolos de Sambrook et al. (1989) e meios e soluções usados com levedura foram preparados segundo protocolos de Sherman et al. (1986).

-Meio LB- 1% triptona; 1% NaCl; 0,5% extrato de levedura (2% ágar para meio sólido).

-Meio 2YT- 1,6% triptona; 0,5% NaCl; 1% extrato de levedura.

-Meio rico para levedura (YPD)- 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose (2% ágar para meio sólido).

-Meio rico para levedura (YPGal)- 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% galactose (2% ágar para meio sólido).

-Meio mínimo para levedura (YNBGlu)- 0,7% YNB; 2% glicose; suplementado com os aminoácidos necessários (2% ágar para meio sólido).

-Meio mínimo para levedura (YNBGal)- 0,7% YNB; 2% galactose; suplementado com os aminoácidos necessários (2% ágar para meio sólido).

-Meio YNB/X-Gal- 0,1M de fosfato de sódio pH 7,0; 0,7% YNB; 2% glucose; 2% ágar; suplementado com os aminoácidos adenina e histidina; foi adicionado 40µg/ml de X-Gal.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Manipulação de DNA

-Isolamento de DNA plasmidial de bactéria (miniprep)

Uma colônia de bactéria foi inoculada em 2mL de LB líquido contendo antibiótico para seleção. O inóculo foi incubado a 37°C sob agitação por uma noite. Após o crescimento, 1mL de cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante é descartado e as bactérias são ressuspensas em 100µl de GET (25mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM EDTA pH 8,0; 1% glicose) . A seguir foi adicionado na suspensão 200µl de solução SDS/NaOH (1% SDS, 200mM NaOH). A homogeneização foi feita por inversão e os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 150µl de 7,5M de acetato de amônio e a solução é misturada várias vezes por inversão e incubado por 5 minutos novamente. Os tubos são centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 500µl de isopropanol, agitado por inversão e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O pellet de DNA foi lavado com 500µl de 70% etanol, seguido por secagem e ressuspensado em 100µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0).

-Isolamento de DNA plasmidial de levedura

O volume de 5mL de cultura em fase estacionária foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante é desprezado e o pellet de células foi lavado com água estéril e ressuspensado em 200µl de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1% SDS; 100mM NaCl; 1mM EDTA). Foram adicionados 200µl de fenol clorofórmio e 0,2g de pérolas de vidro. O tubo foi agitado vigorosamente por 5 minutos, foi adicionado mais 200µl do tampão de lise e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi repetida a extração com fenol. Ao novo sobrenadante foi adicionado 200mM de NaCl e 500µl

de etanol absoluto. Após centrifugação de 10 minutos, o pellet foi lavado com 500µl de etanol 70%, o DNA foi secado, e ressuspendido em 10µl de TE.

-Isolamento de DNA genômico de levedura

O volume de 10 mL de cultura em fase estacionária foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e as células foram lavadas em água estéril. O pellet de células foi ressuspendido em 10mL de 1M sorbitol e 14mM de β-mercaptoetanol, incubado a 30°C por 30 minutos. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão de esferoplastização (0,9M sorbitol; 50mM Fosfato de sódio pH 7,5; 14mM β-mercaptoetanol) e foi adicionado 1mg de liticase, incubado por 37°C durante 30 minutos. Após centrifugação, o pellet foi ressuspendido em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 8,0; 1% SDS 1%; 20mM EDTA) e incubado a 65°C por 20 minutos. Foi adicionado 200µl de KOAc no gelo e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 50µl de TE pH 8,0.

- Análise de DNA e construção de plasmídeos

Clonagem e análise de DNA foram realizados como descrito por Sambrook et al (1989) e Sambrook and Russel (2001). DNA foi seqüenciado usando o método do Big Dye (Perkin-Elmer). Plasmídeos usados nesse estudo estão resumidos na Tabela 4 e estratégias de clonagem estão descritas resumidamente abaixo. A fusão *lexA::NOP53* usada no ensaio de duplo-híbrido foi construída inserindo um fragmento de DNA (BamHI- Sall) de 1.3 kb contendo a ORF *NOP53* amplificada por PCR no pBTM-116, que tinha sido previamente digerido com as enzimas de restrição BamHI-Sall, gerando o plasmídeo pBTM-NOP53. Plasmídeo pACT-NOP53 (14-456, números correspondem aos resíduos de aminoácidos de Nop53p codificado pelo clone de cDNA) carrega o gene codificando a proteína híbrida do domínio de ativação de transcrição de Gal4p e Nop53p. YCpGAL-A-NOP53 foi construído inserindo o fragmento NOP53 (BamHI-Sall) obtido de pBTM-NOP53 no vetor YCplac33GAL1-A, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. Plasmídeo pGFP-N-NOP53 foi construído inserindo o fragmento NOP53 (XbaI-Sall), obtido do vetor YCplac111GAL-HIS-NOP53 digerido com as mesmas enzimas de restrição, no vetor pGFP-N-FUS digerido com as enzimas de restrição SpeI-XhoI.

pRS-GAL-His-NOP53 foi obtido inserindo fragmento (BamHI-Sall) contendo a seqüência NOP53 e o fragmento (EcoRI-BamHI) contendo a seqüência GAL1-HIS no vetor PRS313 digerido com EcoRI-Sall. Para construção de pET-NOP53, o PCR amplificado da ORF *NOP53* (BamHI-Sall) foi inserido no vetor pET-28a digerido com as enzimas de restrição BamHI-XhoI. Depois de confirmada a presença do inserto, todos os clones são seqüenciados para controle da seqüência e fase de leitura.

Os fragmentos de DNA de *NOP53*, codificando as porções do N-terminal (de aminoácidos 1 ao 210) e C-terminal (de aminoácidos 210 a 456) da proteína, foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* e clonados nos vetores pBTM e pGADC2, para análise por duplo-híbrido, e no vetor YCplac33GAL-A, fusionado a proteína A (ProtA), sob controle do promotor de galactose, para análise funcional. Em seguida, os fragmentos de *NOP53* codificando as regiões N- e C-terminal foram clonados no vetor pGEX (GE Healthcare), usando os sítios de restrição *BamHI* e *Sall*, e *EcoRI* e *PstI*, respectivamente, gerando os vetores pGEX-NOP53-N e pGEX-NOP53-C. O plasmídeo pET-NIP7 já tinha sido descrito previamente (Zanchin et al., 1997).

-Reações enzimáticas

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactéria foram clivados com as enzimas de restrição respectivas, ou tratados com fosfatase alcalina (CIP) ou T4 DNA ligase seguindo recomendações dos fabricantes.

-Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os DNAs plasmidiais são submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, a uma voltagem de 100 volts. A eletroforese de DNA foi realizada em 1X TAE (40mM Tris-acetato pH 8,5; 2mM EDTA).

-Extração de fragmentos de DNA de gel de agarose

Após a eletroforese das amostras de DNA a 100 V em gel de agarose 1%, o DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e iluminação ultravioleta. Os fragmentos de DNA cortados do gel foram purificados usando o sistema *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen). Os DNAs foram passados por uma coluna,

sendo ligados a uma membrana de sílica-gel, lavagem com álcool e o DNA puro foi eluído com tampão EB fornecido pelo kit.

-Amplificação de DNA por PCR

As reações foram realizadas com aproximadamente 20ng de DNA molde ou 500ng de DNA genômico de *S.cerevisiae*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA polimerase e 200µM de dNTPs em tampão apropriado em volume final de 100 µl. A solução foi incubada por 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de incubações a 94°C por 1min (desnaturação), a 55°C por 1min (anelamento) e a 72°C por 3min e 30 segundos (extensão). Segue-se incubação a 72°C por 10 min. Dependendo dos oligonucleotídeos usados e do DNA a ser amplificado as condições de anelamento e extensão foram alteradas. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% e purificados pelo kit da Qiagen.

-Seqüenciamento

DNA plasmidial extraído de *E. coli* usando o sistema *CONCERT (GIBCO-BRL)* foi seqüenciado com o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PERKIN ELMER), o qual contém AmpliTaq® DNA Polymerase, BigDye terminadores e todos os componentes requeridos para esta reação. Usando as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 1', (desnaturação a 94°C por 20", anelamento a 52°C por 20", alongação a 60°C por 4') 40 ciclos.

3.2.2. Manipulação de bactérias

Cepas de *Escherichia coli* DH5α e BL21(DE3) foram mantidas em meio LB e manipuladas de acordo com as técnicas descritas por Sambrook et al., 1989. Cepas de bactéria utilizadas neste estudo com uma breve descrição das características genéticas estão listadas na Tabela 3.

- Transformação de *E. coli* por choque térmico

Método utilizado como descrito por Hanahan (1983). Bactérias foram incubadas a 37°C por 2 horas até uma OD₆₀₀ 0,6 (cultura em fase logarítmica), centrifugadas e ressuspendidas em 0,1 M de CaCl₂/ 15% glicerol gelado. Para armazenamento, as

alíquotas da suspensão foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C .

Células competentes de *E. coli* foram descongeladas em gelo. Foi adicionado 50 ng de DNA plasmidial ou 10 μl de ligação à 100 μl de suspensão de células e no caso de transformação por PEG foi adicionado 80 μl de tampão de transformação (1X KCl; 1,5% PEG₃₅₀₀). As células são mantidas no gelo por 30 minutos e então submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos ou incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente no caso de transformação por PEG. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e incubado por 1 hora a 37°C . A cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 100 μl de meio LB. Posteriormente, a suspensão de células foi plaqueada em meio seletivo contendo antibiótico para a seleção de transformantes e as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

- Transformação de *E. coli* por eletroporação

Segundo Dower et al. (1988). Uma cultura de bactérias crescendo a 37°C até uma OD_{600} de 0,6 foi concentrada e conservada em glicerol 10% a -70°C . Para a transformação, células foram eletroporadas com DNA plasmidial com o *Gene Pulser* e o *Pulse Controller (BIO-RAD)*, ajustando o Gene Pulser com uma capacitância de 25 μFD e uma voltagem de 2,50 kV em cubetas de 0,2 cm, e o Pulse Controller a uma resistência de 200 Ω .

3.2.3. Manipulação de levedura

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

- Transformação com acetato de lítio e DNA carreador (transformação de alta eficiência de *S.cerevisiae*)

Segundo Sherman et al. (1986), células de levedura foram incubadas a 30°C com constante agitação por 18 horas até uma OD₆₀₀ de 0,8. 200 µl de células foram lavadas com água estéril, concentradas e ressuspensas em TE pH 8,0/0,1M LiOAc e a estas foi adicionado 5 µg de DNA plasmidial, 200 µg de DNA de esperma de salmão (Gibco) e uma solução de PEG₃₅₀₀/LiOAc/TE (0,1M LiOAc, 1X TE, 50% PEG₃₅₀₀). A mistura de células e DNA foi incubada a 30°C por 30 minutos, invertendo o tubo a cada 5 minutos, e em seguida submetida a um choque térmico a 42°C por 15 minutos. Posteriormente as células foram centrifugadas, ressuspensas em TE, foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C por 2 dias ou até o aparecimento de colônias.

-Transformação com acetato de lítio e DTT (transformação rápida de *S.cerevisiae*).

Como descrito em Chen et al., 1992, 200 µl de células crescendo a 30°C com constante agitação por 18 horas até atingir fase estacionária (OD₆₀₀ ≥1,0) foram lavadas com TE e em seguida ressuspensas em solução de LiAc-PEG-DTT (200µl de 0,2 M acetato de lítio, 800µl de 50% PEG₃₅₀₀, 100µl de 1M DTT). A esta suspensão de células foi adicionado 2-5 µg de DNA plasmidial e foi incubada a 42°C por 30 minutos. Imediatamente depois, as células foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C por 2 dias ou até o aparecimento de colônias .

- Eletroporação.

Células de levedura foram crescidas a 30°C com agitação por 18 horas até uma OD₆₀₀ de 1,3-1,5 (aproximadamente 1x10⁸ cel/mL); após lavagens exaustivas com água estéril gelada, as células foram ressuspensas em 1 M de sorbitol estéril gelado. Usando 0,1 µg de DNA plasmidial diluído em TE. As leveduras foram eletroporadas com o Gene Pulser *BIO-RAD* com uma capacitância de 25 µFD e uma voltagem de 1,50 kV em cubetas de 0,2 cm. E o Pulse Controller *BIO-RAD* a uma resistência de 200Ω.

- Esporulação de leveduras

As células diplóides foram crescidas em meio de esporulação líquido (1%

acetato de potássio) a 30°C, sob agitação até a formação de esporos (7-14 dias). Foram então centrifugados 200 µl da cultura e, após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 µl de 1 M de sorbitol. Foi adicionado 5µl de liticase (10 mg/ml) e a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. As células são centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e ressuspensas em 1mL de água. Os tubos são agitados no vortex por 2 minutos. Durante este tratamento os esporos se agrupam e ficam presos na parede do tubo, pois os esporos são relativamente hidrofóbicos. As células vegetativas não aderem nas paredes e são removidas ao descartar a suspensão aquosa de células, seguido por sucessivas lavagens do tubo com água. Nisso consiste o método de isolamento de esporos por hidrofobicidade (Rockmill et al., 1991). Os esporos são ressuspensos em 1mL de 0,01% Nonidet-P40 e sonicados no gelo por 3 minutos para que os esporos se desprem da parede do tubo. Os esporos foram plaqueados em placa de YPGal contendo 200µg/mL de genética, incubada a 30°C até o aparecimento de colônias. O genótipo das células haplóides foi caracterizado utilizando diferentes meios seletivos, no caso para isolar a cepa haplóide $\Delta Nop53/Gal::A-Nop53$, meio contendo galactose e genética permitiu o crescimento enquanto não houve crescimento na presença em glicose.

3.2.4. Ensaio de duplo híbrido para identificar proteínas que interagem com Nop53p

A cepa L40, utilizada neste trabalho, apresenta as seguintes marcas de auxotrofia: adenina, histidina, leucina, e triptofano. A transformação da levedura (Sherman, 1986) com o vetor contendo o gene de interesse fusionado ao “DNA binding domain” de lexA de procariotos (que se liga a seqüências específicas de DNA) e a biblioteca de cDNA ou uma proteína alvo fusionada ao “transcription activation domain” de Gal4p de levedura permite a identificação de interação genética entre proteínas. O crescimento das células transformadas com os dois plasmídeos na ausência de histidina indica a interação das duas proteínas. A aproximação dos domínios de ligação ao DNA do domínio de ativação do fator de transcrição culmina com a transcrição do gene repórter. No caso a cepa L40 possui os genes *HIS3* de levedura e *LacZ* como repórteres integrados no genoma. A interação é confirmada pelo teste de X-Gal para determinar a expressão de um segundo gene repórter, o da β -galactosidase (Bartel & Fields, 1995). Portanto, o

método do duplo-híbrido (Vojtek & Hollenberg, 1995) consiste na avaliação da interação *in vivo* entre duas proteínas expressas na levedura através da ativação da transcrição dos dois genes repórteres (Fig.6). Este sistema serve para estabelecer ou confirmar interações entre duas proteínas conhecidas ou para a busca em bibliotecas genômicas ou de cDNAs de proteínas que interagem com uma proteína alvo.

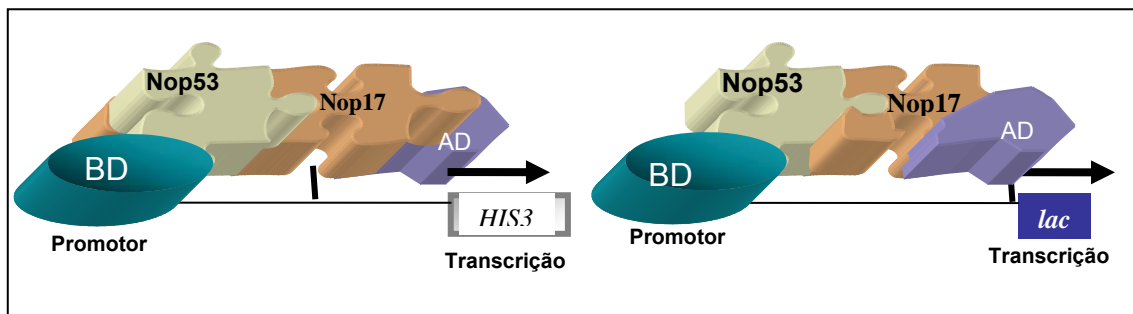


Fig.6. Modelo de ativação da transcrição dos genes repórteres no sistema do duplo-híbrido.

A cepa YDG146 é derivada da L40 (Vojtek & Hollenberg, 1995), contendo o plasmídeo pBTM-NOP53, que codifica a fusão *lexA-Nop53p*. A expressão da proteína de fusão está sob controle do promotor constitutivo *ADH1* e a marca de seleção do plasmídeo pBTM em levedura é TRP1. Foi realizada a transformação em larga escala da YDG53 com a biblioteca de cDNA fusionada ao domínio de ativação de *GAL4* (pACT-cDNA; ATCC 87002). Transformantes foram plaqueados diretamente em meio YNB sem histidina para uma seleção imediata das proteínas que interagem com Nop53p.

A cepa YDG146 foi transformada com o plasmídeo pGAD-NOP17, que codifica a proteína de fusão Gal4p-AD-Nop17p. L40 também foi transformada com pBTM-NIP7 e pACT-NOP53. Os transformantes foram plaqueados diretamente em meio sólido de YNB sem histidina para avaliar a interação das proteínas com Nop53p. Colônias His⁺ foram transferidas para membrana de nitrocelulose, crescidas em placa de YNB por 2 dias, para avaliar a expressão de *lacZ* (Vojtek & Hollenberg, 1995). Células foram lisadas mergulhando as membranas em nitrogênio líquido e o ensaio de atividade de β -galactosidase foi testado usando 100 mg/ml de X-gal em buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄,

50mM β -mercaptoetanol) incubado a 30°C, como descrito previamente (Sherman et al., 1986). Análise da atividade de β -galactosidase (β -Gal) nas cepas foi quantificado a partir de extrato celular gerado em buffer Z usando ONPG como substrato (Bartel & Fields, 1995). Cepa L40-41 foi utilizada como controle positivo e cepa YDG-53/pGAD-C2 foi utilizado como controle negativo no sistema de interação por duplo-híbrido (Zanchin & Goldfarb, 1999a; Tabela 2).

Cepa de L40 também foi co-transformada com outros plasmídeos codificando proteínas fusionadas ao domínio de ligação a DNA (BD, *lexA*), Tabela 2, e com plasmídeos pACT-NOP8, pACT-RRP43, pGADC2-NOP53, pGADC2-NOP53-N, pGADC2-NOP53-C, pGADC2, que codificam proteínas de fusão contendo o domínio de ativação da transcrição (AD, *GAL4*). Interações foram avaliadas novamente pelos marcadores *HIS3* e *lacZ* em placas de YNB suplementadas com adenina e 1,2 mM de 3-AT (3-amino-triazol; Sigma). Amino -triazol foi adicionado para avaliar interações com Nip7p pois a proteína fusiona ao BD ativa sozinha a transcrição dos genes repórteres.

-Teste de Atividade de β -Galactosidase

Ensaio de X-Gal (Vojtek and Hollenberg, 1995). Este ensaio é um método bastante sensível para testar se as colônias nas placas estão expressando β -Galactosidase. As colônias de levedura crescidas por 2 a 3 dias em meio sólido foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*BioRad*) e em seguida lisadas no banho com nitrogênio líquido por 30 segundos. Depois, as membranas foram colocadas em papel filtro umedecido com Buffer Z contendo X-gal (100mg/mL) e incubadas a 37° C até o aparecimento de coloração azulada nos clones positivos, por um período máximo de duas horas.

Ensaio de ONPG (Miller, 1972). O nível de expressão de *lacZ* em células de levedura foi quantificado através deste ensaio colorimétrico de atividade de β -Galactosidase usando como substrato ONPG (*O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside). Células de levedura crescendo a 30°C por 18 horas em constante agitação até uma OD₆₀₀ de 0,5-1,0 foram centrifugadas e ressuspensas em Buffer Z. Em seguida, estas foram lisadas com “glass beads”. Ao extrato protéico adicionou-se ONPG (4 mg/mL em 100mM de tampão fosfato pH 7,0) e foi incubado a 37°C por 15 minutos até 2 horas. Depois foi medida a atividade de *LacZ* a OD₄₂₀.

A atividade da β -Gactosidase foi calculada mediante a seguinte relação:

$$\text{Unidades da Atividade } \beta\text{-Galactosidase} = \text{OD}_{420}(\text{extrato}) / \text{OD}_{600}(\text{células})$$

3.2.5. Co-imunoprecipitação de proteínas

As células são ressuspensas em tampão NET-2 (20mM Tris, 150mM NaCl, 20% Tween20) ou outro tampão apropriado, juntamente com 1mM de PMSF e 1mM de DTT. O extrato das células é obtido através de vibração com “glass beads” ou lise em “French Press”. O lisado é centrifugado por 15 min à 10.000rpm e extrato de proteína total é quantificado por BCA (Sigma). As amostras são concentradas quando necessário por precipitação com 10% TCA e desnaturadas para serem aplicadas no gel de poliacrilamida. O gel é transferido para a membrana de PVDF por 2 horas em solução de buffer de transferência (25mM Tris, 192mM Glicina, 15%Metanol) e bloqueado overnight em 5% BSA em PBS. A membrana é lavada em PBS antes da incubação com o anticorpo. O anticorpo é incubado com a membrana durante no mínimo 2 horas. A membrana é então lavada em PBS e incubada com anticorpo secundário por 2 horas. Western blot é revelado pelo sistema ECL (Amersham).

As células de levedura foram crescidas expressando a proteína de fusão A-Nop53p (ProtA, domínio Z da Proteína A de *Staphylococcus aureus*) em 50mL de cultura até OD₆₀₀ 0,8-1.0. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão NET2 com PMSF e DTT. Após a quebra de células com glass beads, o extrato produzido foi submetido a separação por SDS-PAGE para avaliar o nível basal da proteína.

Ensaio de imunoprecipitação com ProtA foi realizado a partir de extratos de 500 ml de células de levedura crescidas até a OD₆₀₀ ~1.3-1.5 a 30°C em YNB-Gal e com os suplementos necessários. Extrato total de células foi preparado ressuspendendo as células em 1 ml de tampão A gelado (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 5 mM acetato de magnésio, 150 mM acetato de potássio, 0,2% v/v Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Células foram quebradas através de agitação no vortex com a adição de um volume de pérolas de vidro ao extrato que foi clarificado por centrifugação a 16,000 g for 30 min at 4°C. Extratos contendo as proteínas de fusão foram incubados com 200 μ l da resina IgG-sepharose (GE Healthcare) por 2 hr a 4°C. A resina de IgG-sepharose foi extensivamente lavada com o tampão A gelado e

as proteínas ligadas a resina foram ressuspensas em 80 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE. Procedimento similar foi realizado para ensaio de co-imunoprecipitação com as porções de Nop53p, ProtA-Nop53p-N e ProtA-Nop53-C, exceto que durante a incubação com a resina IgG sepharose, e lavagem da resina, a concentração do acetato de potássio foi aumentada de 150mM para 500 mM. As amostras foram separadas por SDS-PAGE, seguido pelo ensaio de Western blot. Para essa análise, as membranas foram hibridizadas com anticorpo policlonal contra Nip7p (Zanchin et al., 1997). Fusões com ProtA são detectadas com anti-IgG. Western foi revelado com ECL (GE Healthcare).

A purificação de TAP-RRP43 foi realizada seguindo protocolo já descrito (Mitchell, 2001). A cepa contendo o gene *RRP43* integrado no genoma e fusionado ao TAP ("Tandem affinity purification", Open Biosystems), foi crescida em meio YPD a 30°C sob agitação até OD₆₀₀ 2,0. 4L de células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão TMN(10mM Tris pH 7.6, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,1% Nonidet P40, 1mM DTT, 1mM PMSF). As células foram lisadas através de agitação vigorosa com pérolas de vidros. Após centrifugação, o extrato total foi incubado com 100µl de IgG-sepharose (GE Healthcare) por 2 horas a 4°C sob agitação. A resina foi lavada com 40 mL do mesmo tampão de lise e incubada com 100µl do tampão de clivagem contendo 1mM de DTT e 0,5mM EDTA e 20U de TEV protease (provinda da subunidade catalítica da proteína Nla do vírus "etch" de tabaco) por uma noite a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante é coletado e submetido a ensaios de degradação de RNA.

As proteínas imunoprecipitadas com A-Nop53p foram analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF usando alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid como matriz no instrumento Ettan Maldi-Tof/Pro (GE Healthcare), como já descrito (Westermeier & Naven, 2002). Resumidamente, as bandas dos géis foram isoladas, descoloradas, e tratadas com DTT e IAA para redução e alquilação de pontes de dissulfeto. As amostras foram re-hidratadas com 40 ng/µL de solução de tripsina em 50 mM NH₄HCOOH e a reação ocorreu O.N a 30°C. Peptídeos tratados com tripsina foram extraídos do gel usando solução de H₂O/ACN/TFA (1:1:0.05) incubando no banho de ultra-som. Solução de peptídeo foi concentrada e dialisada com ZipTip C-18 (Millipore) previamente à análise. As amostras foram misturadas com a solução matriz (1:1) e aproximadamente 0,4 µL foram depositados nas lâminas e incubadas a temperatura ambiente até que se secassem. Espectrometria de massas foi

realizada no modo reflectron e com calibrantes internos (peptídeos provindos da autólise de tripsina) foram usados. Calibração externa também foi realizada em caso os peptídeos de tripsina não estivessem presentes ou claros. A lista obtida pela massa foi analisada por “peptide mass fingerprinting algorithms” (MASCOT e/ou ALDENTE) através de pareamento com seqüências de proteínas conhecidas já depositadas nos bancos de dados.

3.2.6. *Ensaio in vitro de interação proteína-proteína (“pull-down”)*

A interação entre His-Nop53p e GST-Nop17p foi realizada da seguinte forma: extrato celular foi gerado a partir da cepa BL21/GST e BL21/GST-NOP17 (Tabela 3) em buffer PBS (20 mM Tris-Cl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40) com PMSF e DTT, misturado com 500 µl de resina Glutathione-sepharose (GE Healthcare) e His-Nop53p, que tinha sido expressa em *E. coli*, e incubado a 4°C por 2hrs. A resina Glutathione sepharose foi precipitada e lavada com buffer PBS e proteínas ligadas foram eluídas e submetidas à eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF (BioRad). A membrana foi incubada com anticorpo anti-His (GE Healthcare) para detectar His-Nop53p, ou com anti-GST (Sigma) para detectar GST ou GST-Nop17p.

3.2.7. *Análise de proteínas*

-Quantificação de proteínas

Para a determinação da concentração de proteínas de extratos celulares de proteínas purificadas foi utilizado o método de sulfato de cobre e BCA (Sigma).

- Separação de proteínas por SDS-PAGE

Os extratos protéicos foram analisados através de eletroforese em gel de poli-acrilamida, seguindo protocolo em Sambrook et al., (1989). O gel para empacotamento continha acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 5% Tris-HCl 300mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1µl/mL de TEMED e o gel de separação continha acrilamida:bis-acrilamida (29:1) 10% ou 12% ou 15%; Tris-HCl 380mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 0,4µl/mL de TEMED. As amostras em tampão de amostra 6X (Tris-HCl 40mM pH 6,8; glicerol 8%, SDS 2%; DTT 100mM;

azul de bromofenol 0,1%) foram incubadas a 94°C por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel é submetido à voltagem de 150V em tampão de corrida Tris-glicina 1X (Tris-HCl 25mM; glicina 250mM; SDS 0,1%).

- Coloração de proteínas por “Coomassie Blue” e prata

O gel de acrilamida foi incubado em solução de Coomassie Blue R 0,25% em metanol 45% e ácido acético 10% por 2 horas e descorado em solução de etanol 50% e ácido acético 10%. Para coloração com prata seguiu-se o protocolo do fabricante da AMRESCO.

- Western Blotting

Após eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Towbin et al., 1979) em tampão de transferência gelado (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glycine; 15% metanol). Esta transferência foi feita com uma corrente constante de 45 mA por um período de 60 minutos.

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com TBST (Tris-HCl 10 mM; 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM) contendo 5% de BSA (albumina de soro bovino), sob leve agitação por uma hora a 25°C. Transcorrido este tempo, a membrana foi lavada repetidamente com TBST e posteriormente incubada por 18 horas em TBST contendo o anticorpo anti-His (GE Healthcare) na diluição de 1:3000. A membrana foi lavada novamente com 0,1% BSA em TBST e depois foi transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, *GE Healthcare*) na diluição de 1:7500 por 2 horas. A membrana foi então submetida a lavagem final com 0,1% BSA/TBST antes da revelação.

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

3.2.8. Produção e purificação de proteína recombinante

-Teste de indução da produção de proteína recombinante

Uma cultura estacionária de *E.coli* transformada com o plasmídeo de interesse foi

diluída 1:100 em 10mL de meio LB líquido contendo o antibiótico adequado e crescida a 37°C sob agitação até OD₆₀₀ 0,6. Após crescimento 1 amostra de 1mL foi retirado da cultura, centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm e suspensa em 50µl de tampão de amostra para proteína (não induzido). O restante da cultura é induzido com 0,5mM de IPTG e 1 mL de amostra é retirado da cultura em intervalos de 1 hora após 4 horas de crescimento. Novamente as células são centrifugadas e ressuspensas em tampão de amostra para proteínas. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue.

-Produção da proteína recombinante em larga escala

Foi utilizado o mesmo procedimento para o teste de indução da produção da proteína recombinante porém o volume de cultura foi de 2L de LB líquido contendo o antibiótico apropriado. Após 2-3 horas de indução a 30°C com 0,5mM de IPTG, as células são coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 30 minutos, lavadas com água e congeladas a -20°C.

-Purificação da proteína Nop53p em fusão com cauda de histidina

E. coli BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28-NOP53, foi incubado em meio de LB medium contendo 100 µg/ml de kanamicina a 37°C. Atingida a OD₆₀₀ ~0.8, 0.5 mM IPTG foi adicionado a cultura e transferido para 30°C por 2 hr. As células coletadas foram lisadas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF. Para a lise celular, a suspensão de células é lisada em French press, em gelo. O lisado foi centrifugado a 16.000g por 1 hora para a precipitação de RNase II e o material solúvel foi incubado com a resina de Q-sepharose. Em seguida, o lisado que não ligou na Q-sepharose, contendo His-Nop53p foi incubado com 200µl da resina de Ni-NTA (QIAGEN) por 2 horas a 4°C. O procedimento para purificação foi feito da seguinte forma: A amostra foi incubada com a resina por 1 hora a 4°C. Em seguida, a amostra não ligada foi passada pela coluna, seguida por lavagem com 20 mL de tampão de lavagem, e eluição da proteína de fusão com gradiente de imidazol. As frações obtidas pela cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue. As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e submetidas à cromatografia na resina de heparina-sepharose (GE Healthcare), usando o mesmo tampão para ligação e eluindo com gradiente de sal de 50 mM a 1 M KCl. As frações que continham a proteína foram

dialisadas em 50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl.

-Purificação de proteína em fusão com cauda de GST (glutathione S-transferase)

E. coli BL21(DE3) cells contendo plasmídeos codificando proteínas teste ou controle foram incubadas em 500mL de meio de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. Quando atingida a OD600 ~0.8, 0.5 mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) foi adicionado às culturas contendo os plasmídeos pGEX-Nop53-N or pGEX-Nop53-C que foram transferidas para 37°C por 2 e 4 hrs, respectivamente. As células foram centrifugadas e lisadas em tampão de lise Tris-NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5% v/v Nonidet-40). A suspensão foi submetida à lise pela French press. O lisado foi clarificado a 16.000 rpm por 1 hora e o sobrenadante submetido a cromatografia de afinidade utilizando 100 µl da resina de glutathione sepharose (GE Healthcare). O procedimento para purificação foi realizado da seguinte forma: a amostra foi aplicada na coluna e incubada por 1 hora com a resina a 4°C. Em seguida, a resina foi lavada com 20mL do tampão de lise e a proteína de fusão foi eluída em tampão de eluição (10mM Tris-HCl pH 8,0 , 20mM glutathione reduzida). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS –PAGE e coloração por coomassie blue. As frações que continham a proteína foram reunidas, dialisadas e concentradas em coluna de centrifugação (Millipore).

3.2.9. Obtenção da cepa mutante condicional $\Delta nop53/GAL$;A-NOP53

A cepa diplóide *NOP53/ $\Delta nop53$* foi obtida de EUROSCARF e transformada pelo método de acetato de lítio (Chen et al.,1992) com o plasmídeo contendo o gene *NOP53* sob controle do promotor regulável *GAL1*, em fusão com ProtA (Fig. 7). Essa cepa diplóide foi submetida à esporulação, como descrito acima.

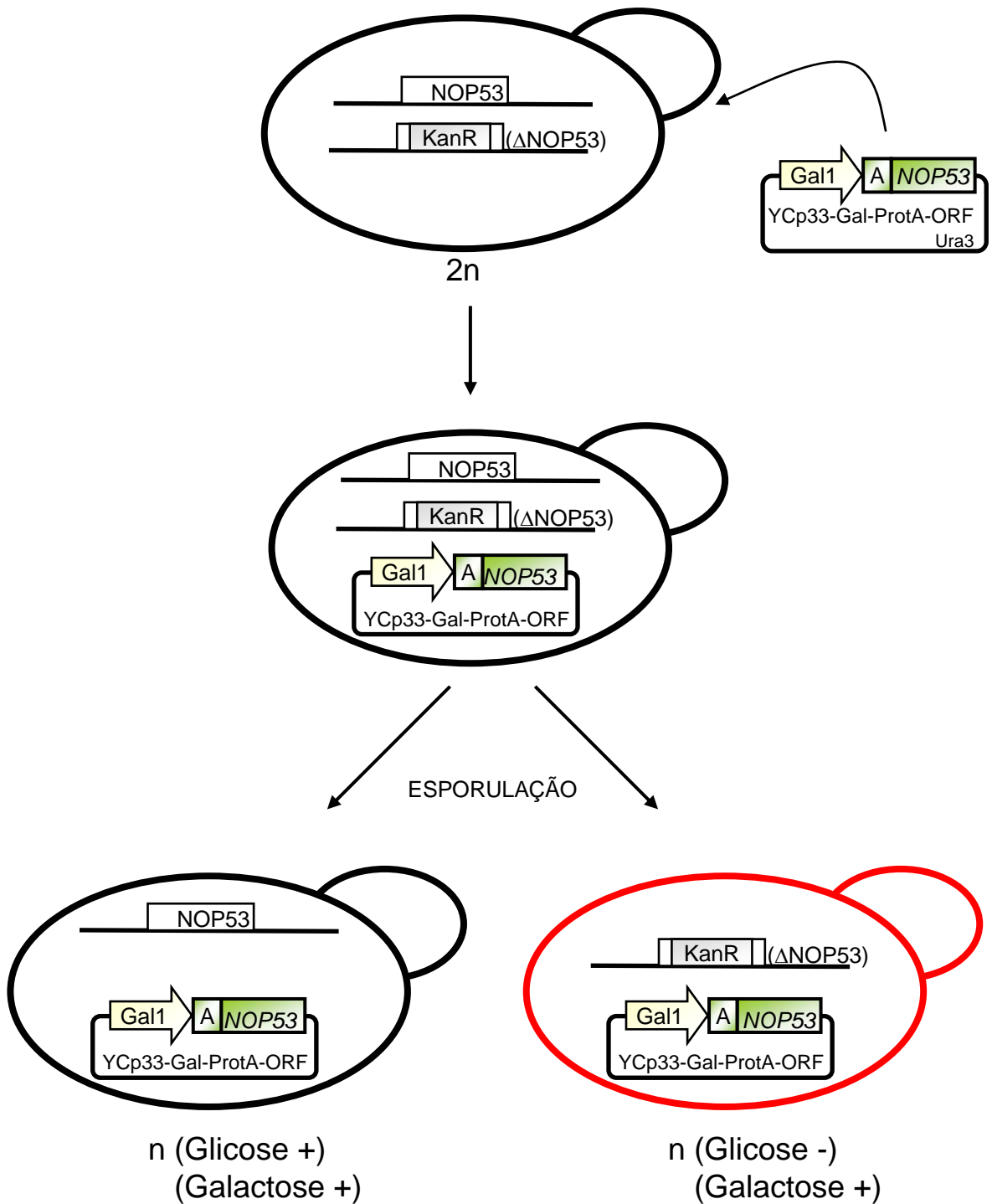


Figura 7. Modelo de esporulação e obtenção da cepa haploíde *n* $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$.

3.2.10. Análise de processamento de RNA através de Northern blot

-Extração de RNA total de *S.cerevisiae*

Culturas da cepa selvagem *NOP53* e da cepa condicional haplóide $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ em crescimento exponencial foram transferidas do meio de galactose para o meio restritivo (glicose). Amostras de células dos vários tempos foram coletadas e congeladas. O RNA total foi extraído das cepas de levedura através do método modificado de fenol quente (Oliveira & McCarthy, 1995).

- Eletroforese de RNA

RNA total (20 μ g) foi desnaturado com glyoxal e separado por eletroforese em gel de agarose 1,3%, corrido em tampão de fostato de sódio (Sambrook et al. 1989). Para detecção de pequenos RNAs, o RNA total (20 μ g) também foi separado em géis de poliacrilamida 6%-7M urea, corridos em 1X Tris-borate-EDTA (TBE).

-Marcação radioativa e hibridização das sondas

O gel de RNA foi submetido a Northern blotting, sendo transferido para membrana Hybond nylon (GE Healthcare). Membranas foram posteriormente hibridizadas com diferentes sondas de oligonucleotídeos marcadas radioativamente (32 P), complementares a regiões específicas do 35S pré-rRNA (Tabela 5) ou fragmentos de DNA, correspondentes à ORF de actina, que foram marcados com 32 P pelo kit de random primers da invitrogen. As condições de hibridização foram descritas previamente (Zanchin et al., 1997) e análise é feita em Phosphorimager (MolecularDynamics).

3.2.11. Marcação metabólica *in vivo* de RNA (“pulse-chase labeling”)

Marcações *in vivo* foram executas como descrito previamente (Zanchin et al., 1997). Para marcação *in vivo* com 3 H-Uracila, culturas das cepas *NOP53* e $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ em crescimento exponencial foram incubadas por 12 horas em meio mínimo com uracila. As células são coletadas nesse momento, ressuspensas em meio sem uracila, seguido por pulse-chase na presença de

uracila radioativa, 50 μCi de [^3H]uracila por ml. Após incorporação do radioativo por 3 minutos a 30°C é adicionada uma concentração final de 300 $\mu\text{g/ml}$ de uracila não radioativa e as células são coletadas nos intervalos de tempo de 0, 3, 10, 30, e 60 minutos e congeladas (Warner, 1973). O RNA é extraído das células, desnaturado, separado por eletroforese e transferido para uma membrana. As membranas de Nylon são tratadas com solução En 3 Hance (NEN -Amersham) e expostas ao filme radiográfico por 1 mês.

Na marcação *in vivo* com Metil- ^3H -Metionina, 150 ml de cultura das cepas *NOP53* e $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ incubadas previamente por 12 hrs em YNB-glicose sem metionina são ressuspendidas em meio mínimo e adicionado 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de [metil- ^3H]-metionina (GE Healthcare) incubado por 1 minuto e meio. Em seguida foi adicionado um excesso de metionina não radiativa (na concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$). As células são coletadas nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 8 e 16 minutos e congeladas rapidamente em banho de etanol e gelo seco (Warner, 1973). O RNA extraído é transferido para a membrana, tratada com intensificador e exposta ao filme no cassete durante 2 meses.

3.2.12. Primer extension

Cultura de células em crescimento exponencial das cepas de levedura selvagem (WT) e $\Delta NOP53/GAL-A-NOP53$ foram transferidas de YP-Gal para meio YP-Glu. Células foram coletadas no momento da troca de meios e após 12 horas incubadas em meio de glicose. RNA total extraído pelo método do fenol quente como descrito previamente (Oliveira & McCarthy, 1995) foi utilizado para análise por primer extension. Reações de primer extension foram realizadas como descrito previamente (Oliveira & McCarthy, 1995), com a marcação das sondas com $\gamma^{32}\text{P}$ ATP com PNK (Invitrogen), anelamento de 1pmol do oligo marcado ao RNA (10 μg de RNA total utilizado) em banho-maria a 65°C por 10 min, seguido da reação de extensão da transcriptase reversa com 100 U de transcriptase reversa MMLV (Invitrogen) e dNTPs (0,5mM) por 30 min a 37°C. Os produtos de cDNA são precipitados, ressuspendidos em H $_2$ O, tratados com RNase A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e desnaturados com solução contendo formamida e analisados em gel de poli(acrilamida) desnaturante 7% poli(acrilamida)/6M uréia em tampão 1XTBE. O gel é

seco e exposto O/N ao screen para análise em Phosphorimager. Reação de seqüenciamento envolve 2 reações de PCR (GIBCO), 30 ciclos cada. Os oligonucleotídeos usados na primer extension estão listados na tabela 5.

Experimentos de “footprinting” foram realizados através de crosslink de 5 pmol do rRNA 5.8S+29 transcrito *in vitro* a His-Nop53p, em seguida, 1 pmol do primer marcado radioativamente [³²P] foi anelado ao rRNA, e 20 µg de Proteinase K foi adicionado. Extensão foi realizada com 100 U de MMLV transcriptase reversa (Invitrogen) e 0,5 mM de dNTPs por 30 min a 37°C. Produtos de cDNA foram precipitados e ressuspendidos em água, tratados com 5 µg de RNase A, desnaturados e analisados em gel desnaturante de poliacrilamida 7%. Reações controle de seqüenciamento foram realizadas usando o kit da Thermo-Sequenase (GE Healthcare). Géis foram secos e analisados por Phosphorimager.

3.2.13. Co-imunoprecipitação de RNAs

Extrato celular total, provindo de 500 ml de cultura das cepas YDG152 ou YDG153 expressando a proteína A e a proteína fusionada A-Nop53p, foi adicionado a 200µl de resina de IgG-sepharose (GE Healthcare) como descrito previamente (Dez et al., 2002). Imunoprecipitação foi realizada a 4°C por 2 hrs. Resina de IgG-sepharose foi lavada com tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM acetato de magnésio, 0,2% Triton-X-100, 150mM de acetato de potássio, 1mM DTT, inibidor de proteases) e RNA foi isolado da fração que liga a resina. Após precipitação, o RNA recuperado é desnaturado e separado por eletroforese em géis de poliacrilamida 6% ou em gel de agarose 1,5% e transferidos para membranas de Nylon. Para efeito de comparação, 1% do RNA obtido do extrato total foi aplicado no gel. Hibridização foi realizada como descrito acima, usando as sondas específicas para snoRNAs e rRNAs.

Extrato total de células W303/A, Δ NOP53/YCp33-GAL::A-NOP53, WT/YCp33-GAL::A-NOP53-N, WT/YCp33-GAL::A-NOP53-C, foram preparadas como descrito acima e Nop53p fusionado a ProtA foi isolada incubando com IgG sepharose (GE Healthcare) por 2 hr a 4°C. Após extensa lavagem com tampão A, RNA foi isolado das frações ligadas a resina através da extração direta de RNA da suspensão de resina com fenol. Em seguida o RNA é precipitado e ressuspendido em água tratada com DEPC e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida

6% ou 1.5% agarose gels e através de northern blot como descrito previamente (Gonzales et al., 2005), usando sondas específicas para os pré-rRNA, rRNAs e snoRNAs. Como comparação, 1% do RNA recuperado do extrato total of RNA foi aplicado no gel, e normalizados usando pelo nível do RNA scR1 endógeno.

3.2.14. Ensaio de ligação a RNA *in vitro*

Fragmento de DNA correspondendo ao rRNA 5.8S+29 foi clonado no vetor pGEM-T (Promega), linearizados e a transcrição *in vitro* foi realizada com a enzima T7 RNA polimerase (Invitrogen), na presença de 50 μ Ci de α -³²P-UTP. Um pmol de RNA marcado radioativamente foi incubado com diferentes concentrações de proteína purificada His-Nop53p e His-Nip7p em tampão A utilizado para a co-imunoprecipitação de RNAs (Gonzales et al., 2005) por 30 minutos a 37°C. RNAs usados como competidores frios foram gerados por transcrição *in vitro* do pGEM-T 5.8S (gerando o 5.8S rRNA) ou pBluescript (RNA não específico) na presença de 10mM de NTPs. Crosslinking com UV foi realizada posicionando os complexos de RNA-proteína no gelo e irradiando por 15 minutos a 260 nm com transiluminador (Fotodyne). Amostras foram tratadas com 5ug de RNaseA por 30 minutos a 37°C, separados em gel desnaturante de poli-acrilamida 6% e visualizados por Phosphorimager. Para ensaio de band-shift, os complexos de RNA-proteína foram analisados em gel de poli-acrilamida nativo 6% polyacrilamida ou 1,5% gel de agarose.

3.2.15. Localização subcelular com GFP de Nop53p

A localização subcelular de Nop53p foi analisada monitorando o sinal de fluorescência produzido pela proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescent protein) fusionada ao amino-terminal da Nop53p. Portanto, a proteína de fusão foi construída clonando a seqüência do gene NOP53 downstream da seqüência de GFP já existente no vetor pGFP-N-FUS (Nidenthal et al., 1996). A localização subcelular de Nop1p foi analisada pelo monitoramento do sinal vermelho de fluorescência de RFP (red fluorescent protein) fusionado ao amino-terminal da proteína. As proteínas GFP, GFP-Nop53p e RFP-Nop1p foram expressas nos plasmídeos pGFP-N-FUS, pGFP-N-NOP53 and pRFP-NOP1 (Tabela 4)

transformados na cepa $\Delta nop53$ (Tabela 2). A cepa $\Delta nop53$ foi co-transformada com os vetores expressando GFP ou GFP-NOP53 e RFP-NOP1. Estas células foram inoculadas em meio mínimo (para indução do promotor MET25) em pH 7.0 até uma OD₆₀₀ de 0,5. Posteriormente, a cultura foi transferida para uma lâmina de microscópio. GFP e RFP foram excitadas com luz UV e a fluorescência detectada em microscópio de fluorescência confocal. Células vivas foram imobilizadas em placas histológicas contendo L-polilisina, em meio aquoso. As preparações foram cobertas com lamínulas, seladas e imediatamente analisadas em microscópio confocal. Imagens foram obtidas com laser Argon (488 nm) e HeNe (543 nm) e software para confocal foi utilizado na análise da imagem. Esses experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Gláucia Machado-Santelli, ICB-USP. Para avaliar a localização subcelular das porções de Nop53p foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima. Para isso as proteínas GFP-N-Nop53p, GFP-C-Nop53p e RFP-Nop1p foram expressas na cepa *NOP53*.

3.2.16. Imunoprecipitação de cromatina

Cultura da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ crescida em YPGAL até a OD₆₀₀ de 0.2-0.6 foi coletada e processada conforme descrito previamente (Gallagher et al, 2004; Keogh and Buratowski, 2004). Solução de cromatina foi incubada por 2hrs com a resina IgG de coelho (Amersham), pré-lavada com tampão de lise FA. O material imunoprecipitado foi lavado com tampão com baixo e alto teor de sal, e a cromatina recuperada. Cromatina recuperada e input foram submetidos ao crosslink reverso e analisados por PCR. Várias regiões de diferentes genes foram amplificadas após o Chip. [α -³²P] dATP foi adicionado ao PCR (0,5 μ Ci/25 μ l). Os resultados do Chip foram quantificados (Nedea et al.,2003), por PhosphorImager e normalizados com a região intergênica do cromossomo V como controle interno, para obtenção da eficiência da amplificação e subtração do “background”. Os valores no histograma correspondem à média de três PCRs realizados com três preparações diferentes de cromatina imunoprecipitada. Para o tratamento com RNase, RNase mix (RNase A/RNase T1-Fermentas) foi adicionado ao extrato total de células para a concentração final de 10 μ g/ μ l. O extrato total foi então incubado por 1 hr a 25°C e submetido a imunoprecipitação a 4°C por 2 horas.

3.2.17. RT-PCR

RNA total das cepas foi extraído pelo método modificado de fenol-quente (Oliveira & McCarthy, 1995). A preparação da fita de cDNA foi feita pela Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Amplificação por PCR foi feita pela Taq DNA polymerase (Amersham). Os pares de primers usados para a análise por PCR foram: PCRs foram realizados em 30 ciclos a 94°C .

3.2.18. Ensaio de RNase H

1 pmol de 5.8S rRNA transcrito radioativamente foi incubado por 30 min a 37°C com 5µl do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM acetato de magnésio, 0,2% Triton-X-100, 150mM de acetato de potássio, 1mM DTT, 1mM PMSF) na ausência de proteínas como controle ou na presença de 20 pmol de His-Nop53p ou 20 pmol de His-Nip7p em um volume final de 20 µl. Foi adicionado à reação 10 pmol de oligo de DNA complementar a diferentes regiões do 5.8S rRNA e incubado por 10 min a 30°C. Após o anelamento foi adicionado à reação 1U de RNase H (Gibco) e incubado por 1 hora a 30°C. Extração do RNA foi feita com fenol-clorofórmio e o RNA precipitado foi ressuspenso em tampão de amostra contendo formamida e aplicado em um gel desnaturante de 8% de acrilamida.

3.2.19. Ensaio de ATPase e helicase

1 pmol de 5.8S rRNA frio foi incubado por 30 min a 37°C com 5 µl do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM acetato de magnésio, 0,2% Triton-X-100, 150mM de acetato de potássio, 1mM DTT, 1mM PMSF, 4 uCi γ -³²P ATP e 10uM ATP) na ausência de proteínas (como controle) ou na presença de 20 pmol de his-Mtr4p, 20 pmol de His-Nop53p ou 20 pmol de His-Nip7p em um volume final de 20 ul. A reação foi finalizada adicionando EDTA para uma concentração final de 10mM e 2 ul da reação foram aplicados a membrana de TLC em um tampão de corrida 0,8M LiCl e 0,5M ácido acético.

1pmol de 5.8S rRNA transcrito *in vitro* foi incubado com 10 pmol de oligo de DNA marcado radioativamente e complementar ao RNA. O RNA e oligo de DNA foi

desnaturado a 65°C por 10min e renaturado a temperatura ambiente. O RNA anelado ao oligo foi incubado por 30 min a 37°C com 5ul do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM acetato de magnésio, 0,2% Triton-X-100, 150mM de acetato de potássio, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10Um de ATP) na ausência de proteínas como controle ou na presença de 20pmol de His-Mtr4p e His-Nop53p ou 20 pmol de His-Nip7p em um volume final de 20 µl. Para finalizar a reação foi adicionado 5 ul de tampão de amostra e aplicado em um gel nativo de 8% de acrilamida.

3.2.20. Ensaio de RNase

1pmol de 5.8S rRNA transcrito radioativamente foi incubado por 30 min a 37°C com 5µl do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM acetato de magnésio, 0,2% Triton-X-100, 150mM de acetato de potássio, 1mM DTT, 1mM PMSF) na ausência de proteínas como controle ou na presença de 20 pmol de GST, 20pmol de his-Rrp6p, 20pmol de his-Nop53p ou 20 pmol de his-Nip7p em um volume final de 20µl. Para finalizar a reação foi adicionado 5µl de tampão de amostra contendo formamida e aplicado em um gel desnaturante de 8% de acrilamida.

3.2.21. Gradiente de polissomos

Análise por gradiente de polissomos foi realizada como descrito anteriormente (Gonzales et al., 2005). Células das cepas *NOP53* e $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ foram incubadas em meio contendo glicose por 12 horas e coletadas em intervalos de tempo de 0 e 12 horas. Extratos celulares foram preparados em tampão BBA com inibidores de proteases e colocados em solução de sacarose de 5% a 47%. Os gradientes foram corridos por 3 horas a 39000 rpm em rotor SW41 da Beckman (tubos polyallomer). Posteriormente o gradiente foi analisado por ultravioleta OD 254nm. As sondas de oligonucleotídeos usadas para as análises por Northern estão descritos na Tabela 5.

3.2.22. *Purificação de RNA polyA*

Para purificação de RNA poly-A, RNA total (400 µg) das cepas *NOP53* e Δ *NOP53/GAL-A-NOP53* crescendo durante 12 horas em meio de glicose foi purificado com 50 µl de oligo dT sepharose (Gibco), seguindo protocolo do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de interação entre Nop53p e outros fatores envolvidos em processamento de rRNA

4.1.1. Nop53p interage com proteínas envolvidas no processamento de pré-rRNA, Nop17p e Nip7p, através de duplo-híbrido e “pull-down”.

Nop53p não tinha tido sua função caracterizada anteriormente, mas informações do banco de dados de *Saccharomyces cerevisiae* (SGD) e da literatura indicavam que essa proteína fosse essencial para a viabilidade celular e estivesse presente no complexo do poro nuclear de levedura (Rout et al., 2000). Nop53p também foi identificada como componente do complexo pré-60S (Bassler et al., 2001; Nissan et al., 2002). Em nosso laboratório, foi identificada também a interação entre Nop17p (envolvida em processamento de rRNA, Gonzales et al., 2005) e Nop53p, o que nos levou a iniciar o estudo desta última. Com o objetivo de caracterizar a função de Nop53p, foi feita uma análise de sua interação com outras proteínas que já eram alvos de estudo no laboratório e que estão envolvidas em processamento de rRNA.

Nessa análise, foram realizados experimentos utilizando o sistema do duplo-híbrido, testando a interação entre proteínas fusionadas ao domínio de ligação a DNA de *lexA* (BD) e proteínas fusionadas ao domínio de ativação da transcrição de *Gal4p*. A interação é detectada pela expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. Primeiramente, verificamos que a proteína de fusão *lexA-Nop53p* é funcional, pois complementa o crescimento da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53/YCplac111-ADH1-lexA-NOP53$ em glicose (dados não mostrados). Além de verificarmos que a fusão *lexA-Nop53p* é funcional, transformamos L40/pBTM-NOP53 com o vetor pGAD vazio para verificar se *LexA-Nop53p* é capaz de ativar sozinha a expressão dos genes repórteres. Observou-se que em meio His^- não há crescimento de L40/pBTM-NOP53/pGAD, cepa que passou a ser utilizada como controle negativo.

Nos testes de interação entre proteínas foi confirmada a interação entre Nop17p e Nop53p no sistema do duplo-híbrido, e pudemos observar que as proteínas interagem independentemente do “tag” (Fig. 8A, B). Entretanto, a interação é mais forte quando Nop17p está fusionada ao domínio de ligação a DNA (BD-Nop17p; Fig. 8A, B). Também foi verificado que Nop53p interage com Nip7p,

proteína pertencente ao complexo do pré-60S, envolvida no processamento do pré-rRNA 27S (Baßler et al., 2001; Nissan et al., 2002; Zanchin et al., 1997; Fig. 8A,B). Como a proteína de fusão BD-Nip7p ativa sozinha a transcrição dos genes repórteres, foi utilizado 1mM de 3AT nas placas para poder inibir parcialmente a síntese de histidina e permitir avaliar a interação com Nop53p. A interação entre essas duas proteínas através do duplo-híbrido condiz com a presença de ambas no complexo do pré-60S e indica que essas elas interajam diretamente no complexo.

Para confirmar a interação de Nop53p com Nop17p e Nip7p, ensaios de “pull-down” foram realizados com proteínas recombinantes em fusão com diferentes tags. His-Nop53p e GST-Nop17p foram expressas em *E. coli*, extrato de células expressando GST-Nop17p foi incubado com a resina Glutathiona-sepharose e, após a lavagem da resina, o extrato de células expressando His-Nop53p foi adicionado à fração ligada à mesma. Após a lavagem da resina, o material ligado foi eluído. Os resultados obtidos demonstram que GST-Nop17p co-precipita His-Nop53p (Fig. 8C). Experimento realizado em paralelo com GST como controle negativo não precipitou His-Nop53p (Fig. 8C). Esses resultados confirmam a interação específica entre Nop17p e Nop53p. A interação com Nip7p também foi confirmada por pull-down (Coltri et al., no prelo). A confirmação das interações de Nop53p com Nop17p e com Nip7p, corrobora a hipótese de envolvimento de Nop53p em processamento de rRNA. Para caracterizar a função de Nop53p foram realizados os experimentos descritos a seguir.

4.2. Análise da localização subcelular de Nop53p

4.2.1. GFP-Nop53p co-localiza com RFP-Nop1p no nucléolo.

A interação de Nop53p com Nop17p e Nip7p, duas proteínas nucleolares (Gonzales et al., 2005; Zanchin et al., 1997) indica que Nop53p também seja uma proteína nuclear. Para verificar a localização subcelular dessa proteína, foi utilizada uma fusão com GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein), GFP-Nop53p. A proteína de fusão RFP-Nop1p (**R**ed **F**luorescent **P**rotein-Nop1p; Gonzales et al., 2005) foi utilizada como marcador nucleolar. A cepa $\Delta nop53/GAL::HIS-NOP53$ foi co-transformada com plasmídeos expressando GFP-Nop53p e RFP-Nop1p e analisada por microscopia confocal. O resultado mostra que GFP-Nop53p co-localiza com RFP-Nop1p (Fig. 9), proteína predominantemente nucleolar. GFP-Nop53p é funcional nessas células, pois complementa o crescimento de $\Delta nop53/GAL::HIS-NOP53/GFP-NOP53$ em meio contendo glicose (dados não mostrados). A localização nucleolar de Nop53p corrobora os dados de interação com Nop17p e Nip7p.

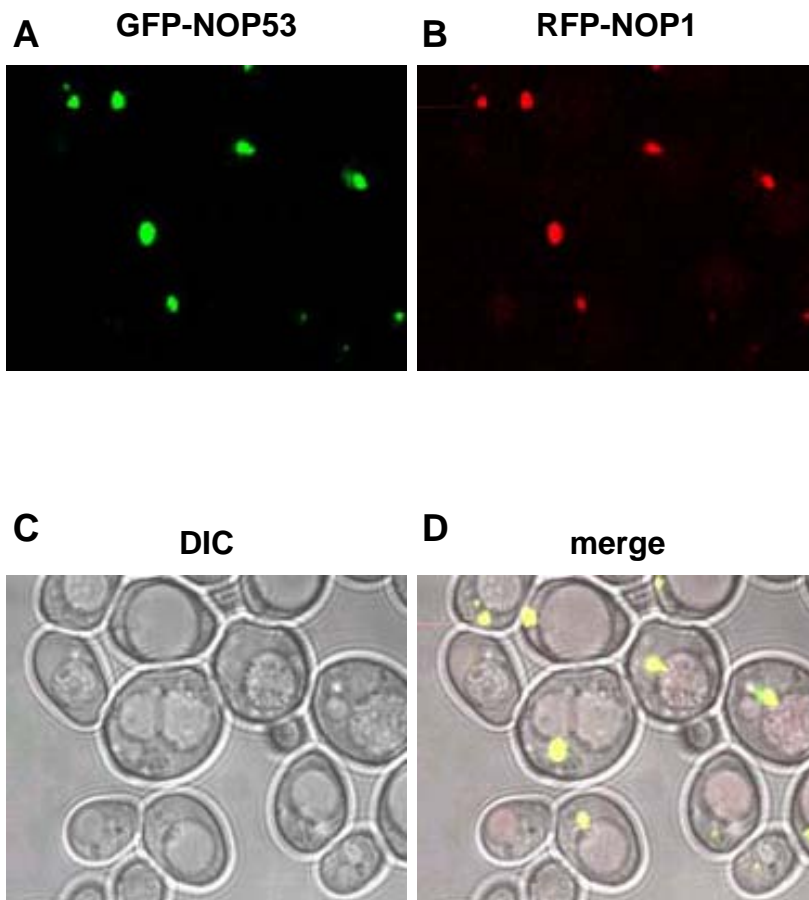


Figura 9. Localização subcelular de GFP-Nop53p. Cepa $\Delta nop53/GFP-NOP53/RFP-NOP1$, expressando as proteínas de fusão GFP-Nop53p e RFP-Nop1p foi utilizada para a determinação da localização subcelular de Nop53p através de microscopia de fluorescência. Imagens obtidas por microscopia confocal a laser demonstram localização de GFP-NOP53 (verde, **A**) e RFP-NOP1 (vermelho, **B**) separadamente. A morfologia das células é observada por DIC (differential interference contrast, **C**). Merge, todos os canais sobrepostos (**D**).

4.3. Obtenção e análise da cepa mutante *condicional* $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$

4.3.1. *NOP53* é um gene essencial.

Para estudar melhor a função de Nop53p, era necessário obter mutantes condicionais do gene *NOP53*, de tal maneira que a expressão do mesmo fosse controlada, permitindo o estudo do efeito da depleção de Nop53p nas células de levedura. Inicialmente, a cepa diplóide 2n, *NOP53/ $\Delta nop53$* , obtida da Euroscarf (Tabela 2), foi transformada com o plasmídeo YCplac33-*GAL::A-NOP53*, que contém o gene *NOP53* fusionado à ProtA e sob controle do promotor *GAL1* (Tabela 4). Para obtenção da cepa haplóide n, *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$* , a cepa diplóide foi submetida à esporulação. Comparando o crescimento da cepa haplóide com a cepa diplóide em placas de glicose, a cepa haplóide foi incapaz de crescer na condição em que a expressão de *GAL::A-NOP53* é reprimida, confirmando tratar-se de uma proteína essencial para a viabilidade celular (Fig. 10A).

Para avaliar o efeito da depleção de Nop53p no crescimento celular, a cepa selvagem (n, *NOP53*) e a mutante condicional (n, *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$*) foram inoculadas inicialmente em meio rico contendo galactose até atingirem a OD₆₀₀ 1.0, a partir de então células foram transferidas para meio contendo glicose. A cepa *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$* passa a aumentar seu tempo de duplicação após 4 horas em glicose e em torno de 12 horas o crescimento é praticamente cessado (Fig. 10B). Esse fenótipo foi complementado quando a cepa foi co-transformada com um plasmídeo contendo uma cópia de *NOP53* sob controle de um promotor constitutivo, o que demonstra que o não crescimento da cepa *$\Delta nop53$* em glicose está diretamente relacionado à expressão de *NOP53*. A cepa condicional haplóide *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$* foi utilizada em todos os experimentos descritos a seguir.

4.3.2. Análise da expressão de ProtA-Nop53p na cepa condicional.

A expressão de A-NOP53 (controlada pelo promotor *GAL1* na cepa *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$*) foi analisada por Northern blot utilizando RNA total extraído das cepas *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$* e *NOP53*, crescendo em glicose por diferentes períodos de tempo. É possível observar que a expressão do gene não é alterada na cepa selvagem, enquanto que na cepa *$\Delta nop53/GAL::A-NOP53$* , depois de 4 horas em glicose o mRNA de A-Nop53p não é mais detectado, o que coincide com o período em que as células têm sua velocidade de crescimento diminuída (Fig. 10C).

A presença de duas bandas correspondendo ao mRNA de A-Nop53p é devido à falta de uma seqüência de terminação de transcrição no plasmídeo YCplac33-A-NOP53. Como controle interno do Northern blot, foi utilizada uma sonda radioativa complementar a *GAR1*, componente do snoRNP de box H/ACA (Fig. 10C).

Para verificar a expressão de ProtA-Nop53p, foi feito um Western blot com anti-IgG contra proteínas de extrato total das cepas *NOP53* e $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, crescendo em glicose por diferentes períodos de tempo. ProtA-Nop53p pode ser detectada até 8 horas depois da transferência das células para glicose (Fig. 10D). Para controle interno do experimento, foi utilizado antisoro policlonal anti-eIF2 α . Apesar de que a partir de 4 horas em glicose o mRNA codificando A-Nop53p não é mais detectado, a proteína A-Nop53p ainda está presente nas células pelo menos até 8 horas depois da inibição de sua expressão. Isso explica a diminuição do crescimento da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ a partir de 4 horas em glicose e a parada de crescimento somente a partir de 12 horas nessas condições.

Após a obtenção da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, e considerando que a proteína interage com fatores envolvidos na biogênese ribossomal, o próximo passo seria utilizar essa cepa para analisar o processamento de rRNA em condições de depleção da proteína. Com base na análise de expressão de ProtA-Nop53p e crescimento da cepa condicional, os experimentos de análise de processamento de rRNA foram feitos com amostras de RNA de células crescendo em glicose por pelo menos 12 horas.

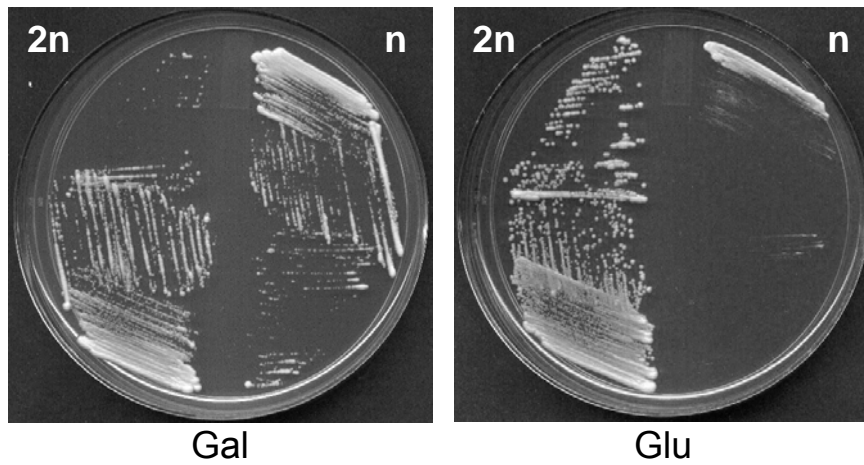
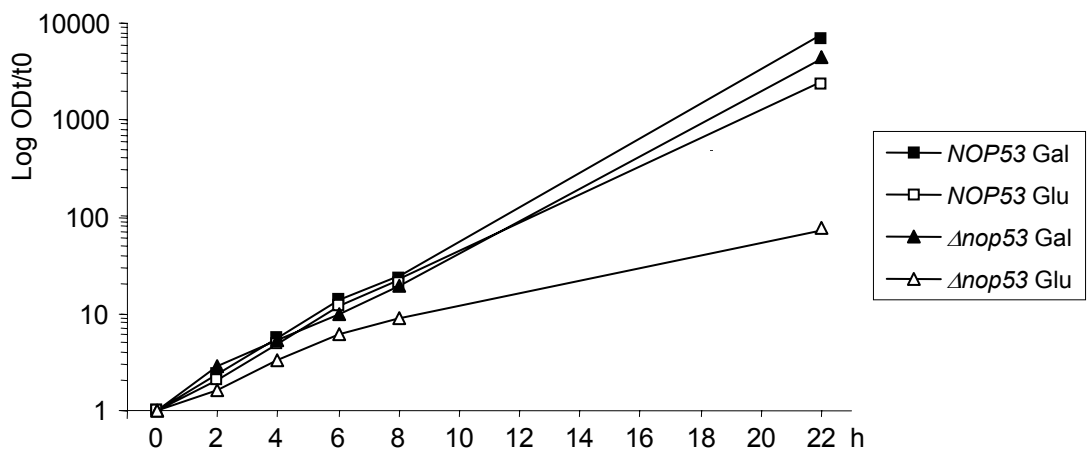
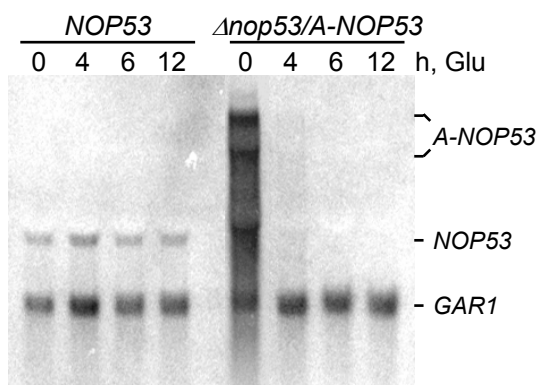
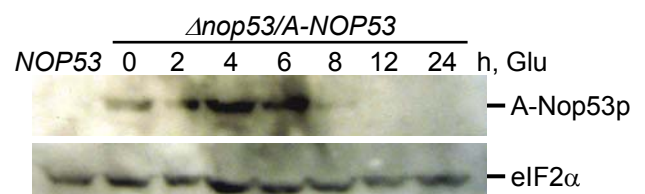
A*Δnop53/A-NOP53***B****C****D**

Figura 10. *NOP53* é um gene essencial. (A) cepas 2n, *NOP53/Δnop53* e n, *Δnop53/GAL:A-NOP53* foram plaqueadas em YPGal ou YPD. A cepa haplóide não é capaz de crescer em glicose. (B) Curvas de crescimento das cepas *NOP53* e *Δnop53/GAL:A-NOP53* em meio YPGal ou YPD. (C) Análise por Northern blot da expressão de *A-NOP53* na cepa *Δnop53/GAL:A-NOP53* em glicose. Sonda de DNA contra o mRNA de *GAR1* foi usado como controle interno. (D) Análise por Western blot da expressão de A-Nop53p em glicose. eIF2α foi detectada com anticorpo anti-eIF2α e usado como controle interno. Cepa selvagem, *NOP53*, não expressa a proteína de fusão A-Nop53p e, portanto, Nop53p não é detectada nesta cepa.

4.4. Análise do processamento do pré-rRNA ribossomal na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$

4.4.1. $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ acumula os rRNAs intermediários 7S e 27S.

Como Nop53p interage com proteínas envolvidas no processamento do pré-rRNA e está localizada no compartimento envolvido em biogênese ribossomal, o nucléolo, decidimos investigar se Nop53p também está envolvida em síntese ribossomal. Analisamos o processamento de pré-rRNA na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ através de marcação *in vivo* (“pulse-chase labelling”), Northern blot e primer extension.

Inicialmente, fomos analisar o metabolismo de RNA na ausência de Nop53p através de marcação *in vivo* com [^3H]uracila e [metil- ^3H]metionina (Fig. 11). Neste caso, células $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ e $NOP53$ foram incubadas por 12 horas em glicose e depois submetidas a pulsos de marcação com uracila ou metil-metionina marcadas radioativamente, o que permite a análise do processamento do pré-rRNA transcrito durante o pulso de marcação radioativa. A cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, em geral, apresentou uma diminuição na eficiência de formação dos rRNAs maduros 18S, 25S e 5.8S e acúmulo dos pré-rRNAs 35S, 27S e 7S (Fig. 11). O defeito é mais evidente na síntese do 25S e do 5.8S rRNAs, enquanto que a síntese do 18S rRNA é menos afetada. Marcação *in vivo* com ^3H -uracila demonstra que o rRNA 5.8S maduro já pode ser detectado na cepa $NOP53$ após 3 minutos de “chase”, enquanto que na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ o pré-rRNA 7S continua sendo detectado após 60 minutos. Isso demonstra que na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ há um nítido defeito no processamento do 27S pré-rRNA em 5.8S e 25S rRNAs maduros (Fig. 11 A,C). Marcação *in vivo* com [metil- ^3H]metionina também demonstra defeito na formação do 25S rRNA na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ comparado com o efeito muito menor na formação do 18S rRNA maduro, que pode ser devido a um processamento mais lento dos pré-rRNAs na ausência da proteína (Fig. 11B). O retardo observado na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ na formação dos rRNAs maduros 25S e 5.8S, confirma o seu possível papel no processamento de pré-rRNA que leva à formação da subunidade ribossomal 60S.

Para avaliar melhor o efeito de Nop53p nas etapas do processamento de pré-rRNA, os níveis basais de pré-rRNAs e rRNAs maduros foi analisado através de Northern blot, usando sondas específicas para os rRNAs maduros e as regiões espaçadoras do pré-rRNA. As cepas $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ e $NOP53$ foram

incubadas em meio contendo galactose e em seguida transferidas para glicose por diferentes períodos de tempo. A análise dos Northernblots demonstra que na ausência de Nop53p há uma diminuição na quantidade dos rRNAs maduros 25S, 18S e 5.8S e um acúmulo dos pré-rRNAs precursores 35S, 27S e 7S, comparado com a cepa controle (Fig. 12). O defeito no processamento do pré-rRNA é visível principalmente após 12 horas. Na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, a normalização dos rRNAs precursores e rRNAs maduros usando como controle interno o mRNA de actina confirma a redução do rRNA maduro 25S em 50% e do rRNA maduro 18S em 25% após 12 horas em glicose. No mesmo intervalo, houve uma redução de 75% do rRNA maduro 5.8S e conseqüente aumento do seu precursor imediato, 7S. O acúmulo do pré-rRNA 7S indica que Nop53p pode ser necessária para a adequada função do exossomo, pois o defeito no processamento do 3' do pré-rRNA 7S é um fenótipo característico de mutantes do exossomo (Mitchell et al., 1997; Oliveira et al., 2002; Zanchin et al., 1997).

Apesar da depleção de Nop53p não afetar fortemente a formação do rRNA 18S, foi possível visualizar um acúmulo dos pré-rRNAs 23S e 35S (Fig. 12). Esse efeito nos primeiros passos do processamento pode ser justificado pela interação encontrada com a proteína Nop17p ou com outros fatores que estejam envolvidos nessas etapas. As baixas concentrações dos rRNAs maduros 25S e 5.8S detectadas por Northern blot foram consistentes com os dados obtidos na marcação *in vivo*. Os resultados do Northern blot indicam que Nop53p seja necessária para o processamento apropriado do pré-rRNA, e está envolvida nas etapas finais de clivagem que levam à síntese dos rRNAs maduros 25S e 5.8S.

Para estudar mais detalhadamente os efeitos da depleção de Nop53p nas clivagens do pré-rRNA, foram realizados experimentos de primer extension, utilizando primers que anelam em regiões dos rRNAs maduros próximo às suas extremidades 5'. Assim como os Northernblots, os ensaios de primer extension foram realizados com RNA total extraído de células crescendo por diferentes tempos em glicose. Extensão do primer P2, que anela nos nucleotídeos 34-53 "downstream" do 5' do 18S rRNA, demonstrou que depleção de Nop53p resulta em produtos mais curtos, indicando que o rRNA 18S esteja sendo degradado na direção 5'-3' (Fig. 13A). Uma diminuição similar na quantidade do produto da primer extension é observada nas extensões de reação usando primer P4, complementar aos nucleotídeos 42-64, downstream do 5' do rRNA 5.8S (Fig. 13B). Extensão do primer

P7, complementar aos nucleotídeos 80-105 downstream do 5' do 25S, também resultou em uma diminuição da concentração da banda correspondente ao 5' do rRNA 25S (Fig. 13C). Porém, o efeito da depleção de Nop53p no 25S rRNA não foi tão severo quanto aquele observado nos rRNAs 18S e 5.8S. Em todos os casos, observa-se na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ bandas menores, correspondendo a paradas da reação de polimerização pela transcriptase reversa em regiões downstream dos sítios normais de clivagem do rRNA (Fig. 13). Experimentos controle foram realizados em paralelo com RNA total extraído da cepa *NOP53*. Nessas células, a extensão dos produtos do primer corresponde ao 5' correto dos rRNAs. De forma interessante, quando os mesmos experimentos foram realizados com a cepa mutante *rrp43-1* (subunidade do exossomo; Oliveira et al., 2002), os resultados foram muito similares aos observados na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ (Fig. 13). Portanto, as reações de primer extension com RNA total da cepa *rrp43-1* crescendo em condições não permissivas indicam que quando o exossomo não está funcional e o processamento do pré-rRNA é defeituoso, os precursores e intermediários de rRNAs podem sofrer degradação no sentido 5'-3'. De forma interessante, a cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ demonstrou o mesmo fenótipo, indicando que Nop53p afeta a função do exossomo.

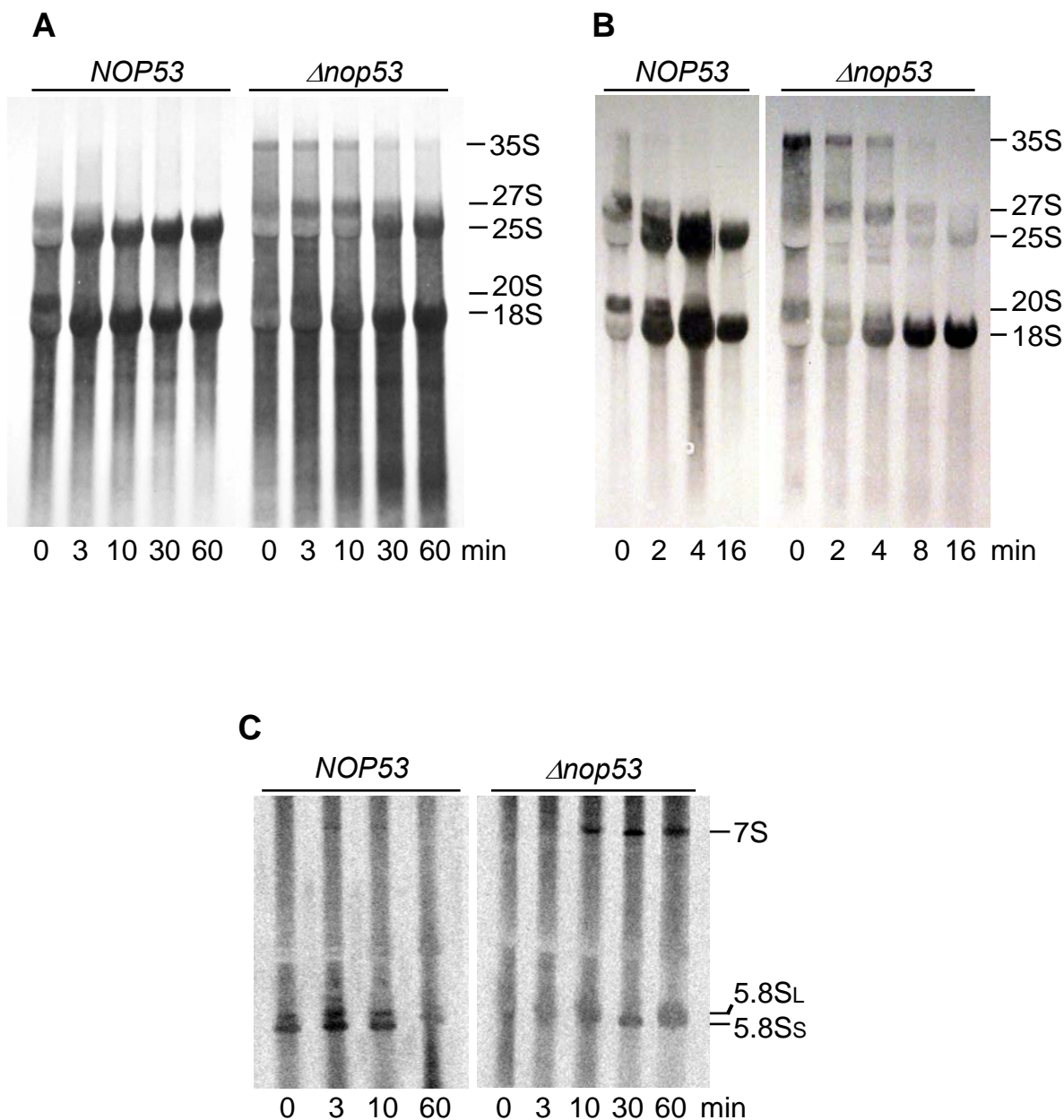


Figura 11. Marcação de rRNA *in vivo*. “Pulse-chase labeling” de RNA com [^3H]-uracila ou com [metil- ^3H]-metionina foi realizado após incubar as cepas *NOP53* e *Δnop53/A-NOP53* em meio contendo glicose por 12 horas. RNA total foi extraído, submetido a eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana de Nylon, e analisado pro Phosphorimaging. **(A)** Marcação com [^3H]-uracila. **(B)** Marcação com [metil- ^3H]-metionina. **(C)** RNA total separado em gel de poliácridamida após marcação com [^3H]-uracila. Uma aliquota de 20 μg de RNA total foi aplicada em cada canaleta. Bandas correspondendo aos principais intermediários e rRNAs maduros estão indicados.

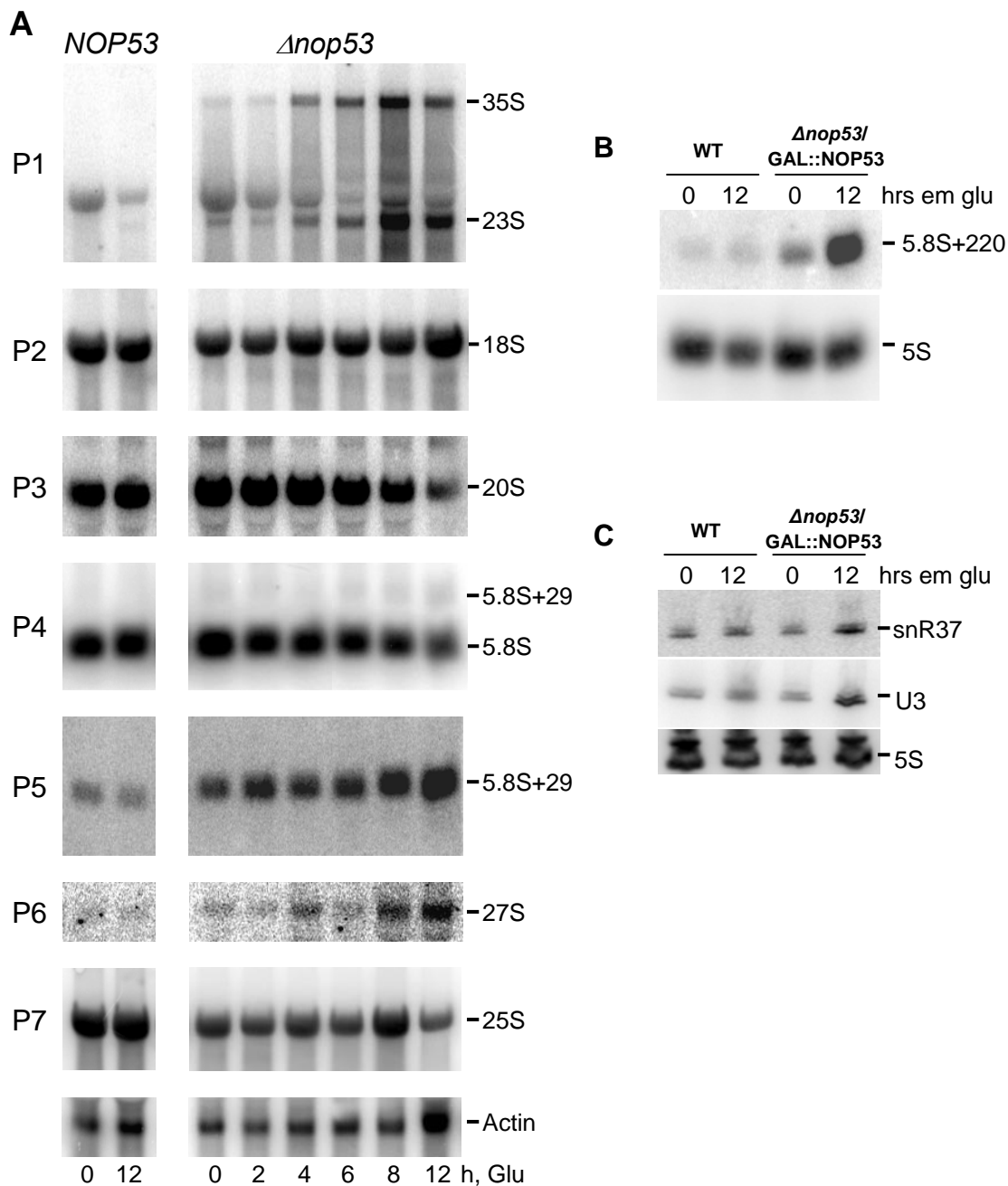
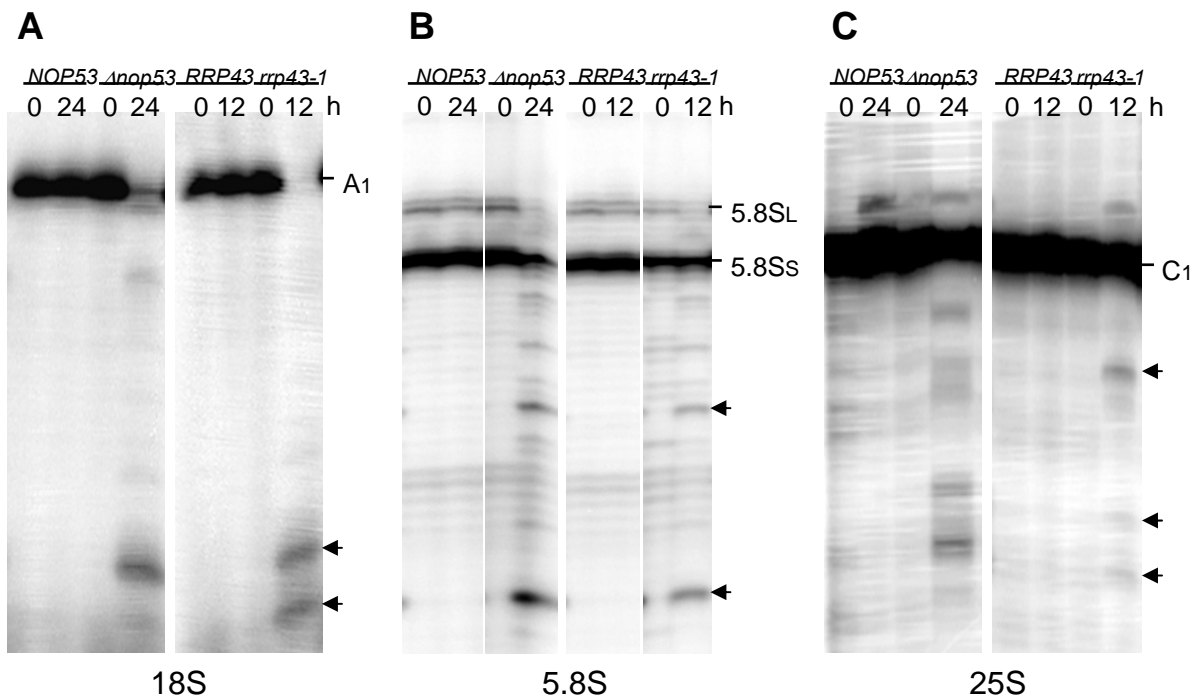


Figura 12. Análise do processamento de pré-rRNA através de Northern blot. (A) RNA total foi extraído de células incubadas por diferentes intervalos de tempo em glicose e hibridizado contra sondas de oligonucleotídeos específicas para diferentes regiões do pré-rRNA. Bandas correspondendo aos principais intermediários e aos rRNAs maduros estão indicadas à direita. mRNA de actina foi utilizado como controle interno. (B) Análise de intermediários de processamento do rRNA 5.8S na cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53*. (C) Nível basal de snoRNAs nas cepas *NOP53* e *Δnop53/GAL::A-NOP53*.



D

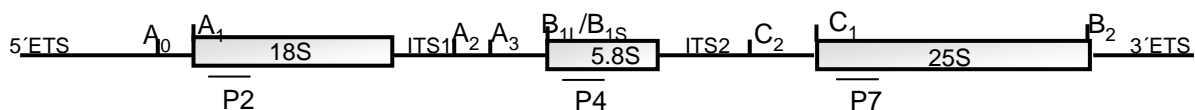


Figura 13. Análise do processamento de pré-rRNA através de primer extension. RNA total foi extraído das cepas *NOP53* e *Δnop53/A-NOP53*, crescendo em meio contendo glicose por diferentes intervalos de tempo e usado nos experimentos de primer extension. Cepas *RRP43* e *rrp43-1* foram incubadas a 37°C pelos períodos indicados, antes da extração de RNA. Reações de primer extension foram realizadas usando oligonucleotídeos P2 (**A**), P4 (**B**) e P7 (**C**), que são complementares às seqüências nas porções 5' dos três rRNAs maduros, 18S, 5.8S e 25S, respectivamente. Bandas correspondendo às extremidades 5' dos rRNAs maduros estão indicadas à direita. Setas indicam os vários produtos pequenos da primer extension. (**D**) Esquema das regiões às quais as sondas utilizadas são complementares no pré-rRNA 35S.

4.5. Caracterização da ligação de Nop53p ao 5.8S rRNA

4.5.1. Nop53p co-precipita rRNA e interage diretamente com o rRNA 5.8S *in vitro*.

Para saber se Nop53p interage com pré-rRNAs, a cepa *NOP53* expressando ProtA ou ProtA-Nop53p foi utilizada para testar co-immunoprecipitação de pré-rRNAs com estas proteínas em colunas de IgG-sepharose. RNA extraído das diferentes frações foram analisados por Northern blot. Os resultados obtidos demonstram que A-Nop53p co-precipita os pré-rRNAs 27S e 7S, e o rRNA maduro 5.8S (Fig.14A). A-Nop53p também co-precipitou o snoRNA de box H/ACA snR37, envolvido em pseudouridilação do 25S rRNA (Fig.14B). Porém, A-Nop53p não co-precipitou snoRNAs envolvidos no processamento do 18S rRNA (dados não mostrados). Isso poderia indicar que Nop53p participa do processamento ou montagem de snoRNPs de box H/ACA. Porém, a falta de Nop53p na célula não afeta a estabilidade de snoRNAs de box H/ACA (Fig. 12). O mais provável é que a co-immunoprecipitação de snR37 ocorra como resultado da co-precipitação da partícula de pré-60S, e não da ligação direta ao snoRNA. Experimentos posteriores demonstraram que Nop53p é capaz de imunoprecipitar snoRNAs de box C/D e H/ACA presentes no complexo do pré-60S, mas não afeta a pseudouridinação do rRNA (dados não mostrados). Portanto, a interação de Nop53p com snoRNP de box H/ACA não deve ser direta, mas ocorrer no contexto do pré-60S.

A quantificação das bandas obtidas na hibridização demonstrou que A-Nop53p co-precipitou 4,3 vezes mais snR37, 4,7 vezes mais 5.8S e 50 vezes mais 7S que o controle ProtA. Esses resultados confirmam que Nop53p faz parte do complexo pré-60S, participando no processamento de 27S pré-rRNA e, mais diretamente, do processamento do 7S pré-rRNA.

Para avaliar se Nop53p é capaz de interagir diretamente com o rRNA 5.8S, independentemente de outras proteínas, foi realizado experimento de ligação a RNA *in vitro*. Para isso, His-Nop53p foi purificada de *E. coli* e sua interação com o rRNA 5.8S transcrito *in vitro* foi testada. Os resultados demonstram que His-Nop53p liga esse RNA diretamente (Fig. 15), o que confirma a hipótese de envolvimento direto de Nop53p no processamento do pré-rRNA 7S, precursor imediato do 5.8S.

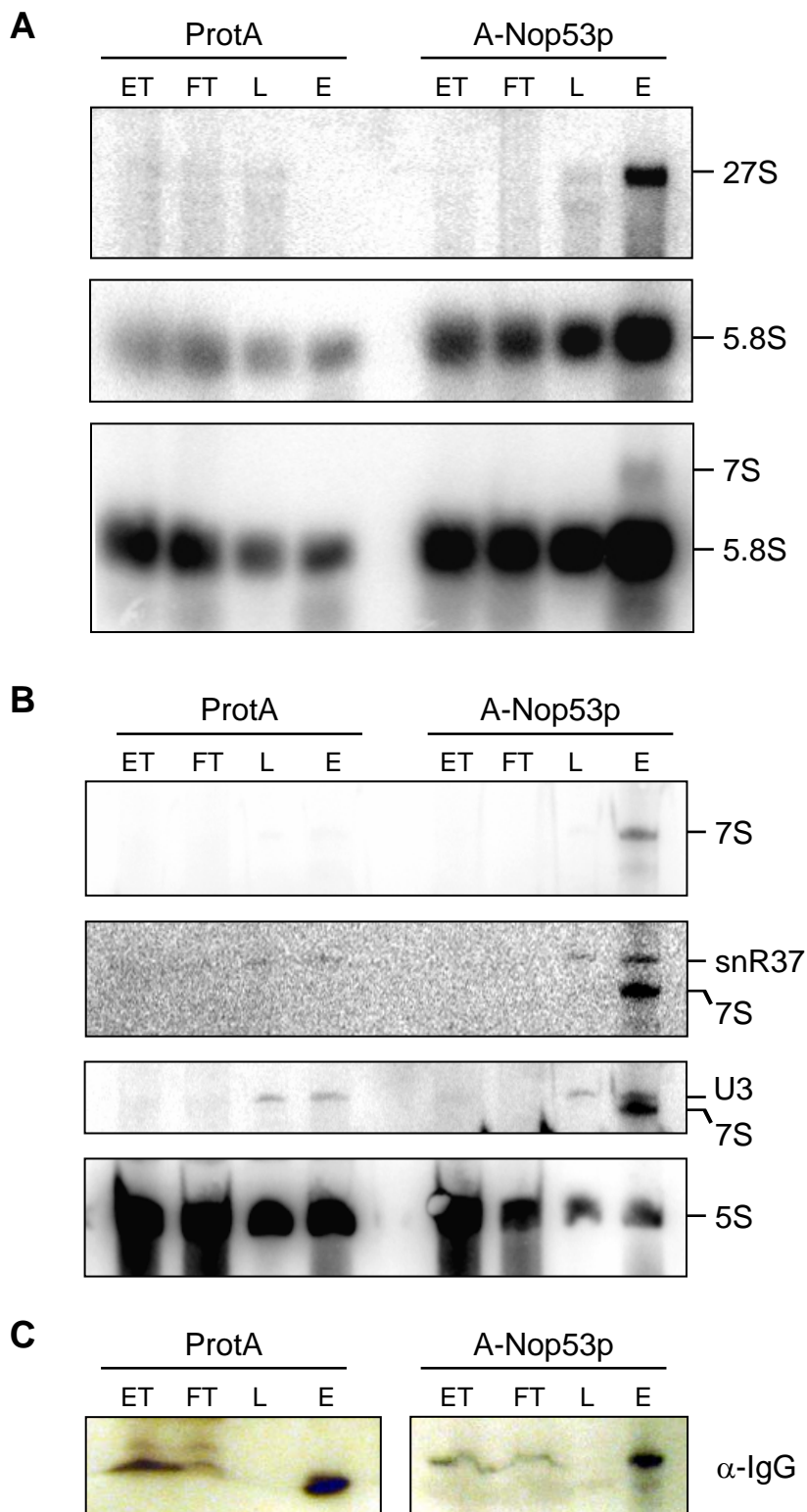


Figura 14. Co-imunoprecipitação de rRNA com A-Nop53p. Co-imunoprecipitação de RNAs com ProtA (controle negativo) ou A-Nop53p. RNA extraído de diferentes frações da imunoprecipitação foi separado em gel de agarose (A) ou gel de poliacrilamida (B). RNA foi detectado por hibridização contra sondas específicas para rRNAs e snoRNAs, como indicado acima. (A) Painel inferior corresponde à super-exposição do painel do meio, permitindo a visualização da banda correspondente ao pré-7S. (C) Western blot de proteína total das mesmas frações acima. Bandas correspondentes à ProtA e A-Nop53p foram detectadas com soro Anti-IgG. ET, extrato total; FT, flow through; L, fração de lavagem; E, fração ligada à coluna (resina).

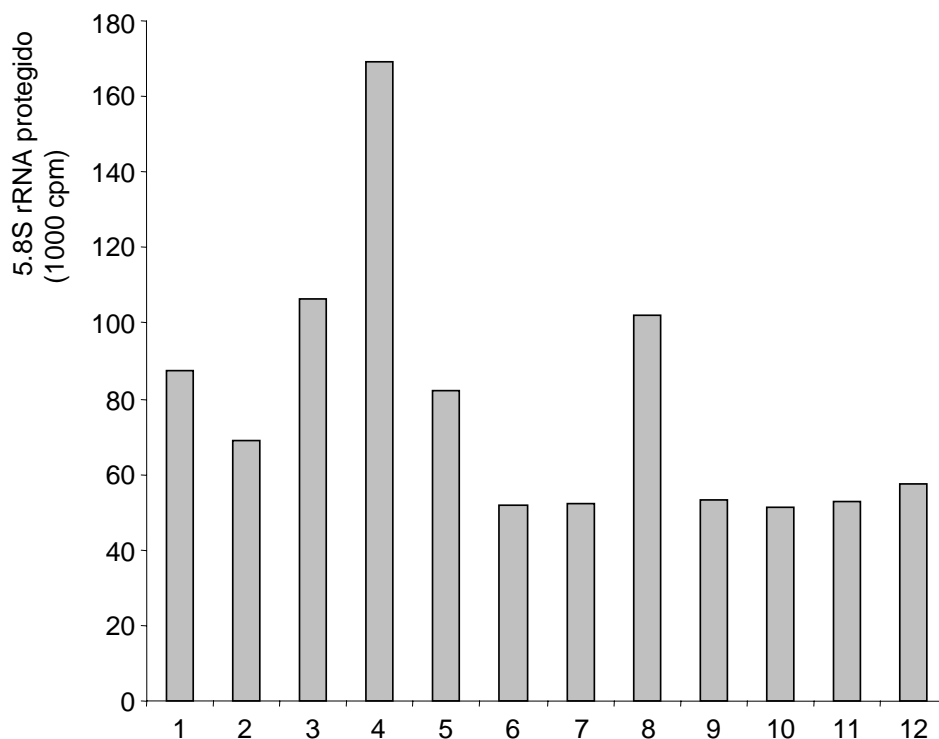
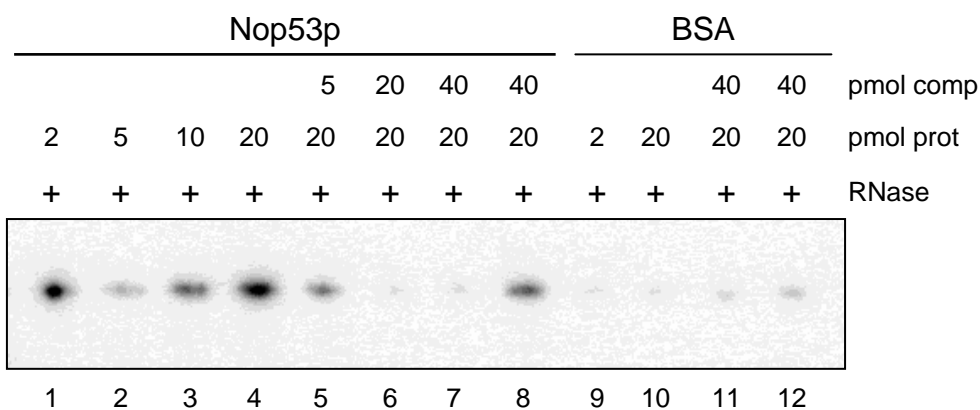


Figura 15. Ligação de Nop53p ao rRNA 5.8S. 1 pmol de rRNA 5.8S, transcrito *in vitro* e marcado radioativamente, foi incubado com concentrações crescentes de His-Nop53p ou BSA, na ausência ou presença de competidor não marcado. Amostras foram submetidas à “UV crosslink”, digestão com RNaseA, e resolvidas em gel desnaturante de poliacrilamida. 1-4, rRNA [³²P]-5.8S incubado com 2-20 pmol de His-Nop53p; 5-7, 20 pmol de His-Nop53p e 5-40 pmol de 5.8S frio; 8, 20 pmol de His-Nop53p e 40 pmol de RNA competidor inespecífico; 9-10, rRNA 5.8S e concentrações crescentes de BSA; 11, 20 pmol de BSA e 40 pmol de rRNA 5.8S frio; 12, [³²P]-5.8S, 20 pmol de BSA e 40 pmol de competidor inespecífico. Painel inferior mostra a quantificação da proteção das bandas de rRNA [³²P]-5.8S.

4.5.2. *Nop53p é recrutada para o pré-rRNA co-transcricionalmente.*

Devido à localização nucleolar de Nop53p e sua associação direta ao rRNA 5.8S, fomos investigar se essa interação com o rRNA ocorre co-transcricionalmente através de ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), usando a proteína de fusão ProtA-Nop53p. Cromatina imunoprecipitada foi analisada através de reações de PCR radioativo, usando primers complementares a diferentes regiões do 35S rDNA e de genes de snoRNAs snR37 (box H/ACA) e snR74 (box C/D). Os resultados demonstram que ProtA-Nop53p imunoprecipita especificamente cromatina do 5.8S, mas não cromatina do 18S ou 25S (Fig. 16A). Como Nop53p interage diretamente com o 5.8S rRNA, ChIP foi realizado na presença de RNase A/T1 para verificar se ligação de ProtA-Nop53p à cromatina é dependente da transcrição ativa. Os resultados demonstram que na presença de RNase A/T1, a imunoprecipitação de cromatina é reduzida aos mesmos níveis de ProtA (Fig. 16B,D). Esses resultados demonstram que Nop53p liga rRNA 5.8S co-transcricionalmente. Além disso, para confirmar a ligação de Nop53p à cromatina de rDNA durante a transcrição, interação direta entre Nop53p e o fator de transcrição da RNA polimerase I, Rrn3p (Claypool et al., 2004) foi observado por experimentos de "pull-down" (Fig. 16E).

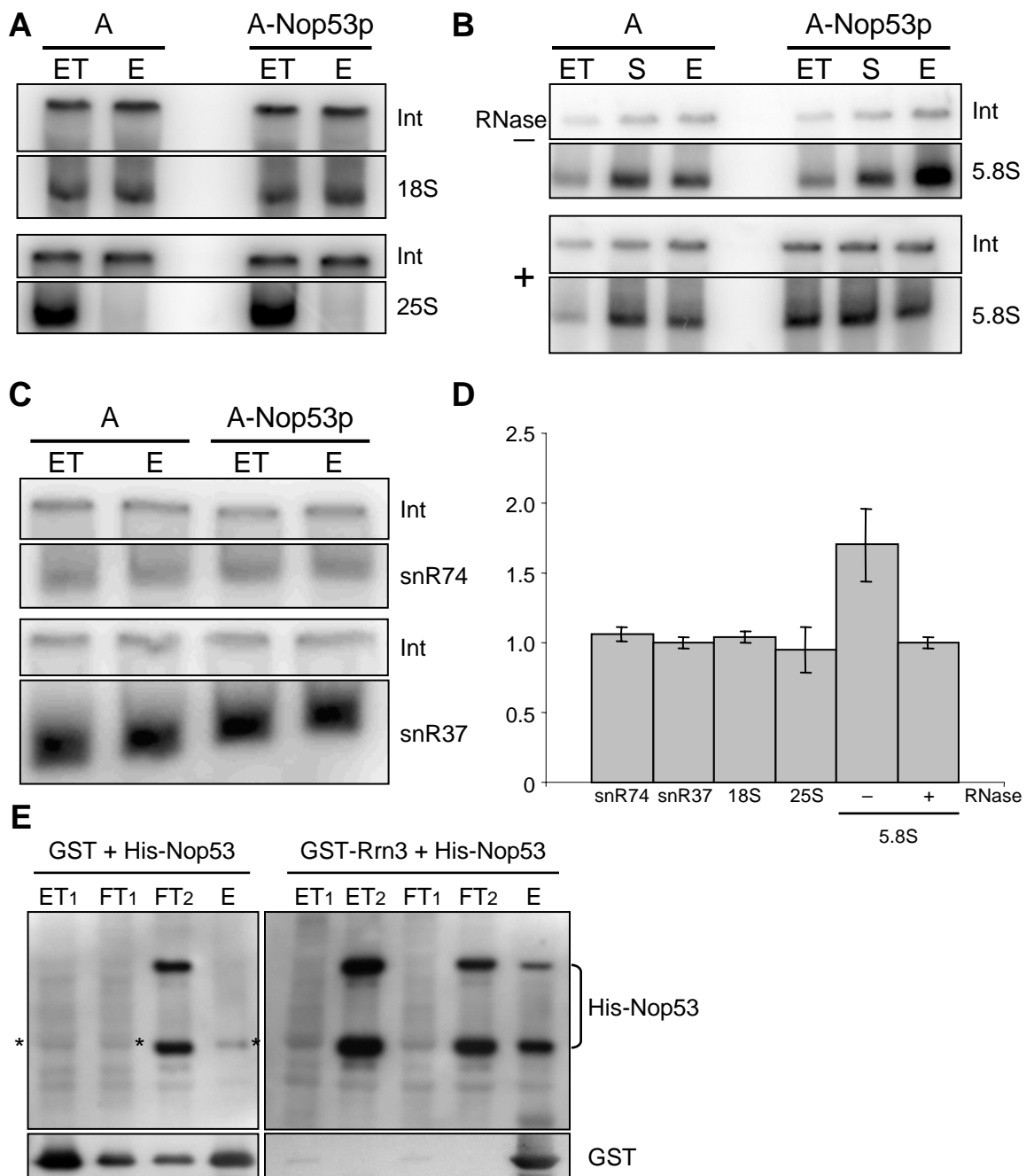


Figura 16. Nop53p imunoprecipita cromatina do rRNA 5.8S e interage com fator de RNA pol I.

Amplificação por PCR de diferentes regiões do rDNA e genes de snoRNAs após ChIP com A-Nop53p, ou ProtA. **(A)** PCR para amplificação das regiões da cromatina dos rRNAs 18S e 25S. **(B)** Amplificação da região do rRNA 5.8S com amostras de ChIP na ausência (painel superior) e na presença (painel inferior) de RNaseA/T1. **(C)** Amplificação da cromatina de snoRNAs. Int., região intergênica do cromossomo V (controle interno); ET, extrato total; S, cromatina sonicada; E, eluição. **(D)** Quantificação das bandas obtidas no PCR por Phosphorimaging. Valores representam a razão do rDNA/região intergênica. Barras de desvio padrão estão demonstradas. **(E)** Western blot para detecção de proteínas após ensaio de pull-down. Extrato total das células expressando GST ou GST-Rrn3p (ET1) foi incubado com a resina de glutationa-sepharose, flow through foi coletado (FT1) e após lavagem, extrato total de células expressando His-Nop53p (ET2) foi adicionado. Flow through foi coletado novamente (FT2), resina foi lavada, e fração ligada foi obtida (E). His-Nop53p é co-precipitada com GST-Rrn3p. His-Nop53p foi detectada com anticorpo anti-His. GST e GST-Rrn3p foram detectados com soro anti-GST. Bandas correspondentes a proteína inteira e produtos de quebra de His-Nop53p estão indicados à direita. * indica proteína presente em extrato de *E.coli* que corre próximo a His-Nop53p.

4.5.3. Nop53p interage com duas regiões do rRNA 5.8S e protege uma região de 30 nucleotídeos.

Como Nop53p interage com o rRNA 5.8S, fomos determinar os sítios desse rRNA que são reconhecidos por Nop53p. Para isso foram realizados experimentos de “footprinting”, nos quais a ligação de Nop53p ao RNA levaria à inibição da reação de primer extension. Nesses experimentos, o RNA 5.8S+29 rRNA (5.8S contendo um segmento de 29 nucleotídeos do ITS2), transcrito *in vitro*, foi incubado com Nop53p purificada, os complexos Nop53p-5.8S+29 obtidos foram submetidos a UV “crosslink”, tratados com proteinase K, e submetidos à primer extension, usando um primer complementar à extensão 3’ do rRNA 5.8S+29 (Fig. 17). Foram identificados dois sítios principais de inibição da primer extension nas amostras do rRNA incubado com Nop53p e que não podem ser observados nas reações só com o RNA. Nop53p ligou duas regiões do 5.8S, uma região da extremidade 5’ do rRNA 5.8S, e outra região, perto da extremidade 3’ (Fig. 17A). Como os rRNAs são bastante estruturados, apresentando várias porções envolvidas em estruturas secundárias, é possível que as duas regiões do rRNA 5.8S reconhecidas por Nop53p correspondam a um segmento em dupla-fita.

Para determinar o tamanho da região do rRNA 5.8S reconhecido por Nop53p, foram realizados experimentos de proteção do RNA à digestão com RNases A/T1, depois da ligação Nop53p-5.8S (Fig. 17B). Os resultados indicam que Nop53p proteja uma região de aproximadamente 30 nucleotídeos do rRNA 5.8S.

4.5.4. *Fragmento do 5.8S rRNA, abrangendo os dois sítios de ligação, é necessário para a ligação de Nop53p.*

Para determinar se Nop53p reconhece uma região de fita simples ou dupla no rRNA 5.8S, foram realizados experimentos de ligação RNA-proteína *in vitro* com oligoribonucleotídeos correspondendo às duas regiões do 5.8S inferidas através dos experimentos descritos acima. Confirmando os dados acima, Nop53p ligou ambos oligos de RNA, mas com baixa afinidade, comparada à ligação ao rRNA 5.8S, o que indica que ambas regiões tenham que estar presente no rRNA para que Nop53p se ligue eficientemente (Fig. 18). Portanto, Nop53p deve reconhecer regiões mais longas do RNA ou estruturas secundárias do rRNA 5.8S. Quando fragmentos do 5.8S rRNA foram usados nos experimentos *in vitro*, Nop53p ligou ambos os fragmentos mais eficientemente que os oligos de RNA. Esses resultados indicam que Nop53p requer porções de RNA maiores que 20 nucleotídeos para ligar eficientemente, provavelmente reconhecendo região de dupla fita do rRNA 5.8S.

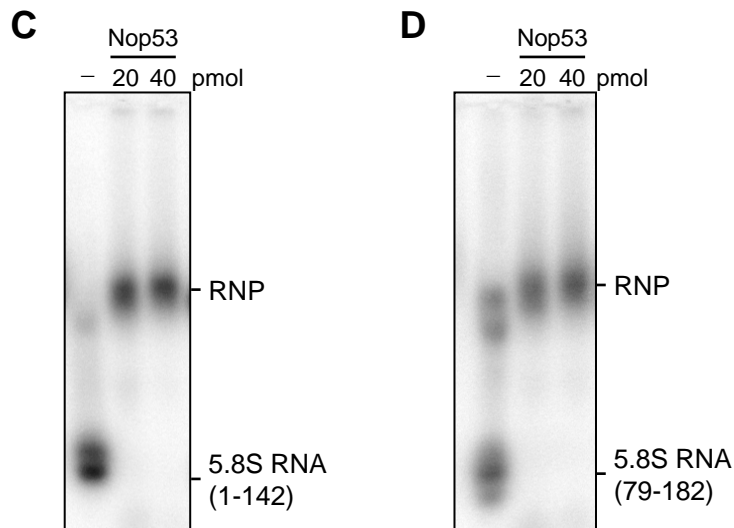
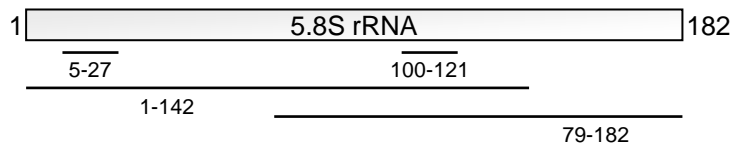
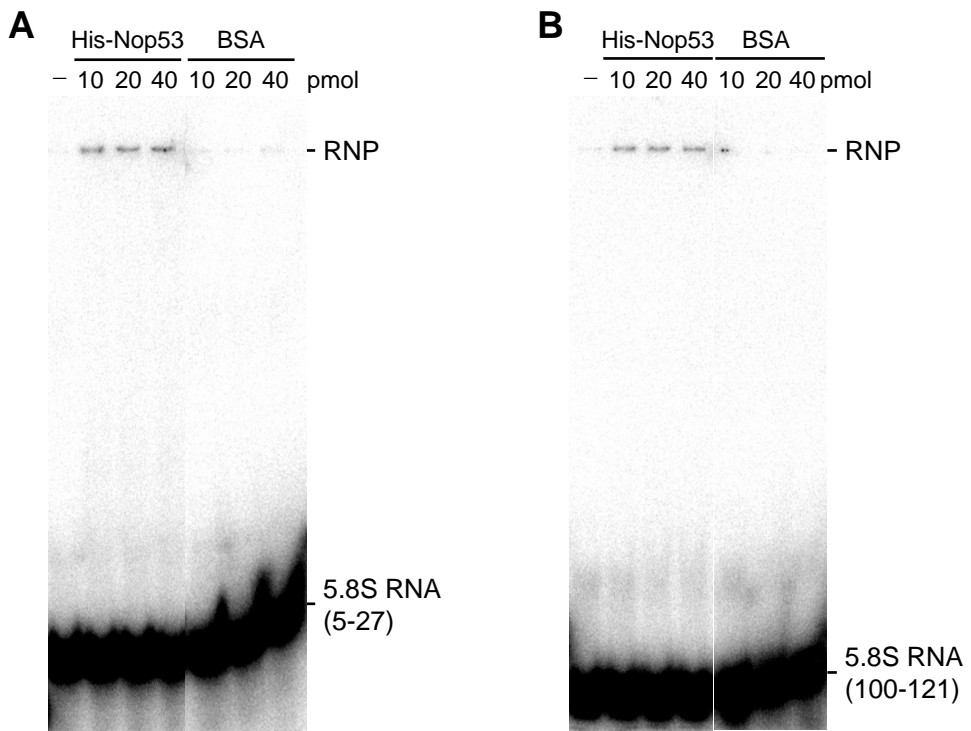


Figura 18. Ligação de Nop53p a oligos de RNA correspondendo a diferentes regiões do rRNA 5.8S. Ensaios de band-shift foram realizados com oligos de RNA correspondendo aos nucleotídeos 5-27 (A), 100-121 (B) do rRNA 5.8S, ou RNA transcrito *in vitro* correspondendo a segmentos do rRNA 5.8S 1-142 (C), e 79-182 (D). Bandas correspondendo a RNAs livres e complexos de RNA-proteína (RNP) estão indicados à direita.

4.5.5. Interação de Nop53p e Nip7p com o rRNA 5.8S.

Nip7p também se liga ao rRNA 7S, e sua depleção leva ao acúmulo do pré-rRNA 27S na célula (Coltri et al., no prelo; Zanchin et al., 1997). Com o objetivo de testar a possível competição entre Nop53p e Nip7p pela ligação ao 7S, foi realizado um ensaio de co-imunoprecipitação de RNA em coluna de IgG sepharose com extratos totais das cepas *NOP53* e $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ expressando A-Nip7p. A-Nip7p co-imunoprecipitou pré-rRNAs do pré-60S em ambas as cepas, mas apesar de precipitar mais do intermediário rRNA 27S na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, em glicose, com a depleção de Nop53p, há um acúmulo de 27S nessa cepa (Fig. 19A). Assim, pode-se concluir que a ligação de Nip7p ao pré-60S não é dependente de Nop53p.

Ainda com o objetivo de testar se há competição entre Nop53p e Nip7p por ligação ao rRNA 5.8S, foram realizados experimentos de ligação dessas proteínas a um RNA transcrito *in vitro* correspondendo ao rRNA 5.8S+120 (120 nucleotídeos do espaçador ITS2 na extremidade 3' do 5.8S). Os resultados demonstram que Nop53p e Nip7p podem se ligar ao rRNA concomitantemente (Fig. 19B). Esses resultados confirmam a hipótese de que esses dois fatores de processamento não competem pela ligação ao substrato, mas interagem com o pré-rRNA independentemente *in vitro*. Entretanto, como essas duas proteínas interagem entre si, este resultado não exclui a hipótese de o super-shift do RNA visto no gel ser devido à interação proteína-proteína.

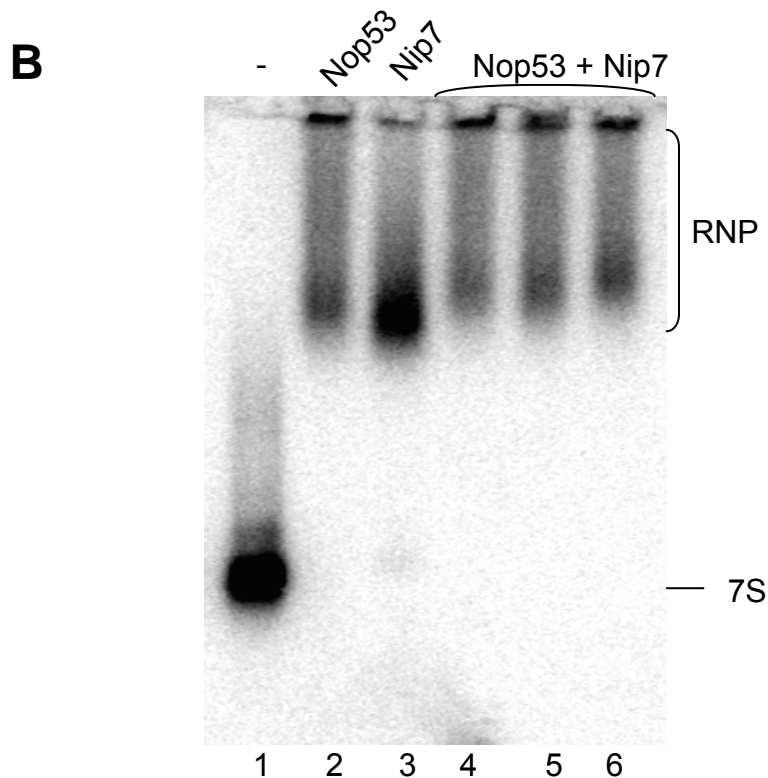
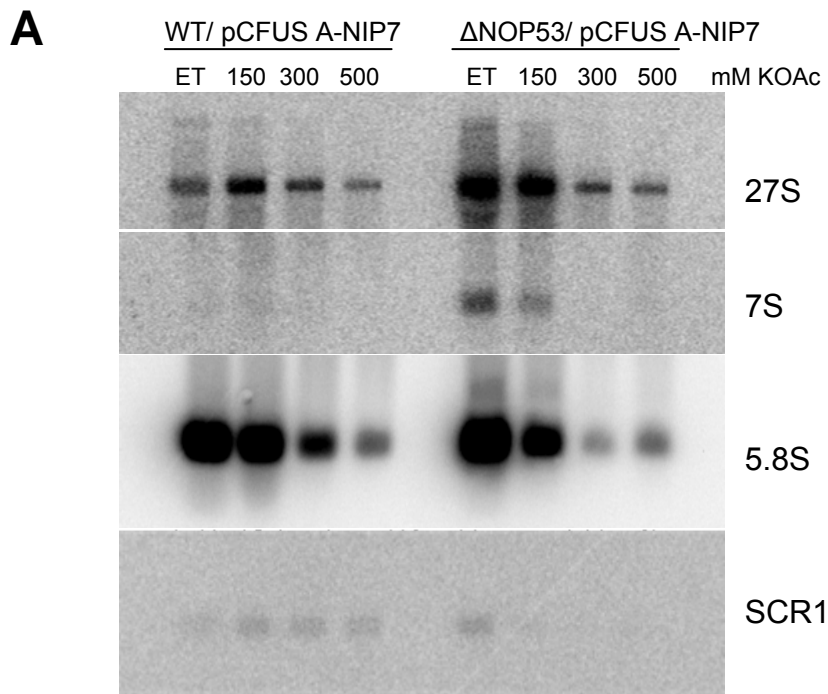


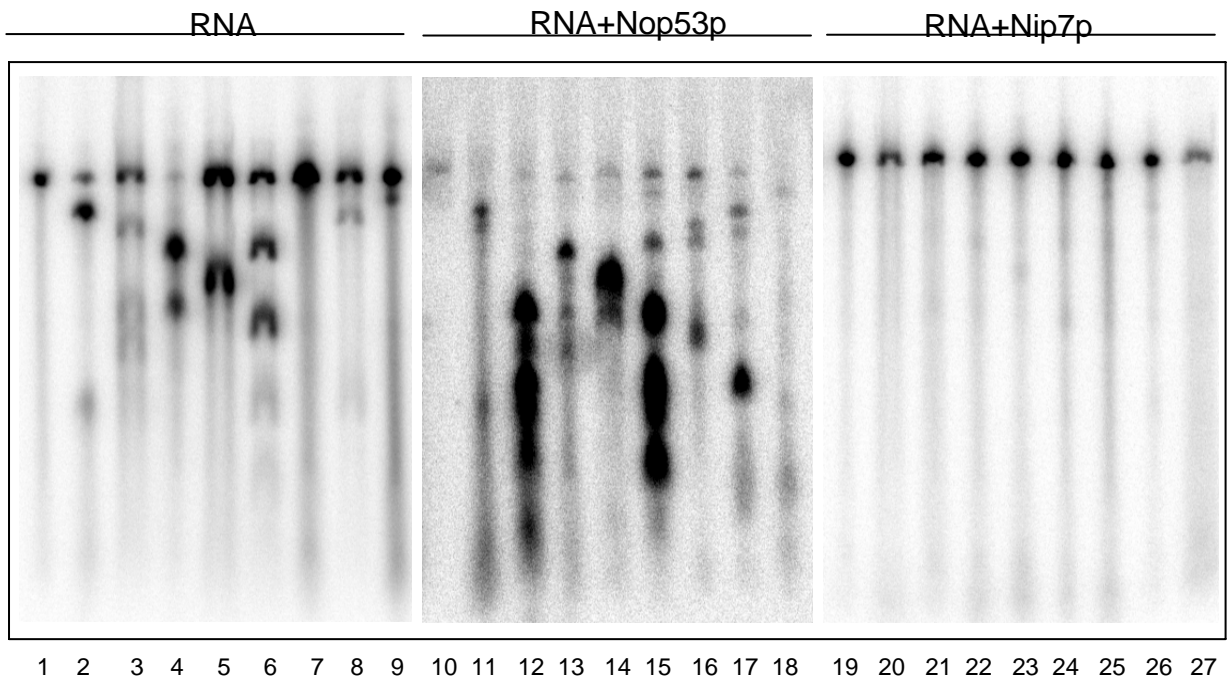
Figura 19. Ligação de Nop53p e Nip7p ao rRNA 5.8S. (A) Co-imunoprecipitação de RNA com A-Nip7p nas cepas *NOP53* e $\Delta nop53$. Northern blot com diversas sondas específicas para rRNAs e scr1 (controle interno), marcadas radioativamente. (B) rRNA ^{32}P -5.8S+220nt foi incubado com 40 pmol de Nop53p ou Nip7p, e amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. 1, RNA; 2, Nop53p; 3, Nip7p; 4, Nop53p e Nip7p, adicionadas ao mesmo tempo; 5, Nip7p adicionada 15 min depois da adição de Nop53p; 6, Nop53p adicionada 15 min depois de Nip7p.

4.5.6. Nop53p altera a estrutura secundária de 5.8S rRNA.

Para identificar se a ligação de Nop53p ao RNA promove a alteração estrutural de uma determinada região no RNA, foi realizado o ensaio de proteção do rRNA 5.8s contra digestão com RNase. rRNA 5.8S foi transcrito *in vitro* e incubado com Nop53p ou Nip7p, e em seguida, oligos de DNA complementares a diferentes regiões do rRNA 5.8S foram anelados aos complexos rRNA-proteína. A seguir, foi feito um tratamento com RNase H, que digere RNA em dupla-fita híbrida com DNA. Como Nop53p liga-se fortemente ao rRNA 5.8S, esperávamos inicialmente que os sítios do rRNA envolvidos na interação com Nop53p, fossem protegidos da degradação pela RNase H. Porém, o que foi observado é que na presença de Nop53p, o RNA foi muito mais degradado em diferentes regiões, especialmente na região mais próxima à extremidade 3' do RNA. O RNA livre de proteínas foi usado como controle e o padrão de degradação foi diferente daquele obtido na presença de Nop53p, exceto no anelamento dos oligos A e C (Fig. 20). Como Nip7p é uma proteína que também liga o rRNA 5.8S, mas preferencialmente a regiões de dupla-fita (Coltri et al., no prelo), esperávamos que a interação Nip7p-5.8S dificultasse o anelamento dos oligos de DNA ao 5.8S e, portanto, sua degradação por RNase H. De maneira interessante, foi exatamente isso que observamos, porém essa proteção ocorre ao longo de todo o RNA (Fig. 20).

O efeito de desenovelamento que Nop53p promoveu na conformação do 5.8S rRNA, levantou a hipótese de que esta proteína pudesse atuar como helicase na célula, expondo o extremo 3' do rRNA 7S à degradação pelo exossomo, o que corroboraria os resultados observados no processamento deste RNA. Porém, experimentos para testar a possível atividade de helicase ou de ATPase de Nop53p não confirmaram essa hipótese.

A



B



Figura 20. Ensaio de proteção do rRNA 5.8S+29 por Nop53p ou Nip7p à degradação com RNase H. (A) Ensaio de RNase H com o rRNA ^{32}P -5.8S. 1,10, 19, RNA não tratado com RNase H; 2-9, RNA anelado aos oligos de DNA A-H, respectivamente;11-18, RNA complexado a Nop53p anelado aos oligos de DNA A-H; 20-27, RNA complexado a Nip7p anelado aos oligos de DNA A-H. (B) Esquema da posição dos oligos de DNA ao longo da seqüência do rRNA 5.8S.

4.6. Análise da associação de Nop53p ao complexo do pré-60S.

4.6.1. *Nop53p se associa à subunidade ribossomal 60S e a um complexo de alto peso molecular.*

Sabendo da interação de Nop53p com proteínas envolvidas na biogênese ribossomal e do defeito observado na maturação dos rRNAs que compõem a subunidade maior na ausência de Nop53p, decidimos analisar o perfil de polissomos da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, incubada por 12 horas em meio contendo galactose ou glicose. Os resultados mostram uma diminuição do número de subunidades 60S na ausência de Nop53p e subsequente redução de ribossomos (80S) e de polissomos (Fig. 21). Esses resultados são condizentes com uma deficiência na biogênese ribossomal, que corrobora os dados de interação de Nop53p com proteínas envolvidas neste mesmo processo. Portanto, a ausência de Nop53p afeta a biogênese da subunidade ribossomal 60S, prevista na análise de processamento de rRNAs que formam esta subunidade na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$.

Como Nop53p co-purificou cromatina durante a transcrição de pré-rRNA e depleção de Nop53p leva ao acúmulo dos pré-rRNAs 7S, 27S e 35S, foi levantada a hipótese de que Nop53p permanecesse ligada ao rRNA 5.8S durante seu processamento. Através da análise das proteínas presentes nas diferentes frações obtidas nos experimentos de gradiente polissomal, podemos verificar que ProtA-Nop53p se concentra nas frações contendo 27S e 7S pré-rRNAs e 5.8S rRNA maduro, correspondendo ao complexo pré-60S (Nissan et al., 2002). Nop53p também foi detectada em um complexo maior, provavelmente correspondendo ao 90S. Nessas frações também foi detectada a presença de Nop1p, componente do SSU processomo, marcador do 90S. Esses resultados confirmam que Nop53p se liga ao rRNA 5.8S nas etapas iniciais de processamento, permanece ligada a esse RNA durante o processamento e está presente no pré-60S. Nip7p, como esperado, também se associou à subunidade 60S. Na presença de Nop53p, entretanto, Nip7p está principalmente na forma livre, enquanto que nas condições de depleção de Nop53p, Nip7p está presente na fração contendo 27S em maior concentração que sua forma livre (Fig. 21).

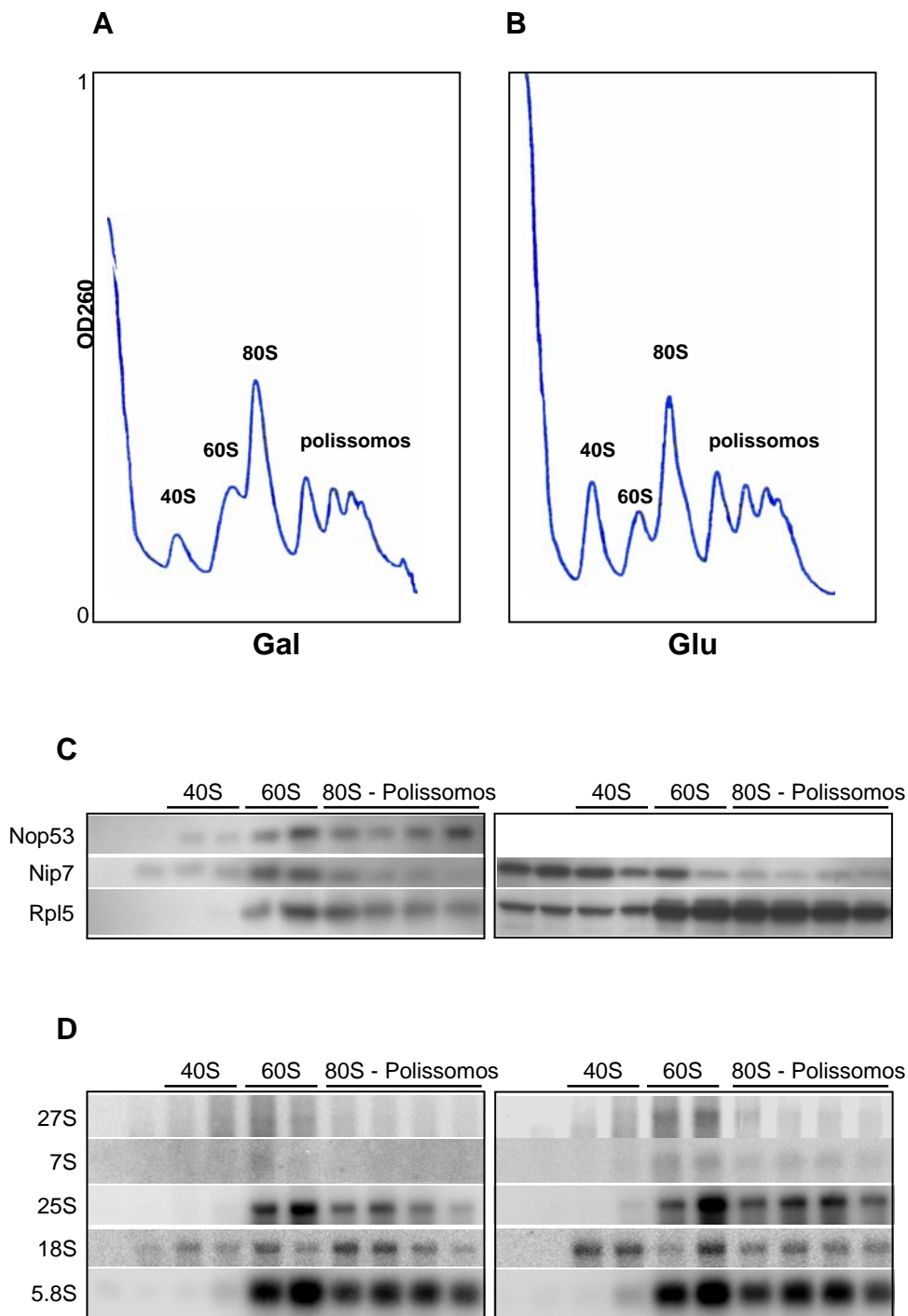
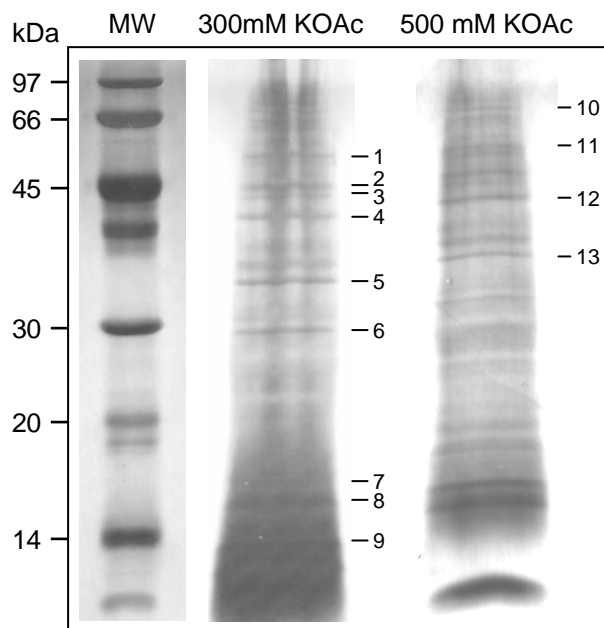


Figura 21. Perfil polissomal da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$.

Extrato total da cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ crescendo em galactose (A), ou em glicose por 12 horas (B) foi fracionado em gradiente de sacarose 5-47%. Proteínas e RNA foram extraídos das frações e analisados por Western (C) e Northern Blots (D), respectivamente. Proteínas e RNA foram detectados com anticorpos ou sondas radioativas específicos, indicados à esquerda. Expressão de A-Nop53p é reprimida em glicose, e portanto, essa proteína não pode ser visualizada nessas condições.

4.6.2. *Nop53p se associa a proteínas do pré-60S e 90S.*

Para esclarecer a sua função molecular no processamento de rRNA, foi iniciada uma busca de novas proteínas, além de Nop17p e Nip7p, que interagem com Nop53p através de experimentos de co-purificação de complexos de proteínas com ProtA-Nop53p. Para isso, foi preparado extrato total de levedura, purificação de complexos com A-Nop53p por cromatografia de afinidade, e identificação das proteínas co-purificadas por espectrometria de massas (em colaboração com o Dr. Daniel Pimenta - Instituto Butantan). Para avaliar a força de interação com Nop53p, as proteínas foram eluídas da coluna com duas concentrações de sal (300 mM KOAc e 500 mM KOAc), separadas por eletroforese em gel de gradiente de poli-acrilamida (18 a 24%), e visualizadas através de coloração com prata. Os resultados obtidos demonstram que Nop53p co-purifica proteínas presentes no complexo pré-60S (Fig. 22). Como esperado, foram identificadas proteínas ribossomais da subunidade maior, proteínas envolvidas em processamento de rRNA, e algumas ainda não caracterizadas, possíveis alvos de estudo. É interessante notar que as proteínas ribossomais identificadas se associam às subunidades ribossomais nas etapas iniciais do processamento, e são portanto, fatores que fazem parte do complexo pré-90S. Por outro lado, Nip7p e Nop17p, não foram identificadas nesse experimento, provavelmente devido ao baixo nível de expressão de Nop17p, e à interação fraca com Nip7p, ou talvez por essas interações serem transientes e de difícil detecção nas condições de co-purificação utilizadas. Também foram identificados proteínas citoplasmáticas e fatores envolvidos em vias distintas, que possivelmente sejam falsos positivos. Dentre as proteínas envolvidas em metabolismo de RNA estão Pab1p (poly-A binding protein; Caponigro & Parker, 1995; Otero et al., 1999; Tarun & Sachs, 1996), e Nop8p, envolvida em processamento do pré-60S (De laCruz et al., 2004; Rosado et al., 2007; Zanchin & Goldfarb, 1999a).

A**B**

	Protein	Access number	MW (kDa)	Function
2	Rpl3	P14126	44	60S ribosomal protein L3
4, 12	Rpl4A	P10664	39	60S ribosomal protein L4A
6, 13	Rps5	P26783	25	40S ribosomal protein S5
7	Rpl38	S53402	8.8	60S ribosomal protein L38
11	Dhh1	S31229	58	RNA helicase
5	YJL204C	S77615	97	Hypothetic protein
9	YOR020C	Q6B158	11	Hypothetic protein
10	YLR072W	Q08001	78	Unknown
3	Act2	S20225	44	Actin nucleation
1	Imdh2	P38697	57	Inosine monoph. dehydrog.
8	Mal	P90467	8.7	Hypothetic protein

Figura 22. Co-purificação de proteínas com A-Nop53p e identificação por espectrometria de massas. (A) Proteínas complexadas com A-Nop53p foram eluídas com diferentes concentrações de sal, separadas em gel de SDS/gradiente de poli-acrilamida 16-24%, e visualizadas através de coloração com prata. Bandas foram extraídas do gel e proteínas identificadas por espectrometria de massas. (B) Tabela contendo proteínas identificadas após análise das bandas indicadas em A.

4.7. Análise das funções das regiões N- e C-terminal de Nop53p

4.7.1. *Nip7p interage com Nop53p através do domínio PUA.*

Nip7p apresenta um domínio PUA em sua porção C-terminal, que é similar ao domínio presente em Cbf5p, fator do snoRNP de box H/ACA (Coltri et al., no prelo). Esse domínio está provavelmente envolvido em interação proteína-proteína e proteína-RNA (Aravind and Koonin., 1999; Hallberg et al., 2006; Ishitani et al., 2002; Manival et al., 2006; Marco-Marín et al., 2007; Reinert et al., 2006). Para avaliar se esse domínio de Nip7p é responsável pela interação com Nop53p, e qual região de Nop53p está envolvida na interação, foi utilizado o sistema do duplo-híbrido. Para avaliar a interação de Nip7p com as porções de Nop53p, a cepa L40/pBTM-NIP7 foi transformada com pGADC2-NOP53, pGADC2-N-NOP53 e pGADC2-C-NOP53. Nip7p interage com as porções N- e C-terminal de Nop53p (Fig.23). O crescimento nas placas sem histidina e a quantificação da atividade de β -gal demonstram que a interação de Nip7p com as porções de Nop53p ou com a proteína inteira é similar.

O domínio N-terminal de Nip7p não interagiu com Nop53p. Por outro lado, a porção C-terminal de Nip7p, que contém o domínio PUA, interage com Nop53p. BD-C-NIP7 é capaz de ativar a transcrição dos genes repórteres, sendo necessário acrescentar 1,2 mM de 3-AT nas placas para testar a interação dessa porção de Nip7p com outras proteínas. A quantificação da atividade de β -galactosidase, que permite visualizar de forma mais clara a força de interação, revela que a interação do domínio PUA é um pouco mais forte com a porção C-terminal de Nop53p (Fig. 23).

4.7.2. *Domínio carboxi-terminal de Nop53p interage com Nop17p.*

Nop17p interagiu com a porção C-terminal de Nop53p fusionada ao AD (Fig. 23). Por outro lado, a porção N-terminal de Nop53p não interagiu com Nop17p (Fig. 23). As porções amino e carboxi-terminal de Nop17p também não demonstraram interação com Nop53p (Fig. 23). Estes resultados indicam que a região carboxi-terminal de Nop53p é fundamental na interação com Nop17p. Como esta região de Nop53p não está envolvida na interação direta com o RNA, é possível especular que a região C-terminal de Nop53p esteja envolvida em interações proteína-proteína. Concluindo, N-Nop53p interage mais fortemente com Nip7p enquanto que C-Nop53p interage com Nop17p.

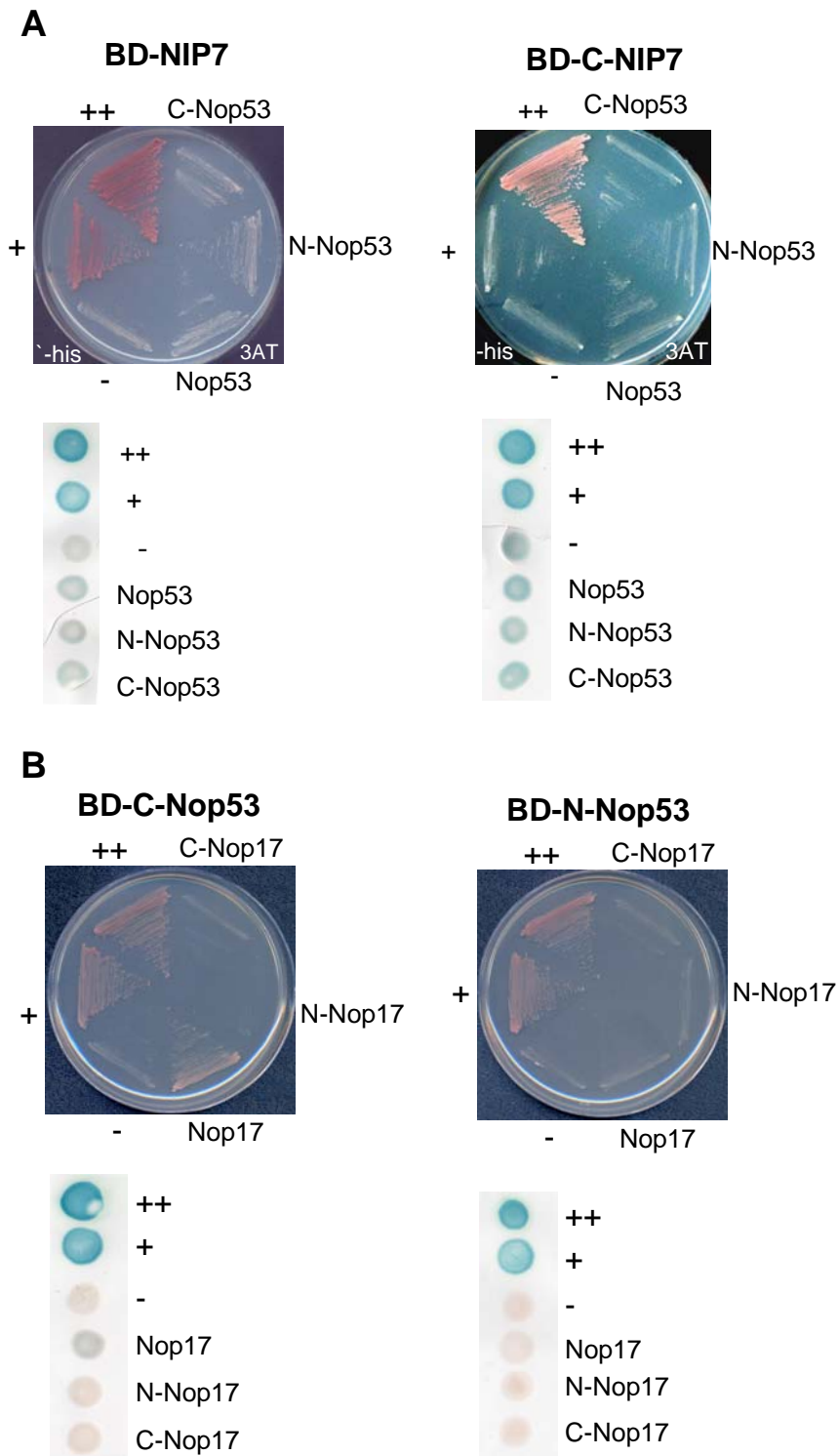


Figura 23. Domínios de interação de Nop53p com Nip7p e Nop17p. Análise da interação de proteínas no sistema do duplo-híbrido pela expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*. **(A)** Interação entre BD-Nip7p e AD-Nop53p, AD-N-Nop53p, ou AD-C-Nop53p. **(B)** Interação entre BD-C-Nip7p e AD-Nop53p, ou suas versões truncadas. **(C)** Teste de interação entre BD-C-Nop53p e AD-Nop17p, AD-N-Nop17p, ou AD-C-Nop17p. **(D)** Teste de interação entre BD-N-Nop53p e AD-Nop17p, AD-N-Nop17p, ou AD-C-Nop17p. ++, +, controle positivos; -, controle negativo.

4.7.3. Nop53p liga-se ao rRNA 5.8S através de sua porção N-terminal.

Embora não contenha em sua seqüência domínios conhecidos de ligação a RNA, Nop53p liga-se ao rRNA 5.8S especificamente. Para determinar a região da proteína envolvida nessa ligação com o complexo do pré-60S, foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação de RNA com ProtA-Nop53p e com as porções amino- e carboxi-terminal da proteína, também fusionadas à ProtA (Fig. 24). Os resultados demonstram que ambas as porções de Nop53p co-imunoprecipitam rRNA, o que indica que interações proteína-proteína e proteína-RNA sejam responsáveis pela presença de Nop53p no pré-60S. A porção C-terminal (A-C-Nop53p) co-purifica os rRNAs 27S, 7S e 5.8S mais eficientemente, que A-N-Nop53p. Isso indica que a ligação da porção carboxi-terminal de Nop53p aos complexos de pré-rRNPs é mais estável. Esse experimento, entretanto, indica somente a região de Nop53p que se liga mais estávelmente ao complexo do pré-60S, mas não determina se é suficiente para ligação direta a RNA. Experimentos de ligação das porções de Nop53p a RNA transcrito *in vitro* demonstram que a porção N-terminal é capaz de se ligar diretamente ao RNA, mas não a porção C-terminal da proteína (Fig. 25). Portanto, esses resultados demonstram que Nop53p liga 5.8S rRNA através de sua região N-terminal, mas a ligação é estabilizada por interação proteína-proteína que ocorre no pré-60S, já que C-Nop53p imunoprecipitou mais eficientemente o pré-60S.

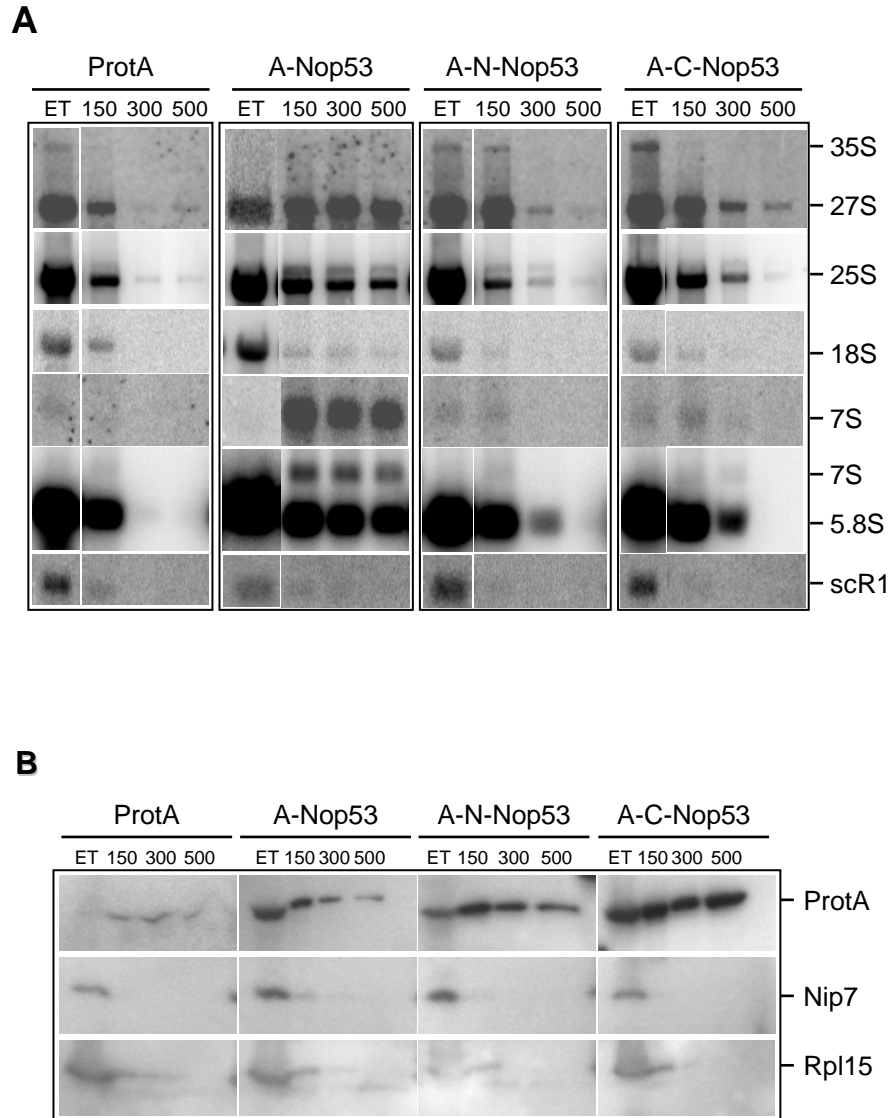


Figura 24. Co-imunoprecipitação de RNA com Nop53p ou suas porções N- e C-terminais. (A) Northern blot de RNA co-imunoprecipitado com ProtA-Nop53p, ProtA-N-Nop53p, ou ProtA-C-Nop53p. Sondas usadas são específicas contra rRNAs ou scR1 (controle interno). (B) Western blot de proteínas obtidas dos mesmos experimentos. Soro anti-Nip7p ou anti-Rpl5p (proteína da subunidade ribossomal maior), foram usados. Fusões com ProtA foram detectadas com soro anti-igG.

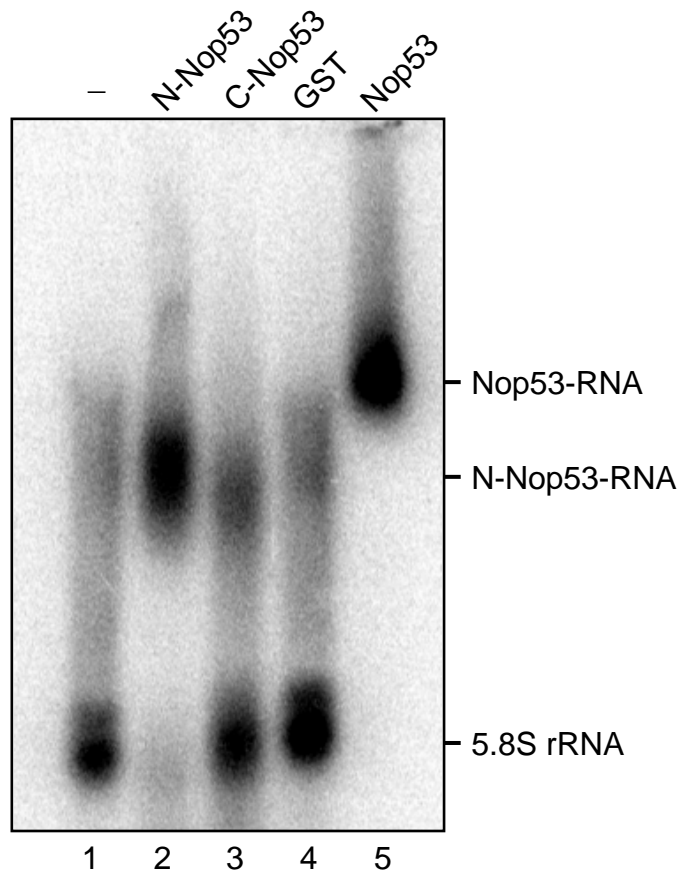


Figura 25. Ensaio de ligação de mutantes de Nop53p a RNA. rRNA ^{32}P -5.8S+29 foi incubado com 20 pmol de Nop53p, ou suas formas truncadas, GST-N-Nop53p, GST-C-Nop53p, ou com GST. Complexos de proteína-RNA foram analisados através de eletroforese em gel nativo e visualizados através de Phosphorimager.

4.7.4. *GFP-N-NOP53p e GFP-C-NOP53p são direcionadas ao nucléolo.*

Apesar da localização nucleolar de Nop53p, esta proteína não apresenta domínio de localização nuclear conservado na sua seqüência de aminoácidos. Para determinar se existe alguma região da proteína importante para sua localização nucleolar, ou se é transportada para o núcleo através de proteínas com as quais interage, foram obtidos dois clones parciais de NOP53 em fusão com GFP (GFP-N-NOP53 e GFP-C-NOP53). Os resultados demonstram que os dois mutantes localizam no nucléolo (Fig. 26), levando-nos à conclusão de que interações com proteínas devem ser responsáveis pela localização nucleolar de Nop53p.

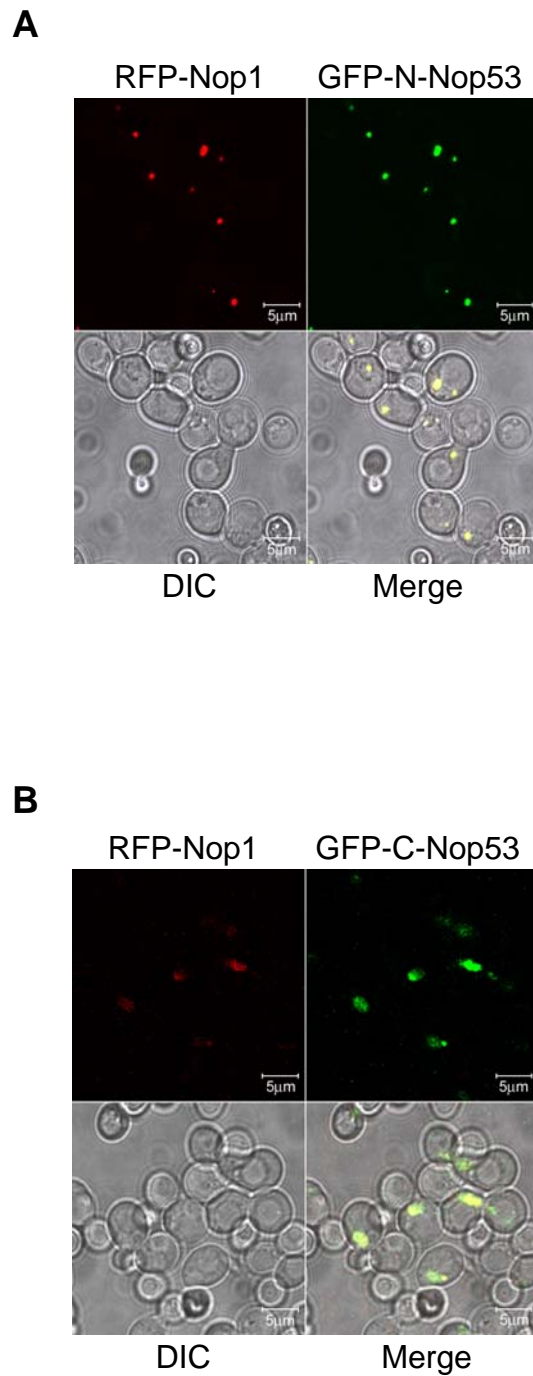


Figura 26. Localização subcelular das proteínas truncadas GFP-N-Nop53p e GFP-C-Nop53p. Cepas de levedura *NOP53* expressando GFP-N-Nop53p e RFP-Nop1p (**A**); ou GFP-C-Nop53p e RFP-Nop1p (**B**) foram analisadas por microscopia confocal.

4.7.5. *N-Nop53p complementa parcialmente a cepa mutante condicional.*

Como demonstrado acima, N-Nop53p liga o rRNA 5.8S diretamente e interage com Nip7p, enquanto que C-Nop53p interage mais estavelmente com Nop17p e com o pré-60S. Esses resultados levantam a questão de se as porções truncadas de Nop53p complementarizam o crescimento da cepa condicional em glicose. Para responder essa questão, $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ foi transformada com plasmídeos expressando constitutivamente as porções N- e C-terminal de Nop53p para testes de complementação do fenótipo mutante. Quando o processamento de pré-rRNA foi analisado nesses transformantes, foi possível visualizar na cepa expressando C-Nop53p maiores níveis dos intermediários do processamento e menor nível de 5.8S maduro que na cepa expressando N-Nop53p (Fig. 27). N-Nop53p complementou parcialmente a ausência da proteína inteira, havendo níveis maiores de 5.8S maduro. Esses resultados indicam que a interação com Nip7p e ligação direta com 5.8S rRNA são responsáveis pela função molecular de Nop53p.

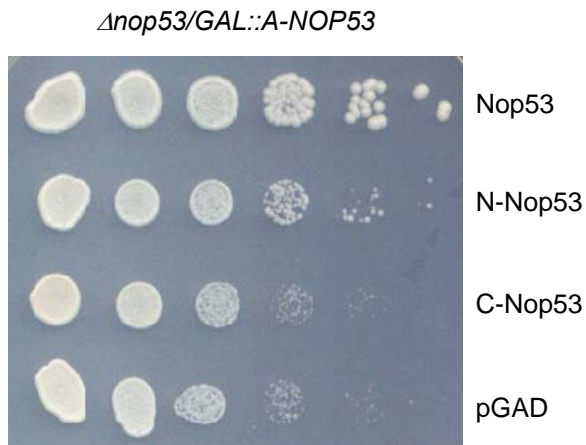
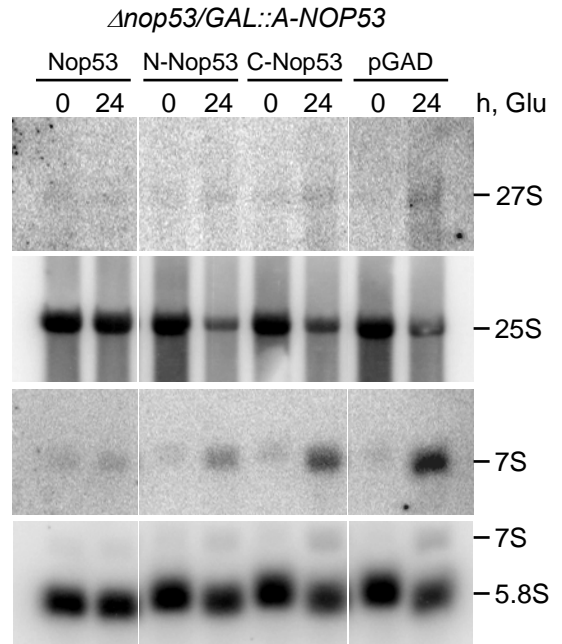
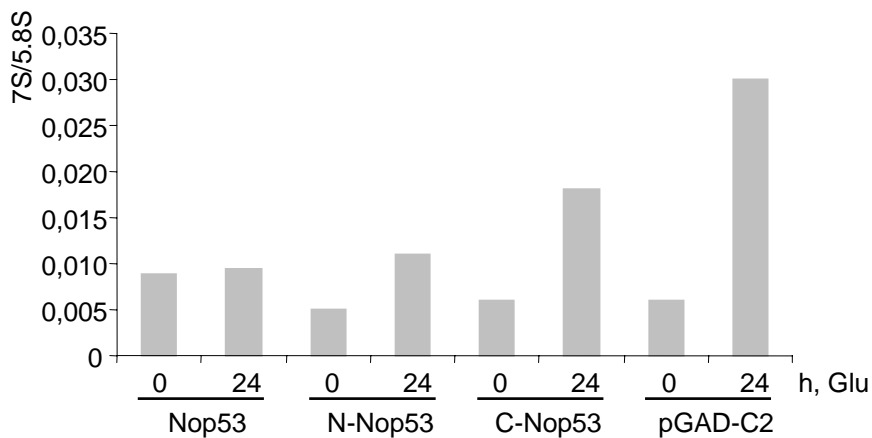
A**B****C**

Figura 27. Análise da complementação da cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53* por formas truncadas de Nop53p. (A) Diluição seriada da cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53* expressando Nop53p, N-Nop53p, C-Nop53p sob controle do promotor constitutivo em placa contendo glicose. **(B)** Processamento de pré-rRNA nas mesmas cepas de **A**, foi analisado através de Northern blot. Sondas contra rRNAs são indicadas à direita. **(C)** Quantificação da razão dos rRNAs 7S/5.8S, mostrando a eficiência da maturação do rRNA 5.8S nas células expressando formas truncadas de Nop53p.

4.8. Análise do efeito de Nop53p na atividade do exossomo

4.8.1. *Δnop53/GAL::A-NOP53* acumula formas poliadeniladas de pré-rRNA.

Nop53p foi relatada interagindo com o complexo TRAMP (Thomson & Tollervey, 2005), responsável por poliadenilar RNAs que serão encaminhados para degradação pelo exossomo nuclear (La Cava et al., 2005; Vanacova et al., 2005). Como demonstrado aqui, Nop53p afeta o processamento de pré-rRNA, levando ao acúmulo dos pré-rRNAs 27S e 7S. Além disso, como mostrado na Fig. 15, a cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53* apresenta o mesmo fenótipo de degradação de rRNA no sentido 5'-3' que mutantes do exossomo. Isso indica que intermediários do processamento de rRNA podem acumular na forma poliadenilada na cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53* em condições de depleção de Nop53p, como foi observado em mutantes para a subunidade nuclear do exossomo *Δrrp6* (Carneiro et al., 2007; Kuai et al., 2004).

Para confirmar o papel de Nop53p como cofator do exossomo, necessário para a degradação de RNAs poliadenilados, iniciamos experimentos de análise desses RNAs na cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53*. Para essa análise, RNA total foi extraído das cepas *NOP53* e *Δnop53/GAL::A-NOP53*, incubadas em meio contendo glicose por 12 horas, e o RNA foi utilizado na purificação de RNA polyA⁺. RNA total foi então incubado em colunas de oligo dT-sepharose, e frações correspondendo ao material não ligado e ligado foram analisados por Northern blot com sonda específica para os rRNAs intermediários de 27S e 7S. Os resultados mostraram que os pré-rRNAs 27S e 7S estão poliadenilados na cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53*, confirmando a hipótese inicial (Fig. 28A). Portanto, na ausência de Nop53p os rRNAs não processados corretamente acumulam na célula em sua forma poliadenilada por não estarem sendo eficientemente degradados pelo exossomo.

4.8.2. *Nop53p* interage com a subunidade nuclear *Rrp6p* do exossomo.

Na ausência de Nop53p, o defeito mais marcante no processamento de rRNA é a diminuição da eficiência do processamento do pré-rRNA 27S, com acúmulo do intermediário 7S, e diminuição de concentração dos rRNAs maduros 25S e 5.8S. O mesmo efeito é observado em mutantes das subunidades do exossomo e do seu cofator Mtr4p/Dob1p (de la Cruz et al., 1998; Mitchell et al., 1997; Oliveira et al., 2002; Zanchin & Goldfarb, 1999b). Para determinar se o efeito da depleção de Nop53p no

processamento de 5.8S pelo exossomo é indireto, ou se Nop53p interage diretamente com o exossomo, foram testadas as possíveis interações entre Nop53p com as subunidades desse complexo através do sistema do duplo-híbrido, mas nenhuma interação foi detectada nesse sistema (dados não mostrados). Experimentos de co-purificação de proteínas recombinantes fusionadas aos tags GST ou His foram então realizados.

Levando em consideração que Nop53p é nucleolar e que Rrp6p é a única subunidade do exossomo exclusivamente nuclear, e que na ausência de Rrp6p há um efeito na poliadenilação dos rRNAs (Van Hoof et al., 2000a), similar ao que foi observado na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, Rrp6p parecia ser a candidata mais provável a interagir com Nop53p. Para testar esta hipótese, foi realizado experimento de pull-down de GST-Rrp6p e His-Nop53p. Os resultados demonstram que essas duas proteínas interagem diretamente (Fig. 28B). Para verificar se a interação com o exossomo ocorre exclusivamente via Rrp6p, também foi testada a interação de Nop53p com Mtr3p, outra subunidade do exossomo. Neste caso, porém, His-Nop53p não co-purificou esse fator (Fig. 28B). Esses resultados levam à conclusão de que Nop53p liga ao rRNA 5.8S durante a transcrição e deve direcionar o 7S para o exossomo durante o processamento.

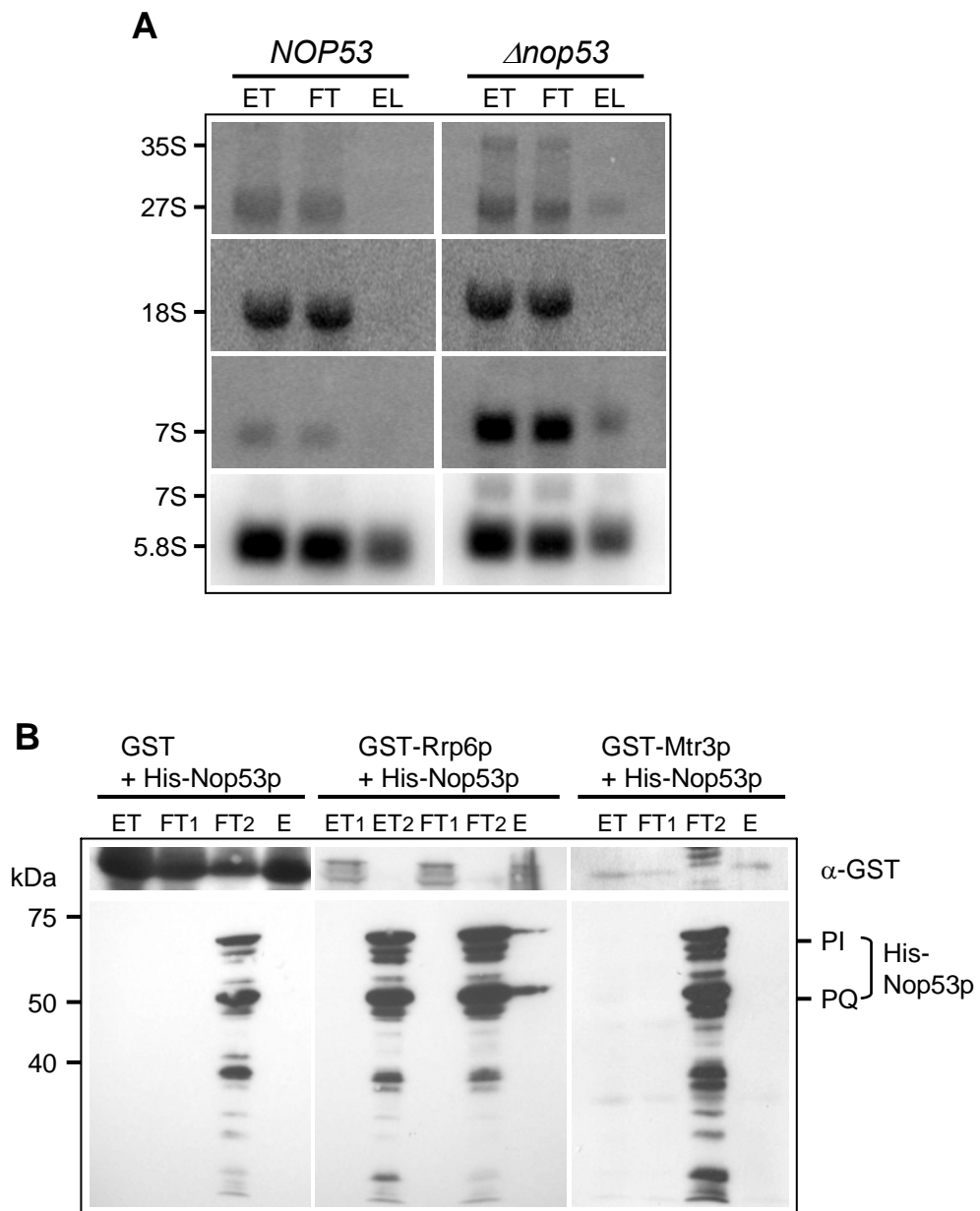


Figura 28. Análise de poliadenilação de rRNA na cepa *Δnop53/GAL::A-NOP53* e da interação de Nop53p com o exossomo.

(A) RNA total foi isolado das cepas *NOP53* e *Δnop53/GAL::A-NOP53*, e purificado em colunas de oligodT-sepharose. RNA poliadenilado foi analisado através de Northern blot por hibridização por contra sondas específicas para rRNAs. I, input; FT, flow through; EL, RNA poliadenilado eluído. (B) Western blot para detecção de proteínas do ensaio de pull-down. Extrato total de células de *E.coli* expressando GST, GST-Rrp6p, ou GST-Mtr3p (ET₁) foi incubado com glutationa-sepharose, frações do flow through foram coletadas (FT₁) e após lavagem, extrato total de células expressando His-Nop53p (ET₂) foi adicionado. Fração do flow through foi coletada de novo (FT₂), a resina foi lavada (não mostrado), e fração eluída obtida (E). His-Nop53p é co-precipitada com GST-Rrp6p. His-Nop53p foi detectada com anti-His. GST, GST-Rrp6p e GST-Mtr3p foram detectados com anti-GST. Bandas correspondentes à proteína inteira (PI) e produtos de quebra (PQ) estão indicados à direita.

4.8.3. *Nop53p* estimula a atividade de RNase de *Rrp6p* e do exossomo *in vitro*.

Como *Rrp6p* interage com *Nop53p*, uma questão que gostaríamos de responder é de que forma *Nop53p* afeta a atividade do exossomo. *Nop53p* poderia recrutar o exossomo, ou sua presença no RNA poderia facilitar a degradação da cauda 3' do pré-rRNA 7S pelo exossomo, ou ainda, *Nop53p* poderia ser um fator de controle de qualidade.

Inicialmente, confirmamos a atividade de RNase da proteína GST-*Rrp6p* recombinante purificada, que degradou o rRNA 5.8S *in vitro*. Esperávamos que *Nop53p* estimulasse a atividade de RNase de GST-*Rrp6p*, porém o que observamos é que na presença de *Nop53p*, por esta se ligar fortemente ao rRNA 5.8S, inibe a degradação do mesmo pela RNase *Rrp6p* (dados não mostrados). Como *Nop53p* interage mais fracamente com oligos de RNA, fomos avaliar em seguida a degradação *in vitro* de oligos de RNA correspondendo a regiões do rRNA 5.8S. Foram então realizados ensaios de degradação de oligos de RNA *in vitro* com GST-*Rrp6p* e com o exossomo de levedura obtido da purificação com TAP-*Rrp43p*, na presença ou ausência de His-*Nop53p*. Os resultados demonstram que *Nop53p* é capaz de estimular a atividade de RNase do exossomo, mas não de *Rrp6p* (Fig. 29A). Esses resultados indicam que *Nop53p* como co-fator do complexo inteiro do exossomo, mas não de sua subunidade isolada.

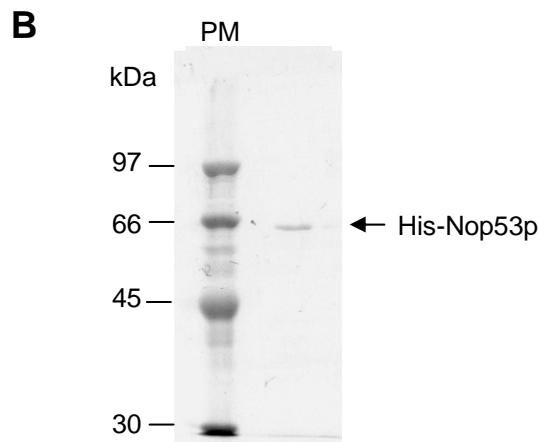
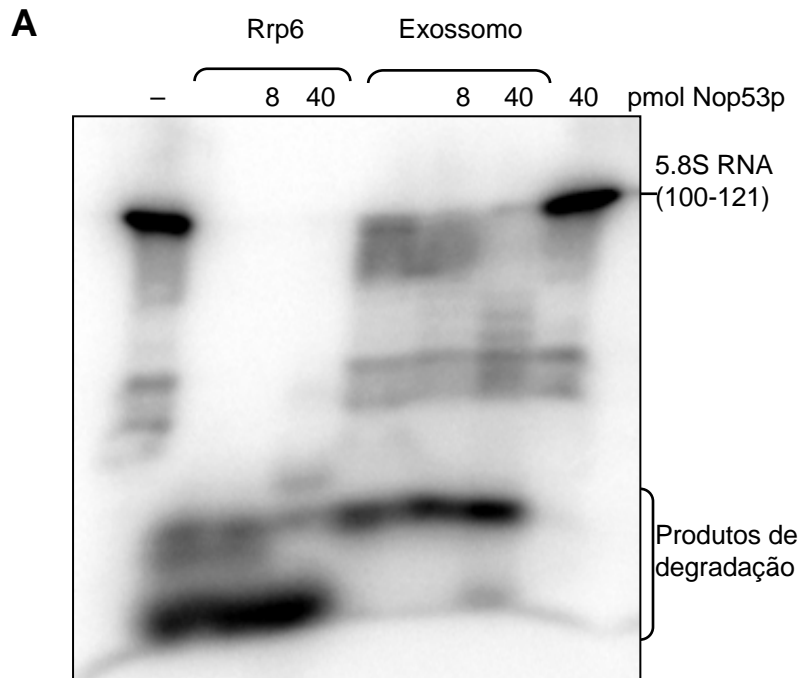


Figura 29. Análise do efeito de Nop53p na degradação de RNA pelo exossomo. (A) Ensaio de degradação de RNA *in vitro*. Oligo de RNA marcado radioativamente correspondente aos nucleotídeos 100-121 do rRNA 5.8S, incubado com 1 pmol de GST-Rrp6p ou com 1 μ g do exossomo isolado com TAP-Rrp43p, e 8 a 40 pmol de His-Nop53p. Reações foram incubadas por 10 min a 37°C e analisadas através de eletroforese em gel desnaturante de acrilamida. Os diferentes produtos de degradação gerados por Rrp6p e pelo exossomo estão indicados à direita. (B) Gel de poliácridamida 12% corado com Coomassie blue para visualização da proteína His-Nop53p purificada e utilizada no experimento *in vitro* acima.

5.DISCUSSÃO

5.1. Interação de Nop53p com o rRNA 5.8S.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* para caracterizar o papel de Nop53p no processamento de rRNA em levedura demonstram que o papel de Nop53p envolve interações proteína-proteína e proteína-RNA. Nop53p se liga ao pré-rRNA co-transcricionalmente, co-precipitando cromatina do 5.8S, mas não do 18S ou 25S. Nop53p é recrutada para a cromatina do 5.8S de maneira dependente da transcrição ativa, já que isso só é observado na ausência de RNases em experimentos de ChIP. Esses dados indicam que Nop53p se ligue ao 5.8S co-transcricionalmente e continua ligada a esse rRNA no complexo do pré-60S, afetando o processamento do pré-rRNA 7S pelo exossomo. Corroborando esses dados, nós demonstramos que Nop53p interage com o fator da RNA polimerase I, Rrn3p (Claypool et al., 2004) e co-purifica proteínas ribossomais que se associam aos rRNAs da subunidade 60S nas etapas iniciais de processamento, como Rps5p e Rpl4p (Ferreira-Cerca et al., 2005; Yeh and Lee, 1998). Outros complexos de proteínas interagem com fatores transcricionais e influenciam o processamento de pré-rRNA, dentre eles, está o complexo CURI, formado por CK2, Utp21p, Rrp7p e Ifh1p, que interligam a transcrição de rRNA com a transcrição de genes de proteínas ribossomais (Rudra et al., 2007). Algumas subunidades do snoRNP U3 atuam nos passos iniciais da biogênese ribossomal, ligando-se ao rRNA durante a transcrição e participando do processamento de rRNA (Dez et al., 2007; Dragon et al., 2002; Gallagher et al., 2004). Algumas dessas Utps foram classificadas com t-Utps, por estarem envolvidas na etapa de iniciação da transcrição por RNA pol I (Gallagher et al., 2004). Alguns fatores do SSU se ligam ao rRNA precursor co-transcricionalmente, principalmente fatores envolvidos no processamento de 18S rRNA, formando o SSU knob no 5' do pré-rRNA, que pode ser visualizado por microscopia eletrônica (Dragon et al., 2002; Mougey et al., 1993). Esses “knobs” aumentam de tamanho durante a transcrição, indicando que etapas de enovelamento do rRNA, processamento ou modificação e associação de proteínas ribossomais ocorra co-transcricionalmente, sendo que a maioria dos transcritos sofre clivagem co-transcricional em ITS1 (Osheim et al., 2004).

Em seguida, durante o processamento, fatores envolvidos na maturação do 27S pré-rRNA se associam ao RNA, formando o complexo LSU (Grandi et al., 2002;

Venema and Tollervey, 1999). Nop53p deve participar da formação do “knob” LSU, e como está presente nas frações do gradiente que contém pré-rRNAs do LSU, deve permanecer ligada ao 5.8S até o final do processamento. Uma possível explicação para Nop53p não ter precipitado cromatina do 25S pode ser em função da clivagem co-transcricional em C2, separando os rRNAs 7S e 25S. Existem diversas evidências sugerindo a interação direta entre fatores envolvidos em processamento de pré-rRNA e RNA pol I. Como a associação de Cbf5p e de Nop2p com RNA pol I, da qual dependem para sua participação em processamento de pré-rRNA (Cadwell al., 1997; Zebarjadian et al., 1999). É interessante ressaltar que esses dois fatores também interagem com Nop53p (Sydorsky et al., 2005).

Enquanto que o papel da RNA Pol I no processamento e associação de rRNA foi pouco estudado, o recrutamento de fatores da maquinaria de processamento de mRNA por RNA pol II está bem consolidado (Aguilera et al., 2005; Buratowski et al., 2005). Esse mecanismo é regulado pela modulação do estado de fosforilação do domínio CTD da subunidade maior de RNA pol II. Apesar de RNA pol I não apresentar uma subunidade com domínio semelhante, diversos fatores envolvidos na transcrição por RNA pol II participam também da transcrição por RNA pol I, incluindo o complexo necessário para a associação de RNA pol II com a maquinaria de “capping”, que se associa fisicamente a RNA pol I e ao rDNA (Schneider et al., 2006; 2007).

Experimentos de footprinting para mapear as regiões do rRNA 5.8S reconhecidos por Nop53p demonstram que esta proteína reconhece duas regiões neste rRNA, uma próxima à extremidade 5', abrangendo os nucleotídeos 5 a 27, e outra região, próxima à extremidade 3' do 5.8S. Predição da estrutura secundária demonstra que ambas as regiões do 5.8S devem estar em regiões de dupla-fita de rRNA. De fato, Nop53p liga fragmentos do rRNA 5.8S mais eficientemente do que oligonucleotídeos de fita simples.

Interações proteína-RNA são importantes para diversos processos regulatórios, sendo responsáveis pelo processamento adequado do RNA, pelo seu transporte núcleo-citoplasmático, meia-vida, e taxa de tradução (no caso de mRNAs). Várias proteínas que ligam mRNAs reconhecem e se ligam especificamente a seqüências conservadas, como no caso das seqüências ricas em AU e U, denominadas AREs, regulando a tradução e estabilidade dos mRNAs (Ross, 1995). Dentre as proteínas descritas dessa classe estão AUF1p e HuRp, que

desempenham papéis opostos na meia-vida dos mRNAs que elas reconhecem. Enquanto a ligação de AUF1p é determinante para direcionar o mRNA para degradação pelo exossomo, HuRp estabiliza o mesmo mRNA, permitindo sua tradução (Brennan and Steitz, 2001; Loflin et al., 1999). As duas proteínas estão no mesmo compartimento celular, ligam-se aos mesmos sítios no mRNA e, por ligarem na mesma região, competem entre si (Lal et al., 2004). Nop53p e Nip7p, de forma análoga, ligam-se ao mesmo rRNA, 7S. Apesar disso, essas duas proteínas não parecem competir entre si em ensaios *in vitro*. Considerando que as duas proteínas interagem com o mesmo RNA e com o exossomo, é pouco provável que elas se liguem ao pré-rRNA concomitantemente. Portanto, é possível que estejam envolvidas na regulação do exossomo em etapas diferentes do processamento do pré-rRNA 7S. Os dados demonstrados aqui e outros gerados no laboratório (Luz et al., submetido) nos levam a sugerir que Nop53p recruta o exossomo e estimule o processamento do 7S, enquanto que Nip7p, ao interagir com o exossomo, iniba sua atividade e permita a liberação do rRNA 5.8S maduro.

Várias dessas proteínas envolvidas no reconhecimento de rRNA são conservadas evolutivamente. Em uma busca em banco de dados para identificar possíveis ortólogos de Nop53p de *Saccharomyces cerevisiae* foram encontrados diferentes organismos contendo ORFs hipotéticas que codificam proteínas com seqüências homólogas a Nop53p (Fig. 30). Nop53p é uma proteína essencial em *S. cerevisiae* e conservada em eucariotos, mostrando uma homologia maior entre eucariotos inferiores. Entretanto, Nop53p também apresentou homologia com genes de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, camundongo e humanos, indicando uma função conservada na evolução. O possível ortólogo humano (candidato a supressor de tumor de glioma, número de acesso, NP056525) apresenta 21% de identidade com Nop53p, sendo 41% de identidade na região C-terminal. É interessante notar que a possível ortóloga humana de Nop53p (hNop53p) foi recentemente localizada no nucléolo (Andersen et al., 2005), confirmando a hipótese de conservação da proteína ao longo da evolução. Teste de complementação da cepa mutante condicional de *NOP53* com hNop53p, entretanto, demonstrou que a proteína humana não é funcional em levedura. De forma interessante, apesar de Nop53p não demonstrar homologia de seqüência com Mpp6p de humanos, ambas as proteínas desempenham papéis similares no processamento de pré-rRNA. As duas proteínas são nucleolares, ligam o pré-rRNA

7S e são necessárias para seu processamento, e interagem com a subunidade Rrp6p/PM-Scl-100 (Schilders et al., 2005).

O ensaio de proteção contra digestão por RNaseH, demonstrou que Nop53p facilita a degradação do rRNA 5.8S em algumas posições. Esse resultado, somado ao fenótipo de acúmulo de 7S na cepa $\Delta nop53/GAL::NOP53$, poderia indicar que Nop53p pudesse atuar como uma RNA helicase durante o processamento, embora não apresente domínio conservado de helicase. As RNAs helicases, que compreendem o grupo de DEXD/H box, participam ativamente de várias etapas de processamento de RNA, como splicing, degradação de mRNAs, maturação de snoRNAs e rRNAs (Granneman et al., 2006; Linder, 2006). No entanto, experimentos para avaliar a atividade de helicase e ATPase de Nop53p não apresentaram resultado positivo. Outra possibilidade de atuação da proteína que foi avaliada seria a de atuação como um fator estimulador de helicase. Essa atividade é observada em diferentes sistemas, como é o caso do fator de iniciação de tradução eIF4A, helicase responsável pelo acesso do 5' do mRNA à subunidade ribossomal 40S, que requer a presença de eIF4G, eIF4B e eIF4H para estimular a sua fraca atividade de ATPase e helicase (Rozen et al., 1990). No processamento de rRNA, Esf2p, fator que liga RNA inespecificamente mas afeta o processamento do rRNA 18S, é capaz de estimular a atividade de ATPase de Dbp8p, uma helicase responsável pela associação/dissociação do snoRNA U3 ao rRNA (Granneman et al., 2006). Extrapolando esse mecanismo para Nop53p, esta proteína poderia atuar como um co-fator estimulador da helicase Dob1p/Mtr4p, helicase responsável pelo desenrolamento da estrutura secundária do espaçador ITS2, essencial para a degradação do 3' do rRNA 7S pelo exossomo (de la Cruz, 1998). Entretanto, Nop53p não afetou a atividade de ATPase de Dob1p *in vitro*.

5.2. Interação de Nop53p com outros fatores no complexo pré-60S: Nop17p, Nip7p, Rrp6p.

O exossomo está envolvido em várias etapas de metabolismo de RNA e apresenta diversos co-fatores para auxiliá-lo na sua função. Estudos de interação proteína-proteína realizados no laboratório e por outros grupos de pesquisa estabeleceram a relação entre vários desses fatores envolvidos em processamento de pré-rRNA. Foi demonstrado que a subunidade do exossomo Rrp43p interage com Rrp46p, Nip7p, e Nop17p, que por sua vez interage com Nop58p e Nop53p

(Gonzales et al., 2005; Granato et al., 2005; Oliveira et al., 2002; Zanchin and Goldfarb, 1999b). O círculo é então fechado com a interação entre Nop53p e Nip7p e entre Nop53p e a subunidade Rrp6p do exossomo, como foi demonstrado neste trabalho (Fig. 31). As subunidades do exossomo, Rrp43p e Rrp46p, e Nip7p estão presentes no núcleo e no citoplasma, enquanto que Nop58p, Nop17p, e Rrp6p estão no compartimento nuclear, com uma localização predominantemente nucleolar (Allmang et al., 1999b; Gonzales et al., 2005; Lafontaine et al., 1999; Zanchin et al., 1997; Zanchin and Goldfarb, 1999a). Nop53p também é uma proteína nucleolar e essa localização é consistente com sua função, caracterizada neste trabalho.

Nop17p está envolvida na montagem e estabilização de complexos de snoRNP de box C/D, e afeta as primeiras clivagens do pré-rRNA (Gonzales et al., 2005), enquanto que Nop53p foi co-precipitada com o pré-60S (Babler et al., 2001; Nissan et al., 2002). A interação encontrada entre Nop17p e Nop53p poderia ser explicada de duas formas. A primeira possibilidade seria a presença de ambas as proteínas no pré-60S, sendo que Nop17p estaria presente em complexos de snoRNPs de box C/D, participando das modificações covalentes do rRNA pré-27S. É importante ressaltar que as modificações dos nucleotídeos do centro de peptidil transferase ocorrem nas etapas tardias do processamento (Dez et al., 2004; Lapeyre and Purushothaman, 2004; Nissan et al., 2002). A interação Nop17p-Nop53p poderia também ocorrer no contexto do complexo 90S, onde Nop17p também estaria presente como parte de snoRNPs de box C/D e a interação com Nop53p seria possível pela associação co-transcricional de Nop53p ao rRNA 5.8S, como demonstrado neste trabalho.

Nop53p também co-precipitou o snoRNP de box H/ACA snR37, envolvido em pseudouridinação do rRNA 25S, mas não de snoRNPs envolvidos em modificação do rRNA 18S. Esse resultado nos levou a testar a possível associação de Nop53p com snoRNPs de box H/ACA. Porém, Nop53p não afeta a estabilidade de snoRNAs de box H/ACA, nem a pseudouridinação do rRNA 25S. Portanto, a co-imunoprecipitação de snoRNAs de box H/ACA por A-Nop53p deve ser por associação indireta desses fatores no complexo pré-60S.

Da mesma maneira, a interação entre Nop53p e Nip7p deve ocorrer no contexto das partículas do pré-60S. Portanto, as interações Nop53p-Nop17p e Nop53p-Nip7p podem ocorrer em etapas diferentes do processamento. Foi observado que Nop17p influencia a localização subcelular das proteínas do "core"

de snoRNPs de box C/D (Gonzales et al., 2005). Esse efeito parece ser específico para esses fatores, pois Nop17p não afetou a localização nucleolar de Nop53p.

Nip7p apresenta um domínio PUA (*Pseudo-Uridine synthases e Archaeosine-specific transglycosylases*) em sua porção C-terminal, domínio esse conservado em enzimas modificadoras de tRNA e pseudo-uridine sintases de *Archaea* e eucariotos, e com função descrita de ligação a RNA (Aravind and Koonin, 1999; Hallberg et al., 2006; Ishitani et al., 2002; Manival et al., 2006). Apesar da função desse domínio em Nip7p indicar ligação a RNA, essa também é a região responsável pela interação com Nop53p.

5. 3. Caracterização do domínio funcional de Nop53p.

Localização nucleolar de Nop53p parece ser resultado das interações proteína-proteína, já que o sinal de localização nuclear não pôde ser identificado na sequência de Nop53p, e formas truncadas de Nop53p também são direcionadas ao nucléolo. Nós demonstramos que Nop53p interage com diversas proteínas nucleolares como Nop17p, Nip7p e Rrp6p, e co-purifica proteínas ribossomais que se associam ao rRNA nos passos iniciais do processamento. A identificação da interação entre essas proteínas indica que um desses fatores, ou o complexo inteiro seja importante para direcionar Nop53p para o nucléolo. Um exemplo recente de fator de processamento de rRNA dependente da interação com outras proteínas para sua localização subcelular é a proteína humana hRrp47p, um cofator do exossomo, que depende da interação com a subunidade do exossomo hRrp6p/PM-Scl-100 para ser direcionada para o núcleo (Schilders et al., 2007). Apesar da região de Nop53p responsável pela interação com Rrp6p não ter sido mapeada, sua porção amino-terminal está envolvida na interação com Nip7p, enquanto que a porção carboxi-terminal interage com Nop17p. É importante notar que o C-terminal de Nop53p co-imunoprecipita pré-60S mais eficientemente que a porção amino-terminal da proteína, permitindo concluir que a interação com Nop17p ocorra no contexto do pré-60S. De forma interessante, a porção amino-terminal de Nop53p está envolvida na interação com RNA e pode complementar parcialmente a cepa condicional $\Delta nop53/GAL::NOP53$ em glicose. Esses resultados indicam que as interações com Nip7p e com o RNA são responsáveis pela função molecular de Nop53p no processamento de 27S e 7S pré-rRNAs. De forma similar, a proteína ribossomal Rpl25p afeta o processamento do pré-rRNA 27S e apresenta três domínios

funcionais. Mutações em cada um desses domínios (responsáveis pela importação nuclear, ligação a RNA, associação a subunidade 60S) resultam em defeito do processamento do ITS2 e acúmulo do pré-rRNA 27S, indicando que a associação de Rpl25p ao RNA é necessária mas não suficiente para o processamento do pre-rRNA 27S (van Beekvelt et al., 2001).

5.4. Atuação de Nop53p no processamento de pré-rRNA.

Análise de processamento de rRNA através de Northern blot e “pulse-chase labeling” demonstrou que a cepa $\Delta nop53/GAL::NOP53$, apresenta defeitos no processamento de rRNA, com acúmulo dos precursores e uma diminuição de rRNAs maduros. Apesar de serem evidenciados defeitos nas clivagens iniciais do pré-rRNA, com acúmulo do pré-rRNA 35S e do intermediário 23S, o principal defeito observado é na formação dos rRNAs gerados mais tardiamente, que formarão a subunidade ribossomal 60S. Corroborando os dados de análise de processamento de pré-rRNA e de isolamento do pré-60S, Nop53p co-imunoprecipita os pré-rRNAs 27S e 7S, e o rRNA maduro 5.8S. Ensaios de ligação a RNA *in vitro* demonstraram que Nop53p liga diretamente o rRNA 5.8S. Nip7p também co-imunoprecipitou os pré-rRNAs 27S e 7S, porém, menos eficientemente que Nop53p. Acúmulo do pré-rRNA 27S não processado foi observado também na cepa $\Delta nip7/GAL::nip7-1$ (Zanchin et al., 1997), o que é consistente com a interação funcional com Nop53p. Já o acúmulo do pré-rRNA 7S é um defeito típico causado pela deficiência do exossomo (Allmang et al., 1999b; Mitchell et al., 1997; Oliveira et al., 2002; Zanchin and Goldfarb, 1999b) mas também observado na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, indicando a influência de Nop53p na atividade do exossomo.

De forma interessante, o pré-rRNA 7S acumulado em células depletadas de Nop53p apresenta extremidades 5' aberrantes, indicando que o pré-rRNA esteja sendo degradado por exonucleases 5'-3', provavelmente Rat1p ou Xrn1p (Geerlings et al., 2000; Henry et al., 1994). Esse fenótipo de degradação 5'-3' de pré-rRNAs também foi encontrado em mutantes da subunidade do exossomo ($\Delta rrp43/rrp43-1$). Esses resultados indicam que o exossomo não está sendo recrutado para a degradação de pré-rRNAs não corretamente processados na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$. Análise de expressão de *XRN1* e *RAT1* na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ demonstrou não haver diferença nos níveis basais, comparados à cepa *NOP53*. Portanto, a ativação da via de degradação 5'-3' na ausência de Nop53p, deve

ocorrer através de interações proteína-proteína que recrutam Rat1p e Xrn1p, e não devido a um aumento na expressão dessas exonucleases na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$. Esse sistema de controle de qualidade, no qual as vias de degradação nos dois sentidos (5'-3' e 3'-5') estão interligadas já foi descrito (Bentley, 2005; Fang et al., 2004; Fang et al., 2005; Lejeune et al., 2003). Portanto, para avaliar melhor a atuação de Rat1p e de seus co-fatores como Rai1p na cepa $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$, seria necessário obter duplo mutantes desses genes com NOP53 e verificar seu fenótipo.

Nop53p está conectada ao exossomo de duas formas: uma forma indireta, através de sua interação com Nip7p, que interage com a subunidade Rrp43p (Zanchin and Goldfarb, 1999b), e outra direta, através de sua interação com Rrp6p. Considerando-se a hipótese de que Nip7p atuasse como uma intermediária entre Nop53p e o exossomo, Nop53p poderia facilitar a interação de Nip7p com o exossomo e, dessa forma, influenciar sua atividade. Porém, Nop53p não afetou a interação entre Nip7p e o exossomo, demonstrando que essa interação é independente de Nop53p. Além disso, a associação de Nip7p aos pré-rRNAs da subunidade pré-60S e os níveis basais de Nip7p na cepa $\Delta nop53/GAL::NOP53$ não estão alterados. Somado a isso, o mutante $\Delta nip7/GAL::nip7-1$ não demonstra acúmulo do 7S pré-rRNA, mas sim de 27S, seu precursor imediato. Isso nos permite concluir que a primeira hipótese para atuação de Nop53p, através de sua interação direta com Rrp6p, seja mais provável.

5.5. Nop53p como possível co-fator do exossomo.

Os complexos Ski e TRAMP auxiliam o exossomo na ligação ao substrato e na sua atividade de RNase 3'-5' (LaCava et al., 2005; Van Hoof et al., 2000b; Vanacova et al., 2005). A função de Rrp6p no exossomo depende de Rrp47p/Lr1p, proteína que liga RNA (Stead et al., 2007). A importância dessa interação foi recentemente caracterizada, demonstrando que Rrp47p reconhece especificamente estruturas secundárias e facilita o recrutamento de Rrp6p aos seus substratos (Stead et al., 2007). Previsões estruturais indicam que o substrato de Rrp6p no processamento de rRNA, 5.8S+30 nt, tenha um segmento em dupla-fita na extremidade 3' (Stead et al., 2007). Os resultados mostrados nesta tese indicam que, além de Rrp47p, Rrp6p interage com Nop53p, que pode ser mais uma proteína necessária para controlar a função de Rrp6p no processamento de rRNA. Nop53p

poderia ser responsável por direcionar o exossomo ao pré-rRNA 7S, regulando a função do complexo. Na ausência de Nop53p, o exossomo não é eficientemente direcionado para o processamento do 7S pré-rRNA, ocasionando a poliadenilação do pré-rRNA pelo complexo do TRAMP (LaCava et al., 2005) e o acúmulo de 7S-polyA+, que passa a ser degradado na direção 5'-3'.

Poliadenilação em eucariotos foi considerada por muito tempo um evento que ocorre somente com os mRNAs. Porém há evidências recentes de que a poliadenilação tem um papel importante no controle de qualidade de RNAs e processamento 3' de RNAs precursores não codificantes, como pré-snoRNAs e pré-rRNAs (Kuai et al., 2004; van Hoof et al., 2000b). O complexo TRAMP é responsável pela poliadenilação de RNAs que serão direcionados para degradação pelo exossomo (Laçava et al., 2005). Como demonstrado aqui, na ausência de Nop53p, o exossomo não é recrutado para essa degradação e os RNAs não corretamente processados são degradados por outras RNases, na direção 5'-3'.

Ensaio de degradação de RNA *in vitro* com o exossomo isolado da cepa expressando TAP-Rrp43p demonstrou que apesar de Nop53p não degradar RNA, sua presença estimula o exossomo a degradar RNA. É possível que a ativação do exossomo se dê através do recrutamento do complexo para o substrato através da interação Nop53p-Rrp6p, ou através do recrutamento direto do TRAMP, já que Nop53p também interage com componentes do TRAMP (Krogan et al., 2006; Thomson and Tollervey, 2005). De maneira semelhante ao papel de Nop53p no processamento do pré-rRNA 7S, Nrd1p, direciona o exossomo para mRNAs, estimulando sua degradação (Vasiljeva and Buratowski, 2006).

Em conclusão, os resultados obtidos com a cepa condicional $\Delta nop53/GAL::A-NOP53$ demonstraram que o processamento de rRNA é afetado na ausência de Nop53p, levando à redução da síntese de rRNA, principalmente dos rRNAs que formam a subunidade ribossomal maior, e ao acúmulo dos pré-rRNAs 27S e 7S. O fato da deleção de Nop53p afetar mais fortemente as reações tardias do processamento responsáveis pela formação do 5.8S rRNA maduro, indica que essa proteína seja importante para o apropriado funcionamento do exossomo. Finalmente, com base nos experimentos de atividade de degradação de RNA *in vitro* realizados ao longo deste trabalho podemos concluir que Nop53p tenha um papel direto no controle de atividade do exossomo, através de sua ligação ao rRNA 5.8S (Fig.32).

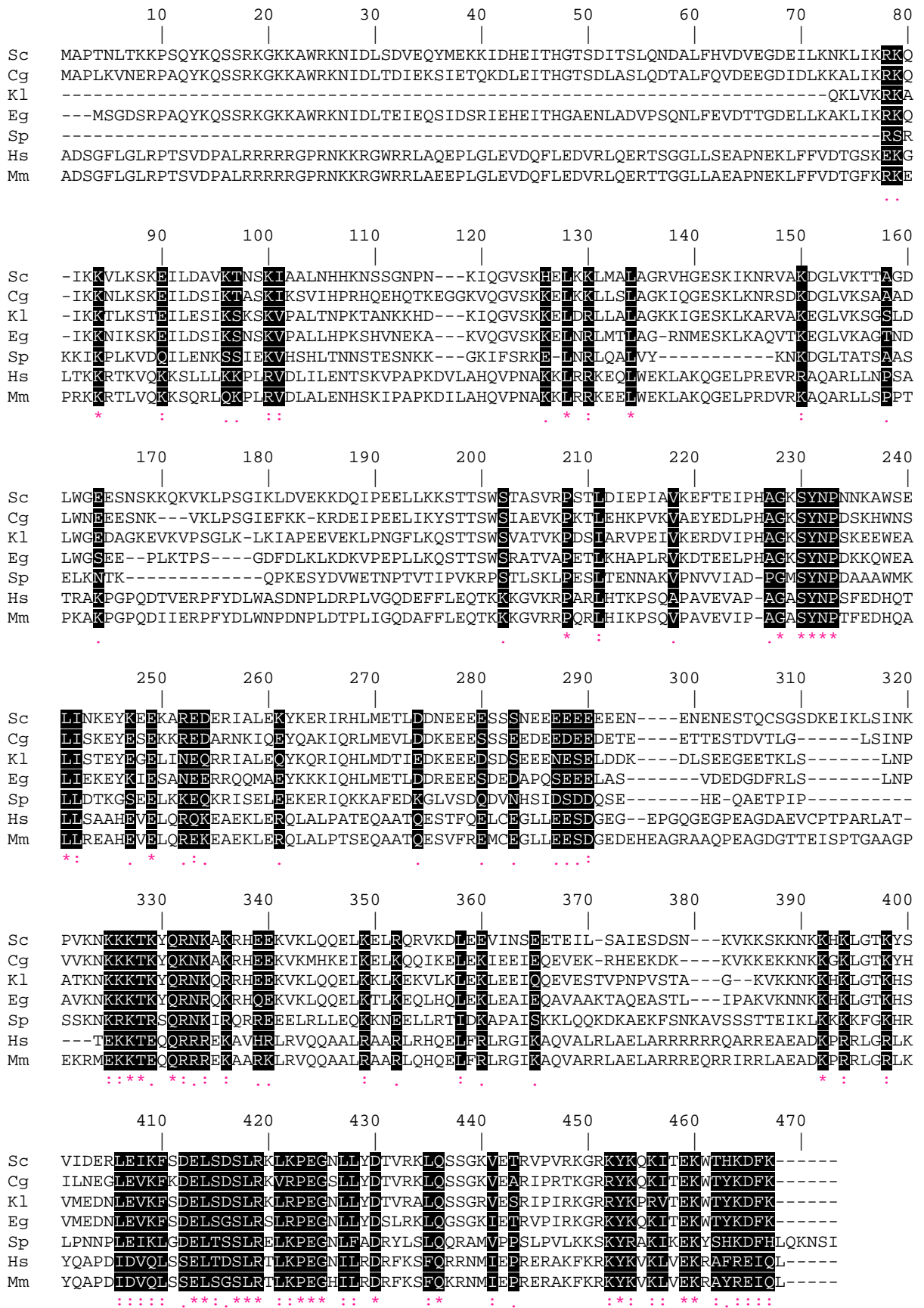


Figura 30. Alinhamento da sequência de Nop53p. Sequência de Nop53p e de possíveis ortólogos em eucariotos foram alinhados. Números correspondem ao posicionamento dos aminoácidos em cada proteína. *C. glabrata*, CAG62427; *K. lactis*, XP_455604; *E. gossypii*, AAS51352; *S. pombe*, CAB52719; *Homo sapiens*, NP_056525; *Mus musculus*, AAH25810. *, identidade; :, alta similaridade; ., baixa similaridade. CLUSTALW foi usado para o alinhamento das seqüências (Altschul et al., 1997).

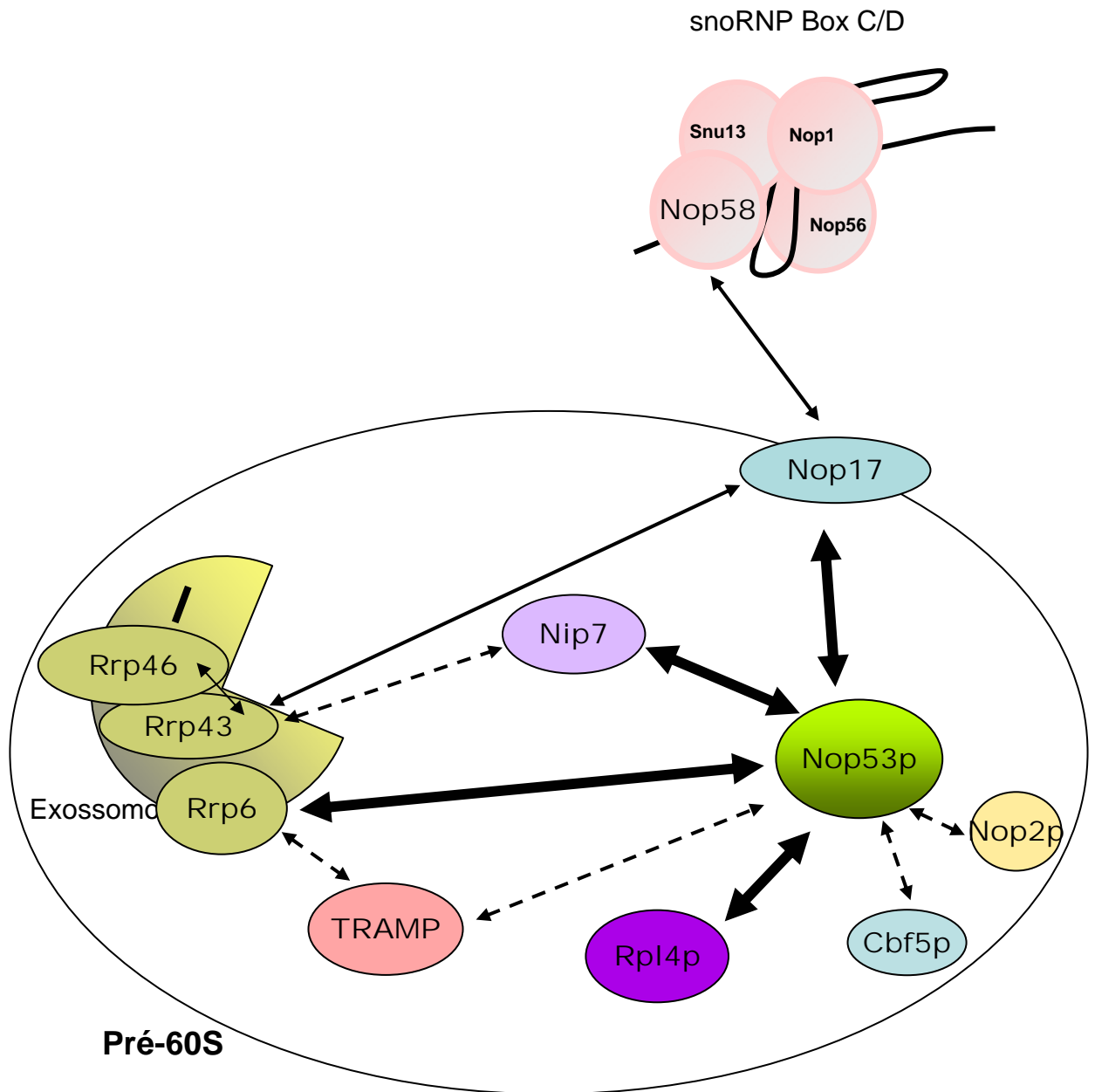


Figura 31. Diagrama das interações proteína-proteína observadas por duplo-híbrido, co-imunoprecipitação e/ou pull-down relacionadas nesta tese. Setas contínuas indicam interações demonstradas neste laboratório. Setas grossas indicam as interações novas caracterizadas neste trabalho. Setas descontinuas correspondem a interações demonstradas por outros grupos de pesquisa.

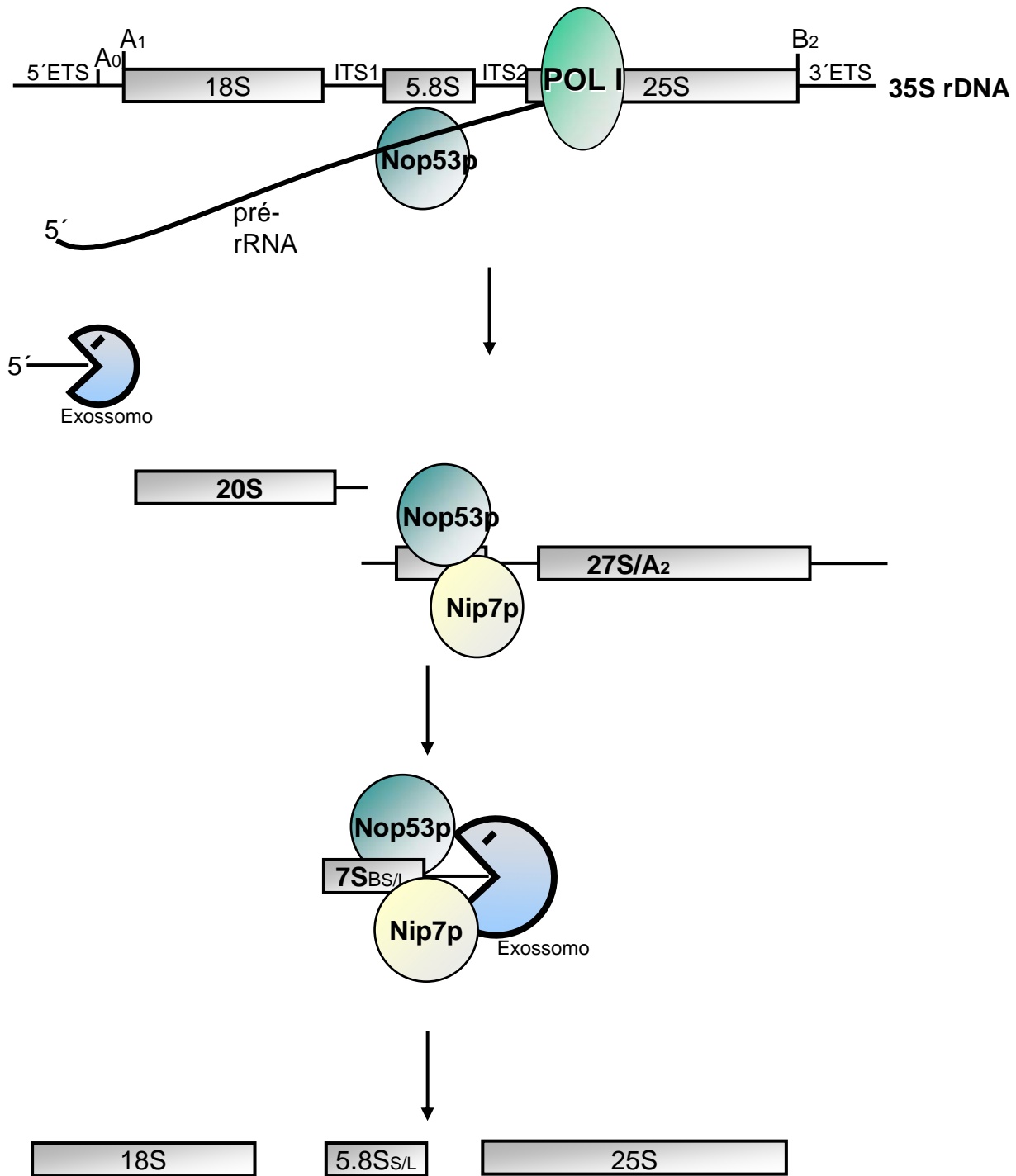


Figura 32. Modelo do papel de Nop53p no processamento de pré-rRNA.

6. CONCLUSÕES

Nop53p foi isolada durante este trabalho, ao longo do qual caracterizamos sua função. Nop53p é uma proteína essencial de *Saccharomyces cerevisiae*, que se localiza no nucléolo, liga-se ao rRNA 5.8S co-transcionalmente e continua ligada a esse rRNA durante o processamento e formação do complexo intermediário pré-60S. Neste complexo, Nop53p interage com outras proteínas envolvidas em processamento de rRNA, dentre elas, Nop17p, Nip7p e Rrp6p. A depleção de Nop53p leva ao acúmulo do pré-rRNA 7S, e através de ensaios de degradação de RNA *in vitro*, podemos sugerir que Nop53p seja um co-fator do exossomo, necessário para seu recrutamento na via de maturação do rRNA 5.8S.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Adams, C.C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P. and Woolford, J.L.Jr.** (2002). *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. *RNA* 8, 150-165.
- 2-Aguilera, A.** (2005). Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol.* 17, 242-50.
- 4-Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D and Mitchell., P.** (1999a). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148-2158.
- 5-Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. and Tollervey, D.** (1999b). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18, 5399-410.
- 6-Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E. and Tollervey, D.** (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Research* 28, 1684-1691.
- 7-Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I. and Mann, M.** (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature.* 6, 77-83.
- 8-Aravind, L and Koonin, E.V.** (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.* 27, 4658-70.
- 9-Baker, K.E. and Parker, R.** (2006). Conventional 3' end formation is not required for NMD substrate recognition in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 12, 1441-5.
- 9-Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R., Fields, S.** (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.*14(6), 920-4.
- 10-Bartel, P and Fields, S.** (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods in enzymology.* 254,241-263.
- 11-Bassler, J., Grandi, P., Gadai, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., Hurt, E.** (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Molecular Cell.* 8, 517-529.
- 12-Bentley, D.L.** (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17, 251-6.

- 13**-Bolívar, F. and Backman, K. (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68, 245-67.
- 14**-Brennan, C.M., Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci.* 58, 266-277.
- 15**-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 5.8S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* 273, 13255-63.
- 16**-Brown, J.T., Bai, X and Johnson, A.W. (2000). The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA* 6, 449-57.
- 17**-Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol.* 17, 257-61.
- 18**-Burkard, K.T and Butler, J.S. (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNP protein Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 20, 604-16.
- 19**-Cadwell, C., Yoon, H.J., Zebarjadian, Y. and Carbon, J. (1997). The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol Cell Biol.* 17, 6175-83.
- 20**-Caponigro, G and Parker, R. (1995). Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes Dev.* 9, 2421-32.
- 21**-Carneiro, T., Carvalho, C., Braga, J., Rino, J., Milligan, M., Tollervey, D. and Carmo-Fonseca, M. (2007). Depletion of the yeast nuclear exosome subunit Rrp6 results in accumulation of polyadenylated RNAs in a discrete domain within the nucleolus. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4157-4165.
- 22**-Chen, D.C., Yang, B.C., Kuo, T.T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet.* 21, 83-4.
- 23**-Claypool, J.A., French, S.L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J.A., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol.Cell.Biol.* 24, 946-956.

- 24**-Coltri, P.P., Guimarães, B.G., Granato, D.C., Silva, T.C.L., Luz, J.S., Oliveira, C.C and Zanchin, N.I.T. RNA interaction, structure analysis and complex formation by the ribosome biogenesis protein Nip7p. (no prelo).
- 25**-Decker, C.J. (1998). The exosome: a versatile RNA processing machine. *Curr. Biol.* 8(7), 238-40.
- 26**-De La Cruz J., Kressler D., Tollervey D, Linder P. (1998). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 1128-40.
- 27**-De la Cruz, J., Lacombe, T., Deloche, O., Linder, P. and Kressler, D. (2004). The putative RNA helicase Dbp6p functionally interacts with Rpl3p, Nop8p and the novel trans-acting Factor Rsa3p during biogenesis of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 166, 1687-99.
- 28**-Demoinet, E., Jaquier, A., Lutfalla, G and Fromont-Racine, M. (2007). The Hsp40 chaperone Jjj1 is required for the nucleo-cytoplasmic recycling of preribosomal factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 13, 1570-81.
- 29**-Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M., Henry, Y. (2002) Naf1p, an essential nucleoplasmic factor specifically required for accumulation of box H/ACA small nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7053-7065
- 30**-Dez, C., Froment, C., Noaillac-Depeyre, J., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2004). Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol.* 24, 6324-37.
- 31**-Dez, C., Houseley, J and Tollervey, D. (2006). Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 25, 1534-46.
- 32**-Dez, C., Dlakic, M and Tollervey, D. (2007). Roles of the HEAT repeat proteins Utp10 and Utp20 in 40S ribosome maturation. *RNA* 13, 1516-27.
- 33**-Dower, W.J., Miller, J.F., Raqsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-45.
- 34**-Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A.L.,

- Hunt,D.F., Baserga,S.J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-70.
- 35**-Eichler, D.C and Craig, N. (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 49, 197-239.
- 36**-Elledge, 1991. Clontech laboratories.
- 37**-Fang, F., Hoskins, J. and Butler, J.S. (2004). 5-fluorouracil enhances exosome-dependent accumulation of polyadenylated rRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10766-76.
- 38**-Fang, F., Philips, S., and Butler, J.S. (2005). Rat1p and Rai1p function with the nuclear exosome in the processing and degradation of rRNA precursors. *RNA* 11, 1571-1578.
- 39**-Fatica, A., Cronshaw, A., Dlaki, M., Tollervey, D. (2002a). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell.* 9, 341-51.
- 40**-Fatica, A. and Tollervey, D. (2002b). Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14, 313-8.
- 41**-Fatica, A., Oeffinger, M., Tollervey, D., Bozzoni, I. (2003). Cic1p/Nsa3p is required for synthesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *RNA* 9, 1431-6.
- 42**-Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P.E., Tschochner, H., Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell.* 20, 263-75.
- 43**-Fields,S and Song,O. (1989) *A novel genetic system to detect protein-protein interactions.* *Nature.* 340, 245-246.
- 44**-Fuentes, J.L., Datta, K., Sullivan, S.M., Walker, A and Maddock, J.R. (2007). In vivo functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* 60S biogenesis GTPase Nog1. *Mol. Genet. Genomics* 278, 105-123.
- 45**-Gadal, O., Strau, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, E., Tollervey, D and Hurt, E. (2001). A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *EMBO J.* 20, 3695-704.
- 46**-Galani, K., Nissan, T.A., Petfalski,E., Tollervey, D and Hurt, E. (2004). Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 55411-8.

- 47-**Gallagher, J.E., Dunbar, D.A., Grannemann, S., Mitchell, B.M., Osheim, Y., Beyer, A.L., Baserga, S.J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev.* 18, 2506-17.
- 48-**Geerlings, T.H., Vos, J.C. and Raue, H.A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA* 6, 1698-1703.
- 49-**Gietz, R.D and Sugino, A. (1998). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* 74, 527-34.
- 50-**Gleizes, P-E., Noaillac-Depeyre, J., Léger-Silvestre, I., Teulières, F., Dauxois, J.Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M.C. and Gas, N. (2001). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J. Cell Biol.* 155, 923-36.
- 51-**Gonzales, F.A., Zanchin, N.I., Luz, J.S., 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, 437-55.
- 52-**Granato, D.C., Gonzales, F.A., Luz, J.S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G.M., Oliveira, C.C. (2005) Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 272, 4450-63.
- 53-**Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A.C., Hurt, E. (2002). 90S Pre-Ribosomes include the 35 S pre- rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular Cell.* 10, 105-115.
- 54-**Granneman, S., Lin, C., Champion, E.A., Nandineni, M.R., Zorca, C., Baserga, S.J. (2006). The nucleolar protein Esf2 interacts directly with the DExD/H box RNA helicase, Dbp8, to stimulate ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res.* 34, 3189-99.

- 55-**Grant, J.W., Taubman, M.B., Church, S.L., Johnson, R.L. and Nadal-Ginard, B. (1990). Mammalian nonsarcomeric myosin regulatory light chains are encoded by two differentially regulated and linked genes. *J. Cell. Biol.* 111, 1127-35.
- 56-**Hallberg, B.M., Ericsson, U.B., Johnson, K.A., Andersen, N.M., Douthwaite, S., Nordlund, P., Beuscher, A.E and Erlandsen, H. (2006). The structure of the RNA m5C methyltransferase YebU from *Escherichia coli* reveals a C-terminal RNA-recruiting PUA domain. *J. Mol. Biol.* 360, 774-87.
- 57-**Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166, 557-80.
- 58-**Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F and Woolford, J.L.Jr. (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol. Cell.* 8, 505-15.
- 59-**Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsy, S., Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* 13, 2452-63.
- 60-**Ho, J., Kallstrom, G. and Johnson, A.W. (2000a). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell. Biol.* 151, 1057-1066.
- 61-**Ho, J., Kallstrom, G and Johnson, A.W. (2000b). Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. *RNA* 6, 1625-34.
- 62-**Honma, Y., Kitamura, A., Shioda, R., Maruyama, H., Ozaki, K., Oda, Y., Mini, T., Jenö, P., Maki, Y., Yonezawa, K., Hurt, E., Ueno, M., Uritani, M., Hall, M.N. and Ushimaru, T. (2006). TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *EMBO J.* 25, 3832–3842.
- 63-**Houseley, J., La Cava, J., Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 529-39.
- 64-**Hung, N.J and Johnson, A.W. (2006). Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 26, 3718-27.

- 65**-Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Kijimoto, T., Nameki, N., Watanabe, M., Kondo, H., Sekine, M., Okada, N., Nishimura, S. and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase. *J. Mol. Biol.* 318, 665-77.
- 66**-Johnson, A.W., Lund, E and Dahlberg, J. (2002). Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* 27, 580-5.
- 67**-Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 18, 1227-40.
- 68**-Keogh, M.C. and Buratowski, S. (2004). Using chromatin immunoprecipitation to map cotranscriptional mRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 257, 1-16.
- 69**-Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell.* 109, 145-148.
- 70**-Kressler, D., Linder, P., De La Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7897-7912.
- 71**-Krogan, N.J., Peng, W.T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Lalev, A., Zhang, W., Davie wala, A.P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A.P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J.E, Hughes, T.R., Emili, A., Greenblatt, J.F. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol. Cell.* 13, 225-39.
- 72**-Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 440, 637-43.
- 73**-Kuai, L., Fang, F., Butler, J.S. and Sherman, F. (2004). Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 8581-6.
- 74**-Kufel, J., Allmang, C., Verdone, L., Beggs, J. And Tollervey, D. (2003). A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. *Nucleic Acids Research* 31, 6788-6797

- 75-**LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*. 121, 713-24.
- 76-**Lafontaine, D.L., Preiss, T., Tollervey, D. (1998). Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol. Cell. Biol.* 18, 2360-70.
- 77-**Lafontaine, D.L and Tollervey, D. (1999). Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* 5, 455-67.
- 78-** Lal, A., Mazan-Mamczarz, Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., Gorospe, M. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J.* 2004. 23, 3092-3102.
- 79-**Lapeyre, B. and Purushothaman, S.K. (2004). Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol Cell.* 16, 663-9.
- 80-**Lejeune, F., Li, X. and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell.* 12, 675-87.
- 81-**Li, H.D., Zagorski, J., Fournier, M.J. (1990). Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 10, 1145-52.
- 82-**Li, Z., Reimers, S., Pandit, S., Deutscher, M.P. (2002). RNA quality control: Degradation of defective transfer RNA. *EMBO J.* 21, 1132-1138.
- 83-**Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 34, 4168-80.
- 84-**Loflin, P., Chen, C.Y., Shyu, A.B. (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 13, 1884-1897.
- 85-**Luz, J.S., Tavares, J.R., Gonzales, F.A., Santos, M.C., Oliveira, C.C. (2007). Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie.*

- 86-**Maden, B.E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 39, 241-303.
- 87-**Manival, X., Charron, C., Fourmann, T.B., Godard, F., Charpentier, B., Branlant, C. (2006). Crystal structure determination and site-directed mutagenesis of the *Pyrococcus abyssi* aCBF5-aNOP10 complex reveal crucial roles of the C-terminal domains of both proteins in H/ACA sRNP activity. *Nucleic Acids Res.* 34, 826-39.
- 88-**Marco-Marín, C., Gil-Ortiz, F., Pérez-Arellano, I., Cervera, J., Fita, I. and Rubio, V. (2007). A novel two-domain architecture within the amino acid kinase enzyme family revealed by the crystal structure of *Escherichia coli* glutamate 5-kinase. *JMB.* 367, 1431-1446.
- 89-**Miller, O.L.Jr., Beatty, B.R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science.* 23, 955-7.
- 90-**Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- 91-**Milkereit, P., Gadal, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., David Tollervey, Mann, M., Hurt, E and Tschochner, H. (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 18, 499-509.
- 92-**Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457-66.
- 93-** Mitchell, P. (2001). Purification of yeast exosome. *Methods Enzymol.* 342, 356-64.
- 94-**Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Mol Cell Biol.* 23, 6982-92.
- 95-**Morrissey, J.P and Tollervey, D. (1993). Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol Cell Biol.* 13, 2469-77.
- 96-**Mougey, E.B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O.L.Jr., Beyer, A., Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev.* 7, 1609-19.

- 97-**Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J.H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*.12, 773-86.
- 98-**Nissan, T.A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* 21, 5539-5547.
- 99-**Nissen, P., Hansen J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 11, 920-930.
- 100-**O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner, Z.R., Peters, E., et al (1995). Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escheria coli* . *Proc. Natl. Acad Sci U S A* 92:1807-1811.
- 101-**Oliveira, C.C and McCarthy, J.E.G. (1995) The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 8936-8943
- 102-**Oliveira, C.C., Gonzales, F.A., 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, 4186-98.
- 103-**Otero, L.J., Ache, M.P., Sachs, A.B. The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms.*EMBO J.* 1999 Jun 1;18(11):3153-63.
- 104-**Perez-Fernandez, J., Roman, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R., Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol Cell Biol.* 27, 5414-29.
- 105-**Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Tengg, M., Jacquier, A., Liebming, E., Nobis, B., Kappel, L., Van der Klei, I., Högenauer, G., Fromont-Racine, M and Bergler, H. (2007). Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6581-92.
- 106-**Piper, P.W., Patel, N., Lockheart, A. (1984). Processing of the 3' sequence extensions upon the 5S rRNA of a mutant yeast in *Xenopus laevis* germinal vesicle extract. *Eur. J. Biochem.* 15. 141, 115-118.

- 107-**Raué, H.A and Planta, R.J. (1991). Ribosome biogenesis in yeast. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 41, 89-129.
- 108-**Reinert, L.S., Shi, B., Nandi, S., Mazan-Mamczarz, K., Vitolo, M., Bachman, K.E., He, H. and Gartenhaus, R.B. (2006). MCT-1 protein interacts with the cap complex and modulates messenger RNA translational profiles. *Cancer Res.* 66, 8994-9001.
- 109-**Rockmill, B., Lambie, E.C., Roeder, G.S. (1991) Spore Enrichment. *Methods in Enzymology.* 194, 146-149.
- 110-**Rosado, I.V., Kressler, D., and De la Cruz, J. (2007). Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. *Nucleic Acids Res.* 35, 4203-13.
- 111-**Ross, J. (195). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59: 423-450.
- 112-**Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., Chait, B.T. (2000) The Yeast Pore Complex: composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of Cell Biology.* 48(4): 635-651.
- 113.**Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., Sonnenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* Mar;10(3):1134-44.
- 114-**Rudra, D., Mallick, J., Zhao, Y. and Warner, J.R. (2007). Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4815-4824.
- 115-**Sambrook, J., Maniatis, T and Fritsch, E.F. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 116-**Sambrook, J and Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 117-**Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P.E., Gas, N., Jacquier, A and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J.* 20, 6475–6484.
- 118-**Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P.E., Lebreton, A., Rousselle, J.C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A and Fromont-Racine, M. (2003). Sequential

protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Molecular and Cellular Biology* 23, 4449-4460.

119-Schäfer, T., Strauß, D., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* 22, 1370-80.

120-Schilders, G., Raijmakers, R., Raats, J.M.H and Pruijn, G.J.M. (2005). MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nuc. Acids Res.* 33, 6795-6804.

121-Schilders, G., Van Dijk, E., Pruijn, G.J. (2007). CID and hMTR4p associate with the human exosome subunit PM-ScI-100 and are involved in pre-rRNA processing. *NAR* 35, 2564-72.

122-Schneider, C., Anderson, J.T and Tollervey, D. (2007). The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. *Molecular Cell* 27, 324-331

123-Schneider DA., French, S.L., Osheim, Y.N., Bailey, A.O., Vu, L., Dodd, J., Yates, J.R., beyer, A.L., Nomura, M. (2006). RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 12707-12.

124- Schneider, D., Michel, Sikes, A.M., Vu, L., Dodd, J., Salgia, S., Osheim, Y., Beyer, A. and Nomura, M. (2007). Transcription Elongation by RNA Polymerase I Is Linked to Efficient rRNA Processing and Ribosome Assembly. *Molecular Cell*, 26, 217-229.

125-Schilders, G., Raijmakers, R., Raats, J.M.H and Pruijn, G.J.M. (2005). MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nuc. Acids Res.* 33, 6795-6804.

126-Schilders, G., Van Dijk, E., Pruijn, G.J. (2007). CID and hMTR4p associate with the human exosome subunit PM-ScI-100 and are involved in pre-rRNA processing. *NAR* 35, 2564-72.

127-Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

128-Sikorski, R.S and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122, 19-27.

- 129-**Stead, J.A., Costello, J.L., Livingstone, M.L., and Mitchell, P. (2007). The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic Acids Research* 35, 5556-5567
- 130.**Sydorsky, Y., Dilworth, D.J., Halloran, B., Yi, E.C., Makhnevych, T., Wozniak, R., Aitchison, J.D. (2005) Nop53p is a novel nucleolar 60S ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochem J.* 388, 819-26.
- 131-**Tarun, S.J.Jr and Sachs, A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* 1996 Dec 16;15(24):7168-77.
- 132-**Thomson, E and Tollervey, D. (2005). Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA.* 11(8):1215-24
- 133-**Tollervey, D. (1987). A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* 6, 4169-75.
- 134-**Trapman, J., Retel, J., Planta, R.J. (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp. Cell Res.* 90, 95-104.
- 135-**Towbin, H., Staehelin, T. And Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76, 4350-4354.
- 136-**Udem, S.A and Warner, J.R. (1973). The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem.* 248, 1412-6.
- 137-**Vale, R.D. AAA proteins. Lords of the ring. *J. Cell. Biol.* 10, 13-9.
- 138-**van Beekvelt, C.A., Graaff-Vincent, M., Faber, A.W., van 't Riet, J., Venema, J. and Raué, H.A. (2001). All three functional domains of the large ribosomal subunit protein L25 are required for both early and late pre-rRNA processing steps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nuc. Acids Res.* 29, 5001-5008.
- 139-**Van Hoof, A and Parker, R. (1999). The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* 12, 347-50.
- 140-**Van Hoof, A., Lennertz, P., Parker, R. (2000a). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* 15, 1357-65.

- 141-**Van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E., Parker, R. Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Mol Cell Biol.* 2000b Nov;20(21):8230-43.
- 142-**Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiller, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., Keller, W. (2005) A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol.* **3**(6):e189.
- 143-**Vanrobays, E., Gelugne, J.P., Gleizes, P.E., Caizergues-Ferrer, M. (2003). Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **23**, 2083-95.
- 144-**Vanrobays, E., Gelugne, J.P., Caizergues-Ferrer, M., Lafontaine, D.L.(2004). Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. *RNA* **10**, 645-56.
- 145-**Vasiljeva, L. and Buratowski, S. (2006). Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol. Cell* **21**, 239-248.
- 146-**Venema, J and Tollervey, D. (1995). Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1629-1650.
- 147-**Venema, J and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 261-311.
- 148-**Vojtek, A.B and Hollenberg, S.M. (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* **255**, 331-342.
- 149-**Wang, G, Yang J, Huijbrechtse, J.M. (1999). Functional domains of the Rps5 ubiquitin –protein ligase. *Mol Cell Biol* **19**: 342-352.
- 150-**Wang, L., Lewis, M.S and Johnson, A.W. (2005). Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA* **11**, 1291-302.
- 151-** Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochemical Sciences* **24**, 437-440.
- 152-**Warner J.R., Udem, S.A., Wu, R.S. (1972). Ribosomal proteins and the assembly of ribosomes in eukaryotes. *Biochem. J.* **129**, 29-30.
- 153-**Warner, J. (1973) Labeling of RNA and phosphoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology.* **194**, 423-428.

- 154**-Wehner, K.A., Gallagher, J.E., Baserga, S.J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7258-67.
- 155**-Westermeier, R and Naven, T. (2002). *Proteomics in practice*. Weinheim, Wiley-VCH.
- 156**-Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., Libri, D., Jacquier, A. (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725-37.
- 157**-Yeh, L.C.C. and Lee, J.C. (1998). Yeast ribosomal proteins L4, L17, L20, and L25 exhibit different binding characteristics for the yeast 35S precursor rRNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1443, 139-148.
- 158**-Zanchin, N.I.T., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., Goldfarb, D.S. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5001-5015.
- 159**-Zanchin, N.I.T and Goldfarb, D.S. (1999a). Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1518-1525.
- 160**-Zanchin, N.I.T and Goldfarb, D.S. (1999b). The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. 27, 1283-1288.
- 161**-Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M.J., Clarke, L. and Carbon, J. (1999). Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7461-72.

Curriculum vitae

1. Dados pessoais

Nome: Daniela Campos Granato

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: São José dos Campos-S.P

Data de nascimento: 13-08-1981

CPF: 220941008-80

RG:35898124-4 Órgão expedidor: SSP U.F: S.P

Endereço residencial: Rua Roberto Weiss, 642. Colinas. São José dos Campos, S.P.

CEP: 12242-160

Telefone:(012)39412556

e-mail:dgranato@q.usp.br

2. Formação acadêmica

2.1. Curso de graduação:

Odontologia pela Faculdade de Odontologia –UNESP- São José dos Campos (período de 1998 a 2002).

Diploma de dentista recebido em 2002.

2.2. Curso de pós graduação:

Doutorado: Universidade de São Paulo - Departamento de bioquímica, instituto de química.

Título da tese: Estudo da função da proteína Nop53p em *Saccharomyces cerevisiae*

Orientadora: Dr. Carla C.Oliveira

Início em 2003.

Bolsa de estudos recebida pela Fapesp (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo)

3. Experiência profissional

3.1. Iniciação científica:

Estudo de propriedades medicinais de *Punica granatum*.

Estudo de diferentes aspectos da úlcera aftosa

3.2. Doutorado:

Estudo da função da proteína Nop53p em *Saccharomyces cerevisiae*

Técnicas envolvidas no projeto de pesquisa: metodologias de RNA (Northern, imunoprecipitação de RNA, ensaio de interação com RNA *in vitro*), metodologias envolvendo proteínas (imunoprecipitação, Western, expressão de proteína em *E. Coli*, e purificação de proteína), técnicas de biologia molecular (clonagem de genes em diferentes vetores de expressão, ensaio de duplo-híbrido).

3.3. Monitoria:

Graduação: Monitoria na disciplina de Periodontologia (2002) na Faculdade de Odontologia-UNESP.

Doutorado: Monitoria para a graduação na Universidade de São Paulo-Instituto de química.

1- Classe de Nutrição, Disciplina de química das biomoléculas.

Professor: Bayardo Torres (2004).

2- Classe de Odontologia, Disciplina de Bioquímica.

Professor: Walter Colli (2005).

4. Idiomas

Inglês: Conversa, escrita e leitura avançado

Italiano: Conversa, escrita e leitura intermediário

5. Participação e resumos publicados em anais de congressos científicos

- VII Congresso do Departamento de Bioquímica da USP, Instituto de Química da USP, S.P, nos dias 5 e 6 de abril de 2004.

Granato, D.C & Oliveira, C.C. Caracterização da função da proteína codificada pela ORF YPL146C de *S.cerevisiae*.

- Encontro da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBQ), Águas de Lindóia, M.G, 2005.

Granato, D.C., Gonzales, F.G., Luz, J.S., Cassiola, F., Machado Santelli, G.M., Oliveira, C.C. Nop18p, an essential nucleolar protein, is involved in the late steps of pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Encontro da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBQ), Águas de Lindóia, M.G, 2006.

Coltri, P.P., Guimarães, B.G., Oliveira, C.C., Granato, D.C., Zanchin, N.I.T. Functional analysis of Nip7p, a conserved protein involved in pre-rRNA processing in *S.cerevisiae*.

- Encontro de RNA, Seattle, Estados Unidos, 2006.

Granato, D.C., Gonzales, F.G., Luz, J.S., Cassiola, F., Machado Santelli, G.M., Oliveira, C.C. Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Encontro de RNA, Seattle, Estados Unidos, 2006.

Coltri, P.P., Guimarães, B.G., Oliveira, C.C., Granato, D.C., Zanchin, N.I.T. Functional analysis of Nip7p, a conserved protein involved in pre-rRNA processing in *S.cerevisiae*.

- Encontro da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBQ), Salvador, B.A, 2007.

Granato, D.C. and Oliveira, C.C. Nop53p interacts co-transcriptionally with the pre-rRNA, binding to the 5.8S rRNA.

Coltri, P.P., Guimarães, B.G., Granato, D.C., Silva, T.C.L., Oliveira, C.C., Zanchin, N.I.T. Functional analyses of Nip7p, a conserved protein involved in pre-rRNA processing in *S.cerevisiae*.

- Encontro de RNA, Wisconsin, Estados Unidos, 2007.

Granato, D.C. and Oliveira, C.C. Nop53p interacts co-transcriptionally with the pre-rRNA, binding to the 5.8S rRNA.

- FESBE, Águas de Lindóia, Brasil, 2007.

Cambiaghi, T. D., Luchessi, A. D., Castilho, B. A., Granato, D. C., Oliveira, C. C., Curi, R. Elucidando o controle traducional de PPAR β no processo de diferenciação de macrófagos.

6. Cursos

6.1. Curso de Extensão Universitária na modalidade de Atualização, Instituto de Química, 07 a 18 de março de 2005. Proteção Radiológica

6.2. Curso de Conhecimentos básicos de espectrometria de massa, LNLS, 2005.

7. Publicações

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

7.2. Coltri, P.P., Guimarães, B.G., Granato, D.C., Silva, T.C.L., Luz, J.S., Oliveira, C.C and Zanchin, N.I.T. RNA interaction, structure analysis and complex formation by the ribosome biogenesis protein Nip7p. (no prelo).

7.3. Granato, D.C., Castilho, B.A., Pimenta, D.C., Santelli-Machado, G.M., Oliveira, C.C. Nop53p interacts with the 5.8S rRNA co-transcriptionally and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. (manuscrito em preparação).

Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*

Daniela C. Granato¹, Fernando A. Gonzales¹, Juliana S. Luz¹, Flávia Cassiola², Glaucia M. Machado-Santelli² and Carla C. Oliveira¹

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

² Department of Cellular and Development Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Keywords

rRNA processing; nucleolus; ribosome synthesis; *Saccharomyces cerevisiae*; pre60S

Correspondence

C. C. Oliveira, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, Ave Prof Lineu Prestes, 748 São Paulo, SP 05508-000, Brazil
Fax: +55 11 3815 5579
Tel: +55 11 3091 3810 (ext 208)
E-mail: ccoliv@iq.usp.br

(Received 12 February 2005, revised 1 July 2005, accepted 12 July 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04861.x

In eukaryotes, pre-rRNA processing depends on a large number of non-ribosomal *trans*-acting factors that form large and intriguingly organized complexes. A novel nucleolar protein, Nop53p, was isolated by using Nop17p as bait in the yeast two-hybrid system. Nop53p also interacts with a second nucleolar protein, Nip7p. A carbon source-conditional strain with the *NOP53* coding sequence under the control of the *GALI* promoter did not grow in glucose-containing medium, showing the phenotype of an essential gene. Under nonpermissive conditions, the conditional mutant strain showed rRNA biosynthesis defects, leading to an accumulation of the 27S and 7S pre-rRNAs and depletion of the mature 25S and 5.8S mature rRNAs. Nop53p did not interact with any of the exosome subunits in the yeast two-hybrid system, but its depletion affects the exosome function. In pull-down assays, protein A-tagged Nop53p coprecipitated the 27S and 7S pre-rRNAs, and His-Nop53p also bound directly 5.8S rRNA *in vitro*, which is consistent with a role for Nop53p in pre-rRNA processing.

The factors involved in rRNA processing in eukaryotes assemble cotranscriptionally onto the nascent pre-rRNAs and include endonucleases, exonucleases, RNA helicases, GTPases, modifying enzymes and snoRNPs (small nucleolar ribonucleoproteins). The precursor of three of the four eukaryotic mature rRNAs contains the rRNA sequences flanked by two internal (ITS1 and ITS2) and two external (5'-ETS and 3'-ETS) spacer sequences that are removed during processing [1,2]. The pre-rRNA is first assembled into a 90S particle that contains U3 snoRNP and 40S subunit-processing factors [3,4]. The early pre-rRNA endonucleolytic cleavages at sites A₀, A₁ and A₂ occur within the 90S particles [3,5]. A₂ cleavage releases the first pre60S particle, which differs in composition from the known 90S particle. Pre60S particles contain 27S rRNA, ribosomal L proteins and many nonribosomal proteins [6].

As they mature, pre60S particles migrate from the nucleolus to the nucleoplasm and their content of non-ribosomal factors changes [7,8]. Nip7p was among the proteins identified in the early pre60S particle [6–8], and has been shown to participate in the processing of 27S pre-rRNA to the formation of 25S [9]. Interestingly, Nip7p also binds the exosome subunit Rrp43p [10]. The exosome complex is responsible for the degradation of the excised 5'-ETS and for the 3'-5' exonucleolytic processing of 7S pre-rRNA to form the mature 5.8S rRNA. The exosome is also involved in the processing of snoRNAs and in mRNA degradation [11–13].

During processing, pre-rRNA undergoes covalent modifications that include isomerization of some uridines into pseudouridines and addition of methyl groups to specific nucleotides, mainly at the 2'-O posi-

Abbreviations

ETS, external transcribed spacer; β -Gal, β -galactosidase; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; ITS, internal transcribed spacer; RFP, red fluorescent protein; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein.

tion of the ribose. These nucleotide modifications are directed by snoRNPs, which select the nucleotide through complementary base-pairing between the snoRNA and the rRNA substrate. The snoRNAs involved in rRNA modification can be divided into two major classes based on conserved sequence elements and on the association with evolutionarily conserved core proteins [14–16]. The box C/D class of guide snoRNAs contains the core proteins Nop1p, Nop58p, Nop56p and Snu13p, and is involved in cleavage and methylation of pre-rRNA. The box H/ACA guide snoRNAs are associated with the core proteins Cbf5p, Gar1p, Nhp2p and Nop10p and function in the conversion of uridine into pseudouridine [17–23].

In addition to the core snoRNP proteins, other proteins have been found to be associated with the snoRNPs and to participate in cleavage reactions as well as methylation and pseudouridylation of specific nucleotides of rRNA [24–28]. Among these proteins is Nop17p, which interacts with the box C/D snoRNP subunit Nop58p and with the exosome subunit Rrp43p [28]. Characterization of Nop17p function showed that it is required for proper localization of the core proteins of the box C/D snoRNP Nop1p, Nop56p, Nop58p and Snu13p [28]. In addition, cells depleted of Nop17p show pre-rRNA processing defects that include increased primer extension products at certain box C/D methylation sites, indicating that Nop17p is required for proper pre-rRNA methylation [28]. A third Nop17p-interacting partner isolated using the yeast two-hybrid system is the protein encoded by the open reading frame (ORF) YPL146C, Nop53p. Nop53p is an essential nucleolar protein, which was also recently identified as a subunit in pre60S particles [6,7].

In this study, we show that Nop53p is required for the late steps of rRNA processing. Consistent with its copurification with the pre60S particle, Nop53p depletion affects exonucleolytic cleavage of the 3'-end of the 7S pre-rRNA, a processing step that requires the function of the exosome [11]. In addition, protein A-tagged Nop53p coprecipitated the 27S and 7S pre-rRNAs and the mature 5.8S rRNA. Purified His–Nop53p also bound *in vitro* transcribed 5.8S rRNA, showing that it must play an important role in ribosome biogenesis, possibly related to the exosome function.

Results

Nop53p interacts with the pre-rRNA processing proteins Nop17p and Nip7p

Saccharomyces cerevisiae Nop53p, a previously uncharacterized essential protein (SGD), is encoded by the

YPL146C ORF and was identified in the yeast nuclear pore complex [29] and as a component of the pre60S complex [6,7]. In this study, Nop53p was isolated in a two-hybrid screen as a protein interacting with Nop17p, which is involved in the early steps of pre-rRNA processing [28]. Nop17p and Nop53p interacted in the two-hybrid system independently of the tag, but the interaction was stronger when Nop17p was fused to the DNA binding domain (BD–Nop17p; Fig. 1). Further protein interaction studies in the two-hybrid system revealed that Nop53p also interacts with Nip7p (Fig. 1), a protein component of the pre60S complex that is involved in processing of 27S preRNA [6,7,9]. The interaction between Nop53p and Nip7p in the two-hybrid system confirms the finding of these two proteins in the pre60S complex. The two-hybrid system was also used to test the interaction between Nop53p and the exosome subunits and between Nop53p and snoRNP proteins of box C/D (Nop1p, Nop56p, Nop58p and Snu13p) and of box H/ACA (Cbf1p, Nop10p, Gar1p and Nhp2p), although no interaction was detected (data not shown).

The Nop53p–Nop17p interaction was confirmed by pull-down assays carried out using *Escherichia coli* expressed His–Nop53p and GST–Nop17p fusion proteins. The results obtained show that His–Nop53p was pulled-down by GST–Nop17p (Fig. 1C). A parallel negative control experiment was carried out using glutathione *S*-transferase (GST), which showed no precipitation of His–Nop53p (Fig. 1C).

Depletion of Nop53p correlates with loss of viability

A diploid *NOP53* deletion strain (*2n*, *NOP53/Δnop53*), obtained from Euroscarf (Table 2), was transformed with a plasmid containing a copy of *NOP53* fused to protein A under control of the regulated *GALI* promoter (Table 1) and induced to sporulation. Haploid *Δnop53/A-NOP53* was not able to grow on glucose plates, confirming that *NOP53* is an essential gene for cell viability (Fig. 2A). A growth curve in liquid medium showed that the growth rate of *Δnop53/A-NOP53* decreases 4 h after shifting cells from galactose-containing medium to glucose (Fig. 2B). The analysis of *A-NOP53* expression in *Δnop53/A-NOP53* cells shows that after 4 h on glucose, the *A-NOP53* mRNA can no longer be detected (Fig. 2C). The two bands corresponding to *A-NOP53* mRNA are due to the lack of an efficient transcription termination sequence in the plasmid YCp33Gal-A-NOP53. The fusion protein A–Nop53p can be detected by immunoblots up to 8 h after shift to glucose-containing medium,

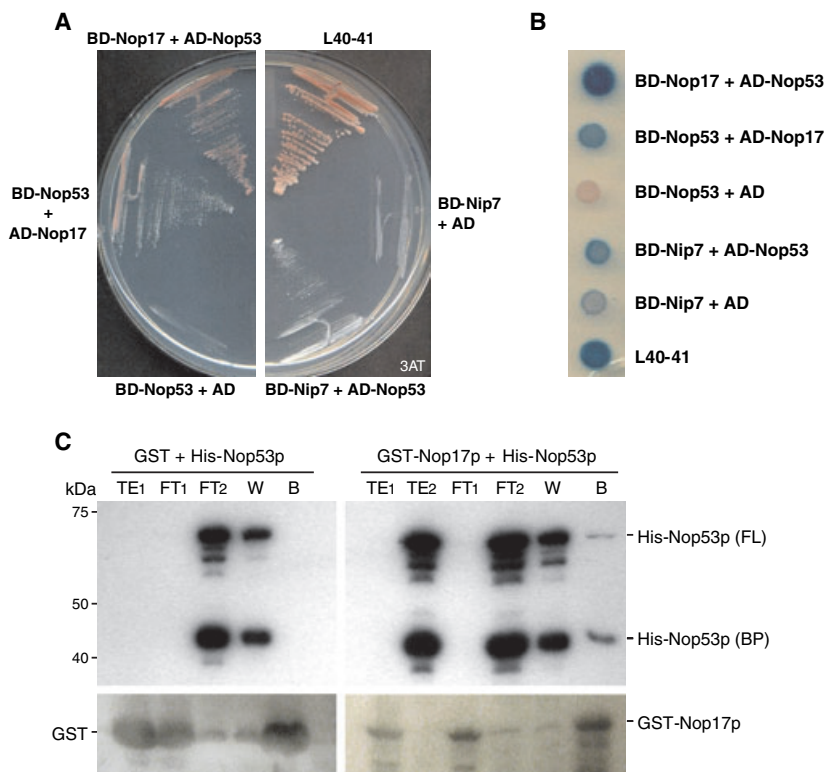


Fig. 1. Assays to test the interaction of Nop53p with other proteins. (A) Test for positive interactions between Nop53p and other proteins fused to the Gal4p activation domain (AD), or to the *lexA* DNA binding domain (BD) tested for the yeast two-hybrid marker *HIS3*. Where indicated, cells were grown on plate containing 1 mM 3-AT. BD-Nop53 + AD and BD-Nip7 + AD (negative controls); strain L40-41 (positive control). (B) Same samples as in (A) tested for the yeast two-hybrid marker β -Gal. (C) Pull-down assay of His-Nop53p and GST-Nop17p. TE₁, total extract from cells expressing GST or GST-Nop17p; TE₂, total extract from cells expressing His-Nop53p; FT₁, flow through from GST or GST-Nop17p cell extracts; FT₂, flow through from His-Nop53p cell extract; W, wash; B, bound fraction. His-Nop53p was detected by immunoblotting with an monoclonal anti-polyhistidine serum: FL (full length protein); BP (breakdown product). GST and GST-Nop17p were detected with an anti-GST serum.

Table 1. List of plasmid vectors used in this study.

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
pBTM116	<i>lexA</i> DNA binding domain, <i>TRP1</i> 2 μ m	[41]
pBTM-NIP7	<i>lexA::NIP7</i> , <i>TRP1</i> 2 μ m	[42]
pBTM-NOP17	<i>lexA::NOP17</i> , <i>TRP1</i> 2 μ m	[28]
pBTM-NOP53	<i>lexA::NOP53</i> , <i>TRP1</i> 2 μ m	This study
pACT-NOP8	<i>GAL4::NOP8</i> , <i>LEU2</i> 2 μ m	[42]
pGADC ₂	<i>GAL4</i> activation domain, <i>LEU2</i> 2 μ m	[43]
pGAD-NOP17	<i>GAL4::NOP17</i> , <i>LEU2</i> 2 μ m	[28]
pGAD-NOP53	<i>GAL4::NOP53</i> , <i>LEU2</i> 2 μ m	This study
YCp33GAL-A	<i>GAL1::ProtA</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	Tavares and Oliveira, unpublished
YCp33GAL-A-NOP53	<i>GAL1::ProtA-NOP53</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	This study
YCp111-His-NOP53	<i>GAL1::His-NOP53</i> , <i>LEU2</i> , <i>CEN4</i>	This study
pRS313	pBluescript, <i>HIS3</i> , <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i>	[44]
pRS-GAL-His-NOP53	<i>GAL1::His-NOP53</i> , <i>HIS3</i> , <i>CEN4</i>	This study
pGFP-N-FUS	<i>MET25::GFP</i> , <i>CEN6</i> , <i>URA3</i>	[45]
pGFP-N-NOP53	<i>MET25::GFP-NOP53</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN6</i>	This study
pRFP-NOP1	<i>ADH1::RFP-NOP1</i> , <i>LEU2</i> , 2 μ m	[28]
pGEX-NOP17	<i>GST::NOP17</i> , <i>Amp^R</i>	[28]
pET-NOP53	<i>His::NOP53</i> , <i>Kan^R</i>	This study

although by this time the levels of the protein are very low (Fig. 2D). The fusion Protein A-Nop53p is functional, supporting growth of the Δ *nop53/A-NOP53* in galactose-containing medium. The detection of

A-Nop53p after 8 h of transcriptional repression of the *GAL1* promoter indicates that this is a stable protein, probably because it is not free in the cell, but part of the pre60S complex.

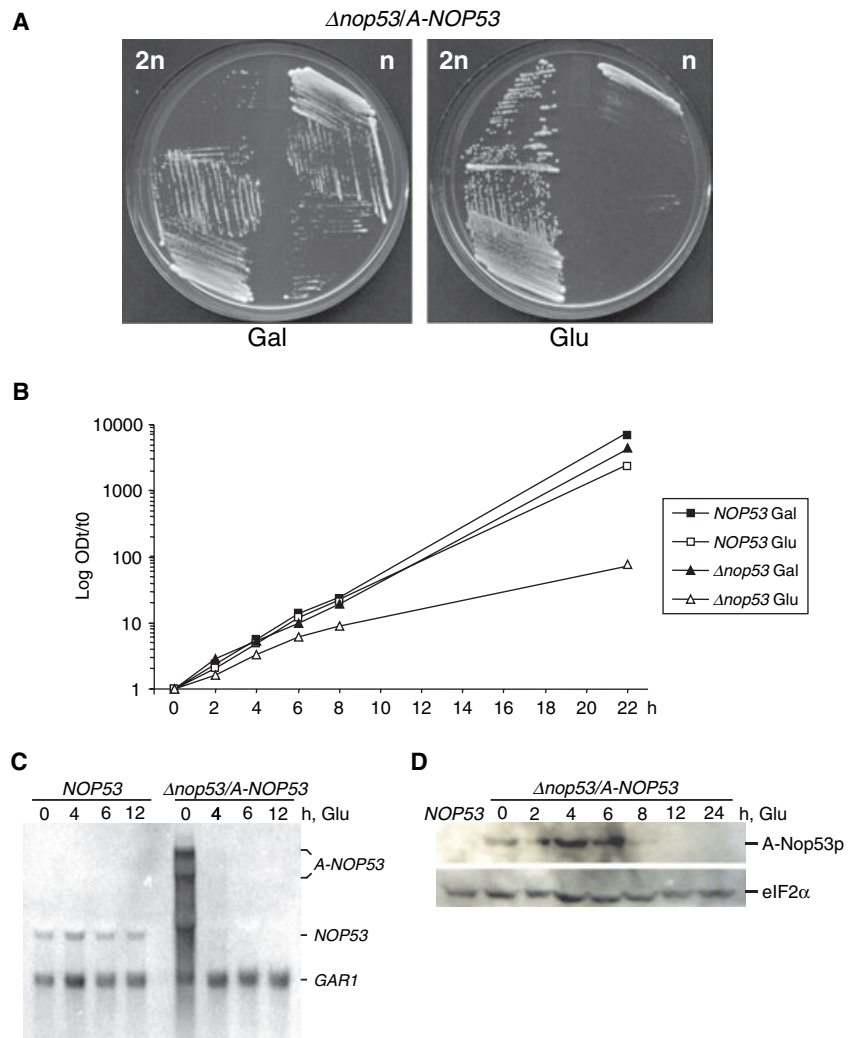


Fig. 2. *NOP53* is an essential gene. (A) To test whether *NOP53* was an essential gene, yeast strains *2n NOP53/Δnop53* and *Δnop53/GAL-A-NOP53* were plated on YPGal or YPD medium. Haploid strain is not able to grow on glucose, which represses the expression of A-Nop53p fusion. (B) Growth curves of *NOP53* and *Δnop53/GAL-A-NOP53* strains in YPGal or YPD medium. (C) Northern blot analysis of *GAL-A-NOP53* expression in *Δnop53* cells in glucose medium. A DNA probe against *GAR1* mRNA was used as an internal control. (D) Western blot analysis of *GAL-A-NOP53* expression in *Δnop53* cells in glucose medium. eIF2 α was detected with an anti-eIF2 α serum and was used as an internal control. *NOP53* does not express A-Nop53p and therefore the band corresponding to the fusion protein is not detected in this strain.

GFP-Nop53p colocalizes with RFP-Nop1p

The interaction of Nop53p with Nop17p, a nucleolar protein [28], and Nip7p, a protein that localizes to the nucleus and the cytoplasm [9], raised the question of where Nop53p would localize in the cell. This was assessed by the utilization of a green fluorescent protein (GFP) fusion (GFP-Nop53p) and a red fluorescent protein (RFP)-Nop1p fusion protein as a nucleolar marker. *Δnop53* cells were cotransformed with plasmids expressing GFP-Nop53p and RFP-Nop1p and observed by confocal microscopy. GFP-Nop53p colocalizes with RFP-Nop1p (Fig. 3), showing a predominantly nucleolar localization. The colocalization was confirmed by using the profile module of LSM 510 software. The GFP-Nop53p fusion protein was functional in these cells, because it complemented the growth of *Δnop53/GAL-His-*

NOP53/GFP-NOP53 in the presence of glucose (data not shown).

Δnop53 shows defects in pre-rRNA processing

Because all the evidence pointed to a role for Nop53p in pre-rRNA processing, the kinetics of pre-rRNA processing was analyzed by pulse-chase labeling with both [3 H]uracil and [methyl- 3 H]methionine. Following incubation of wild-type and *Δnop53/A-NOP53* cells for 12 h in glucose medium, pulse-chase-labeling experiments showed a severe delay in 25S and 5.8S rRNA formation, with accumulation of the 35S, 27S and 7S pre-rRNAs (Fig. 4). Pulse-chase labeling with 3 H-uracil showed that although mature 5.8S rRNA could be detected in the *NOP53* strain after 3 min of chase, in *Δnop53/A-NOP53* 7S pre-rRNA was still visible after 60 min, showing a defect for processing 27S into 5.8S

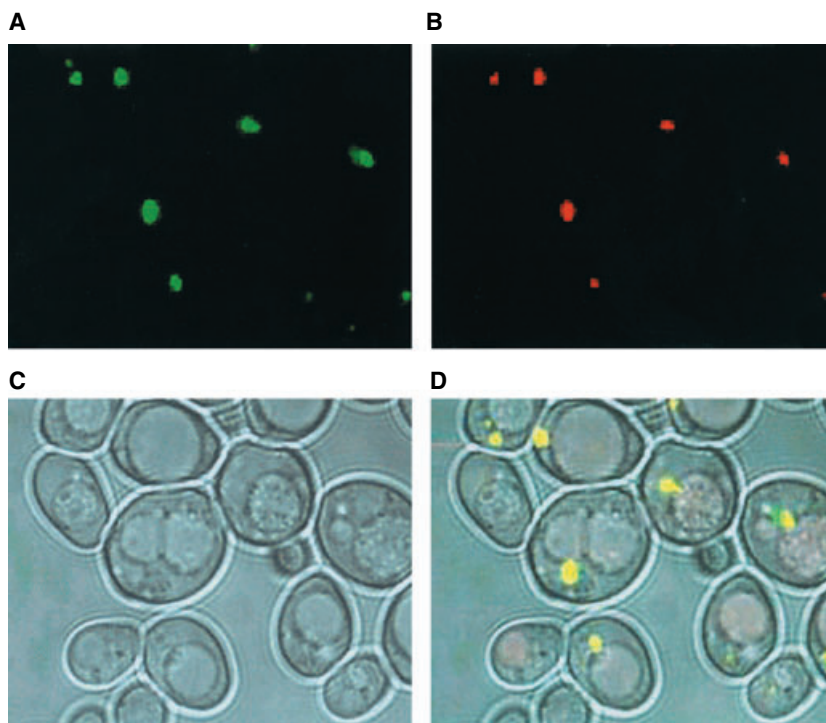


Fig. 3. Subcellular localization of GFP-Nop53p. $\Delta nop53$ strain was cotransformed with plasmids pGFP-N-NOP53 and pRFP-NOP1 encoding the GFP-Nop53p and RFP-Nop1p fusion proteins, respectively. Laser scanning confocal microscope images show the GFP-NOP53 (green) and RFP-NOP1 (red) localization separately (A, B). Cell morphology was observed by DIC (C) and in the final image (D) all the channels are merged.

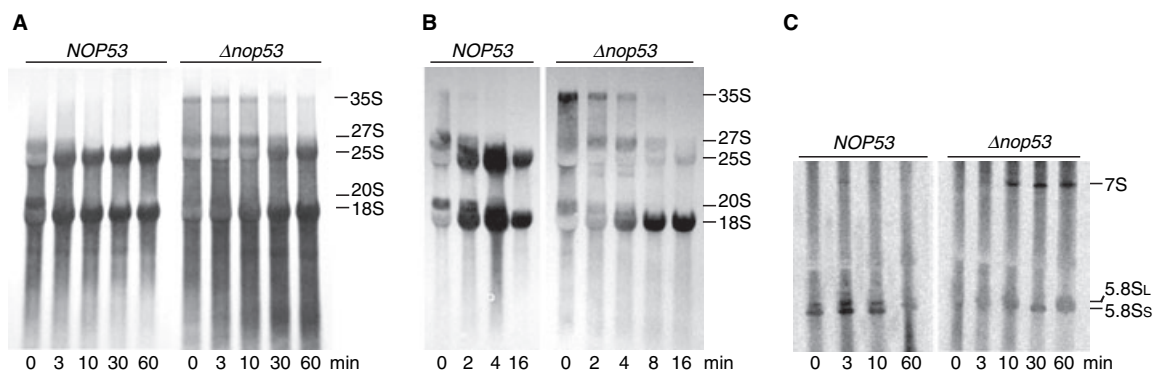


Fig. 4. Metabolic labeling of rRNA. Pulse-chase labeling with [^3H]uracil or with [methyl- ^3H]methionine was performed after incubating $\Delta nop53/A-NOP53$ and control strains in glucose medium for 12 h. (A) Total RNA separated on agarose gel after [^3H]uracil labeling. (B) Analysis on agarose gel of pre-rRNA labeled with [methyl- ^3H]methionine. (C) Total RNA separated on polyacrylamide gel after [^3H]uracil labeling. An aliquot of 20 μg of total RNA was loaded in each lane. The figures show autoradiographs of RNA transferred to nylon membranes incubated in En^3Hance (Amersham Biosciences). Bands corresponding to major intermediates and mature rRNAs are indicated.

and 25S rRNAs (Fig. 4A,C). Pulse-chase labeling with [methyl- ^3H]methionine also showed the delay in 25S formation in $\Delta nop53/A-NOP53$, compared with the much less affected formation of mature 18S rRNA (Fig. 4B).

Analysis of pre-rRNA and rRNA steady-state levels by means of northern blot was performed using specific oligonucleotide probes that hybridize in the pre-rRNA spacer sequences and in the mature rRNAs. Analyses of RNA isolated from cells subjected to

growth in glucose medium for up to 12 h, which leads to Nop53p depletion, also detected pre-rRNA processing defects including accumulation of 35S, 27S and 7S pre-rRNAs and a corresponding decrease in the concentration of the mature 25S and 5.8S rRNAs, as compared with the control strain (Fig. 5). Accumulation of the 7S pre-rRNA indicates that Nop53p may be required for proper exosome function, because defective processing of the 7S pre-rRNA 3'-end is a typical phenotype of exosome mutants [10–13,30]. Although

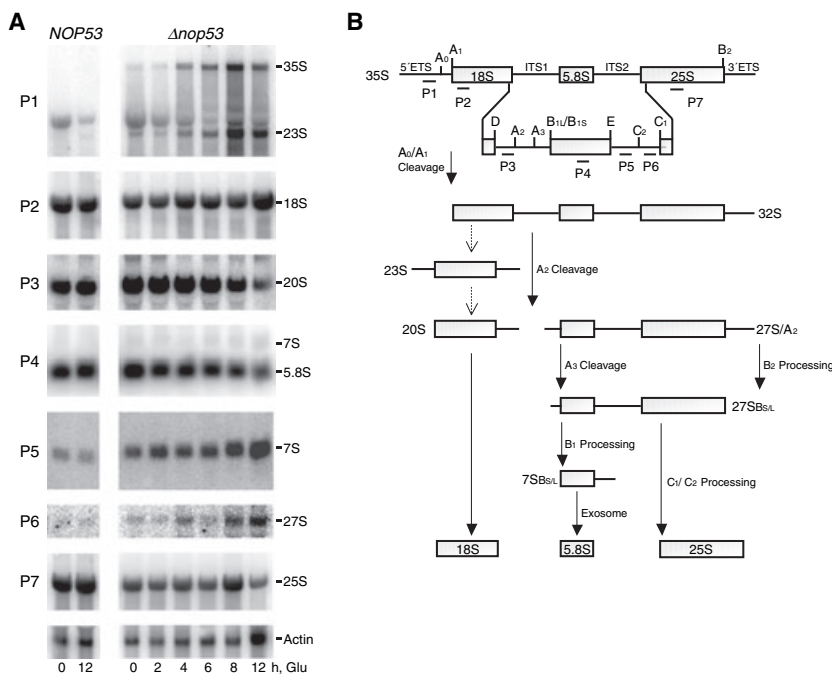


Fig. 5. Northern blot analysis of pre-rRNA processing. (A) Total RNA was extracted from cells incubated in glucose medium for different time intervals and hybridized against specific oligonucleotide probes. The relative positions of the probes on the 35S pre-rRNA are indicated in (B). Bands corresponding to the major intermediates and to the mature rRNAs are indicated on the right-hand side. The lower panel shows a northern blot detecting the actin mRNA, used as an internal control. (B) Structure of the 35S pre-rRNA and major intermediates of the rRNA processing pathway in *S. cerevisiae*. The positions of the probes used for northern blot hybridizations are indicated below the 35S pre-rRNA. Processing of 35S pre-rRNA starts with endonucleolytic cleavages at sites A_0 and A_1 in the 5'-ETS, generating 32S pre-rRNA. The subsequent cleavage at site A_2 , in ITS1, generates the 20S and 27S A_2 pre-rRNAs (dotted arrows indicate a possible pathway including the aberrant intermediate 23S). The 20S pre-rRNA is then processed at site D to the mature 18S rRNA. The major processing pathway of the 27S A_2 pre-rRNA involves cleavage at site A_3 , producing 27S A_3 , which is digested quickly by exonucleases to generate the 27S B_s (27SB short) pre-rRNA. The subsequent processing step occurs at site B_2 , at the 3'-end of the mature 25S rRNA. Processing at sites C_1 and C_2 separates the mature 25S rRNA from the 7S S pre-rRNA. This pre-rRNA is subsequently processed exonucleolytically to generate the mature 5.8S S rRNA. A fraction of the 27S A_2 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 L (5.8S long) rRNA, which is 6–8 nucleotides longer than the 5.8S S rRNA at the 5'-end.

the depletion of Nop53p does not seem to affect the formation of 18S rRNA, an accumulation of 23S and 35S pre-rRNAs results in a slight decrease in the concentration of 18S rRNA (Fig. 5).

The lower concentrations of mature 25S and 5.8S rRNAs detected by steady-state analysis are consistent with the data obtained from the pulse-chase-labeling experiments and indicate that Nop53p is involved in the late steps of rRNA processing. To further investigate the effects of Nop53p deficiency on pre-rRNA cleavages we performed primer extension experiments using primers that anneal in the regions of the mature rRNAs close to the 5'-end of those rRNAs. Extension of the primer P2, that anneals to nucleotides 34–53 downstream of the 18S rRNA 5'-end, showed that depletion of Nop53p leads to shorter 18S rRNA at the 5'-end (Fig. 6A). A similar decrease in the amount of primer extension product is observed for the extension

reactions using primer P4 that anneals to nucleotides 42–64 downstream of the 5.8S rRNA 5'-end (Fig. 6B). Extension of primer P7 (complementary to nucleotides 80–105 downstream of 25S rRNA 5'-end) also resulted in a decrease of concentration of the band corresponding to the 5'-end of the 25S rRNA (Fig. 6C), although in this case the effect of Nop53p depletion was not as strong as observed for the 18S and 5.8S rRNAs. Control experiments were performed in parallel with total RNA extracted from *NOP53* cells. In these cells, the primer extension products corresponded to the correct 5'-ends of the rRNAs. Interestingly, when the same experiments were performed with the mutant exosome subunit strain *rrp43-1* [13], the results were very similar to those obtained from *Δnop53/A-NOP53* cells (Fig. 6). Therefore, the primer extension reactions with total RNA from *rrp43-1* cells growing under nonpermissive conditions indicate that when the exosome is

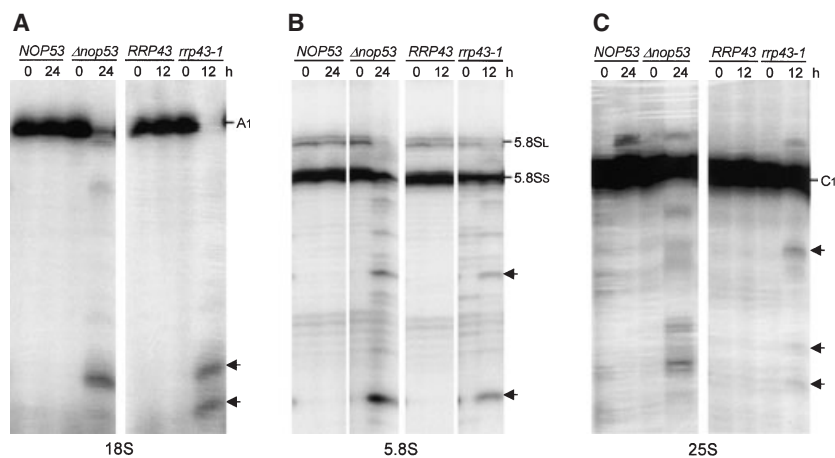


Fig. 6. Analysis of pre-rRNA processing by primer extension. Total RNA was extracted from *NOP53* and $\Delta nop53/A-NOP53$ cells growing in glucose medium for different time intervals and used for primer extension experiments. *RRP43* and *rrp43-1* cells were incubated at 37 °C for the indicated periods prior to RNA extraction. Primer extension reactions were performed using oligonucleotides P₂ (A), P₄ (B) and P₇ (C), which are complementary to sequences downstream of the 5'-end of the three mature rRNAs, 18S, 5.8S and 25S, respectively. Bands corresponding to mature 5'-ends are indicated on the left-hand side. Arrows indicate main shorter primer extension products.

not functional and rRNA processing is defective, precursor and intermediate rRNAs may undergo 5'–3' degradation. Interestingly, $\Delta nop53/A-NOP53$ cells showed the same phenotype, indicating that Nop53p affects exosome function.

Nop53p coprecipitates pre-rRNAs and binds 5.8S rRNA

In order to find out whether Nop53p interacts with pre-rRNAs, *NOP53* strains expressing either Protein A or A–Nop53p fusion protein were constructed to test coimmunoprecipitation of pre-rRNAs on IgG–Sephacrose affinity columns. The results obtained showed that A–Nop53p coprecipitates the 27S and 7S pre-rRNAs, and 5.8S mature rRNA (Fig. 7). A–Nop53p also coprecipitated snR37, a box H/ACA snoRNA involved in pseudouridylation of the 25S rRNA. A–Nop53p did not coprecipitate box C/D snoRNAs U3 and U14, involved in processing of 18S rRNA (Fig. 7; data not shown). Compared with the control Protein A, A–Nop53p coprecipitated 4.31-fold more snR37, 4.67-fold more 5.8S, and 50-fold more 7S. These results indicate that Nop53p participates in the pre60S complex, affecting the processing of the 27S and more strongly the processing of the 7S pre-rRNA. Purified His–Nop53p was also tested for binding to *in vitro* transcribed 5.8S rRNA and the results show that it binds directly to this RNA (Fig. 8). These results support the hypothesis that Nop53p depletion results in a defective function of the exosome.

Nop53p has a putative human homolog

Database searches were performed to identify possible homologs of *S. cerevisiae* *NOP53*, and Nop53p was found to be a conserved protein in eukaryotes, showing a higher conservation in lower eukaryotes (Fig. 9). Despite the fact that Nop53p binds RNA, no RNA recognition motif was identified in its sequence. A putative human ortholog (glioma tumor suppressor candidate, Accession no. NP056525) shares 21% of identity with its *S. cerevisiae* counterpart, but 41% identity at the C-terminal region. Interestingly, hNop53p was also localized to the nucleolus [31], supporting the hypothesis of Nop53p having a conserved function throughout evolution.

Discussion

Protein interaction studies have established a functional link between several proteins involved in pre-rRNA processing. The exosome subunit Rrp43p interacts with Rrp46p, Nip7p and Nop17p [10,13,28]. Nop17p interacts with Nop58p and Nop53p [28] (this study). The circle is closed by the interaction of Nop53p and Nip7p, which was determined here. The exosome subunits Rrp43p and Rrp46p and Nip7p are found both in the nucleus and in the cytoplasm, whereas Nop58p, Nop17p and Nop53p are restricted to the nuclear compartment, showing a predominantly nucleolar localization [9,10,12,20,28]. The subcellular distribution and the interactions of these proteins are consistent with their function in

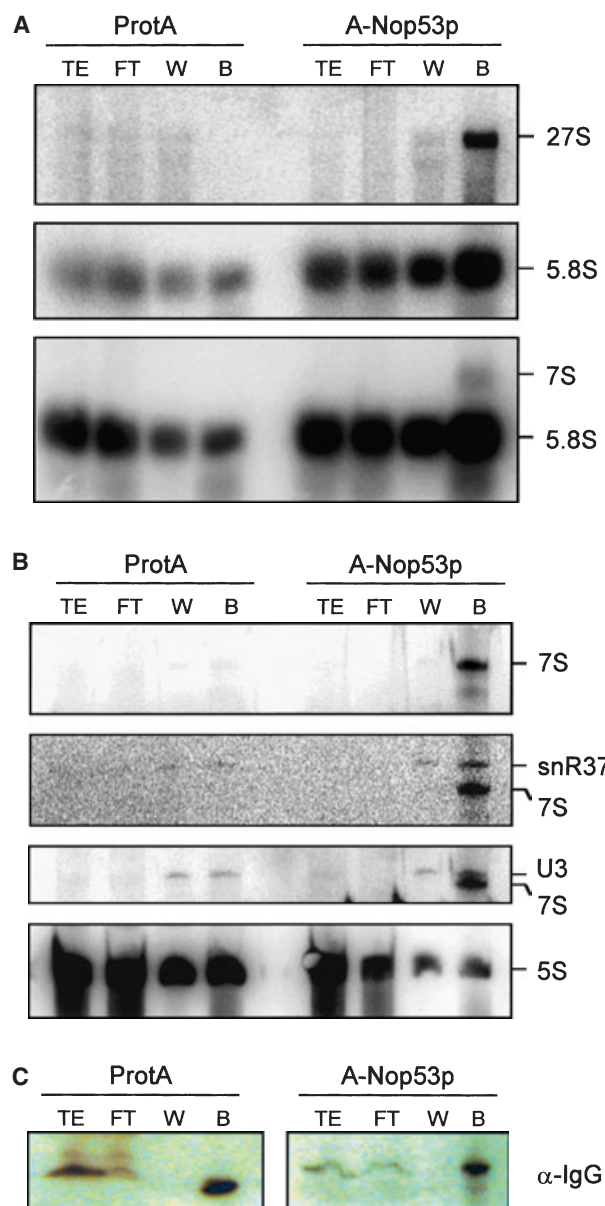


Fig. 7. Coimmunoprecipitation of rRNA with A-Nop53p. (A) Total cell extracts from strains YDG-152 and YDG-153 were mixed with IgG-Sepharose beads for coimmunoprecipitation of rRNAs with A-Nop53p. RNA extracted from different fractions was separated on an agarose gel (A) or a polyacrylamide gel (B). Bound RNA was detected by hybridization against probes specific to rRNAs or snoRNAs as indicated. (A) Lower panel corresponds to overexposure of middle panel, allowing the detection of 7S pre-rRNA band. (C) Immunoblot of total protein from the same fractions as above. Bands corresponding to Protein A and A-Nop53p were detected with anti-IgG iserum. TE, total extract; FT, flow through; W, wash fraction; B, bound fraction (beads).

pre-rRNA processing and ribosome biogenesis. Nop53p colocalizes with the nucleolar protein Nop1p [17] and its localization is consistent with the data

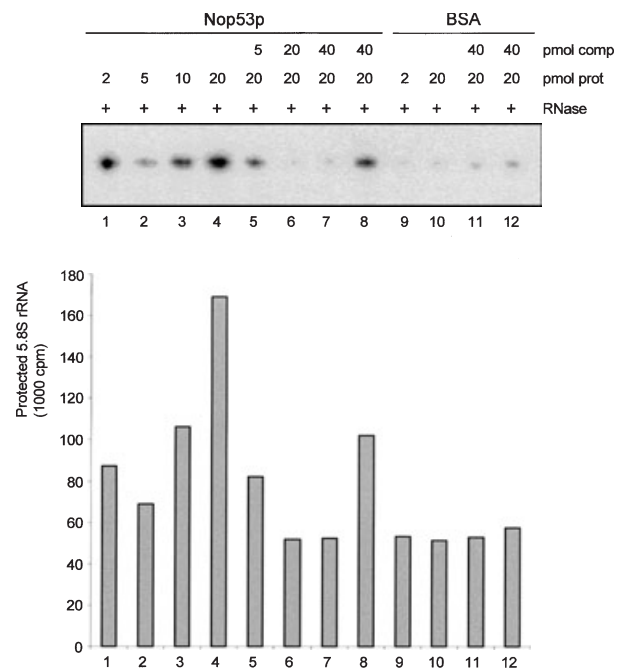


Fig. 8. Nop53p binds 5.8S rRNA. UV cross-linking was performed after incubation of 1 pmol of *in vitro* transcribed, uniformly labeled 5.8S rRNA with increasing amounts of His-Nop53p or bovine serum albumin (NEB), in the absence or presence of cold competitor. After digestion with RNaseA, samples were resolved on a denaturing polyacrylamide gel. 1–4, radioactive 5.8S incubated with 2–20 pmol of His-Nop53p; 5–7, 20 pmol of His-Nop53p and 5–40 pmol of cold 5.8S rRNA; 8, 20 pmol of His-Nop53p and 40 pmol of cold nonspecific competitor RNA; 9–10, [32 P]5.8S incubated with increasing amounts of bovine serum albumin; 11, 20 pmol of bovine serum albumin and 40 pmol of cold 5.8S rRNA; 12, [32 P]5.8S, 20 pmol bovine serum albumin and 40 pmol of cold nonspecific competitor. Lower panel shows quantitation of the protected [32 P]5.8S rRNA bands.

reported in the global yeast protein localization program [32].

The interaction with Nip7p indicated that Nop53p is involved in the late steps of rRNA processing. Evidence supporting this hypothesis was obtained from the Nop53p–rRNA coprecipitation analyses. Nop53p coimmunoprecipitated the 27S and 7S pre-rRNAs and the mature 5.8S rRNAs. *In vitro* RNA-binding assays showed that Nop53p actually binds 5.8S rRNA. Analysis of rRNA processing showed that depletion of Nop53p leads to an accumulation of the 27S and 7S pre-rRNAs, confirming a role for Nop53p on late steps of processing. Accumulation of unprocessed 27S pre-rRNA was observed for cells depleted of Nip7p [9], which is consistent with a functional interaction with Nop53p. Accumulation of the 7S pre-rRNA, by contrast, is a defect typical of a deficient exosome [10–13].

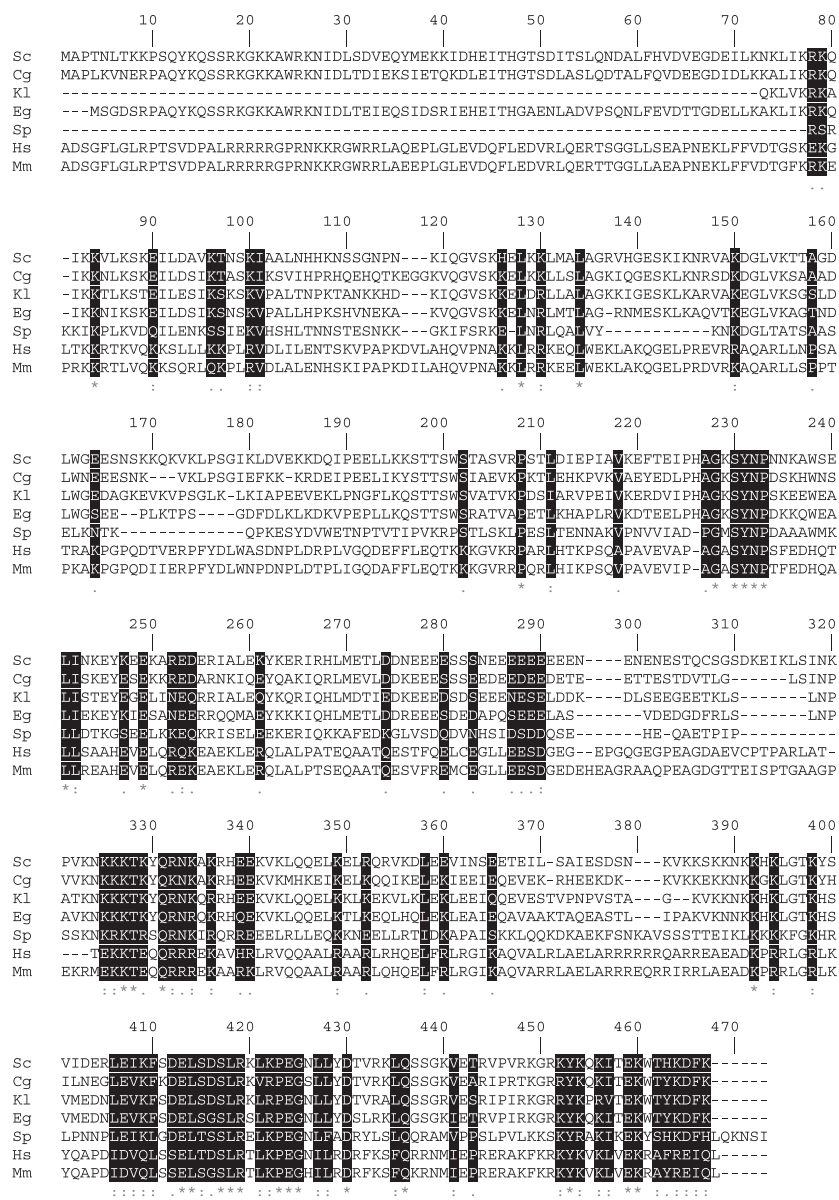


Fig. 9. Multiple sequence alignment of Nop53p. The full sequence of Nop53p and its putative eukaryotic orthologs were aligned. Numbers correspond to amino acid position in each protein. Proteins access numbers: *C. glabrata*, CAG62427; *K. lactis*, XP_455604; *E. gossypii*, AAS51352; *S. pombe*, CAB52719; *Homo sapiens*, NP_056525; *Mus musculus*, AAH25810. *, identity; :, strong similarity; ., weak similarity. CLUSTALW was used for the sequence alignment [50].

Although Nop53p did not interact with any of the exosome subunits in the two-hybrid system (data not shown), it might be connected to the exosome via Nip7p. Similar to exosome mutants $\Delta nop53/A-NOP53$ strain showed higher levels of 7S pre-rRNA, indicating a defective 3'-5' exonucleolytic cleavage of this precursor and therefore that the exosome is not fully active in the absence of Nop53p. Interestingly, the accumulated 7S pre-rRNA in cells depleted of Nop53p contains aberrant 5'-end, indicating that this pre-rRNA is being degraded by a 5'-3' exonuclease, probably Rat1p or Xrn1p [33,34]. Rapid degradation of pre-rRNAs has been reported for many strains with defects in pre-rRNA processing [35-37]. The finding

that the depletion of Nop53p leads to the accumulation of 7S pre-rRNA indicates that Nop53p could mediate the signal for the processing of this pre-rRNA to the exosome. Alternatively, the interaction of Nop53p with Nip7p, that binds the exosome subunit Rrp43p [10] could activate the exosome for processing of the 7S pre-rRNA. However, since *nip7* mutants do not show accumulation of 7S pre-rRNA [9], the former hypothesis seems more likely.

Nop53p also coprecipitated the box H/ACA snoRNA snR37, but not box C/D snoRNAs involved in 18S processing. This result raised the possibility that Nop53p could participate in processing or assembly of box H/ACA snoRNPs. However, the deficiency of

Nop53p did not affect box H/ACA snoRNAs stability (data not shown). It remains to be determined whether Nop53p binds directly box H/ACA snoRNAs, or whether snR37 coimmunoprecipitated as part of the pre60S particle.

The data on the identification of Nop53p interaction with Nop17p, a protein involved in the assembly and/or stabilization of box C/D snoRNPs [28] indicates that these interactions take place on the pre60S particle. Interestingly, the modification of nucleotides at the peptidyl transferase center has been reported to occur late in processing, accounting for the copurification of snoRNPs of box C/D and H/ACA with the pre60S particles [7,27,38]. The interactions reported here between Nop53p and Nop17p, and between Nop53p and Nip7p could occur in the context of the pre60S particles, which is formed by a different number of proteins associated with the 27S rRNA, depending on the phase of processing and transit from the nucleolus to the cytoplasm.

In conclusion, the results obtained with the conditional *Δnop53/A-NOP53* strain showed that rRNA processing is affected in the absence of Nop53p, leading to a reduction in rRNA synthesis and accumulation of the pre-rRNAs 27S and 7S. The finding that depletion of Nop53p affects more strongly the late processing reactions responsible for the formation of the mature 5.8S rRNA, indicates that this novel protein is important for proper exosome function.

During the final preparation of this article a study was published on Nop53p [39]. In that study it is reported that Nop53p is involved in the processing of 27S pre-rRNA, consistent with the data shown here. However, contrary to our data, the authors found that the depletion of Nop53p has stronger effects on the maturation of the 25S rRNA, and not on the 5.8S. Our data show that Nop53p coprecipitates the 27S and 7S preRNAs and the mature 5.8S rRNA, binding directly to the 5.8S rRNA region. These discrepancies may be the result of the different strain background, because Sydorsky *et al.* [39] used their own deletion strain, in which *NOP53* was not essential, whereas the strain we used was purchased from the yeast deletion collection at Euroscarf.

Experimental procedures

DNA analyses and plasmid construction

DNA cloning and analyses were performed as described elsewhere [40]. DNA was sequenced by using the Big Dye method (Perkin-Elmer, USA). Plasmids used in this study are summarized in Table 1, and cloning strategies are

briefly described below. The *lexA::NOP53* fusion used in the two-hybrid assay was constructed by inserting a 1.3 kb *BamHI/SalI* DNA fragment containing the PCR-amplified *NOP53* ORF into pBTM-116, which was previously digested with *BamHI/SalI* restriction enzymes, generating the plasmid pBTM-NOP53. Plasmid pACT-NOP53 (14–456, numbers refer to Nop53p amino acid residues coded by this cDNA clone) bears the gene encoding the hybrid protein of the GAL4p activation domain and NOP53p. YCpGAL-A-NOP53 was constructed by inserting the *BamHI/SalI* *NOP53*-containing fragment obtained from pBTM-NOP53 into Ycp33GAL1-A vector previously digested with the same restriction enzymes. Plasmid pGFP-N-NOP53 was constructed by inserting the fragment *XbaI/SalI* *NOP53* obtained from the YCp111GAL-HIS-NOP53 vector digested with the same enzymes, into the pGFP-N-FUS vector digested with *SpeI/XhoI* restriction enzymes. pRS-GAL-HIS-NOP53 was obtained by inserting the fragment (*BamHI/SalI*) containing *NOP53* sequence and the fragment (*EcoRI/BamHI*) containing GAL1-HIS sequence into the pRS313 vector digested with *EcoRI* and *SalI*. For the construction of pET-NOP53, the PCR amplified *NOP53* ORF (*BamHI/SalI*) was inserted into the pET-28a vector digested with *BamHI* and *XhoI* restriction enzymes.

Yeast transformation and maintenance

Yeast strains used in this work are listed in Table 2. Yeast strains were maintained in yeast extract-peptone medium (YP) or synthetic medium (YNB) as described previously [47]. Glucose or galactose was added as carbon source to a final concentration of 2% as indicated. Yeast cells were transformed using the lithium acetate method as described previously [47]. A *Δnop53* strain was obtained from Euroscarf.

Yeast two-hybrid screen for proteins that interact with Nop53p

The host strain for the two-hybrid screen, L40 [46], contains both yeast *HIS3* and *E. coli lacZ* genes as reporters for two-hybrid interaction integrated into the genome. Strain YDG146 is a derivative of L40, bearing plasmid pBTM-NOP53, which encodes a hybrid protein containing the *lexA* DNA binding domain and the full-length *NOP53* ORF. Transformation of YDG146 was performed with plasmid pGAD-NOP17 containing *NOP17* ORF fused to the *GAL4* activation domain. Alternatively, L40 was transformed with pBTM-NIP7 and pACT-NOP53. Transformants were plated directly onto YNB medium lacking histidine for immediate selection of Nop53p-interacting proteins. His⁺ clones were tested for *lacZ* expression by transferring cells to nitrocellulose filters and analyzing β-galactosidase (β-Gal) activity [46]. β-Gal activity of strains analyzed in two-hybrid experiments was quantitated

Table 2. List of yeast strains used in this study.

Strain	Relevant features	Source or reference
L40	<i>MATa his3d200 trp1-901 leu2-3311 ade2 lys2-801am</i>	[41]
	<i>URA3::(lexAop)8-lacZ LYS2::(lexAop)4-HIS3</i>	[42]
L40-41	L40, pBTM-NIP7, pACT-NOP8	[28]
L40-61	L40, pBTM-NIP7, pACT-RRP43	This study
YFG-131	L40, pBTM-NOP17	[42]
YFG-247	L40, pBTM-NOP17, pACT-NOP53	[43]
YDG-146	L40, pBTM-NOP53	[28]
YDG-147	L40, pBTM-NOP53, pGAD-NOP17	This study
YDG-148	L40, pBTM-NIP7, pGAD-NOP53	This study
NOP53	<i>MATa/α, his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 NOP53/NOP53</i>	Euroscarf
Δnop53 2n	<i>MATa/α, his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0 leu2Δ0/lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 NOP53/NOP53::KAN^r</i>	Euroscarf
Δnop53	<i>MET15 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 NOP53::KAN^r</i>	This study
YDG-149	Δnop53, pGFP-N-FUS, pRS-GAL-His-NOP53	This study
YDG-150	Δnop53, pGFP-N-FUS-NOP53	This study
YDG-151	Δnop53, YCp33GAL-A-NOP53	This study
YDG-152	NOP53, YCp33GAL-A	This study
YDG-153	NOP53, YCp33GAL-A-NOP53	This study

using cell extracts generated in buffer Z using ONPG as substrate [41]. Strain L40-41 was used as a positive control and strain YDG-146/pGAD-C2 was used as negative control for two-hybrid interaction [42] (Table 2).

Protein pull-down and immunoblot analysis

Pull-down of His–Nop53p was assayed as follows: whole-cell extracts from *E. coli* cells expressing either GST or GST–Nop17p were generated in NaCl/P_i buffer and mixed with 500 μL of glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). After washing bound material with NaCl/P_i, whole-cell extracts from *E. coli* cells expressing His–Nop53p were added to the glutathione-Sepharose beads and incubated at 4 °C for 2 h. The glutathione-Sepharose beads were precipitated and washed again with NaCl/P_i and bound proteins were eluted and resolved on SDS/PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), which were incubated with an anti-(poly histidine) serum (Amersham Biosciences) or with an anti-GST serum (Sigma, St. Louis, MO, USA). The immunoblots were developed using the ECL system (Amersham Biosciences).

RNA analysis

Exponentially growing cultures of yeast strains were shifted from galactose to glucose medium. At various times, samples were collected and quickly frozen in a dry ice–ethanol bath. Total RNA was isolated from yeast cells by a modified hot phenol method [48]. RNAs were separated by

electrophoresis on 1.3% agarose gels, following denaturation with glyoxal [40] and transferred to Hybond nylon membranes (Amersham Biosciences). Membranes were probed with ³²P-labeled oligonucleotides complementary to specific regions of the 35S pre-rRNA (Table 3), or with ³²P-labeled DNA fragments corresponding to actin ORF, using the hybridization conditions described previously [9] and analyzed in a Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Metabolic labeling of rRNA

Metabolic labeling was performed as described previously [9]. Exponentially growing cultures of strains *NOP53* and *Δnop53* were incubated at 30 °C for 12 h in YNB–glucose medium lacking methionine. Subsequently, cells were pulse-labeled with 100 μCi·mL⁻¹ [methyl-³H]methionine (Amersham Biosciences) for 2 min and chased with 100 μg·mL⁻¹ unlabeled methionine. At various times, samples were taken and quickly frozen in a dry ice–ethanol bath. For metabolic labeling with [³H]uracil exponential growing cultures of *NOP53* and *Δnop53* were shifted from galactose to glucose medium and incubated for 12 h. Cells were then pulse-labeled for 3 min at 37 °C with 50 μCi of [³H]uracil per mL and chased for up to 1 h after addition of unlabeled uracil to a final concentration of 300 μg·mL⁻¹. At various times samples were taken and quickly frozen. Total RNA was isolated, separated by electrophoresis and blotted as described above. Nylon membranes were incubated in En³Hance (NEN) and submitted to autoradiography.

Table 3. DNA oligonucleotides used for northern blot hybridization and primer extension analyses.

Oligo	Sequence	Reference
P1	5'-GGTCTCTGCTGCCGAAATG-3'	[9]
P2	5'-CATGGCTTAATCTTTGAGAC-3'	[8]
P3	5'-GCTCTCATGCTCTTGCCAAAAC-3'	[9]
P4	5'-CGTATCGCATTTCGCTGCGTTC-3'	[9]
P5	5'-CTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGG-3'	[13]
P6	5'-GTTCCGCTAGACGCTCTCTTC-3'	[9]
P7	5'-GCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGC-3'	[28]
anti-U3	5'-ATGGGGCTCATCAACCAAGTTGG-3'	[49]
anti-U14	5'-CTCAGACATCCTAGGAAGG-3'	[28]
anti-snR11	5'-GACGAATCGTGACTCTG-3'	[20]
anti-snR37	5'-GATAGTATTAACCACTACTG-3'	[20]

Primer extension analysis

Total RNA extracted as described above was used for primer extension analysis. Reactions were performed by annealing 1 pmol of [³²P]-labeled oligonucleotide to 5 µg of total RNA. Following annealing, extension was performed with 100 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and dNTPs (0.5 mM) for 30 min at 37 °C. cDNA products were precipitated, resuspended in H₂O, treated with RNase A, denatured and analyzed on 6% denaturing polyacrylamide gels. Gels were dried and analyzed in a Phosphorimager. Oligonucleotides used in primer extension analyses are listed in Table 3.

Coimmunoprecipitation of RNAs

Total cellular extracts were prepared from strains YDG152 and YDG153 expressing the ProtA or ProtA-Nop53p, respectively, and added to IgG-Sepharose beads (Amersham Biosciences) as described previously [49]. Immunoprecipitation was performed at 4 °C for 2 h. IgG-Sepharose beads were washed with buffer A (20 mM Tris/Cl pH 8.0, 0.5 mM magnesium acetate, 0.2% Triton X-100, 150 mM potassium acetate, 1 mM dithiothreitol and protease inhibitors) [49] and RNA was isolated from bound fractions by adding phenol directly to the beads. After precipitation, the recovered RNA was denatured and separated by electrophoresis on 6% polyacrylamide or 1.5% agarose gels and transferred to nylon membranes. For comparison, 1% of RNA recovered from total extract was loaded on gel. Hybridization was performed as described above, using probes specific to rRNAs and snoRNAs.

RNA binding assay

DNA fragment corresponding to 5.8S rRNA was cloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) vector and *in vitro* transcription was performed with T7 RNA polymerase (Invitrogen), in the presence of 50 µCi of

[³²P]UTP[αP]. One picomole of radiolabeled RNA was incubated with different amounts of purified proteins in the same buffer as used for coimmunoprecipitation of RNAs [49] for 30 min at 37 °C. Cold competitor RNAs were generated by parallel *in vitro* transcription of pGEM-5.8S (generating 5.8S rRNA) or pBluescript (nonspecific RNA) in the presence of 10 mM NTPs. UV cross-linking was performed by placing RNA–protein complexes on ice and irradiation for 15 min at 260 nm using a Fotodyne transilluminator. They were then treated with 3 µg of RNaseA for 30 min at 37 °C, resolved on a 6% denaturing polyacrylamide gel and visualized on a Phosphorimager.

Subcellular localization of Nop53p

The subcellular localization of Nop53p was analyzed by monitoring the fluorescence signal produced by a GFP fusion to the N-terminal of Nop53p. The subcellular localization of Nop1p was analyzed by monitoring the RFP, which was fused to the N-terminus of this protein. GFP, GFP–Nop53p and RFP–Nop1p proteins were expressed from plasmids pGFP-N-FUS, pGFP-N-NOP53 and pRFP-NOPI (Table 1), respectively, transformed into the strain *Δnop53* (Table 2). *Δnop53* cells were cotransformed with vectors expressing GFP–Nop53p and RFP–Nop1p fusion proteins. Living cells were immobilized on L-polylysine coated histological slides, in aqueous medium. The preparations were covered with cover slips, sealed and immediately observed by confocal microscope. Ar (488 nm) and HeNe (543 nm) lasers were used for image acquisition and the confocal software used for image analysis.

Acknowledgements

We would like to thank the following people for their support during the development of this work: Nilson I.T. Zanchin for suggestions and critical reading of this manuscript; Sandro R. Valentini for anti-GST serum; Tereza C. Lima Silva and Zildene G. Correa for DNA

sequencing; Celso R. Ramos for sequence alignment; and José R. Tavares and Mauricio B. Goldfeder for helping with yeast two-hybrid assays; Roberto Cabado for confocal microscopy assistance. DCG, JSL and FC were recipients of FAPESP fellowships, and FAG was recipient of a CNPq fellowship. This work was supported by FAPESP grant (03/06031-3 to CCO).

References

- Venema J & Tollervey D (1995) Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1629–1650.
- Kressler D, Linder P & Cruz J (1999) Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 7897–7912.
- Grandi P, Rybin V, Baßler J, Petfalski E, Strauß D, Marzioch M, Schäfer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervey D *et al.* (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* **10**, 105–115.
- Granneman S & Baserga SJ (2004) Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res* **296**, 43–50.
- Wehner KA, Gallagher JEG & Baserga SJ (2002) Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Mol Cell Biol* **22**, 7258–7267.
- Baßler J, Grandi P, Gadai O, Leßmann T, Petfalski E, Tollervey D, Lechner J & Hurt E (2001) Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* **8**, 517–529.
- Nissan TA, Baßler J, Petfalski E, Tollervey D & Hurt E (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* **21**, 5539–5547.
- Fatica A, Cronshaw AD, Dlakia M & Tollervey D (2002) Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* **9**, 341–351.
- Zanchin NIT, Roberts P, DeSilva A, Sherman F & Goldfarb DS (1997) *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* **17**, 5001–5015.
- Zanchin NIT & Goldfarb DS (1999) The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res* **27**, 1283–1288.
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M & Tollervey D (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3′-5′ exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466.
- Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E & Tollervey D (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**, 5399–5410.
- Oliveira CC, Gonzales FA & Zanchin NIT (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.
- Maxwell ES & Fournier MJ (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* **35**, 897–934.
- Tollervey D & Kiss T (1997) Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 337–342.
- Warner JR (2001) Nascent ribosomes. *Cell* **107**, 133–136.
- Schimmang T, Tollervey D, Kern H, Frank R & Hurt EC (1989) A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J* **8**, 4015–4124.
- Bachelier J-P & Cavallé J (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biol Sci* **22**, 257–261.
- Gautier T, Bergès T, Tollervey D & Hurt E (1997) Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* **17**, 7088–7098.
- Lafontaine DLJ & Tollervey D (1999) Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* **5**, 455–567.
- Lafontaine DLJ & Tollervey D (2000) Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* **20**, 2650–2659.
- Filipowicz W & Pogačić V (2002) Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 319–327.
- Cahill NM, Friend K, Speckmann W, Li Z-H, Terns RM, Terns MP & Steitz JA (2002) Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP. *EMBO J* **21**, 3816–3828.
- Hong B, Wu K, Brockenbrough JS, Wu P & Aris JP (2001) Temperature sensitive nop2 alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **14**, 2927–2937.
- Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlege RE, Shabanowitz J, Osheim Y *et al.* (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**, 967–970.
- Bonnerot C, Pintard L & Lutfalla G (2003) Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2′-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Mol Cell* **12**, 1309–1315.
- Dez C, Froment C, Noaillac-Depyre J, Monsarrat B, Caizergues-Ferrer M & Henry Y (2004) Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles,

- associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol* **24**, 6324–6337.
- 28 Gonzales FA, Zanchin NIT, Luz JS & Oliveira CC (2005) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in pre-rRNA processing. *J Mol Biol* **346**, 437–455.
- 29 Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y & Chait BT (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635–651.
- 30 Mitchell P, Petfalski E & Tollervey D (1996) The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev* **10**, 501–513.
- 31 Andersen JS, Lam YW, Leung AKL, Ong S-E, Lyon CE, Lamond AI & Mann M (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**, 77–83.
- 32 Huh W-K, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS & O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691.
- 33 Henry Y, Wood H, Morrissey JP, Petfalski E, Kearsley S & Tollervey D (1994) The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J* **13**, 2452–2463.
- 34 Geerlings TH, Vos JC & Raué HA (2000) The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'-3' exonucleases. *RNA* **6**, 1698–1703.
- 35 Venema J & Tollervey D (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **33**, 261–311.
- 36 Allmang C, Mitchell P, Petfalski E & Tollervey D (2000) Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res* **28**, 1684–1691.
- 37 Kufel J, Allmang C, Petfalski E, Beggs J & Tollervey D (2003) Lsm proteins are required for normal processing and stability of ribosomal RNAs. *J Biol Chem* **278**, 2147–2156.
- 38 Lapeyre B & Purushothaman SK (2004) Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Mol Cell* **16**, 663–669.
- 39 Sydorsky Y, Dilworth DJ, Halloran B, Yi EC, Makhnevych T, Wozniak RW & Aitchison JD (2005) Nop53p is a novel nucleolar 60S ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochem J* in press.
- 40 Sambrook J, Maniatis T & Fritsch EF (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 41 Bartel PL & Fields S (1995) Analyzing protein–protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* **254**, 241–263.
- 42 Zanchin NIT & Goldfarb DS (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.
- 43 James P, Halladay J & Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425–1436.
- 44 Sikorski RS & Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- 45 Niedenthal RK, Riles L, Johnston M & Hegemann JH (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**, 773–786.
- 46 Vojtek AB & Hollenberg SM (1995) Ras–Raf interaction: two × hybrid analysis. *Methods Enzymol* **255**, 331–342.
- 47 Sherman F, Fink GR & Hicks JB (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 48 Dez C, Noaillac-Depeyre J, Caizergues-Ferrer M & Henry Y (2002) Naf1p, an essential nucleoplasmic factor specifically required for accumulation of box H/ACA small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* **22**, 7053–7065.
- 49 Oliveira CC & McCarthy JEG (1995) The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 8936–8943.
- 50 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.

Structural insights into the interaction of the Nip7 PUA domain with poly-uridine RNA

Journal:	<i>Biochemistry</i>
Manuscript ID:	bi-2007-015876.R1
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Coltri, Patrícia; Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Center for Structural Molecular Biology Guimarães, Beatriz; Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Center for Structural Molecular Biology Granato, Daniela; University of São Paulo, Biochemistry Luz, Juliana; University of São Paulo, Biochemistry Teixeira, Elaine; Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Center for Structural Molecular Biology Oliveira, Carla; University of São Paulo, Biochemistry Zanchin, Nilson; Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Center for Structural Molecular Biology



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Structural insights into the interaction of the Nip7 PUA domain with poly-uridine RNA^{†‡}

Patrícia P. Coltri^{§#}, Beatriz G. Guimarães^{§#}, Daniela C. Granato^{||}, Juliana S. Luz^{||}, Elaine C. Teixeira[§], Carla C. Oliveira^{||} and Nilson I. T. Zanchin^{*§}

[§]Center for Structural Molecular Biology
Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLS
Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000
PO Box 6192, CEP13083-970, Campinas SP, Brazil

^{||}Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 748
São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

Running title: Nip7 proteins interact with poly-uridine

Key words: Nip7p, PUA domain, RNA interaction

[†] This work was supported by FAPESP grants CEPID/CBME-98/14138-2; SMolBNet-00/10266-8 and 06/02083-7 to N. Z. and B.G.G., and 03/06031-3 to C.C.O.

[‡] Coordinates and structure factors for the PaNip7 crystal structure were deposited at RCSB Data Bank with accession number 2P38.

[#] These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author: Nilson I. T. Zanchin

Centro de Biologia Molecular Estrutural

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

Campinas - SP – Brazil

Caixa Postal (PO Box) 6192 - CEP 13083-970

Tel. 55 19 3512 1113

Fax. 55 19 3512 1004

e-mail:zanchin@lnls.br

ABBREVIATIONS:

Nip7p, *Saccharomyces cerevisiae* nuclear import protein 7

PaNip7, *Pyrococcus abyssi* Nip7p ortholog

HsNip7, *Homo sapiens* Nip7p ortholog

PUA domain, *Pseudo-Uridine* synthases and Archaeosine-specific transglycosylases-containing domain

ArcTGT, *P. horikoshii* archaeosine tRNA-guanine transglycosylase

Rrp43p, *S. cerevisiae* ribosomal RNA processing protein 43

Nop8p, *S. cerevisiae* nucleolar protein 8

Nop53p, *S. cerevisiae* nucleolar protein 53

EMSA, electrophoretic mobility shift assay

ITS1, internal transcribed spacer sequence 1

ITS2, internal transcribed spacer sequence 2

5' ETS, 5' external transcribed spacer sequence

RNase A, ribonuclease A

1
2
3 **ABSTRACT:** The conserved protein Nip7 is involved in ribosome biogenesis being
4 required for proper 27S pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit assembly in
5 *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Nip7p interacts with nucleolar proteins and with the
6 exosome subunit Rrp43p but its molecular function remains to be determined. Solution of
7 the *Pyrococcus abyssi* Nip7 (PaNip7) crystal structure revealed a monomeric protein
8 composed by two alpha-beta domains. The N-terminal domain is formed by a five-
9 stranded anti-parallel β -sheet surrounded by 3 α -helices and a 3_{10} helix while the C-
10 terminal, a mixed β -sheet domain composed by strands $\beta 8$ to $\beta 12$, one α -helix and a 3_{10}
11 helix, corresponds to the conserved PUA domain (after *Pseudo-Uridine* synthases and
12 Archaeosine-specific transglycosylases). By combining structural analyses and RNA
13 interaction assays we assessed the ability of both yeast and archaeal Nip7 orthologs to
14 interact with RNA. Structural alignment of the PaNip7 PUA domain with the RNA-
15 interacting surface of the ArcTGT (archaeosine tRNA-guanine transglycosylase) PUA
16 domain indicated that in the archaeal PUA domain positively charged residues (R151,
17 R152, K155 and K158) are involved in RNA interaction. However, equivalent positions
18 are occupied by mostly hydrophobic residues (A/G160, I161, F164 and A167) in
19 eukaryotic Nip7 orthologs. Both proteins can bind specifically to poly-uridine and RNA
20 interaction requires specific residues of the PUA domain as determined by site-directed
21 mutagenesis. This work provides experimental verification that the PUA domain
22 mediates Nip7 interaction with RNA and reveals that the preference for interaction with
23 poly-uridine sequences is conserved in *Archaea* and eukaryotic Nip7 proteins.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Eukaryotic ribosome biogenesis takes place mainly in the nucleolus where a large pre-rRNA, containing the sequences of the mature 18S, 5.8S and 25S/28S rRNAs separated by external and internal spacer sequences, is transcribed by RNA polymerase I, and the 5S rRNA is transcribed by RNA polymerase III. The pre-rRNA is assembled with processing factors concomitantly with transcription, undergoing subsequently extensive endo- and exonucleolytic cleavage and covalent modification to generate the mature rRNAs (1, 2). Major pre-rRNA processing and ribosome assembly steps have already been described and a large number of factors identified especially in the yeast model system. The large *Saccharomyces cerevisiae* 35S pre-rRNA is assembled into a 90S particle, which is rapidly converted into the pre-40S and the pre-60S pre-ribosomal particles. While the pre-40S particles are further processed in the cytoplasm, pre-60S pre-rRNAs undergo several endo- and exonucleolytic digestions before export to the cytoplasm, where ribosome assembly terminates (1, 3). Important progress has recently been made regarding the identification of the components of the pre-ribosomal complexes. The 90S pre-ribosome contains the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, 40S subunit processing factors and a large number of 40S subunit ribosomal proteins, along with a small number of 60S ribosomal proteins (3). Characterization of the U3 snoRNP led to the identification of the small subunit processing complex, termed SSU processome, which contains 28 proteins required for maturation of the 18S rRNA and 40S subunit biosynthesis (4). Absence of 27S pre-rRNA processing factors in the 90S pre-ribosome indicates that the 60S subunit biogenesis factors and structural proteins join the complex later in the process (4-6).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Nip7p is a conserved protein component of yeast pre-60S complexes (5) that is essential for cell viability and for biosynthesis of 60S ribosome subunits. It was initially identified in yeast as required for processing of the 27S pre-rRNA to form the mature 25S and 5.8S rRNAs (7). Accumulation of unprocessed 27S pre-rRNA in Nip7p-depleted cells implicates Nip7p in the processing of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) (7). It localizes to the nucleolus but was also found to sediment in the region of free 60S subunits in sucrose density gradients (7) which is consistent with its presence in pre-60S complexes (5). Neither Nip7p nor its nucleolar interacting partners, Nop8p and Nop53p, whose molecular function also remains to be described, seem to possess intrinsic catalytic activity (8-10). Yeast Nip7p interacts also with the exosome subunit Rrp43p (9). Although an intact exosome is required for maturation of the 3'-end of the 5.8S rRNA following cleavage of the 27S pre-rRNA in ITS2 (11,12), our analyses of Nip7p deficient yeast strains failed to provide a functional link connecting Nip7p to the exosome function. The interaction between the yeast proteins Nip7p-Nop8p is conserved by their human orthologs (13) and recently we have shown that the human Nip7 can be pulled-down from HEK293 cell extracts by the GST-tagged Shwachman-Bodian-Diamond syndrome associated protein (14), indicating that both proteins are part of the same complex, a finding that implicates Nip7p in 60S ribosome biogenesis also in humans.

Nip7 orthologs share a highly similar two-domain architecture with the C-terminal region corresponding to the conserved PUA domain. This domain, named after *Pseudo-Uridine* synthases and *Archaeosine-specific* transglycosylases (15), was initially described in tRNA modifying enzymes and in pseudo-uridine synthases from *Archaea* and eukaryotes (16-18) and has been proposed to mediate protein-RNA interactions.

1
2
3 However, the PUA domain was also found in the human candidate oncogene MCT1,
4 which was reported to interact with the mRNA cap translation factor complex via its
5 PUA domain and to modulate translation of a subset of mRNAs (19). Interestingly, one
6 of the domains of the *Escherichia coli* glutamate 5-kinase, an enzyme with function not
7 related to RNA metabolism, also contains a PUA domain (20).
8
9

10
11 Despite the information obtained from yeast conditional mutant strains and from
12 protein interaction analyses (7,10), the molecular function of Nip7p remains elusive and
13 the scope of this work was to investigate the role played by Nip7 and particularly by its
14 conserved C-terminal PUA domain in regard to RNA interaction. Following solution of
15 the crystal structure of the archaeal Nip7 ortholog from *Pyrococcus abyssi* (PaNip7),
16 comparative structural analyses revealed that the residues involved in RNA contacts are
17 conserved in archaeal PUA domains but equivalent residues are replaced by mostly
18 hydrophobic residues in the PUA domain of eukaryotic Nip7. The initial working
19 hypothesis involved the possible interaction of Nip7p with pre-rRNA sequences. Since
20 yeast Nip7p showed low binding affinity for several regions of the pre-rRNA, additional
21 RNA binding studies were conducted which revealed that both the yeast Nip7p and
22 PaNip7 orthologs can bind directly to poly-uridine sequences, indicating conserved
23 functional features among the orthologs. The results presented in this work include also
24 mutational analyses of the PUA domain residues predicted to mediate yeast Nip7p and
25 PaNip7 interaction with RNA and have established a role for the PUA domain of Nip7
26 proteins in binding of uridine-rich RNAs.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and bacterial strains. Plasmids used in this study are listed in Table 1 and cloning procedures are summarized below. Plasmid pET28-Nip7p for expression of histidine-tagged yeast Nip7p was generated by transferring the 546 bp Nip7p coding sequence from pCYTEX-Nip7 (7) to pET28a using the NdeI/BamHI restriction sites. Plasmid pCYTEX-PaNip7 has been described previously (21). The PaNip7 PaNip7^{R151A/R152A} and PaNip7^{K155A/K158A} mutant variants were constructed by PCR amplification of the PaNip7 coding sequence using plasmid pCYTEX-PaNip7 as DNA template, oligonucleotide ONZ184 as forward primer (5'AGG AAG CAT ATG AGT GGT GAG CTG AGG 3') and either oligonucleotide ONZ519 (5' GGA TCC CTA ACG CCT TAA AAA CTC CCC AAC ATC CTT TAA ATT TTT TAT AAA TGC TGC ATC GCT CTT CGG 3') or ONZ520 (5'GGA TCC CTA ACG CCT TAA AAA CTC CCC AAC ATC CGC TAA ATT TGC TAT AAA TCT TCT ATC GC 3') as reverse primers, containing the base substitutions to replace either R151 and R152 or K155 and K158 by alanine residues. The resulting PCR products were subsequently inserted into the pETTEV plasmid (22) using the NdeI/BamHI restriction sites, generating plasmids pET-PaNip7^{R151A/R152A} and pET-PaNip7^{K155A/K158A}. These plasmids express histidine-tagged proteins to allow purification by metal chelating affinity chromatography. Construction of the yeast Nip7p^{I161A/F164A} mutant was performed by two sequential PCR steps. Initially, an 80 bp fragment of the Nip7p C-terminal region was PCR-amplified using oligonucleotide ONZ522 as forward primer (5' GGT GCA GTT GCT GCC AGA CAA GCA GAT ATT GG 3'), containing base substitutions to replace I161 and F164 by

1
2
3 alanine, and oligonucleotide ONZ283 as reverse primer (5' GCA GGT CGA CCT AAG
4 TAA ACA AGG TGT C 3'). The resulting PCR product was used as reverse primer in
5 combination with oligonucleotide ONZ521 (5' CGG CAT ATG AGA CAG CTA ACA
6 GAA GAA GAG 3') for PCR-amplification of the complete Nip7p coding sequence
7 containing the I161A/F164A mutations, which was subsequently subcloned into the
8 pETTEV plasmid (22) using the NdeI/SalI restriction sites, generating plasmid pET-
9 Nip7^{I161A/F164A}. The pre-rRNA coding sequence from the 5'-ETS up to cleavage site A₀
10 and the ITS2 sequence were PCR-amplified using *S. cerevisiae* genomic DNA and
11 cloned into the plasmid pGEM-T (Promega), generating pGEM-5'ETS and pGEM-ITS2.
12 Construction of plasmid pGEM-5.8S has been described previously (10).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 All plasmid constructs were verified by DNA sequencing analysis. *E. coli* strains DH5 α
28 and BL21(DE3), used for DNA amplification and protein expression, respectively, were
29 manipulated according to standard techniques (23).
30
31
32
33
34
35

36 *Recombinant proteins expression and purification.* Expression and purification of PaNip7
37 has been described previously (21). Expression of proteins from pET28a-derivative
38 plasmids was performed in *E. coli* BL21(DE3) cells incubated in LB medium containing
39 kanamycin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) at 30°C. At an OD₆₀₀ of ~0.8, the cultures were induced by
40 adding 0.5 mM IPTG and incubating at 30°C for further 4h-6h. Cells were harvested by
41 centrifugation, suspended in buffer containing 50 mM sodium phosphate pH 7.2, 100
42 mM NaCl, 10% glycerol and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and treated
43 with lysozyme (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 30 minutes on ice. Subsequently, cells were disrupted by
44 sonication and the his-tagged proteins were initially purified by metal-chelating affinity
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 chromatography on Ni-NTA columns (Qiagen), using 20-200 mM imidazole gradients
4 for elution. Nip7p was further purified by chromatography on a heparin-sepharose
5 column (GE Healthcare) using the same buffer as above for binding and a 50 mM to 1 M
6 KCl gradient for elution. PaNip7^{R151A/R152A} and PaNip7^{K155A/K158A} were purified further
7 by ion exchange chromatography on a mono-Q column (GE Healthcare) using buffer
8 containing 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl and 5 mM β -
9 mercaptoethanol for binding and a 50 mM to 1 M NaCl gradient for elution. The
10 Nip7p^{I161A/F164A} protein was refolded from inclusion bodies as described previously for
11 the wild-type Nip7p (7). Following refolding, Nip7p^{I161A/F164A} was purified by metal-
12 chelating affinity chromatography on Ni-NTA a column (Qiagen) using the procedure
13 described above.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 *UV-cross-linking assays.* For analysis of the interaction of yeast Nip7p with sequences of
33 the yeast pre-rRNA, the RNA fragments corresponding to the 5.8S rRNA, the 5' spacer
34 (5'-ETS), the ITS2 spacer sequences and an unrelated control RNA were transcribed *in*
35 *vitro* with T7 or SP6 RNA polymerases using linearized plasmids in the presence of 10
36 μ Ci of [α -³²P]-UTP (10). *In vitro* transcription of linearized plasmids pGEM-5'ETS,
37 pGEM-ITS2 and pGEM-5.8S using T7 RNA polymerase generate RNAs of 550, 220 and
38 180 nucleotides, respectively. The unrelated RNA was transcribed *in vitro* from
39 linearized pBlueScript, generating a 65 nucleotide RNA. One pmol of radiolabelled RNA
40 was incubated with different amounts of purified His-Nip7p in buffer A containing 20
41 mM Tris-Cl pH 8.0, 5 mM magnesium acetate, 150 mM potassium acetate, 0.2% v/v
42 Triton X-100, 1 mM DTT and 1 mM PMSF with 0.8 U RNase OUT (Invitrogen) for 30
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 min at 37°C. 5-20 pmol of cold RNAs generated by parallel *in vitro* transcription of the
4
5 plasmids cited above were used in the competition assays. UV-cross-linking was
6
7 performed by placing RNA-protein complexes on ice and irradiating for 5 min at 260 nm
8
9 using a Fotodyne transilluminator (Stratagene). Subsequently, samples were treated with
10
11 10 µg of RNase A for 30 min at 37°C. Complexes were resolved on 6% denaturing
12
13 polyacrylamide gels using 20 mM CAPS pH 11.0 (N-Cyclohexyl-3-
14
15 aminopropanesulfonic acid) as buffer and visualized on a Phosphorimager. Relative band
16
17 intensities were quantified by volume integration using the Image Quant software v. 5.0
18
19 (Molecular Dynamics).
20
21
22
23

24
25
26
27 *Electrophoretic mobility shift assays (EMSA).* For EMSA under native conditions, 20
28
29 pmol of the RNA oligoribonucleotides poly-G₍₁₈₎, poly-A₍₂₅₎, poly-U₍₂₅₎ and poly-C₍₂₅₎
30
31 were [³²P]-labeled using 1 U T4 PNK (Fermentas) and 20µCi [³²P]-ATP. 0.4 pmol of
32
33 each [³²P]-labeled oligoribonucleotide were incubated with different amounts of the
34
35 indicated proteins in buffer A for 30 min at 37°C. Complexes were resolved on 8%
36
37 polyacrylamide gels using TBE buffer pH 8.0 for electrophoresis and visualized on a
38
39 Phosphorimager. Relative band intensities were quantified by volume integration using
40
41 the Image Quant software v. 5.0 (Molecular Dynamics).
42
43
44
45
46
47

48
49 *Crystallization and Data Collection of the Pyrococcus abyssi Nip7p ortholog.* PaNip7
50
51 was crystallized as described previously using the vapor diffusion method (21). Best
52
53 crystals were obtained using 100 mM HEPES buffer pH 7.2 and 4.1 M NaCl as
54
55 precipitant. Data collection was performed at 100 K at the D03B-MX1 beam line of the
56
57
58
59
60

1
2
3 Brazilian Synchrotron Light Laboratory using 1.427 Å radiation and recorded on a
4 marCCD165 detector. Data from native crystals were processed to 1.8 Å resolution.
5
6 Iodide derivative crystals were obtained by the quick cryo-soaking technique (24,25) and
7
8 diffracted to 1.9 Å resolution (21). Statistics from native and derivative data collection
9
10 have been described previously by Coltri and coworkers (21).
11
12
13
14
15
16
17

18 *Structure Solution and Refinement.* The structure of PaNip7 was solved using the SIRAS
19 method. At the time PaNip7 crystals were obtained, no structure from homologous
20 proteins was available in the PDB. Seven Γ sites with occupancies greater than 0.7 were
21 found with the program SHELXD (26) using only anomalous data from the derivative
22 crystal. According to the Matthews coefficient calculation, the asymmetric unit should
23 contain 332 residues (two monomers), therefore SHELXD results indicated the presence
24 of at least one anomalous scatterer per approximately 47 residues. Refinement of heavy
25 atoms parameters and calculation of phases were carried out with SHARP (27) using data
26 from native and derivative crystals. An improved electron density map (Supplementary
27 Figure 1) was obtained by solvent flattening with SOLOMON (28). The starting model
28 was built using the program ARP/wARP (29). 50 cycles of autobuilding resulted in seven
29 polypeptide chain fragments containing a total of 289 residues (out of 332). The model
30 was manually completed using the program O (30) and structure refinement was carried
31 out with REFMAC (31) from the CCP4 package (32). Refinement cycles were alternated
32 with visual inspection of the electron density maps and model rebuilding with the
33 program O (30). During the final cycles water molecules were added using the program
34 ARP/wARP (29). The final model has an R_{factor} of 20.7% ($R_{\text{free}} = 25.7\%$) to 1.8 Å
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 resolution with good overall stereochemistry. As defined by the program PROCHECK
4
5 (33) all non-glycine and non-proline residues fall in the most favored or additionally
6
7 allowed regions of the Ramachandran plot. Further details of refinement are presented in
8
9
10 Table 2.
11
12
13
14

15 *Molecular Modeling of Saccharomyces cerevisiae Nip7p.* The Nip7p homology model
16
17 was generated using the SWISS-MODEL homology-modeling server (34). Atomic
18
19 coordinates of human Nip7 homologue (PDB code 1SQW) were used as template. Pair-
20
21 wise alignment resulted in sequence identity of 56.8% between template and target with
22
23 no gaps. High sequence identity allowed modeling of a continuous chain containing
24
25 residues 1 to 176. After structure refinement by energy minimization, the final model
26
27 presented good overall stereochemistry.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Crystal structure of Pyrococcus abyssi Nip7 and comparison with eukaryotic orthologs.

Structural analyses were performed in order to obtain information on the mechanism of Nip7p PUA domain interaction with RNA. The crystal structure of the human Nip7p ortholog (HsNip7) has already been described (35; PDB code 1SQW), showing a two-domain architecture in which the C-terminal domain corresponds to the conserved PUA domain. In this work, we describe the crystal structure of the *Pyrococcus abyssi* Nip7 ortholog, PaNip7, which was solved by single isomorphous replacement methods with anomalous scattering (SIRAS) using diffraction data from a native crystal and from an iodide derivative (21). The model was refined at 1.8 Å resolution to a final R_{factor} of 20.7% ($R_{\text{free}} = 25.7\%$). The final atomic model of PaNip7 includes two crystallographically independent monomers and 252 water molecules. The quality of the electron density allowed modeling of residues 5 to 159 (out of 166) in both monomers. A superposition of the symmetrically independent monomers shows no structural differences and results in an overall rms deviation of 0.11 Å for the 154 common C α atoms. The two independent monomers associate in a head-to-tail orientation generating a dimer. The interface between the monomers buries a total of $\sim 700 \text{ \AA}^2$ of solvent-accessible area per molecule, or $\sim 8 \%$ of its total surface. These values led us to suppose that the dimer formation was induced by crystallization and has no biological relevance. In fact, results of gel filtration experiments and dynamic light scattering support this hypothesis (data not shown). The PaNip7 monomer is composed of two alpha-beta domains (Figure 1). The larger N-terminal domain contains a five-stranded antiparallel β -

1
2
3 sheet surrounded by 3 α -helices and one 3_{10} helix ($\alpha 3$). The C-terminal domain that
4
5 corresponds to the putative RNA-binding domain (PUA) comprises residues 95 to 159
6
7 and contains a mixed β -sheet composed of strands $\beta 8$ to $\beta 12$, one α -helix and one short
8
9 3_{10} helix ($\alpha 6$) (Figure 1).
10
11

12
13 A comparison of the PaNip7 atomic coordinates with the contents of the Protein
14
15 Data Bank using the SSM service (36) identified structural alignment with HsNip7, the
16
17 human Nip7p ortholog (PDB code 1SQW) (22% amino acid identity), and with a
18
19 conserved hypothetical protein from *Thermoplasma acidophilum* (15% amino acid
20
21 identity) (not published, PDB code 1Q7H). Superposition of the PaNip7 structure with
22
23 the orthologs from *H. sapiens* and *T. acidophilum* resulted in overall rms deviations of
24
25 2.13 Å (114 C α aligned) and 1.92 Å (102 C α aligned) respectively. Despite the overall
26
27 structural similarity HsNip7 and PaNip7 differ in the C-terminal PUA domain, where
28
29 HsNip7 presents a large insertion between β -sheets $\beta 11$ and $\beta 12$ including residues 149 to
30
31 156, which form helix $\alpha 7$, not present in the PaNip7 structure (Figure 1). Yeast and
32
33 human Nip7 orthologs share an overall 56.8% amino acid identity and 75% similarity.
34
35 Since there is no crystal structure available for Nip7p, we took advantage of this high
36
37 similarity and constructed a homology model of Nip7p to help us interpret the RNA
38
39 interaction data. As expected, the *S. cerevisiae* Nip7p homology model and the HsNip7
40
41 crystallographic structure show a perfect superposition, with overall rms deviation of
42
43 0.09 Å (all C α aligned) (Figure 1B).
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53
54 *Nip7p PUA domain structure analysis and RNA-interacting residues.* Despite the low
55
56 sequence similarity among proteins from eukaryotes and *Archaea*, the PUA domain
57
58
59
60

1
2
3 presents a conserved three-dimensional structure (Figure 1C). Superposition of PaNip7
4 and HsNip7 PUA domain structures resulted in overall rms deviations of 0.90 Å for 58
5
6
7
8 C α aligned. Comparison with other PUA domains also resulted in a good structural
9
10
11 superposition (*P. horikoshii* tRNA-guanine transglycosylase - PDB code 1J2B: rmsd =
12
13 1.15 Å for 58 C α aligned; *T. maritima* tRNA pseudouridine synthase - PDB code 1ZE1:
14
15 rmsd = 1.40 Å for 61 C α aligned; *P. abyssi* Cbf5 - PDB code 2AUS: rmsd = 1.08 Å for
16
17 58 C α aligned). Interestingly, helix α 7, the main structural difference between PaNip7
18
19 and HsNip7p PUA domains, is also found in PUA domains from other archaeal proteins
20
21
22
23 (Figure 1C).

24
25 The crystal structure of *P. horikoshii* tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) in
26
27 complex with tRNA revealed the residues from domain C3 (the PUA domain) involved
28
29 in RNA interaction (37; PDB code 1J2B). Structural comparison of PUA domains shows
30
31 that most of the ArcTGT residues which participate in RNA interaction are structurally
32
33 conserved in PaNip7 (Figure 2, Table 3). In the PaNip7 structure, arginine and lysine
34
35 residues (R151, R152, K155, K158) form a positively charged path which may be
36
37 implicated in RNA binding, in a similar manner as described for the tRNA-ArcTGT
38
39 complex (Figure 2, Table 3). Interestingly, analysis of the HsNip7 crystallographic
40
41 structure and the Nip7p homology model revealed a charge pattern different from PaNip7
42
43 (Figure 3). In particular, PaNip7 arginine and lysine residues putatively involved in RNA
44
45 interaction are not structurally conserved in the yeast and human counterparts, the same
46
47 region being occupied by a glycine and three residues with hydrophobic side chain (Table
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 3). As shown in Figure 3B, the PUA domain of PaNip7 displays a highly positive
electrostatic surface in the predicted RNA-interacting region, whereas the PUA domain

1
2
3 of Nip7p displays an overall hydrophobic surface with a positively charged patch
4 restricted to the region containing residues K100, K115 and R154 that are not conserved
5
6 in PaNip7. This finding indicates that in these proteins, the PUA domain-RNA contacts
7
8 might be mediated by different interactions.
9
10

11
12
13
14
15 *Nip7p interacts directly with poly-uridine.* Given the requirement of Nip7p for 27S pre-
16
17 rRNA processing in yeast, Nip7p was expected to interact with regions of the pre-rRNA
18
19 or with sequences corresponding to the mature rRNAs. In order to test this hypothesis, a
20
21 series of *in vitro* RNA interaction assays were initially performed by using recombinant
22
23 histidine-tagged Nip7p and *in vitro* transcribed RNAs corresponding to the 5.8S rRNA,
24
25 ITS2 and 5'-ETS regions of the yeast pre-rRNA. An unrelated RNA transcribed from
26
27 vector pBluescript (pBS) was used as a non specific competitor. Nip7p did not produce
28
29 shifted bands on electrophoretic mobility shift assays with these RNAs under native
30
31 conditions (data not shown), indicating that the affinity of Nip7p for the pre-rRNAs
32
33 sequences tested is low. However, Nip7p interaction with RNAs derived from the 35S
34
35 yeast pre-rRNA can be observed in RNase protection assays, in which RNA-Nip7p
36
37 complexes were UV-cross-linked and treated with RNase A prior to denaturing
38
39 polyacrylamide gel electrophoresis (Figure 4). In an attempt to determine whether Nip7p
40
41 shows a higher affinity for a particular pre-rRNA region, we performed competition
42
43 experiments. In these assays, 20 pmol Nip7p bound to 1 pmol of [³²P]-labeled RNA were
44
45 incubated with unlabeled RNAs at concentrations of 5, 10 and 20 pmol (Figure 4).
46
47 Although ITS2 was a somewhat more efficient competitor relative to the other RNAs,
48
49 particularly relative to the unrelated RNA derived from the pBluescript plasmid (Figure
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 4), this experiment does not indicate that Nip7p recognizes a specific sequence of the
4
5 RNAs tested.
6

7
8 In order to determine whether Nip7p shows a higher affinity to a particular RNA
9
10 sequence, we performed a second round of experiments using homo-oligoribonucleotides
11
12 in native electrophoretic mobility shift assays. Interestingly, these assays revealed that
13
14 Nip7p binds specifically to poly-U (Figure 5A). Parallel assays were performed also with
15
16 PaNip7, which also showed specific binding to poly-U. No band corresponding to a
17
18 mobility shift equivalent to the one observed for poly-U was detected for the poly-C,
19
20 poly-A and poly-G probes, although in the case of yeast Nip7p, the signal of the probe
21
22 disappeared from the free probe region and a band appeared in the well region (Figure
23
24 5A, arrowhead). We interpreted the presence of the band in the well as resulting from
25
26 unspecific binding and aggregation. Although poly-G is known to adopt higher order
27
28 structures that may affect protein interaction, it was included in the assay to have a
29
30 complete set of RNA homopolymers tested. Binding of Nip7p and PaNip7 to poly-U was
31
32 concentration-dependent (Figure 5B). Although equivalent amounts of protein and of ³²P-
33
34 labelled poly-U probe were used for both Nip7p and PaNip7, the signal for Nip7p-poly-U
35
36 complexes was consistently weaker in all assays performed. The signal of the free probe
37
38 diminishes with the increase of the Nip7p concentration in the binding reaction and part
39
40 of the material is retained in the well, suggesting that part of the sample does not enter the
41
42 gel.
43
44
45
46
47
48
49

50
51
52
53 *Mutation analysis of RNA-interacting residues of the Nip7 PUA domain.* The fact that
54
55 both *P. abyssi* and *S. cerevisiae* Nip7 orthologs show preference for binding to poly-U
56
57
58
59
60

1
2
3 RNAs is quite intriguing (Figure 5). In the case of PaNip7, evidence from structure
4 comparison of its PUA domain with the PUA domain of ArcTGT indicates that RNA
5 interaction is mediated by contacts of positively charged residues (R151, R152, K155,
6 K158) with phosphates of the RNA (Figure 2, Table 3). In order to test whether these
7 residues are involved in RNA interaction, two mutant clones were generated. Both are
8 double mutants, one containing alanine residues at positions 151 and 152
9 (PaNip7^{R151A/R152A}) and the other containing alanine residues at positions 155 and 158
10 (PaNip7^{K155A/K158A}). The mutant proteins were expressed in *E. coli* and purified for RNA
11 binding assays. Binding of both mutant proteins to poly-U was drastically reduced as
12 determined by EMSA (Figure 6), which strongly supports the hypothesis that residues
13 R151, R152, K155 and K158 of PaNip7 are directly involved in RNA binding.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 As described above and in Table 3, PaNip7 residues R151, R152, K155 and K158
30 are not conserved in the PUA domain of Nip7p and HsNip7 proteins, with equivalent
31 positions being occupied by residues G160, I161, F164 and A167. We hypothesized that
32 if involved in RNA interaction, residues I161 and F164 should play an important role
33 since they contain larger side chains relative to alanine and glycine residues of positions
34 160 and 167, respectively. A mutant clone was constructed in which residues I161 and
35 F164 were replaced by alanine. The recombinant mutant protein (Nip7p^{I161A/F164A}) was
36 assayed for poly-U binding, and similarly to PaNip7 mutants, showed reduced RNA
37 binding activity (Figure 6). This result is consistent with the direct involvement of
38 residues I161 and F164 with RNA interaction.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

The PUA domain has already been identified in approximately 600 proteins of different families (38), including a large number of uncharacterized proteins. In RNA modifying enzymes, the PUA domain function has been associated with RNA interaction. However, increasing evidence suggests that the PUA domain fold provides a structural scaffold for more general macromolecular interactions than initially thought (38). In *E. coli* glutamate 5-kinase, which displays a two-domain architecture with an N-terminal amino acid kinase (AAK) domain and a C-terminal PUA domain, the PUA domain has apparently assumed a role non-related to RNA processing, taking part in monomer interaction, in formation of a cavity at the dimer interface involved in magnesium binding, and binding a glutamate residue (20). The human candidate oncogene MCT1 shows a molecular weight similar to Nip7 proteins and contains a PUA domain in the C-terminal region. Unlike Nip7 PUA domains, this particular PUA domain was reported to interact with the mRNA cap translation factor complex, linking the MCT1 protein to translational control (19). In the *E. coli* methyltransferase YebU, which methylates cytidine₁₄₀₇ of the 16S rRNA, the PUA domain forms a tight interface with the methyltransferase domain and although there is no straightforward model that explains the mechanistic role played by the PUA domain of YebU (17), it still could be involved in RNA interaction during methylation of the 16S rRNA.

The experimental evidence for the mechanism of PUA domain interaction with RNA is based mostly on the crystal structures of the archaeal Cbf5 (39), TruB (40) and ArcTGT (37) proteins in complex with RNA that are currently available at PDB. In these complexes, the PUA domain contacts the RNA molecule using a glycine-containing loop

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

which connects the first α -helix and the second β -strand and, via residues from the sixth β -strand. RNA recognition depends on the identity of the $\alpha 1$ — $\beta 2$ and $\beta 6$ side chains involved in RNA interactions (reviewed in 38). Corresponding regions in PaNip7 include helix $\alpha 5$ (PUA $\alpha 1$), the loop between $\alpha 5$ and the 3_{10} helix $\alpha 6$ and, β -strand $\beta 12$ (Figure 1). In Cbf5 and TruB, the PUA domains mediate the interaction with the minor groove of double-stranded RNA (39, 40) whereas the ArcTGT PUA domain binds to the bottom of the the tRNA^{Val} acceptor stem, through the major groove (37). The structural alignment suggests that PaNip7 uses a mechanism similar to ArcTGT for RNA-interaction, involving the positively charged residues R151, R152, K155, K158 from β -strand $\beta 12$ (Figure 2). However, these residues are not structurally conserved in the yeast and human Nip7p counterparts, which are replaced by a glycine and three residues with hydrophobic side chain (Figure 3B, Table 3). In fact, the structure of the PUA domain from PaNip7 revealed two differences relative to eukaryotic Nip7p and other archaeal PUA domains, which possess an insertion between β -strands $\beta 11$ and $\beta 12$ as compared to PaNip7 (residues 149 to 156 which form helix $\alpha 7$). The second difference involves the composition and distribution of positively charged residues that renders the PaNip7 PUA domain with a highly positive electrostatic surface and the Nip7p PUA domain with a predominantly hydrophobic surface. In Nip7p and HsNip7, electrostatic interaction between positively charged residues and phosphates of the RNA backbone would only be possible through a different region of the PUA domain involving residues K100, K115 and R154. In accordance with the structural comparisons, mutational analyses (Figure 6) have shown that residues R151, R152, K155 and K158 of PaNip7 are involved in RNA interaction. Mutational analysis of the yeast Nip7p has also shown that residues I161 and

1
2
3 F164 are required for RNA interaction, indicating that the same region of the PUA
4 domain interacts with poly-U in archaeal and yeast Nip7p proteins but probably via
5
6 different contacts.
7
8

9
10 The *S. cerevisiae* ribosome biogenesis Rrp5p protein has also been described to
11 preferentially bind poly-U and U-rich sequences (41). Rrp5p contains twelve tandem
12 repeats of the S1 RNA binding domain in the N-terminal region that is responsible for
13 RNA binding *in vitro* with a higher affinity to poly-U (41). Genetic depletion of Rrp5p
14 results in accumulation of pre-rRNA species with extended 5' end, affecting biogenesis
15 of both ribosomal subunits. Based on deletion analyses of the pre-rRNA, de Boer and co-
16 workers (41) have proposed that Rrp5p may bind to a conserved single-stranded U-rich
17 sequence upstream the pre-rRNA cleavage site A2 in ITS1. Genetic depletion of Nip7p
18 results in accumulation of unprocessed 27S pre-rRNA (7), indicating that it is required
19 for processing of ITS2. As many 60S biogenesis factors, Nip7p is not found in 90S pre-
20 ribosomes (3) and, consistently with the genetic depletion data, it cosediments with the
21 60S subunit peak in sucrose density gradients (7) and has been found associated with pre-
22 60S complexes (5,6). Although the *in vitro* interaction assays indicated a low Nip7p
23 affinity for the ITS2 region (Figure 4) even though it contains several U-rich stretches,
24 Nip7p interacts with the nucleolar proteins, Nop8p and Nop53p (9,10), both containing
25 RNA interaction domains, that may bind the pre-rRNA and help stabilize Nip7p on ITS2
26 *in vivo*. However, one has to consider also that the Nip7p preference for binding to poly-
27 U raises the question whether *in vivo* Nip7 proteins might bind to U-rich snoRNAs
28 instead of pre-rRNA sequences. Nip7p does not possess intrinsic catalytic activity and
29 might function as an adaptor since it has the ability to bind to RNA via the C-terminal
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 PUA domain and interacts with proteins involved in pre-rRNA processing, such as
4
5 Rrp43p, Nop8p and Nop53p (9,10), possibly via its N-terminal domain. The temperature
6
7 sensitive *nip7-1* allele results from mutation of a conserved glycine residue at position 71
8
9 which is replaced by an aspartic acid (7), affecting Nip7p stability and interaction with
10
11 other proteins in the yeast two-hybrid system (data not shown).
12
13
14

15 In conclusion, we have shown that the PUA domain of Nip7 proteins mediates
16
17 interaction with RNA. Although RNA-binding assays did not identify a 35S pre-rRNA
18
19 sequence to which Nip7p could bind specifically, we found that Nip7 proteins bind
20
21 specifically to poly-U RNAs *in vitro*. Structural and mutational analyses revealed that
22
23 equivalent regions, including residues R151, R152, K155 and K158 in PaNip7 and
24
25 residues I161 and F164 in yeast Nip7p PUA domains are involved in RNA interaction.
26
27
28
29
30
31

32 ACKNOWLEDGEMENTS

33
34 The authors are grateful to Zildene G. Correa for technical assistance. P.P.C.,
35
36 D.C.G. and J.S.L. are recipients of FAPESP fellowships.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes, *Gene* 313, 17-42.
2. Peng, W. T., Robinson, M. D., Mnaimneh, S., Krogan, N. J., Cagney, G., Morris, Q., *et al.* (2003) A panoramic view of yeast noncoding RNA processing, *Cell* 113, 919-933.
3. Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., *et al.* (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors, *Mol. Cell* 10, 105-115.
4. Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., *et al.* (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis, *Nature* 417, 967-970.
5. Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001) Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export, *Mol Cell*. 8, 517-529.
6. Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm, *EMBO J.* 21, 5539-5547.
7. Zanchin, N. I. T., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D. S. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis, *Mol. Cell. Biol.* 17, 5001-5015.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
8. Zanchin, N.I.T., and Goldfarb, D. S. (1999a) The exosome subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA, *Nucl. Acids Res.* 27, 1283-1288.
 9. Zanchin, N.I.T., and Goldfarb, D. S. (1999b) Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p, *Mol. Cell. Biol.* 19, 1518-1525.
 10. Granato, D. C., Gonzales, F. A., Luz, J. S., Cassiola, F., Machado-Santelli, G. M., and Oliveira, C. C. (2005) Nop53p, an essential nucleolar protein that interacts with Nop17p and Nip7p, is required for pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS J.* 272, 4450-4463.
 11. van Hoof, A., Staples, R. R., Baker, R. E., and Parker, R. (2000) Function of the Ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA, *Mol. Cell. Biol.* 20, 8230-8243.
 12. Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases, *Cell* 91, 457-466.
 13. Sekiguchi, T., Todaka, Y., Wang, Y., Hirose, E., Nakashima, N., and Nishimoto, T. (2004) A novel human nucleolar protein, Nop132, binds to the G proteins, RRAG A/C/D, *J. Biol. Chem.* 279, 8343-8350.
 14. Hesling, C., Oliveira, C. C., Castilho, B. A., and Zanchin, N. I. T. (2007) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome associated protein interacts with HsNip7 and its down-regulation affects gene expression at the transcriptional and translational levels, *Exp. Cell Res.* in press

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
15. Aravind, L., and Koonin, E. (1999) Novel predicted RNA-binding Domains Associated with the Translation Machinery, *J. Mol. Biol.* *48*, 291-302.
16. Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Kijimoto, T., Nameki, N., Watanabe, M., *et al.* (2002) Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase, *J. Mol. Biol.* *318*, 665-677.
17. Hallberg, B. M., Ericsson, U. B., Johnson, K. A., Andersen, N. M., Douthwaite, S., Nordlund, P., Beuscher, A. E. 4th, and Erlandsen, H. (2006) The structure of the RNA m⁵C methyltransferase YebU from *Escherichia coli* reveals a C-terminal RNA-recruiting PUA domain, *J. Mol. Biol.* *360*, 774-787.
18. Manival, X., Charron, C., Fourmann, J. B., Godard, F., Charpentier, B., and Branlant, C. (2006) Crystal structure determination and site-directed mutagenesis of the *Pyrococcus abyssi* aCBF5-aNOP10 complex reveal crucial roles of the C-terminal domains of both proteins in H/ACA sRNP activity, *Nucl. Acids Res.* *34*, 826-839.
19. Reinert, L.S., Shi, B., Nandi, S., Mazan-Mamczarz, K., Vitolo, M., Bachman, K.E., He, H., and Gartenhaus, R.B. (2006) MCT-1 protein interacts with the cap complex and modulates messenger RNA translational profiles, *Cancer Res.* *66*, 8994- 9001.
20. Marco-Marín, C., Gil-Ortiz, F., Pérez-Arellano, I., Cervera, J., Fita, I., and Rubio, V. (2007) A novel two-domain architecture within the amino acid kinase enzyme family revealed by the crystal structure of *Escherichia coli* glutamate 5-kinase, *J. Mol. Biol.* *367*, 1431-1446.
21. Coltri, P. P., Guimarães, B. G., Oliveira, C. C., and Zanchin, N. I. T. (2004) Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Pyrococcus abyssi*

- 1
2
3 protein homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p, *Acta Cryst. D* 60, 1925-
4
5 1928.
6
7
8 22. Carneiro, F. R., Silva, T. C., Alves, A. C., Haline-Vaz, T., Gozzo, F. C., and Zanchin,
9
10 N. I. T. (2006) Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and
11
12 identification of heterodimer formation with SCAND1, *Biochem. Biophys. Res.*
13
14 *Commun.* 343, 260-268.
15
16
17 23. Sambrook, J., Fritsch, E. J., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory
18
19 manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
20
21
22 24. Dauter, Z., Dauter, M., and Rajashankar, K. R. (2000) Novel approach to phasing
23
24 proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides, *Acta Cryst. D* 56, 232-237.
25
26
27 25. Nagem, R. A. P., Dauter, Z., and Polikarpov, I. (2001) Protein crystal structure
28
29 solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous
30
31 scatterers, *Acta Cryst. D* 57, 996-1002.
32
33
34 26. Sheldrick, G. M., and Schneider, T. R. (2001) Methods in Macromolecular
35
36 Crystallography (Turk, D., and Johnson, L., eds.) pp. 72-81, IOS PRESS, Amsterdam.
37
38
39 27. La Fortelle, E., and Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter
40
41 refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous
42
43 diffraction methods, *Methods in Enzymology* 276, 472-494.
44
45
46 28. Abrahams, J. P., and Leslie, A. G. W. (1996) Methods used in the structure
47
48 determination of bovine mitochondrial F1 ATPase, *Acta Cryst. D* 52, 30-42.
49
50
51 29. Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S. (1999) Automated protein model building
52
53 combined with iterative structure refinement, *Nat. Struct. Biol.* 6, 458-463.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
30. Jones, T., Zou, J., Cowan, S., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Cryst. A* 47, 110–119.
31. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Cryst. D* 53, 240–255.
32. Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Cryst. D* 50, 760-763.
33. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton., J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
34. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server, *Nucl. Acids Res.* 31, 3381-3385.
35. Liu, J. F., Wang, X. Q., Wang, Z. X., Chen, J. R., Jiang, T., An, X. M., Chang, W. R., and Liang, D. C. (2004) Crystal structure of KD93, a novel protein expressed in human hematopoietic stem/progenitor cells, *J. Struct. Biol.* 148, 370-374.
36. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Chryst. D* 60, 2256-2268.
37. Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S., and Yokoyama, S. (2003) Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme, *Cell* 113, 383-394.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
38. Perez-Arellano, I., Gallego, J., and Cervera, J. (2007) The PUA domain - a structural and functional overview, *FEBS J. in press*
39. Li, L., and Ye, K. (2006) Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle, *Nature 443*, 302-307.
40. Pan, H., Agarwalla, S., Moustakas, D.T., Finer-Moore, J., and Stroud, R. M. (2003) Structure of tRNA pseudouridine synthase TruB and its RNA complex: RNA recognition through a combination of rigid docking and induced fit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100*, 12648-12653.
41. de Boer, P., Vos, H.R., Faber, A.W., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2006) Rrp5p, a trans-acting factor in yeast ribosome biogenesis, is an RNA-binding protein with a pronounced preference for U-rich sequences, *RNA 12*, 263-271.

Table 1. Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant features	Reference
pCYTEX-PaNip7	<i>P. abyssi</i> Nip7, <i>Amp</i> ^R	(21)
pET-PaNip7 ^{R151A/R152A}	<i>P. abyssi</i> His-PaNip7-R151A/R152A, <i>Kan</i> ^R	This study
pET-PaNip7 ^{K155A/K158A}	<i>P. abyssi</i> His-PaNip7-K155A/K158A, <i>Kan</i> ^R	This study
pET28-Nip7	<i>S. cerevisiae</i> His-Nip7, <i>Kan</i> ^R	This study
pET-Nip7 ^{I161A/F164A}	<i>S. cerevisiae</i> His-Nip7-I161A/F164A, <i>Kan</i> ^R	This study
pGEM-5.8S	<i>S. cerevisiae</i> 5.8S rRNA, <i>Amp</i> ^R	(10)
pGEM-5'ETS	<i>S. cerevisiae</i> 5'-ETS, <i>Amp</i> ^R	This study
pGEM-ITS2	<i>S. cerevisiae</i> ITS2, <i>Amp</i> ^R	This study

Table 2. Refinement statistics

Resolution range (Å)	51.99-1.80
Number of reflections	31334
Protein atoms	2443
Water molecules	252
$R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ (%)	20.7/25.7
Rms deviation from ideality	
Bonds (Å)	0.016
Angles (deg.)	1.710
Mean B-values (whole chain) (Å ²)	
Monomer A	28.7
Monomer B	28.8
Solvent atoms	39.2
Ramachandran plot (%)	
Most favored regions	92.0
Additional allowed regions	8.0

Table 3. Residues of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) PUA domain involved in RNA interactions and structurally equivalent residues in Nip7p proteins from *P. abyssi*, *S. cerevisiae* and *H. sapiens*.

protein	Residue									
ArcTGT	E515	F519	D525	F527	K529	G572	R573	K576	R578	K579
PaNip7	K103	L107	D113	P117	E117	R151	R152	K155	L157	K158
ScNip7	N102	P106	H112	L114	A116	G160	I161	F164	Q166	A167
HsNip7	G102	S106	H112	L114	S116	A160	I161	F164	Q166	A167

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Structural comparison of Nip7 proteins. **(A)** Structure-based sequence alignment of human and *P. abyssi* Nip7 showing the insertion/deletion regions. Secondary structures are assigned on the top (PaNip7) and on the bottom (human Nip7). Structurally aligned residues are represented in red. **(B)** Superposition of PaNip7 (blue) and human Nip7 (magenta) crystallographic structures and *S. cerevisiae* Nip7p homology model (orange). Secondary structure elements of PaNip7 PUA domain and helix H7 in human and yeast Nip7 are indicated. **(C)** Superposition of PUA domains showing overall structural conservation and local differences: PaNip7 (blue), human Nip7 (PDB code 1SQW, magenta), *P. horikoshii* tRNA-guanine transglycosylase (PDB code 1J2B, green), *T. maritima* tRNA pseudouridine synthase (PDB code 1ZE1, cyan), *P. abyssi* Cbf5 (PDB code 2AUS, red). The region corresponding to helix H7, not found in PaNip7, is indicated.

Figure 2. Residues of PUA domain involved in RNA interaction. Stereo view of a structural comparison of PUA domains of PaNip7 (blue) and archaeosine tRNA-guanine transglycosylase in complex with tRNA (ArcTGT, green). The ArcTGT residues involved in tRNA interactions and the structurally correspondent side-chains in PaNip7 structure are shown in sticks. The labels refer to PaNip7 residues and the RNA molecule is represented in orange-blue.

Figure 3. Structural comparison of the *P. abyssi* and *S. cerevisiae* Nip7 PUA domains. **(A)** Overlay of the PaNip7 (blue) and Nip7p (orange) PUA domains. Positively charged

1
2
3 residues which could form a basic pathway for RNA interaction are showed in sticks and
4 labeled. (B) Electrostatic surfaces of the PaNip7 (left) and Nip7p (right) PUA domains
5 colored by charge, from red (negative) to blue (positive). The upper panel shows the
6 electrostatic surface in the same position as shown in (A). The lower panel shows the
7 domains rotated by 90°, resulting from a 45° rotation to the right for the PaNip7 PUA
8 domain (left) and from a 45° rotation to the left for the Nip7p (right) PUA domain, as
9 indicated by the green arrows, to better view the positively charged regions. Residues
10 indicated in (A) are represented in sticks.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Figure 4.** Analysis of yeast Nip7p interaction with pre-rRNA sequences. (A) and (B) 20
25 pmol of Nip7p was incubated with 1 pmol of *in vitro* transcribed [³²P]-labeled 5.8S RNA
26 and [³²P]-labeled ITS2 RNA, respectively. Subsequently the reactions were incubated
27 with increasing amounts (0, 5, 10 and 20 pmol) of unlabeled competitor RNAs as
28 indicated. Samples were submitted to UV-cross-linking for 5 min, treated with RNase A
29 and resolved on denaturing polyacrylamide gels using 20 mM CAPS pH 11.0 both as
30 electrophoresis and gel buffer. Protein-RNA complexes were visualized by
31 autoradiography. Lanes marked with “-” indicate the controls without Nip7p. (C) and (D)
32 Quantitation of the assays shown in (A) and (B), respectively. The graphs show the
33 relative intensity of the bands in the competition reactions as compared to the reaction
34 where no unlabeled competitor was added (lane 0).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **Figure 5.** Analysis of yeast Nip7p and PaNip7 interaction with oligoribonucleotides. The
54 panels show protein-RNA complexes resolved by electrophoretic mobility shift assays
55
56
57
58
59
60

1
2
3 under native conditions on polyacrylamide gels and visualized by autoradiography as
4 described in the Experimental Procedures section. (A) One pmol of the indicated
5 oligoribonucleotides (poly-A₍₂₅₎, poly-U₍₂₅₎, poly-C₍₂₅₎ and poly-G₍₁₈₎) was incubated with
6 50 pmol of recombinant PaNip7 (left panel) or with recombinant yeast Nip7p (right
7 panel). (B) One pmol of [³²P]-labeled poly-U₍₂₅₎ was incubated with increasing
8 concentrations of recombinant PaNip7 or with recombinant yeast Nip7p. Arrows indicate
9 the shifted bands corresponding to the complexes formed by PaNip7 and yeast Nip7p
10 proteins with poly-U oligoribonucleotides. The arrowhead indicates the samples trapped
11 in the wells.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Figure 6.** Analysis of the interaction of Nip7p and PaNip7 mutants with
28 oligoribonucleotides. The panels show protein-RNA complexes resolved by
29 electrophoretic mobility shift assays on polyacrylamide gels and visualized by
30 autoradiography as described in the Experimental Procedures section. (A) One pmol of
31 [³²P]-labeled poly-U₍₂₅₎ or poly-C₍₂₅₎, was incubated with 50 and 100 pmol of the
32 recombinant wild type PaNip7 (WT) and of the mutant PaNip7^{R151A/R152A} and
33 PaNip7^{K155A/K158A}. p-U indicates the positive control in the assay containing [³²P]-labeled
34 poly-U₍₂₅₎ and wild type PaNip7. (B) One pmol of [³²P]-labeled poly-U₍₂₅₎ or poly-C₍₂₅₎,
35 was incubated with 20 and 50 pmol of the recombinant yeast wild type Nip7p (WT) and
36 of the mutant Nip7^{I161A/F164A}. Arrows indicate the shifted bands corresponding to the
37 complexes formed by PaNip7 and yeast Nip7p with poly-U. (C) Graphs showing the
38 quantitation of the PaNip7-poly-U (top) and Nip7p-poly-U (bottom) complexes of the
39 assays shown in (A) and (B), respectively. The graphs show the intensity of the
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 complexes relative to the lanes containing 100 pmol of PaNip7p or 50 of Nip7p,
4
5
6 respectively, which were set to one.
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1.

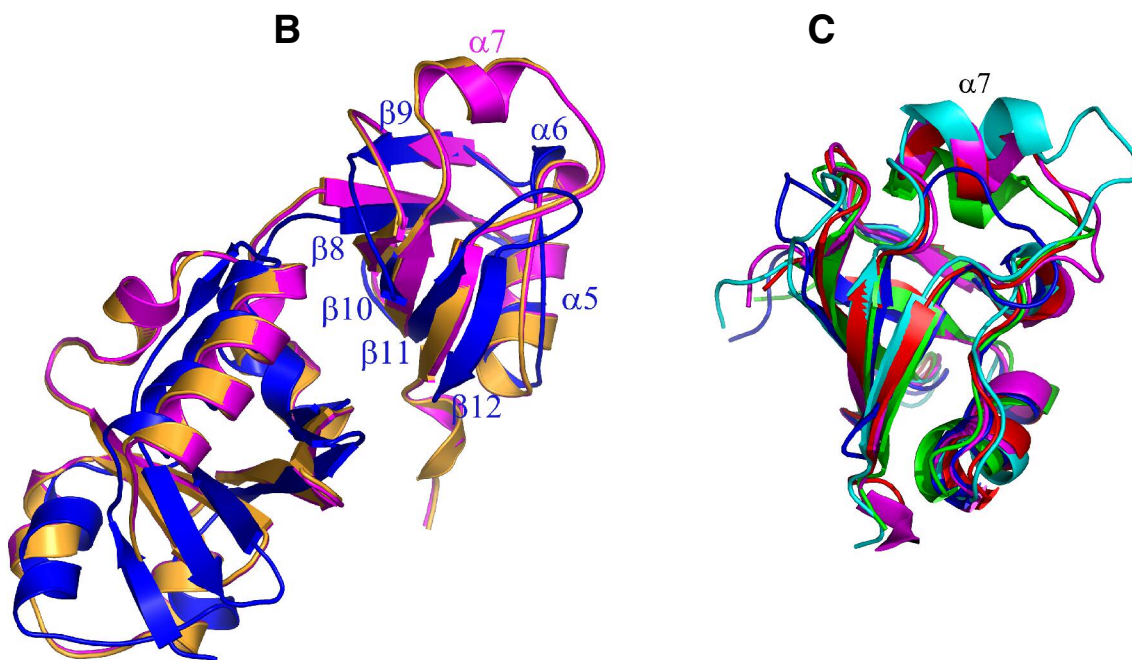
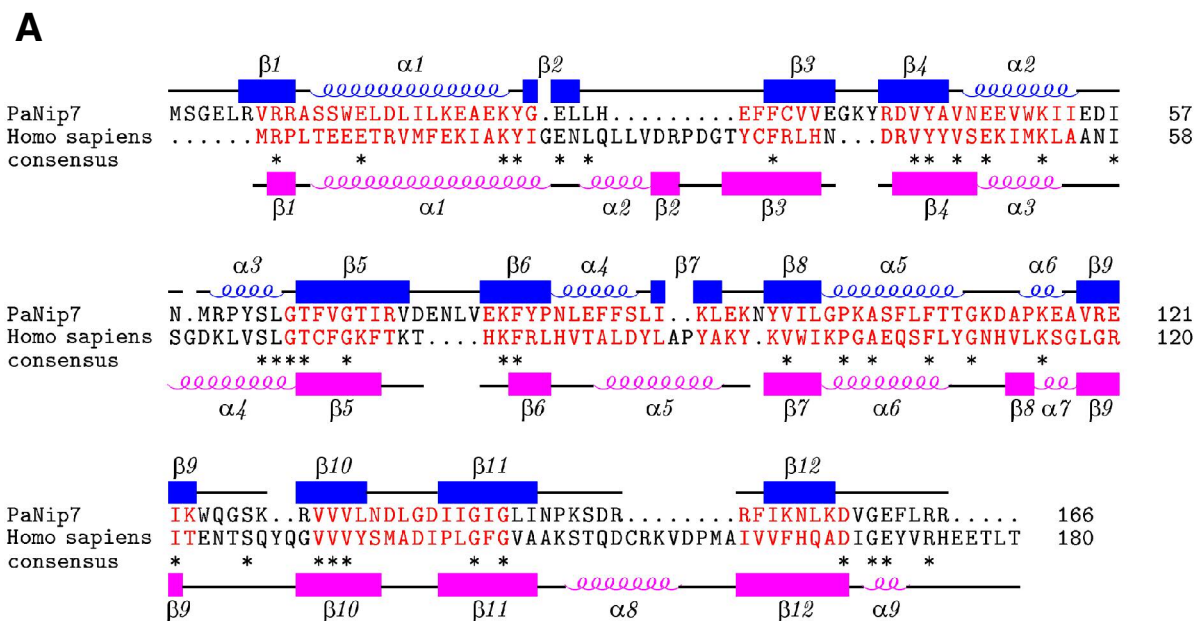


Figure 2.

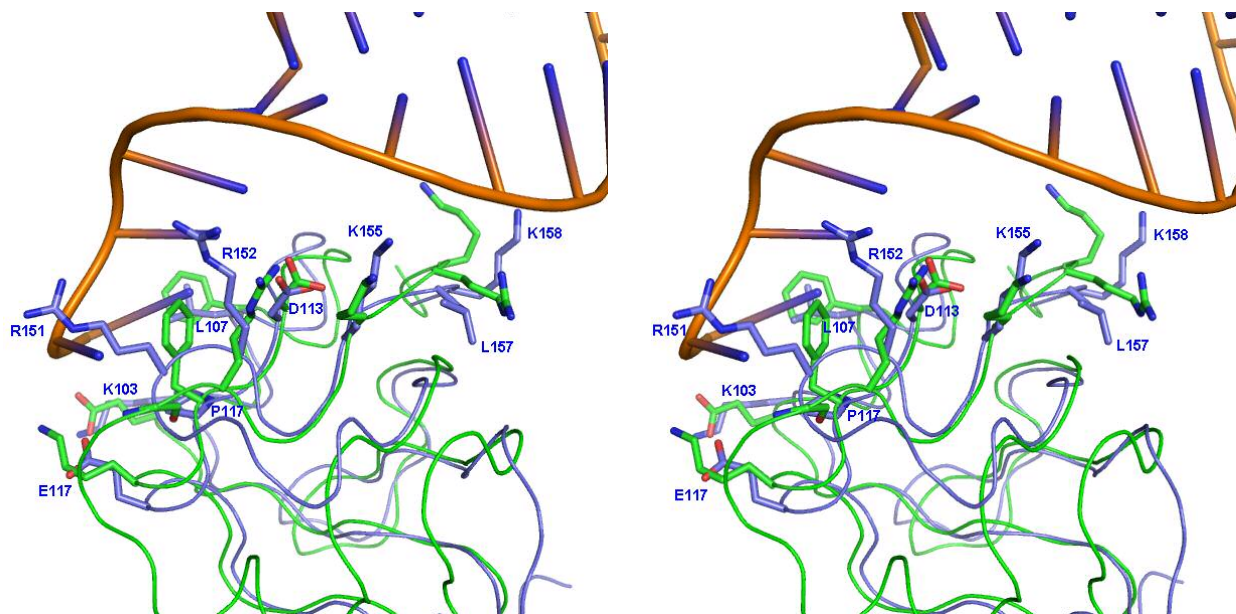


Figure 3.

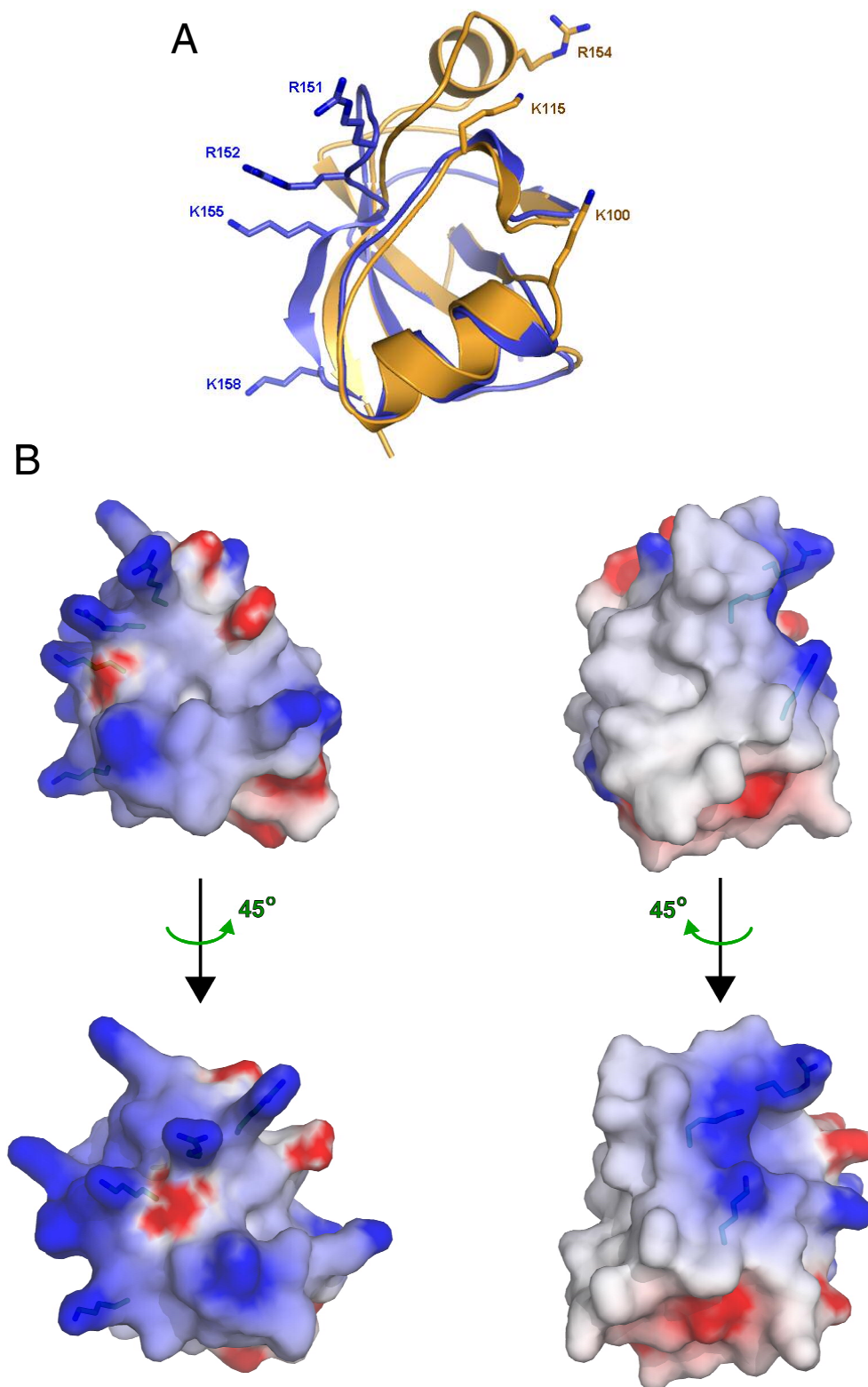


Figure 4.

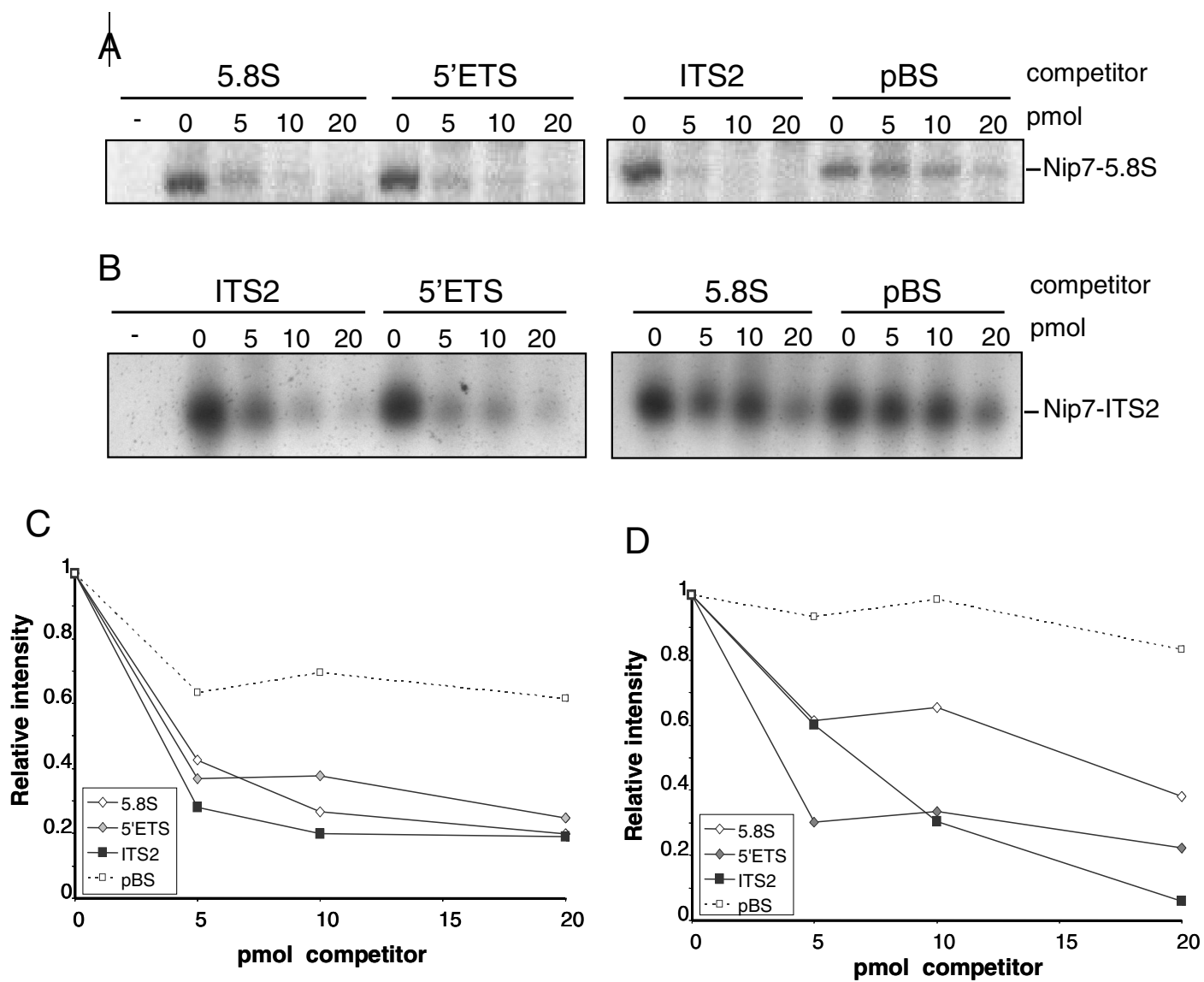


Figure 5.

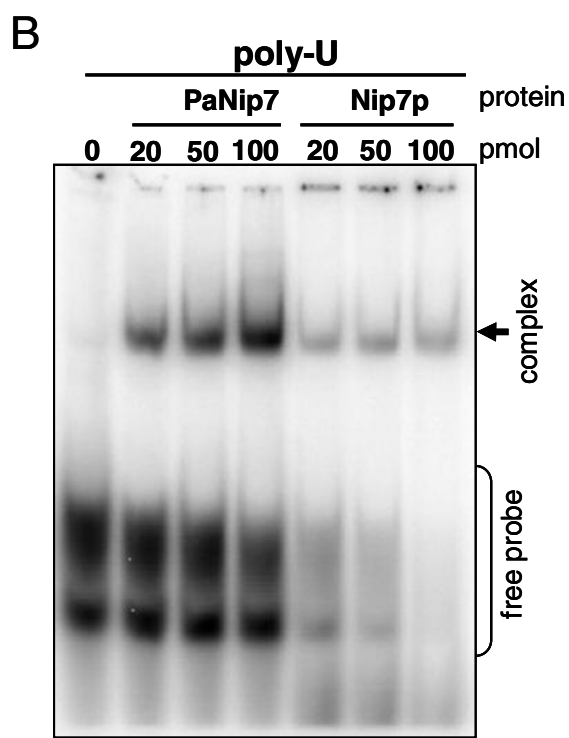
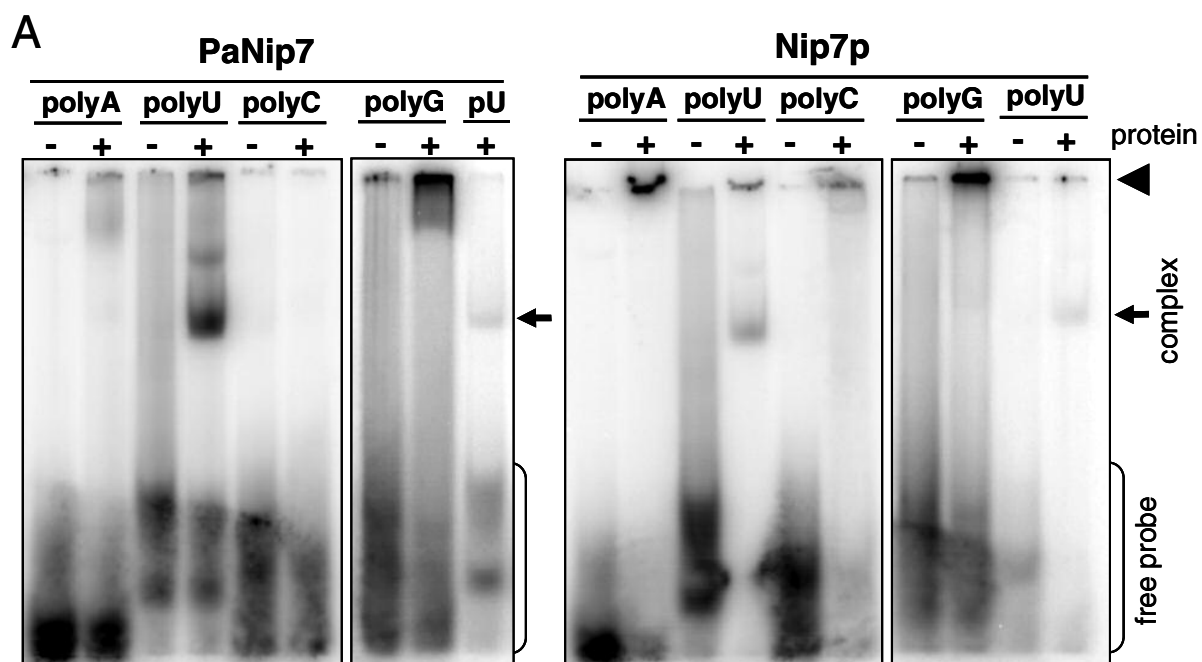
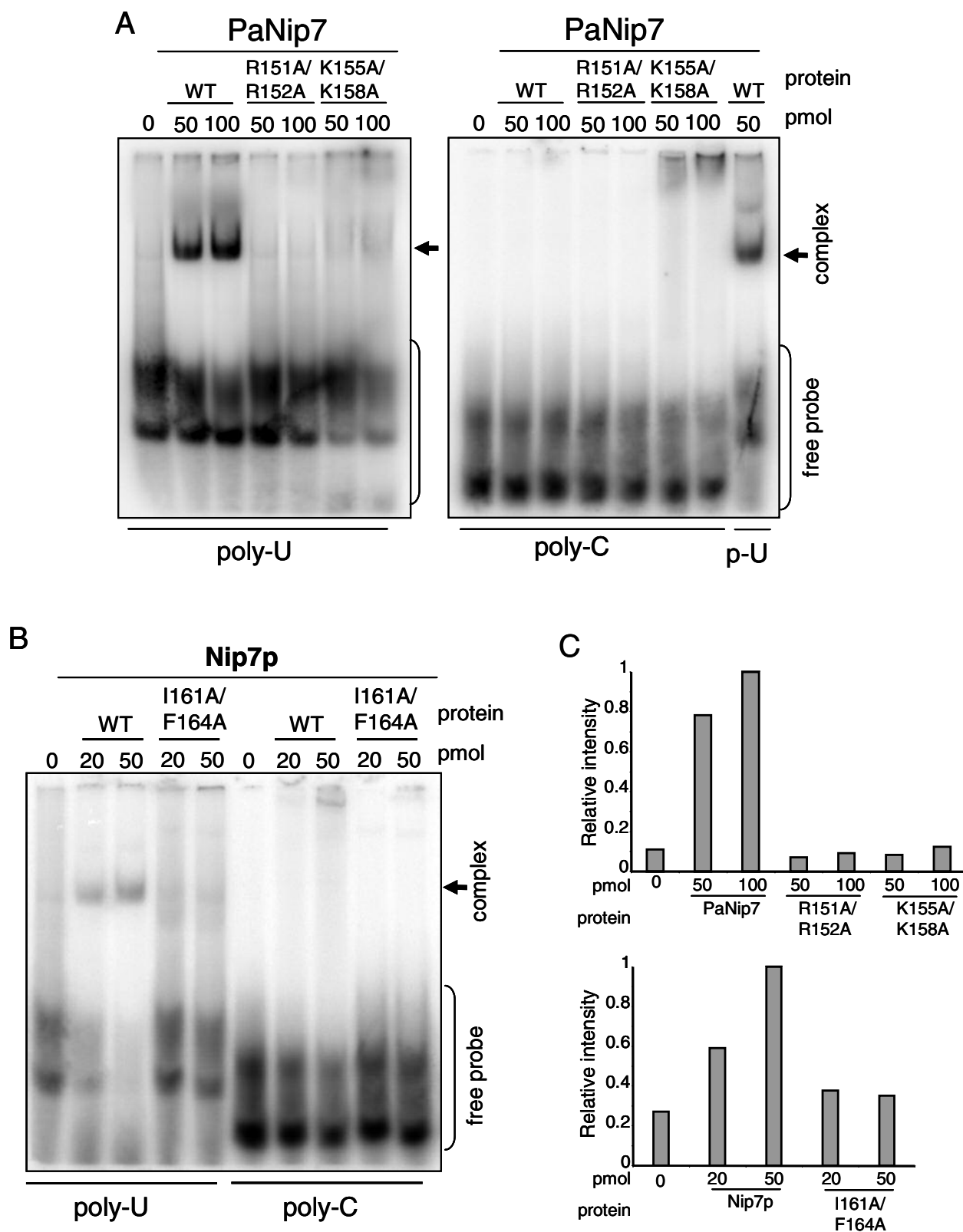
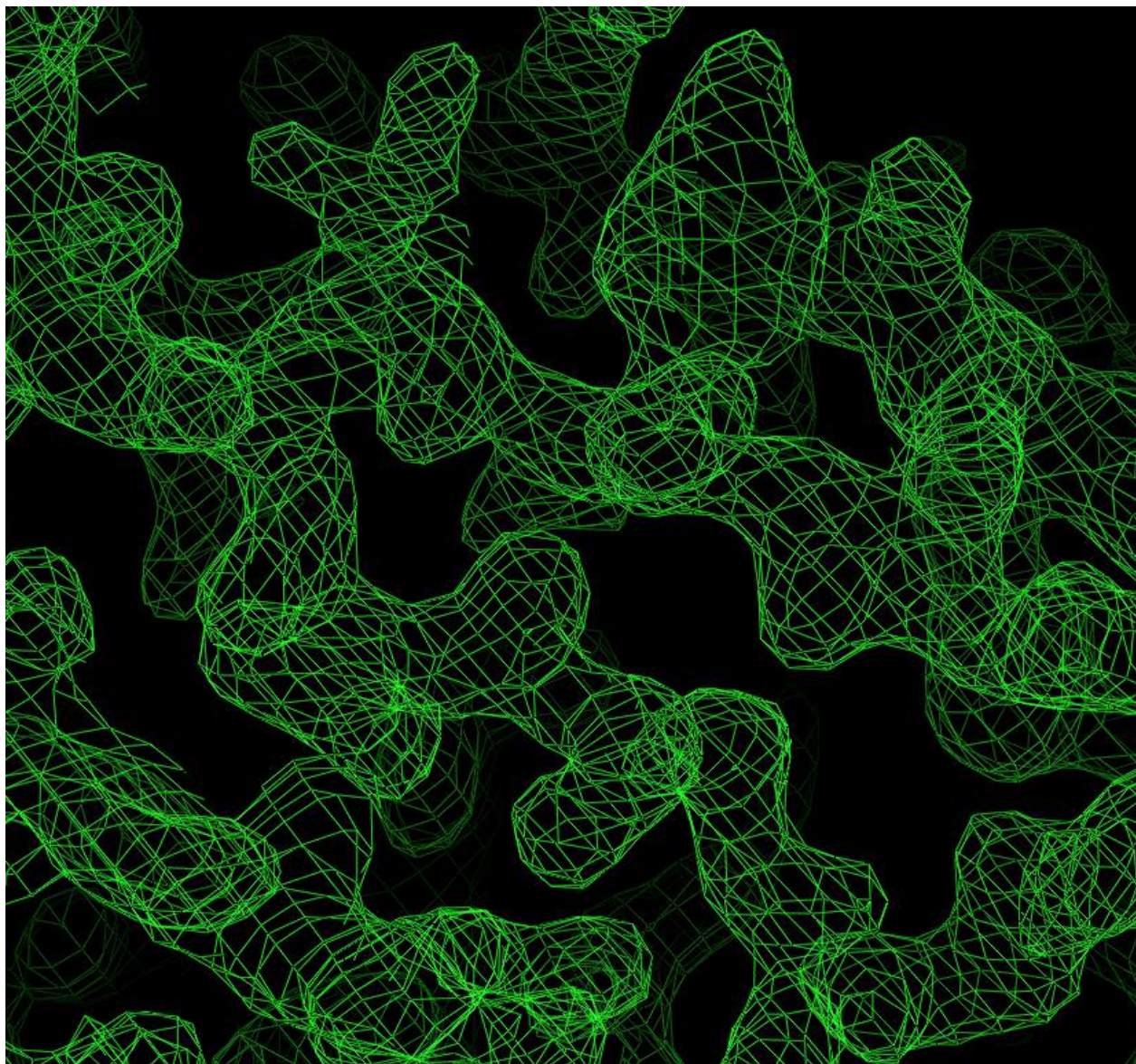


Figure 6.



Supplementary Figure 1

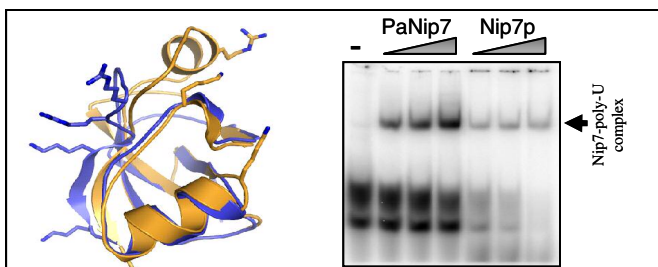


Supplementary Figure 1. 2Fo-Fc electron density map calculated from experimental phases (contour level 1.2σ)

1
2
3
4 **For Table of Contents Use Only**
5
6
7
8
9

10
11 **Structural insights into the interaction of the Nip7 PUA domain with**
12 **poly-uridine RNA**

13 *Patrícia P. Coltri, Beatriz G. Guimarães, Daniela C. Granato, Juliana S.*
14 *Luz, Elaine C. Teixeira, Carla C. Oliveira and Nilson I. T. Zanchin*
15



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)