UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE SUBUNIDADES
DO EXOSSOMO E COM OUTRAS PROTEÍNAS
CELULARES EM *Saccharomyces cerevisiae***

FERNANDO ALEXIS GONZALES ZUBIATE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADORA:

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO OLIVEIRA

**SÃO PAULO
2001**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004164

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G643e Gonzales Zubiato, Fernando Alexis
Estudo de interações entre subunidades do exossomo e com
outras proteínas celulares em *Saccharomyces cerevisiae* /
Fernando Alexis Gonzales Zubiato. -- São Paulo, 2001.
55p.

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

I. Biologia molecular I. T. II. Oliveira, Carla Columbano,
orientador

574.88 CDD

**“Estudo de Interações entre
Subunidades do Exossomo e com
Outras Proteínas Celulares em
Saccharomyces cerevisiae”**

**FERNANDO ALEXIS
GONZALES ZUBIATE**

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área:
Bioquímica.*

Aprovado por:

Profa. Dra. CARLA CALUMBANO DE OLIVEIRA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ - USP

Profa. Dra. MARIE ANNE VAN SLUYS
IB - USP

SÃO PAULO
31 DE AGOSTO 2001.

Capa: Microfotografia tirada da dissertação de doutoramento (Estudo da possível função do gene essencial *ARH1* de *Saccharomyces cerevisiae*) de Liliana Manzella, com autorização.

A Deus.

À Professora Carla Oliveira, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança em mim depositada para desenvolver este trabalho e pela orientação acertada na minha formação científica.

Ao Professor Hamza El-Dorry e meus colegas Ari, Augusto e Nathalie, pelo apoio nas discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Celso, meu padrinho, pela sincera amizade e a oportunidade de crescer profissionalmente.

À Claudia, pela sua amizade, compreensão, e apoio constante nos momentos mais difíceis.

Eterna gratidão à minha família pelo apoio e força, a pesar dos seis mil quilômetros de distância: Papá, Mamá, Franky, Freddy, Felipe, Lolita; abuelitos, tios e primos.

A Carla, Juan, Nathalie, Ari, Augusto pelas discussões bastante científicas acerca da vida, e aos demais colegas do laboratório pela compreensão e disposição em ajudar.

Ao Ivan, meu grande amigo.

Aos meus amigos Miguel Chu, Pámela Gaita, Glenda e Juan pela sua amizade.

Aos meus amigos Celso, César, Diego, Juan, Julio, Luis Fernando, Miguel, Miryam e Paola, componentes da máfia, pelas enriquecedoras experiências vividas juntos.

Ao pessoal de Secretaria de Pós-Graduação pela sua compreensão e paciência. Aos professores do departamento de Bioquímica pela disponibilidade de laboratórios e aparelhos.

Ao bandeijão, minha segunda mãe, pela sua dedicação quase exclusiva.

À professora Itamar pelas muito envolventes aulas e os seminários em portunhol, e aos meus colegas e amigos: Humberto e Miguel.

A Pedro, Jean, Leandro, Aurélio e Fernando Henrique, e todos meus amigos da Bioquímica em geral pela grande amizade demonstrada nestes anos.

Ao CNPq pelo auxílio extremadamente fundamental.

Ao Instituto de Química.

Ao COSEAS pela sua acolhida.

Ao Galo e amigos do CRUSP.

ABREVIATURAS	vi
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Processamento de RNA	3
1.2 O complexo exossomo	6
1.3 Sistema do duplo híbrido	10
1.4 Objetivos	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Cepas de bactéria	13
2.2 Cepas de levedura	13
2.3 Plasmídeos	14
2.4 Primers	14
2.5 Meios de cultura	16
2.6 Soluções e tampões de uso geral	16
2.7 Extração de plasmídeos de bactéria	17
2.8 Extração de DNA de levedura	17
2.8.1 Extração de DNA plasmidial	17
2.8.2 Extração de DNA total	18
2.9 Amplificação por PCR	18
2.10 Clonagens	18
2.11 Transformação de bactéria	20
2.11.1 Choque térmico	20
2.11.2 Eletroporação	21
2.12 Transformação de levedura	21
2.12.1 Transformação com acetato de lítio e DNA carrier	21
2.12.2 Transformação com acetato de lítio e DTT	21
2.12.3 Eletroporação	21
2.13 Análise de restrição	22
2.14 Extração de fragmentos de DNA de gel de agarose	22

2.15	Seqüenciamento	22
2.16	Seleção de clones através do sistema "two hybrid"	22
2.17	Teste de Atividade de β -Galactosidase	23
2.17.1	Ensaio de X-Gal	23
2.17.2	Ensaio de ONPG	23
2.18	Preparação de extrato celular e co-imunoprecipitação	24
2.19	SDS-PAGE	25
2.20	Western Blotting	25
3	RESULTADOS	26
3.1	Seleção de proteínas que interagem com a proteína Rrp43p	26
3.2	Interação entre as proteínas Rrp43p e Rrp46p	31
	Determinação de regiões de interação	33
3.2.1	Mutantes de deleção <i>rrp46</i>	33
3.2.2	Mutantes termo-sensíveis <i>rrp43</i>	33
3.3	Interação da Rrp43p com proteínas do exossomo	36
3.4	Rrp46p e o complexo exossomo	39
3.5	Interação da Rrp43p e eEF2p	41
3.6	Interação de Rrp43p com 137p	41
3.7	Co-imunoprecipitação das proteínas obtidas no "two hybrid"	44
4	DISCUSSÃO	46
5	REFERÊNCIAS	51
	CURRICULUM VITAE	54

°C	graus celsius
aa(s)	aminoácido(s)
β-Gal	β-Galactosidase
AD	domínio de ativação
BD	domínio de união ao DNA
BSA	albumina acetilada de soro bovino
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	ácido desoxiribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETS	seqüência espaçadora externa
ITS	seqüência espaçadora interna
kb	quilobase(s)
kDa	quilodálmton(s)
kV	quilovolts
LB	luria broth
M	molar
mA	mili ampére(s)
mM	milimolar
ml	mililitro(s)
mRNA	RNA mensageiro
nt	nucleotídeo(s)
Ω	ohms
OD	densidade óptica
ONPG	<i>O</i> -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
pré-rRNA	RNA ribossômico precursor
RNase	ribonuclease
RNP	ribonucleoproteína
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
S	coeficiente de sedimentação
SDS	dodecil sulfato de sódio
snoRNAs	small nucleolar RNAs
snRNAs	small nuclear RNAs
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletineldiamina
TLCK-HCl	L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2-heptanone-HCl
tRNA	RNA transportador
µg	micrograma(s)
µl	microlitro(s)
YNB	yeast nitrogen base
YPD	yeast extract peptone dextrose

Em *Saccharomyces cerevisiae*, Rrp43p é uma proteína que faz parte do exossomo, um complexo multiproteico que atua no processamento de snoRNAs, snRNAs e rRNAs e na degradação de mRNA. O exossomo está envolvido nesses processos através de uma ação 3'→5' exonucleolítica. Este complexo é composto por onze subunidades em *S. cerevisiae* e cada uma dessas subunidades tem uma ação predominante nos diferentes processos em que o complexo participa. Por estar envolvido diretamente na maturação dos rRNAs e alguns snoRNAs e snRNAs, assim como na degradação de mRNAs, o exossomo tem um papel importante no controle de expressão gênica.

Com o objetivo de entender melhor a função da subunidade do exossomo Rrp43p, e conseqüentemente do complexo, nas modificações do RNA, realizamos estudos de interação entre proteínas através do método de “two hybrid”, que permite analisar interações *in vivo* entre duas proteínas, convertendo-se assim, em uma ferramenta importante nestes estudos.

Utilizando Rrp43p como “isca” estudamos interações com outras proteínas expressas em *Saccharomyces cerevisiae*, na procura de proteínas envolvidas em alguns eventos de processamento de RNA, que pudessem ajudar a esclarecer em maior detalhe o papel do exossomo na célula. Também examinamos interações da Rrp43p com os demais componentes do exossomo para determinar a possível estrutura deste complexo. Os resultados obtidos demonstram que Rrp43p interage com somente uma outra subunidade do exossomo, Rrp46p. A força desta interação, quando quantificada através do nível de expressão de um gene repórter, é compatível com o fato dessas proteínas formarem parte de um complexo. Estes dados constituem resultados inéditos a respeito da interação entre subunidades do exossomo.

Os resultados evidenciam também a interação entre Rrp43p e uma proteína com função ainda não caracterizada em levedura (aqui denominada 137p). Esta interação foi detectada através do sistema do duplo híbrido, e depois confirmada por co-imunoprecipitação. A determinação da função desta nova proteína poderá ampliar as ferramentas de estudo da função e controle de atividade de Rrp43p e do exossomo.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Rrp43p is one of the eleven subunits of the exosome, a complex involved in the processing of snoRNAs, snRNAs and rRNAs, and in mRNA degradation. The exosome participates in these processes through a 3'-to-5' exonucleolytic activity. Each of the eleven subunits is predominately active in one or few of the processes in which the complex takes part. Since the exosome is involved directly in rRNAs, and in some snRNAs and snoRNAs maturation, as well as in mRNA degradation, it plays an important role on the control of gene expression.

Aiming to a better understanding of the Rrp43p subunit function on RNA processing, we started a screening for Rrp43p-interacting proteins through the yeast two hybrid system. In this study we expected to find proteins interacting with Rrp43p, which were involved in some aspects of RNA processing, and would improve the current knowledge on the exosome function.

In order to obtain more information about the complex structure, we have also studied the interactions between Rrp43p and the other exosome subunits. The results shown here demonstrate that Rrp43p interacts with only one other exosome subunit, Rrp46p. These results can help elucidate the final exosome structure.

We also found the interaction of Rrp43p with a protein of yet uncharacterized function (here named 137p). This interaction, identified in the two hybrid system, was also confirmed through co-immunoprecipitation analysis, and the study of 137p function might bring new insights on Rrp43p function and control.

1.1.Processamento de RNA

O RNA presente na célula desempenha um papel essencial no controle de expressão gênica. Os diferentes tipos de RNAs seguem diferentes vias no caminho da sua maturação,. Em eucariotos, os rRNAs ribossomais 18S, 5,8S e 25S/28S são transcritos pela RNA Polimerase I e o restante rRNA 5S é transcrito pela RNA Polimerase III, a qual também transcreve os diferentes RNAs de transferência (tRNAs). A RNA Polimerase II está encarregada de transcrever os RNAs mensageiros (mRNAs), “small nuclear RNAs” (snRNAs) e “small nucleolar RNAs” (snoRNAs). Depois da transcrição, os RNAs sofrem uma série de modificações que os tornam funcionais.

O rRNA é um componente determinante das subunidades ribossomais e a formação dos ribossomos na célula depende fundamentalmente da correta maturação dos RNAs ribossomais (rRNAs). Em eucariotos, esta maturação ocorre principalmente no nucléolo (Hadjiolov, 1985). Algumas das modificações que sofrem os rRNAs incluem metilações covalentes de bases e ribose, e conversão de resíduos uridina a pseudouridinas (Maden, 1990; Eichler and Craig, 1994), as quais sucedem mediante ações enzimáticas guiadas pelos small nucleolar RNAs (snoRNAs) que indicam, através de complementações snoRNA/pré-rRNA, onde estas modificações deverão acontecer (Kiss-Lászó et al., 1998).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, os rRNAs 18S, 5,8S e 25S são formados a partir de um único rRNA precursor de 35S, que contém regiões espaçadoras entre os futuros rRNAs maduros: regiões externas (5'ETS e 3'ETS) e internas (ITS1 e ITS2). Estas regiões espaçadoras são removidas através de clivagens endonucleolíticas e exonucleolíticas (Eichler and Craig, 1994; Venema and Tollervey, 1995), graças à ação combinada de diferentes fatores que se associam ao rRNA como endonucleases (Rnase MRP, Rnt1p), 5'→3' exonucleases (Rat1p, Xrn1p) e 3'→5' exonucleases (complexo exossomo) (Kressler et al., 1999; Venema and Tollervey, 1999).

Inicialmente, o pré-rRNA 35S é clivado endonucleoliticamente, pela ação de Rnt1p, juntamente com a snRNP U3, no espaçador 5'ETS (nos sítios A₀, A₁ e A₂) (Elela et al., 1996). Os fragmentos liberados depois da clivagem em A₀ e A₁ são degradados por Xrn1p e Rat1p no sentido 5'→3' (Lafontaine and Tollervey, 1995; Stevens et al., 1991; Figura 1).

Figura 1. Processamento do pré-rRNA in *S. cerevisiae*. **A.** Estrutura do pré-rRNA 35S com os sítios de clivagem endo-exonucleolítica. **B.** Principal via de processamento do pré-rRNA.

O pré-rRNA 32S gerado após a modificação em A₂, sofre uma clivagem endonucleolítica no ITS1 (no sítio A₂), separando as espécies que vão formar parte das subunidades ribossomais menor e maior, pré-rRNA 20S e pré-rRNA 27SA₂, respectivamente. Em seguida, o 20S é exportado ao citoplasma e convertido no rRNA 18S mediante uma clivagem na extremidade 3' (sítio D) (Udem and Warner, 1973).

O processamento do pré-rRNA 27SA₂ segue duas vias diferentes e independentes na maturação (Henry et al., 1994), gerando duas espécies de 5,8S (5,8S_S e 5,8S_L, as quais diferem em 7-8 nucleotídeos na extremidade 5') (Rubin, 1974). Uma via de processamento compreende a ação endonucleolítica da Rnase MRP sobre o pré-rRNA 27SA₂ em ITS1 (no sítio A₃) (Lygerou et al., 1994), e em seguida a ação 5'exonucleolítica de Rat1p e Xrn1p (Henry et al., 1994). Depois, o pré-rRNA 27SA₃ é clivado nos sítios C₁ e C₂, liberando-se os rRNAs 25S e o 7S_S; este 7S é posteriormente processado na extremidade 3' pelo exossomo até formar o 5,8S_S (Mitchell et al., 1996). Na via alternativa, o pré-rRNA 27SA₂ não sofre a clivagem pela RNase MRP, e no final são gerados os rRNAs maduros 25S e 5,8S_L (Henry et al., 1994).

Depois de transcrito, o pré-mRNA também é submetido a exaustivos processos no núcleo antes de ser convertido em mRNA maduro. Nestes processos encontram-se envolvidos diferentes fatores protéicos e importantes seqüências dentro do próprio pré-mRNA. O pré-mRNA sofre a adição do "cap" (7-metilguanosina) no extremo 5' imediatamente depois da transcrição ter sido iniciada em um processo denominado de "capping". Posteriormente, acontece a adição de uma cauda de poli A no extremo 3' (poliadenilação) e a remoção de introns ("splicing") (revisto em Decker, 1998). O mRNA maduro, depois de transportado para o citoplasma, poderá ser traduzido.

Os snoRNAs, envolvidos no processamento de rRNA, e os snRNAs, envolvidos em "splicing", são produzidos na célula também como formas imaturas; alguns são poliadenilados e todos precisam ser processados tanto na extremidade 5' como na 3' (Petfalski et al., 1998; Maxwell and Fournier, 1995). A maturação dos tRNAs inclui modificações pós-transcricionais como clivagens exonucleolíticas nos extremos 5' e 3', splicing de introns e alteração de nucleotídeos (revisto em Decker, 1998).

1.2.O Complexo exossomo

Como mencionado acima, vários fatores protéicos estão envolvidos na maturação de RNAs. Dentre eles está o exossomo, que é um complexo bastante importante nos diferentes passos do processamento do rRNA em *Saccharomyces cerevisiae*. Este complexo foi identificado inicialmente a partir da co-purificação por gradiente de glicerol da Rrp4p, como um componente de um complexo multienzimático, o qual demonstrou uma atividade exonucleolítica 3'→5' (Mitchell et al., 1996). Pelo menos 11 proteínas formam parte deste complexo em levedura, algumas destas recentemente identificadas: Rrp4p, Rrp40p, Rrp41p/Ski6p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p/Dis3p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p, Csl4p e Rrp6p (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999b). Oito dessas proteínas têm homologia com exonucleases de *E. coli* (Allmang et al., 1999b; Mitchell et al., 1997) (ver Tabela 1) e quatro confirmaram atividade de 3'→5' exonuclease *in vitro*: Rrp4p, Rrp41p, Rrp44p e Rrp6p (Mitchell et al., 1997; Burkard and Butler, 2000). Todos os componentes do exossomo são essenciais para a viabilidade da célula (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997) exceto a Rrp6p (Briggs et al., 1998). O complexo exossomo apresenta-se em duas formas, uma forma nuclear e outra citoplasmática, as quais diferenciam-se pela proteína Rrp6p que está presente somente na fração nuclear (Briggs et al., 1998; Allmang et al., 1999b).

Como demonstrado inicialmente, o complexo exossomo está envolvido na maturação da extremidade 3' do rRNA 5,8S (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997). Mutantes de cada subunidade do exossomo demonstraram, individualmente, defeito no processamento do pré-rRNA 7S até o rRNA maduro 5,8S (Allmang et al., 1999b).

Recentemente, demonstrou-se que o exossomo também é importante na degradação da região 5'ETS depois das clivagens em A₀ e A₁ acontecer (Allmang et al., 1999b). Apesar de o exossomo não participar diretamente nos primeiros passos do processamento do pré-rRNA, essas reações requerem a presença de todos os componentes do exossomo (Allmang et al., 2000), já que em estudos com mutantes em genes de subunidades do exossomo, observou-se um acúmulo do pré-rRNA 35S e um desaparecimento do pré-rRNA 32S (produto da clivagem em A₁). As clivagens em A₂ e A₃ no ITS1 também foram afetadas em mutantes exossômicos, efeito refletido nos níveis dos rRNAs maduros 18S e 25S, e

Proteína	Fenótipo	Homólogo em <i>E. coli</i>	Homólogo em <i>T. brucei</i>	Homólogo em <i>A. thaliana</i>	Homólogo em mamíferos
Rrp4p	essencial	S1 RNA BD	TbRrp4	AtRrp4p	hRrp4p
Rrp40p	essencial	S1 RNA BD	TbRrp40		hRrp40p
Rrp41p	essencial	RNase PH	TbRrp41A, p41B	AtRrp41p	hRrp41p
Rrp42p	essencial	RNase PH			
Rrp43p	essencial	RNase PH			
Rrp44p	essencial	RNase R	TbRrp44		hDis3p
Rrp45p	essencial	RNase PH	TbRrp45		PMScl-75, OIP2 e KIAA0116
Rrp46p	essencial	RNase PH			hRrp46p
Csl4p	essencial	S1 RNA BD	TbCsl4		hCsl4p
Mtr3p	essencial	RNase PH			
Rrp6p	ts letal	RNase D	TbRrp6		PMScl-100

Tabela 1 . Proteínas componentes do complexo exossomo em *Saccharomyces cerevisiae* e homólogos em outros organismos.

conseqüentemente, na produção das subunidades ribossomais (Allmang et al., 2000; Zanchin and Goldfarb, 1999a).

O exossomo atua também na maturação de alguns snoRNAs e snRNAs, auxiliado pela endonuclease Rnt1p (Allmang et al., 1999a). Mutações nos genes *rrp4*, *rrp41/ski6*, *mtr3* e $\Delta RRP6$ afetaram o correto processamento 3' dos snoRNAs U24 e U18, assim como na deadenilação do snRNA U4 e dos snoRNAs: sn33, sn40, U18, U74, snR73 e snR72 (van Hoof et al., 2000).

O exossomo está envolvido ainda na degradação de mRNAs, que é um importante processo na célula, já que não só determina o “steady-state” de um mRNA, mas também é um importante ponto regulatório na expressão gênica (Belasco and Brawerman, 1993). Uma das principais vias de degradação de mRNA é iniciada pela deadenilação dos mRNAs em um processo que envolve Pan1p e Pab1p. Este processo é seguido pela perda do “cap” na extremidade 5' do mRNA realizada por Dcp1p e Dcp2p, e pela degradação do corpo de mRNA na direção 5'→3' feita pela exonuclease Xrn1p e na direção 3'→5', na qual o exossomo está envolvido, já que mutantes em *RRP4* e *RRP41/SKI6*, demonstraram deficiência na degradação do mRNA (Vreken and Raué, 1992; Anderson and Parker, 1998).

O papel do exossomo é essencial nas modificações que sofre o RNA, e sua importância na célula é demonstrada pela conservação que existe deste complexo entre espécies separadas na evolução. Além da homologia observada entre os componentes exossômicos e RNases bacterianas, também foi identificado um complexo correspondente ao exossomo eucariótico em “archeobacterias” (o “archeal exosome”), constituído por um complexo de RNases, proteínas de união ao RNA e helicases que regulam o processamento e degradação 3'→5' de espécies de RNA (Koonin et al., 2001).

No parasita unicelular *Trypanosoma brucei*, foram identificados oito genes que codificam proteínas com alta similaridade aos componentes do exossomo TbRRP4, TbRRP40, TbRRP41A, TbRRP41B, TbRRP44, TbRRP45, TbCSL4 e TbRRP6. Todos exceto TbCSL4 são essenciais na célula e estão envolvidos no processamento do rRNA 5,8S. Apesar da homologia encontrada entre as proteínas de *S. cerevisiae* e *T. brucei*, no complexo purificado em *T. brucei* estão presentes somente as proteínas TbRRP4p,

TbRRP45p, TbCSL4, TbRRP6 e uma proteína de função ainda desconhecida (Estévez et al., 2001).

Em *Arabidopsis thaliana* foi encontrado o homólogo do gene de levedura *RRP41(SKI6)*. A expressão do cDNA de *AtRRP41* foi capaz de complementar o fenótipo letal do mutante nulo *rrp41(ski6)* em *S. cerevisiae*, complementando também os defeitos no processamento do rRNA de 5,8S e na degradação de mRNA. Além disso, a proteína de *Arabidopsis thaliana* AtRrp41p conseguiu restaurar a integridade do complexo exossomo em levedura mutante *rrp41*-nulo e interagir *in vitro* com Rrp44p e Rrp4p de levedura, sugerindo que as interações existentes entre as subunidades do exossomo sejam conservadas na evolução (Chekanova et al., 2000).

Em humanos também existe um complexo semelhante ao exossomo, que foi encontrado inicialmente a partir da co-purificação da proteína humana hRrp4p (homóloga a Rrp4p de levedura) em células HeLa (Mitchell et al., 1997). Estima-se que este complexo chamado PM-Scl (Poliomiositis-scleroderma), tenha entre 11 a 16 componentes, e contém 9 componentes homólogos aos do exossomo em *S. cerevisiae* (Brouwer et al., 2001; Allmang et al., 1999b). Similar ao exossomo, a localização de PM-Scl foi determinada tanto no nucléolo como no citoplasma, e a subunidade exossômica nuclear de levedura é homóloga à de humanos. Três componentes do PM-Scl complementam a função *in vivo* dos respectivos mutantes termosensíveis de levedura: hRrp4 complementa a função de Rrp4p (Mitchell et al., 1997), hDis3 complementa Rrp44p/Dis3p (Shiomi et al., 1998), hCsl4, Csl4p (Baker et al., 1998) e hRrp40, hRrp41 e hRrp46 complementam Rrp40p, Rrp41p e Rrp46p respectivamente (Brower et al., 2001). Esses resultados indicam que o complexo PM-Scl deve desempenhar as mesmas funções do exossomo em humanos.

Uma das subunidades componentes do exossomo em *Saccharomyces cerevisiae* é a Rrp43p, a qual é objeto de estudo de nosso grupo. Esta proteína foi localizada no nucleoplasma, nucléolo e em menor quantidade no citoplasma (Zanchin and Goldfarb, 1999b; Allmang et al., 1999b) e por ter similaridade com a exoribonuclease PH bacteriana (RNase PH), presume-se sua função como 3'→5' exoribonuclease em *Saccharomyces cerevisiae* (Mitchell et al., 1997). Mutações em *RRP43* demonstraram uma diminuição nos níveis da subunidade ribossomal 40S e também na concentração de polissomos, o que sugeriria que a Rrp43p desempenha uma função importante na biogênese da subunidade

40S (Zanchin and Goldfarb, 1999a). Análises de processamento de rRNA confirmaram o envolvimento de Rrp43p em processamento de 5.8S rRNA (Mitchell et al., 1996; Mitchell et al., 1997), assim como de 18S (Zanchin and Goldfarb, 1999a; Oliveira et al., 2001) e na degradação do espaçador 5'-ETS (Allmang et al., 1999b).

1.3.Sistema do "two hybrid"

O sistema do duplo híbrido ("two hybrid system") é utilizado para a análise de interação entre proteínas *in vivo* em levedura. Este método se baseia no mecanismo de ação da proteína de levedura Gal4p. Similarmente a outros fatores eucarióticos de transcrição, Gal4p é constituída por dois domínios, um deles atua interagindo com uma sequência de DNA específica no promotor "DNA-binding domain"-BD e outro domínio está encarregado da ativação da transcrição "Activation domain"-AD (Hope and Struhl, 1986; Keegan et al., 1986). Ausente um dos dois domínios, a transcrição não acontece.

Neste sistema, duas proteínas de fusão são expressas na mesma levedura, uma proteína de interesse fusionada ao BD (de Gal4p ou lexAp) e outra proteína fusionada ao AD de Gal4p; a correta interação entre estes dois híbridos ativará a transcrição dos genes repórteres presentes no genoma de levedura (Fields and Song, 1989; ver Figura 2). As proteínas de fusão geradas contêm sequências de localização nuclear (NLS) para que sejam transportadas para o núcleo.

Através deste sistema pode-se estabelecer interações proteína-proteína ainda desconhecidas, como as encontradas entre oncoproteínas como Ras-Raf (Vojtek et al., 1993) e myc-max (Zervos et al., 1993); interações do repressor transcricional de levedura *SIR4*, o qual forma dímeros (Chien et al., 1991); e a interação encontrada entre a Rrp43p e Nip7p, proteína envolvida na biogênese da subunidade ribossômica 60S (Zanchin and Goldfarb, 1999b). O estudo de complexos presentes na célula também é aprofundado em maior detalhe com este sistema, como por exemplo a análise do complexo de "Sm-like proteins" (proteínas similares Sm) que está envolvido em "splicing" (Fromont-Racine et al., 2000). Outra vantagem importante deste sistema é a capacidade de detectar interações entre proteínas provenientes de organismos de um amplo espectro como *E. coli*, leveduras, plantas e mamíferos (revisto em Bartel and Fields, 1995).

Figura 2. “TWO HYBRID SYSTEM”. Quando as duas proteínas híbridas interagem na célula, a expressão dos genes repórteres é ativada.

1.4.Objetivos

O envolvimento do exossomo em diferentes processos celulares, supõe a associação deste complexo com muitos fatores na célula. A atividade do exossomo e a regulação da mesma, dependem das interações com estes fatores. Com base nessas considerações, este trabalho teve como principal objetivo a identificação de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* que interagem com a subunidade do exossomo Rrp43p.

Para tanto, foi utilizado o sistema de "two hybrid", visando a caracterização de proteínas ainda não previamente identificadas, também envolvidas em processamento de RNA e/ou no controle da função de Rrp43p, e conseqüentemente, do exossomo. Este trabalho visava também o estudo das interações entre Rrp43p e as outras subunidades do exossomo, que pudesse ajudar a esclarecer a própria estrutura desse complexo.

2.1.Cepas de bactéria (Tabela 2)

<i>E. coli</i>	Características	Referência
BNN132	ATCC 47059	Elledge et al.,1991
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983
DH10B	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlac ZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK1-rpsL mupG</i>	Grant et al., 1990
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mtl-1</i>	Bolívar and Backman, 1979

2.2.Cepas de levedura (Tabela 3)

<i>S. cerevisiae</i>	Características	Referência
L40	<i>MATa his3d200 trp1-901 leu2-3,311 ade2 lys2-801am URA3:::(lexAop)₈-LACZ LYS2:::(lexAop)₄-HIS3 GAL4 gal80</i>	Vojtek and Hollenberg, 1995
DG458	<i>MATa ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100 rrp43::KAN p(URA3 GAL::PrTA::RRP43)</i>	Zanchin and Goldfarb, 1999a
Parental-137	<i>MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-100.</i>	Research Genetics
Δ137	<i>MATa, trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 can-100 yhr034c::KAN</i>	Research Genetics
YCO43	DG458 p(YCp111-GAL::His-RRP43)	Este estudo
YCO43A46	YCO43 p(YC33GAL-AP46)	Este estudo
YCO43A137	YCO43 p(YC33GAL-A137)	Este estudo
YCO43AEF2	YCO43 p(YC33GAL-AEF2)	Este estudo

2.3.Plasmídeos (Tabela 4)

Plasmídeos	Características	Referência
pACT-c DNA	<i>ADGAL4::cDNA library LEU2 2um</i>	ATCC, 87002
pACT-EF2	<i>ADGAL4::EF-2 LEU2 2um</i>	Este estudo
pACT-137	<i>ADGAL4::YHR034C LEU2 2um</i>	Este estudo
pACT-RRP43	<i>ADGAL4::RRP43 LEU2 2um</i>	Zanchin and Goldfarb, 1999b
pACT-RRP46	<i>ADGAL4::RRP46 LEU2 2um</i>	Este estudo
pBlueScript-KS	<i>bla (AmpR)</i>	Stratagene
pBTM-116	<i>BDlexA, TRP1 2um</i>	Bartel et al., 1993
pBTM-RRP43	<i>BDlexA::RRP43, TRP1 2um</i>	Este estudo
pBTM-RRP46	<i>BDlexA::RRP46, TRP1 2um</i>	Este estudo
pGAD-424	<i>ADGAL4 LEU2 2um</i>	Bartel et al., 1993
pGAD-C	<i>ADGAL4 LEU2 2um</i>	James et al., 1996
pGADC2-RRP4	<i>ADGAL4::RRP4 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC1-RRP40	<i>ADGAL4::RRP40 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-RRP41	<i>ADGAL4::RRP41 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-RRP42	<i>ADGAL4::RRP42 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC1-RRP44	<i>ADGAL4::RRP44 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-RRP45	<i>ADGAL4::RRP45 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-RRP46	<i>ADGAL4::RRP46 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC3-RRP46.0,5	<i>ADGAL4::rrp46(1-531) LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC1-RRP46.0,2	<i>ADGAL4::rrp46(532-771) LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-CSL4	<i>ADGAL4::CSL4 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-MTR3	<i>ADGAL4::MTR3 LEU2 2um</i>	Este estudo
pGADC2-RRP6	<i>ADGAL4::RRP6 LEU2 2um</i>	Este estudo
YCplac111	<i>pUC19-MCS LEU2 CEN4</i>	Gietz & Sugino, 1988
YCpGALHisRRP43	<i>GAL1::His-RRP43 LEU2 CEN4</i>	Oliveira et al., 2001
YCplac33	<i>pUC19-MCS, URA3 CEN4</i>	Gietz & Sugino, 1988
YCpGAL-RRP43	<i>GAL:PrtA::RRP43 URA3 CEN4</i>	Zanchin and Goldfarb, 1999b
YC33GAL-AP46	<i>GAL:PrtA::RRP46 URA3 CEN4</i>	Este estudo
YC33GAL-A137	<i>GAL:PrtA::YHR034C URA3 CEN4</i>	Este estudo
YC33GAL-AEF2	<i>GAL:PrtA::EF2 URA3 CEN4</i>	Este estudo

2.4.Primers (Tabela 5)

Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento		
cDNAs obtidos	GALACTD	5' TACCACTACAATGGATG 3'
Clones no pBTM	lexAseq	5' CTTCGTCAGCAGAGC 3'

(cont. Tabela 5)

Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das ORFs de <i>S. cerevisiae</i>		
ORFs	SEQÜÊNCIAS	
RRP4	P4Bam5	5' CACAAGCGGATCCATATGTCCGAAG 3'
	P4Xho3	5' GCTTTTGTACTCGAGTTAGTTGC 3'
RRP40	P40LBam5	5' CCAAGAGGATCCAAGATGTCTACG 3'
	P40LXho3	5' GATGATCTCGAGGTGTTTATATATTT 3'
RRP41	P41Bam5	5' CAGCAGGATCCATATGTCAAGAC 3'
	P41Xho3	5' GGCGTTCTCGAGTCTACCTAGCAG 3'
RRP42	P42Bam5	5' GTTGAAAGGATCCTTATGTCTC 3'
	P42Xho3	5' TTGTGACTCGAGTTTATAAATTC 3'
RRP44	P44LSma5	5' GCATCATCCCGGGCAAAACAACATGTC 3'
	P44LXho3	5' CCTGATACTCGAGCATCTTCCATC 3'
RRP45	P45Bam5	5' AGATTAGGATCCAAATGGCC 3'
	P45Xho3	5' CAGTTTTCTCGAGAATATTAGATC 3'
RRP46	P46Bam 5	5' GGAAAAGGATCCAGATGAACCAG 3'
	P46Xho3	5' ATAATCTCGAGTGGCTATACAAC 3'
CSL4	CSLBam5	5' CTATAAGTGGATCCTAATGGCATG 3'
	CSLXho3	5' CTATATGCACTCGAGATAAGC 3'
MTR3	MTR _{Eco5}	5' GTTATCAGAATTCATGAATGTTC 3'
	MTR _{Xho3}	5' GATAATCTCGAGTCTAAG 3'
RRP6	RP6 _{Eco5}	5' GCACCCAATGAATTCGTTATGAC 3'
	RP6 _{Sal3}	5' ATACGCTTGGTCGACATAATCAC 3'
137p	5Bam137	5' GAACAAACAGACGGATCCCGATGGCCG 3'
	3Xho137	5' GAATACTCGAGATGTTAG 3'
EF2	5RGEF2	5' GGAATTCCAGCTGACCACCN _n 3'
	3RGEF2	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGN _n 3'

Meios, soluções e métodos usados com bactérias seguiram protocolos descritos por Sambrook et al. (1989) e meios, soluções e métodos usados com levedura foram descritos por Sherman et al. (1986), onde não indicada outra referência.

2.5.Meios de cultura

2YT: Bacto-triptona 1,6%, bacto-extrato de levedura 1%, NaCl 0,5% pH 7,0.

LB: Peptona/triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5; **LB-amp:** LB contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Para meios sólidos adiciona-se agar a 2%.

M9-Amp-Pro: Ao meio mínimo M9 (46 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 22 mM KH₂PO₄, 8,5 mM NaCl, 18 mM NH₄Cl, glicose 0,4%) adiciona-se prolina (20 mg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). Para meios sólidos adiciona-se agar a 2%.

SOB: Bacto-triptona 2%, bacto-extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, 2,5 mM de KCl, pH 7,0. Depois de esterilizar por autoclavação, adiciona-se MgCl₂ para uma concentração final de 10 mM.

SOC: Meio SOB com 20 mM glicose.

YNB-Galactose. YNB 0,7%, galactose 2% e adicionam-se os aminoácidos e nucleotídeos requeridos: adenina (20 mg/mL), histidina (20 mg/mL), leucina (30 mg/mL). Placas com meio sólido com agar a 2,4%.

YNB-Glicose. YNB 0,7%, glicose 2%.

YPD: Extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, sólidos com agar a 2,4%.

2.6.Soluções e tampões de uso geral

BufferZ: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7,0.

GET: 50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0).

GYT: Glicerol 10%, extrato de levedura 0,125%, triptona 0,215%.

“Lower buffer”: 1x Lower (1,5 M Tris-Base levado até pH 8.8) e acrilamida/bis-acrilamida a 12%.

Solução de acetato de lítio/PEG: 40% PEG₄₀₀₀, 100 mM acetato de lítio, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 7,0.

Solução de CaCl₂: 10 mM acetato de potássio (pH 7,5), 45 mM MnCl₂.4H₂O, 10 mM CaCl₂.2H₂O, 100 mM KCl e 10% glicerol.

Solução de lise: 1% SDS, 200 mM NaOH para bactérias e 1% SDS, 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA para leveduras.

TAE: Para uma solução 1x, usa-se 0,04M Tris-Acetato, 0,001M EDTA a pH 8,0.

Tampão de transferência: (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glycine, 15% metanol)

Tampão de esferoplastização: 0,9 M Sorbitol, 50 mM fosfato de sódio pH 7,5; β -mercaptoetanol concentração final de 14 mM.

TBST: (20 mM Tris pH 8,0, 150 mM Na Cl, 0,05% Tween).

“Upper buffer (stacking)”: Usou-se o tampão Upper Tris (0,5 M Tris-base levado até pH 6,8) e acrilamide/bis-acrilamide ao 4% e SDS 0,1% e adicionou-se persulfato de amônio 0,1% e TEMED.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo em N,N-dimethylformamide (50 mg/mL).

2.7.Extração de plasmídeos de bactéria

Plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina (Birnboim and Doly, 1979) segundo as modificações de Sambrook et al., (1989) ou através do método CONCERT (*GIBCO-BRL*), conforme o fabricante.

2.8.Extração de DNA de levedura

2.8.1.Extração de DNA plasmidial. Células de levedura incubadas a 30°C por 18 horas até uma OD₆₀₀ de 1,0-1,2 (cultura em fase estacionária) foram ressuspensas em uma solução de lise (1% SDS, 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA); e foram lisadas em vortex usando “glass beads” com agitações por 30 segundos, 3 vezes. O DNA foi purificado por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico pH 7,5 mediante centrifugações e agitação no vortex para posteriormente ser precipitado com a adição de dois volumes de etanol absoluto (Bartel and Fields, 1995).

2.8.2.Extração de DNA total. Células crescendo por 18 horas a 30°C até uma OD₆₀₀ de 0,8-1,0 (cultura em fase logarítmica) foram centrifugadas e ressuspensas em sorbitol 1 M (β -mercaptoetanol foi adicionado para concentração final de 14 mM), e incubadas por 30 minutos a 30°C com agitação; após a suspensão ter sido centrifugada, o precipitado foi ressuspendido em tampão de esferoplastização (pré-aquecido a 37°C) e incubado a 37°C por 30 minutos em presença de litase 12mg/mL. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM EDTA, 1 % SDS) e incubadas a 65°C por 20 minutos e em seguida incubadas com 2M KAc em gelo por 1 hora. O DNA foi precipitado com a adição de meio volume de isopropanol.

2.9.Amplificação por PCR (Polimerase Chain Reaction)

A amplificação dos genes do exossomo foi feita a partir do genoma da levedura W303, usando os primers mostrados na Tabela 5 com as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 2', (desnaturação a 94°C por 1', anelamento a 50°C por 1', elongação a 60°C por 3' 30") 40 ciclos e elongação 60°C por 8', com Taq polimerase Platinum (*GIBCO-BRL*), seguindo o protocolo do fabricante.

2.10.Clonagens

A sequência codificadora (ORF; Open reading frame) do gene *RRP43* foi extraído a partir do plasmídeo pACT-RRP43 (Zanchin and Goldfarb, 1999b; Figura 3) com as enzimas de restrição BamHI e SalI, e inserido dentro do plasmídeo pBTM-116 (Bartel et al., 1993; Figura 3) nos mesmos sítios gerando o plasmídeo pBTM-RRP43 o qual expressa a proteína de fusão LexAp-Rrp43p usada no "two hybrid". O pBTM-RRP46 foi obtido a partir da amplificação por PCR da ORF *RRP46* com os oligonucleotídeos P46Bam5 e P46Xho3, este produto de PCR foi clonado no pBTM-116 também nos sítios BamHI e SalI, o híbrido produzido foi LexAp-Rrp46p. Todos os oligonucleotídeos usados nas reações do PCR são mostrados na Tabela 5.

As ORFs dos outros componentes do exossomo foram amplificadas por PCR com primers contendo sítios de restrição BamHI e XhoI para *RRP4*, *RRP40*, *RRP41*, *RRP42*, *RRP45*, *RRP46*, *RRP6*, *CSL4* e *MTR3*, e posteriormente, inseridos no pGADC₂ (James et al., 1996; Figura 3) em sítios de BamHI e SalI. *RRP40* foi inserido no pGADC₁ nos sítios

Figura 3. Plasmídeos usados no sistema “two hybrid”. Mapa de restrição de pBTM-116 mostrando o domínio de união ao DNA de lexAp em preto. Mapas de restrição de pACT e pGAD mostrando o “Activation Domain” de GAL4p.

de BamHI e Sall. Foram assim gerados os plasmídeos pGADC₂-RRP4, pGADC₂-RRP41, pGADC₂-RRP42, pGADC₂-RRP45, pGADC₂-RRP46, pGADC₂-RRP6, pGADC₂-CSL4, pGADC₂-MTR3 e pGADC₁-RRP40. A ORF *RRP44* foi amplificada com primers contendo sítios de SmaI e XhoI e clonado no pGADC₁ em sítios de SmaI e Sall do “polylinker”, gerando o plasmídeo pGADC₁-RRP44. Os fragmentos do gene *RRP46*, *rrp46.0,5* o qual contém os primeiros 531 nucleotídeos e *rrp46.0,2* que contém os 240 últimos nucleotídeos, foram obtidos a partir do pACT-RRP46; o fragmento *rrp46.0,5* foi gerado por clivagens com as enzimas BamHI e EcoRV, subclonado no pBlueScript-SK, clivado com BamHI e XhoI, para posteriormente ser inserido no pGADC₃, em sítios de BamHI e Sall; e *rrp46.0,2* foi clivado por EcoRV e XhoI, subclonado em pBS-SK e inserido em pGADC₁ em sítios BamHI e XhoI, gerando os plasmídeos pGADC₃-P46.0,5 e pGADC₁-P46.0,2. Todos estes genes foram clonados no extremo carboxi-terminal do “Activation Domain” de pGADC e expressaram a proteína ADGal4p (“activation domain” de Gal4p) com a proteína respectiva.

Para a construção de vetores expressando as proteínas de fusão PrtA-Rrp46p, PrtA-137p e PrtA-EF2p usou-se uma dupla sequência do de *Staphylococcus aureus* (*prtA* “IgG-binding domain”) sob o controle do promotor GAL1. YCpGAL-RRP43 (ver Tabela 4; Zanchin and Goldfarb, 1999b) foi clivado com BamHI e Sall para liberação do fragmento de *RRP43*, e o fragmento correspondente ao vetor YCp33-GAL-PrtA foi purificado de gel de agarose e ligado aos produtos de PCR das ORFs: *RRP46*, *YHR034C* e *EF2* com os sítios BamHI e XhoI. Estas ORFs foram inseridas “downstream” da sequência de PrtA, gerando-se desta maneira os plasmídeos YC33GAL-AP46, YC33GAL-A137 e YC33GAL-AEF2 respectivamente. Todas as sequências originadas por PCR foram verificadas por análises de restrição e sequenciamento “upstream” do sítio de ligação.

O DNA foi ligado segundo Sambrook et al., (1989) a 16°C por pelo menos 12 horas com a enzima T₄ ligase e o tampão apropriado (Boehringer, Mannheim).

2.11. Transformação de bactéria

2.11.1. 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 ressuspensas em 0,1 M de CaCl₂ gelado. 50 ng de DNA

plasmidial exógeno foi adicionado à suspensão de células, que foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 minutos. Posteriormente, as células transformantes foram plaqueadas em meio seletivo (LB-Amp).

2.11.2.Eletroporação. Segundo Dower et al. (1988). Uma cultura de bactérias crescendo a 37°C até uma OD₆₀₀ de 0,6 foram concentradas e conservadas 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.

2.12.Transformação de levedura

2.12.1.Transformação com acetato de lítio e DNA carreador. 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. Estas células foram concentradas e ressuspensas em TE contendo 0,1 M de acetato de lítio e a estas foi adicionado 2 µg de DNA plasmidial, 200 ng de Salmon Sperm DNA (*Gibco*) e uma solução de PEG/LiOAc/TE (ver soluções). A mistura de células e DNA foi incubada a 30°C por 30 minutos e em seguida submetida a um choque térmico a 42°C por 15 minutos, para posteriormente ser plaqueada em meio seletivo e incubada a 30°C.

2.12.2.Transformação com acetato de lítio e DTT. Como descrito em Chen et al, 1992, 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 (0,2 M acetato de lítio, 50% PEG, 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.

2.12.3.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 esteril 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 200 Ω .

2.13. Análise de restrição

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactéria foram clivados com as enzimas de restrição respectivas e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% à uma voltagem de 100 volts.

2.14. Extração de fragmentos de DNA de gel de agarose

Após a eletroforese das amostras de DNA a 100 V em gel de agarose, os fragmentos de DNA 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.

2.15. 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", elongação a 60°C por 4') 40 ciclos. Os primers usados nas reações de seqüenciamento estão demonstrados na Tabela 5.

2.16. Seleção de clones através do sistema “two hybrid”

Para esta seleção foi usado o método de “two hybrid” (Vojtek and Hollenberg, 1995) mediante o qual analisa-se a interação de duas proteínas in vivo em levedura. 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 (Figura 2). Os plasmídeos construídos para codificar as duas proteínas híbridas foram o pBTM-116 (Tabela 3; Bartel et al., 1993) e o pACT (Durfee et al., 1993) e pGAD (James et al., 1996). No pBTM-116 (Bartel et al., 1993) foram clonados os genes

RRP43 e *RRP46* “downstream” da sequência codificadora do “DNA-Binding Domain” de *lexAp* o qual está sob o controle do promotor constitutivo *ADH1*, o “polylinker” encontra-se imediatamente depois do BD e a marca de seleção em levedura é *TRP1*. No *pACT* (Durfee et al., 1993) e *pGAD* (James et al., 1996) o “Activation Domain” (AD, Domínio de ativação) de *GAL4p* está sob o controle do mesmo promotor constitutivo presente em *pBTM*.

No *pGAD* “downstream” da sequência do AD foram clonados todos os genes das subunidades do exossomo. No caso do *pACT*, encontra-se inserida uma biblioteca de cDNAs no sítio de *XhoI* (Figura 3). A biblioteca utilizada foi ATCC 87002 (American Type Culture Collection) com as seguintes especificações:

Genome: *Saccharomyces cerevisiae*.

Tamanho dos insertos: até 7,6 kb.

Sítio de restrição utilizado no vetor: *XhoI* T-filled.

Número de recombinantes independentes: $1,0 \times 10^8$.

Não recombinantes (%): 5,0

Titulação: $1,20 \times 10^9$ pfu/mL

Para conversão a plasmídeo foi utilizada a cepa de *E. coli* BNN132 (ATCC 47059), construída pela ligação de cDNAs a adaptadores e inserção em sítios T-filled *XhoI* de *lambdaACT* (Elledge et al., 1991).

2.17. Teste de Atividade de β -Galactosidase

2.17.1. 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 com nitrogênio líquido por 30 segundos. Depois, as membranas foram colocadas em Buffer Z contendo X-gal (500 μ g/mL) e incubadas a 37° C até o aparecimento de cor, por um período máximo de duas horas.

2.17.2. 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 tampão fosfato 100 mM; ver soluções) 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:

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

2.18.Preparação de extrato celular e co-imunoprecipitação

A cepa de levedura YCO43, a qual expressa His-Rrp43p, foi transformada com os plasmídeos YC33GAL-AP46, YC33GAL-A137 e YC33GAL-AEF2 originando as seguintes novas cepas YCO43A46 que expressa as proteínas de fusão His-Rrp43p e PrtA-Rrp46p; YCO43A137 que expressa His-Rrp43p e PrtA-137p e YCO43AEF2 que expressa His-Rrp43p e PrtA-EF2p. Estas células foram inoculadas em meio YNB-Gal (contendo marcadores auxotróficos adenina, histidina e triptofano) e incubadas a 30° C por 18 horas até atingir uma OD₆₀₀ de 1,0-1,5. Imediatamente depois, as culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados ressuspensos em uma solução de TST (50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween) contendo os inibidores de proteases 100 μ M de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 0,7 μ g/mL de pepstatina, 100 μ g/mL de TLCK, 0,5 μ g/mL de leupeptina e 2 μ g/mL de aprotinina. As células em suspensão foram lisadas com “glass beads” em vortex, e os extratos celulares obtidos foram incubados com IgG-sepharose (*Pharmacia*) por pelo menos uma hora a 4°C. Após esse tempo, as suspensões (extratos celulares mais resina) foram colocadas em minicolunas (*BioRad*) e uma primeira fração de cada, correspondente ao “flow through” foi coletada. As colunas foram então submetidas a diferentes lavagens com tampão TST e com 5 mM de acetato de amônio pH 5,0 para retirar excesso de proteínas ligadas inespecificamente à coluna. A eluição de proteínas ligadas fortemente à coluna IgG foi feita com 0,5 M de ácido acético pH 3,4.

2.19.SDS-PAGE

Os extratos protéicos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo protocolo em Sambrook et al., (1989).

2.20.Western Blotting

Após eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (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 (*Pharmacia*) 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-mouse ECL, *Pharmacia*) 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 (*Pharmacia*) 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.

3.1. Seleção de proteínas que interagem com a proteína Rrp43p

Para a identificação de proteínas interagindo com a Rrp43p, iniciamos o “two hybrid” usando como “bait” (isca) esta subunidade exossômica. Para tanto, foram usadas duas proteínas híbridas recombinantes, um híbrido contendo o domínio de união ao DNA (“DNA-binding Domain”-BD) de LexAp fusionado com a proteína Rrp43p; e outra proteína de fusão constituída pelo domínio de ativação (“Activation Domain”-AD) de Gal4p fusionado a uma biblioteca de *S. cerevisiae* de cDNAs.

Estes dois híbridos foram expressos por dois plasmídeos na levedura L40 e a interação entre as duas proteínas híbridas ativa a transcrição dos genes repórteres (Figura 2).

A cepa de levedura *S. cerevisiae* L40 contém em seu genoma dois genes repórteres *HIS3* e *lacZ*, cuja expressão é controlada pelo promotor *Gall*, que neste caso contém seqüências de união da proteína LexAp bacteriana (“LexA-binding sites”). A cepa L40 só é capaz de crescer em meio sem histidina, e de expressar *lacZ*, quando as duas proteínas híbridas codificadas pelos plasmídeos interagirem, ativando os promotores (ver genótipo na Tabela 3).

A seqüência codificadora da proteína Rrp43p foi inserida no plasmídeo pBTM-116 e posteriormente este plasmídeo foi transformado segundo Chen et al., (1992) na cepa L40 de *S. cerevisiae*. A cepa resultante, L40/pBTM-RRP43, foi então transformada segundo Sherman et al. (1986) com o plasmídeo pACT-cDNA library (ATCC 87002; especificações da Biblioteca de cDNA em Material e Métodos). Este segundo método (Sherman et al., 1986) foi utilizado para a transformação de leveduras com a biblioteca de cDNAs porque tem maior eficiência.

Foram realizadas cinco transformações com a biblioteca de cDNAs, resultando em 450 colônias que cresceram em um meio que carece de histidina. O crescimento em placas sem histidina só é possível quando as duas proteínas de fusão interagem, ativando a transcrição de *HIS3*. Estes clones His⁺ foram testados com um segundo gene repórter, *lacZ*. Para este teste, as células foram lisadas por um tratamento com nitrogênio líquido e foram colocadas em uma solução contendo X-Gal, os clones contendo proteínas de fusão que interagem entre si, expressam β -Gal e resultam em aparecimento de coloração azul na presença de X-Gal.

Dos 450 clones que demonstraram expressão da *HIS3*, 28 foram positivas também para *lacZ* (Figura 4), e estes foram submetidos à análise subsequente. O DNA plasmidial foi extraído destes clones positivos pelo método mencionado em Material e Métodos e transferido por transformação com CaCl_2 e/ou electroporação na bactéria HB101, e plaqueadas em meio mínimo M9 com ampicilina e prolina para seleção do plasmídeo pACT, o qual contém a biblioteca de cDNAs. HB101 tem uma mutação no gene *leuB*, o qual pode ser parcialmente complementado pelo gene *LEU2* de levedura que está contido no pACT, e não no pBTM. As bactérias que contêm o pBTM crescem mais lentamente em meio mínimo, possibilitando uma seleção de clones de bactéria contendo o plasmídeo pACT. Extraíu-se o DNA plasmidial a partir de HB101 e submeteu-se a uma análise com a enzima de restrição EcoRV, o que nos permitiu observar diferentes padrões entre pBTM e pACT no gel de electroforese (Figura 5). O plasmídeo pBTM-RRP43 tem 6,7 kb e 2 sítios de clivagem de EcoRV (1 sítio dentro do gene *RRP43*), enquanto que o plasmídeo pACT tem 7,65 kb e 1 sítio de clivagem de EcoRV. Os clones de cDNA inseridos no pACT resultariam em diferentes padrões de clivagem, quando comparados com pBTM-RRP43 que resultava em duas bandas, uma de 4,6 kb e outra de 2,1 kb. Clones de pACT identificados pela análise de restrição foram retransformados em L40/pBTM-RRP43. Doze desses clones tiveram confirmada a expressão dos genes repórteres.

Na identificação dos clones positivos os DNAs plasmidiais de pACT-cDNA foram seqüenciados usando o kit ABI PRISM® (PERKIN ELMER) com um primer correspondente à seqüência de ativação (Gal Activation Domain), que se encontra “upstream” da inserção dos cDNAs. Cada clone foi confrontado pelo programa BLAST do Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>; SGD), o qual nos entregou coordenadas cromossomais (número de cromossomo, fita codificadora e posição), ORF e nome do gene; informação adicional da ORF foi extraído do Yeast Protein Database (YPD; <http://www.proteome.com>). O resultado é demonstrado na Tabela 6.

Figura 4. Seleção de Proteínas interagindo com a Rrp43p. Das 450 colônias obtidas em uma seleção preliminar de crescimento em placas carecendo de histidina, 28 clones mostraram-se positivos no teste da β -Galactosidase. Controles são indicados Nip7p-Rrp43p (interação fraca); Nip7p-Nop8p (interação forte); Rrp43p (controle negativo) .

Figura 5. Seleção de plasmídeos pACT de pBTM por análise de restrição com EcoRV. Clones contendo pACT estão marcados com setas **1.**153.8,183.2 **2.**163.11,163.12 **3.**137.42 **4.**153.2,153.6 **5.**153.2,166.2

Clone	ORF	Início	Fim	Cromossomo	Cadeia	Descrição do locus
118	YGR253C	998353	999135	VII	C	Subunidade de Proteossomo
137	YHR034C	176956	177990	VIII	C	ORF Hipotética
153-166 183	YNL039W	555044	556828	XIV	W	SubUnidade 90 kD de TFIIIB
163	YGR095C	675665	676435	VII	C	Rrp46p Exonuclease Componente do Exossomo
157-164-177 203-204	YDR385W	1243219	1245747	IV	W	Fator de Elongação de Tradução 2 (eEF2)
331	YPR191W	919376	920482	XVI	W	Subunidade 40 kD Ubiquinol Cyt Reduct

Tabela 6. Clones positivos obtidos no "Two Hybrid" confrontados com o Saccharomyces Genome Database.

A Rrp43p usada como “isca” no sistema “two hybrid” interagiu positivamente com 12 proteínas obtidas em diferentes transformações, em um total de aproximadamente 5×10^6 clones testados, das quais consideramos três genes relevantes para um estudo mais aprofundado: *RRP46*, *YHR034C* e *eEF2* (Figura 6).

Foram considerados mais relevantes porque a proteína Rrp46p, também uma subunidade do exossomo, além de um resultado inédito, funcionou como controle positivo do sistema. Apesar da interação entre Rrp43p e eEF2p (fator de alongação de tradução 2) ser aparentemente improvável, cinco clones de *EF2* foram isolados de diferentes transformações. Importante salientar também ter sido encontrada uma ORF hipotética de *S. cerevisiae* (*YHR034C*), com homologia a um gene humano e de *Drosophila melanogaster*, os dois com função também desconhecida. A proteína codificada pelo gene *YHR034C* foi aqui denominada 137p. Esses clones foram portanto escolhidos para análise subsequente.

3.2. Interação entre as proteínas Rrp43p e Rrp46p

Uma interação importante encontrada neste “screening” foi da Rrp43p com outra proteína componente do exossomo em *S. cerevisiae*, a Rrp46p, uma exoribonuclease que tem homologia a RNase PH de bactéria (Mitchell et al., 1997) e hRrp46p em humanos (Allmang et al., 1999b). A interação encontrada entre estas duas proteínas não tinha sido detectada ainda e provou ser tão forte como os controles usados com interações já confirmadas como Nip7p $\leftrightarrow$ Nop8p e Nip7p $\leftrightarrow$ Rrp43p (Zanchin and Goldfarb, 1999b; Figura 6). No início do “screening” esperávamos obter pelo menos um clone de uma das subunidades do exossomo, complexo do qual Rrp43p faz parte, mas não se sabia com qual das subunidades Rrp43p interagiria.

Figura 6. Análise de interação por “two hybrid” entre Rrp43p e clones da biblioteca de cDNA. Cepa L40/pBTM-RRP43 foi transformada com uma biblioteca pACT-cDNA e a interação entre as proteínas foi testada pelo método do two-hybrid, tanto por análise de crescimento na ausência de histidina, como pela atividade de lacZ. **A.** Esquema de “two hybrid”. **B.** Teste de Crescimento em meio sem Histidina. **C.** Teste de X-Gal. 1.Nip7p-Nop8p; 2.Nip7p-Rrp43p; 3.Rrp43p; 4.Rrp43p-Rrp46p; 5.Rrp43p-137p(YHR034C); 6.Rrp43p-eEF2.

Determinação de regiões de interação entre a Rrp43p e a Rrp46p

Para a análise mais detalhada da interação entre estas duas proteínas foram usados mutantes tanto em Rrp43p como em Rrp46p.

3.2.1. Mutantes de deleção *rrp46*. Para identificar quais são as regiões ou domínios pertencentes à Rrp46p que interagem com a Rrp43p, foram usados mutantes de deleção contendo as seqüências codificadoras das regiões separadas tanto amino-terminal (1-177 aminoácidos) e carboxi-terminal (178-257) da proteína Rrp46p. Dentro do plasmídeo pGADC foram clonadas estas duas regiões (os sítios de restrição para cada seqüência têm diferentes pautas de leitura), obtendo pGADC₃-RRP46.0,5 e pGADC₁-RRP46.0,2. Estes plasmídeos foram transformados em L40/pBTM-RRP43 e análise por "two hybrid", usando o teste de crescimento em meio sem histidina e o teste da β -Galactosidase não foi observada interação entre a Rrp43p e estas regiões (Figura 7). Estes dados preliminares indicam que a interação requer a região central da proteína Rrp46p.

3.2.2. Mutantes termo-sensíveis *rrp43*. Análise semelhante foi efetuada para a determinação de regiões de Rrp43p importantes para a interação com Rrp46p, a cepa L40/pGAD-RRP46 foi transformada com mutantes fusionados com o BDlexAp. Para isso foram utilizados mutantes termosensíveis do gene *RRP43* obtidos em nosso laboratório (Oliveira et al., 2001). As mutações da Rrp43p encontram-se localizadas na parte central da proteína: *rrp43-1* (211 Val→Ala), *rrp43-2* (230 Cys→Tyr, 274 Ile→Ter, 276 Cys→Tyr) e *rrp43-3* (162 Ser→Phe, 246 Ala→Thr), e estas afetam a interação com a Rrp46p. Isto indicaria que a região central da Rrp43p é importante para a interação com a Rrp46p, uma vez mutada essa região, a proteína é incapaz de obter uma conformação ativa (Figura 8). O controle negativo (BDlexAp⇌ADGal4-Rrp46p) mostrou uma pequena interação que não foi vista no controle negativo adicional (vazio⇌ADGal4-Rrp46p). Possivelmente a conformação do BD de lexAp (sem fusão) favorece a interação com o ADGal4-Rrp46p, e desta maneira a transcrição dos genes repórteres é ativada, mas em níveis muito mais baixos que no caso de BDlexA-Rrp43p⇌ADGal4-Rrp46p.

Figura 7. Determinação de regiões da Rrp46p que interagem com a Rrp43p. Mutantes de deleção de Rrp46p foram clonados no pGAD e inseridos na cepa L40/pBTM-RRP43 para o teste de “two hybrid”. **A.** Mapa de deleção dos mutantes. **B.** Teste de crescimento em meio sem histidina. **C.** Teste de X-Gal. **1.** Rrp43p - rrp46p.0,2. **2.** Rrp43p- rrp46p.0,5. **3.** Rrp43p-Vetor vazio (Negativo). **4.** Nip7p-Rrp43p. **5.** Nip7p-Nop8p. **6.** Rrp43p-Rrp46p.

Figura 8. Análise de interação por “two hybrid” entre os mutantes de *RRP43* termo-sensíveis e Rrp46p. **A.** Posições dos aminoácidos mutados em *rrp43*. **B.** Teste de crescimento em meio sem histidina **C.** Teste da β -Galactosidase. **Rrp46p-BD:** Controle negativo ADRrp46p $\leftrightarrow$ BDlexAp. **Rrp46y:** Controle negativo ADRrp46p $\leftrightarrow$ vazio.

3.3.Interação da Rrp43p com proteínas do exossomo

Concomitantemente, o sistema “two hybrid” foi utilizado também para estudar em maior detalhe a organização do exossomo. Mediante este sistema a proteína Rrp43p foi confrontada com os demais componentes do complexo, o que nos permitiria saber como as subunidades do complexo estão relacionadas.

As ORFs dos componentes do exossomo foram amplificadas por PCR e inseridas no vetor pGAD, desta maneira os plasmídeos resultantes expressaram os híbridos contendo o “activation domain” de Gal4p: ADGal4-Rrp4p, ADGal4-Rrp40p, ADGal4-Rrp41p, ADGal4-Rrp42p, ADGal4-Rrp44p, ADGal4-Rrp45p, ADGal4-Rrp46p, ADGal4-Csl4p, ADGal4-Mtr3p e ADGal4-Rrp6p. Estes plasmídeos posteriormente foram transformados na levedura L40/pBTM-RRP43.

Usando os mesmos genes repórteres, a Rrp43p confirmou a interação com a subunidade Rrp46p já antes observada no nosso “screening” com a biblioteca de cDNAs. Observou-se também que as outras proteínas do exossomo não mostraram interação com a Rrp43p no teste de crescimento em meio sem histidina e de expressão de β -Galactosidase usando X-Gal (Figura 9). Os níveis de expressão também foram analisados usando o teste de ONPG, utilizado para a quantificação da atividade de β -Galactosidase (Figura 10).

Figura 9. Análise de interação entre Rrp43p e os outros componentes do exossomo. **A.** Esquema do “two hybrid” com a Rrp43p. **B.** Teste da β -Galactosidase. **C.** Teste de crescimento em meio sem histidina.

Interações no "two hybrid"	Atividade de LacZ
Nop8-Nip7	0,441
Nip7-Rrp43	0,037
Rrp43-	0,007
Rrp43-Rrp4	0,016
Rrp43-Rrp40	0,013
Rrp43-Rrp41	0,014
Rrp43-Rrp42	0,012
Rrp43-Rrp44	0,016
Rrp43-Rrp45	0,014
Rrp43-Rrp46	0,313

Figura 10. Análise de atividade da β -Galactosidase usando ONPG.

3.4.Rrp46p e o complexo exossomo

Colocando a ORF *RRP46* no pBTM-116 testou-se interação entre Rrp46p e as outras subunidades do exossomo. A Rrp46p não mostrou ter interação com os outros componentes do exossomo, mas unicamente com a Rrp43p (Figura 11).

Normalmente, para confirmação dos dados obtidos no sistema de "two hybrid", são realizadas clonagens para obtenção das proteínas com as fusões inversas. Para isso, os domínios de união e ativação foram clonados de tal maneira que a ORF *RRP46* foi inserida no plasmídeo pBTM-116 e a ORF *RRP43* no pACT: pACT-RRP43 (Zanchin and Goldfarb, 1999b), resultando na expressão dos híbridos BDlexA-Rrp46p e ADGal4-Rrp43p. A cepa de levedura L40/pBTM-RRP46/pACT-RRP43 expressando essas proteínas de fusão demonstrou ser positiva para os testes com os genes repórteres com a mesma intensidade (Figura 11).

Através dos dados aqui obtidos demonstramos que Rrp43p interage *in vivo* com Rrp46p independentemente dos domínios de ligação ao DNA (BD), ou de ativação da transcrição (AD) utilizados.

Figura 11. Análise de interação entre Rrp46p e os outros componentes do exossomo. **A.** Esquema do “two hybrid” com a Rrp46p. **B.** Teste de Xgal. **C.** Teste de crescimento em meio sem histidina. 1.Rrp46-Rrp4. 2.Rrp46-Rrp40. 3.Rrp46-Rrp41. 4.Rrp46-Rrp42. 5.Rrp46-Rrp43. 6.Rrp46-Rrp44. 7.Rrp46-Rrp45. 8.Rrp46-Csl4. 9.Rrp46-Mtr3. 10.Rrp46-Rrp6. 11.Controle positivo de interação: Rrp43-Rrp46. (++) . Nip7p-Nop8 (+). Nip7-Rrp43 (-). Rrp46-Vetor vazio.

3.5. Interação da Rrp43p e eEF2p

Foram isolados cinco clones de eEF2 (fator de alongação de tradução) que demonstraram interação com a Rrp43p no "two hybrid", estes clones codificam parcialmente o cDNA correspondente a ~1000 nucleotídeos da porção 3' da ORF (a ORF completa do *eEF2* tem 2,2 kb). Como o exossomo está envolvido em processamento de RNA e eEF2 é um fator de alongação de tradução, a interação entre Rrp43p e eEF2 nos pareceu de difícil visualização no limite atual do conhecimento de suas funções na célula. No entanto, o número de clones obtidos na biblioteca de cDNAs e a força de interação medida pelo nível de expressão dos genes repórteres nos impulsionou a estudar em maior detalhe essa possível interação. Para isso, o fragmento de DNA correspondendo ao gene completo de eEF2 foi amplificado por PCR e clonado no pGADC. Caso essas duas proteínas realmente interagissem, e desde que eEF2p completo foi clonado em fusão com o domínio de ativação de Gal4p (o mesmo dos clones obtidos na biblioteca de cDNAs), a expressão dos genes repórteres deveria ser observada. Entretanto, ADGal4-eEF2p completa não mais interagiu com BDlexA-Rrp43p (dados não mostrados). A análise de interação entre essas proteínas por co-imunoprecipitação também não foi confirmada (ver mais adiante).

3.6. Interação de Rrp43p com 137p

Como descrito acima, também obtivemos uma interação com uma proteína codificada pela ORF *YHR034C* (ORF137) cuja função é desconhecida, mas que tem homologia com hipotéticas proteínas em *Drosophila melanogaster* e de humanos. A proteína de *Drosophila* tem um grau de similaridade de 42% e de identidade de 31% com a região amino-terminal da proteína 137p (117 aminoácidos), esta mesma região demonstrou uma similaridade de 50% e uma identidade de 32% com a proteína humana (<http://www.proteome.com/databases/YPD/blastsw>). Alinhamento mostrado na figura 12.

A interação da proteína codificada por este gene provou ter uma interação fraca com a Rrp43p (Figura 13). Entretanto, apesar de fraca, a interação foi confirmada depois da retransformação de L40/pBTM-RRP43 com o plasmídeo pACT-137.

No projeto YPD (Yeast Proteoma Database), foi detectada a interação através de "two hybrid" da proteína 137p com uma Sm-like proteína, Lsm8p, a qual esta envolvida no "splicing" de pré-mRNA através da sua associação ao U6 snRNA (Tharun et al., 2000).

Homologo em humanos137p(YHR034C) *S. cerevisiae***Homologo em *D. melanogaster***

TQIQPQPGFCIKTNxxSSEGxxxxxxxxxxKVFINIxxCHSPSIPPPAxDVTE
 ++I+P F IKT S G KVFIN+ CHSP P P D
 SKIEPIADFVIKTKLLSANGPEKLQDGRxKVFINVxxCHSPLVPKPEVDENA
 I P IKT L DG K FINI C PK EV +
 IHPKPGFVIKTALxxxxxxxxxxDGELKCFINIASCEEIQRPKNEVATDP

EELLQMLEEDQFRIPMSLGEPHAELDAKGQGCTAYDVAVNSDFYRRMQNSD
 + ++ ++++ IP+ + D KGQ C +D +NSD R + +
 RIVFPLIIQNEWEIPIITSCYRMDHDKKGQECYVWDCCINSDCSRWICDDI
 + W IP+ + R D D K C V+D + D +
 SSGSRGLSxxxWSIPMAQTTSRDDFDAKNNHCKVFDVVFHPPDALHLAMRNK

FLRExLVITIAREGLEDKYNLQLNPEWRMMKNRPFMGSIQQNIRSEQRPRI
 LRE +LV E E
 QLRExILVEWCLESCEIRDSVVLCDRIAFFPKMKKKGAELPALEVLNDELHQ
 Q R L++ L++ E V L R + FPK+ KG P +
 QFRQCLIDTAxLDAIEREYKVSLDRANLKF PKLDYKGIPRPTVIRKMADNP

Figura 12. Alinhamento multiple do gene de *Saccharomyces cerevisiae* YHR034C (137p) com outras proteínas hipotéticas em humanos e *D. melanogaster*.

Figura 13. Teste de interação entre Rrp43p e 137p através de Ensaio da atividade da β -Galactosidase e de crescimento em placas sem histidina.

A identificação desta proteína demonstra que o exossomo interage com outras proteínas na célula, algumas ainda não identificadas. O estudo da função da 137p poderá demonstrar a importância dessa interação.

3.7.Co-imunoprecipitação da Rrp43p com as proteínas obtidas no “two hybrid”

Um dos métodos mais usados para a confirmação de resultados obtidos pelo sistema de “two hybrid” é a co-imunoprecipitação, a qual analisa a interação de duas ou mais proteínas *in vitro*. Para analisar as interações encontradas de Rrp43p com as proteínas Rrp46p, 137p e eEF2p foram utilizadas as cepas de *S. cerevisiae* YCO43A46 (que expressa His-Rrp43p e PrtA-Rrp46p), YCO43A137 (que expressa His-Rrp43p e PrtA-137p) e YCO43AEF2 (que expressa His-Rrp43p e PrtA-EF2p) (ver Tabela 2). Os extratos celulares destas três cepas foram passados através de uma coluna de Sepharose IgG (Pharmacia) e as proteínas ligadas à coluna foram submetidas a um SDS-PAGE e analisadas mediante um Western Blotting, usando o anticorpo anti-His (Pharmacia).

À coluna de IgG, ligaram-se as proteínas de fusão PrtA-Rrp46p e PrtA-137p. PrtA-EF2p não foi detectada nesse ensaio (Fig 14A). Como controle positivo de ligação à coluna de IgG, foi utilizado um extrato de células expressando PrtA-Rrp43p, que ligou à coluna. Como controle negativo, foi utilizado um extrato da cepa W303, que não expressa nenhuma dessas proteínas de fusão. His-Rrp43p interagindo com quaisquer das proteínas de fusão com PrtA, PrtA-Rrp46p, PrtA-137p e PrtA-EF2p, seria co-imunoprecipitada e identificada com anticorpo anti-His. His-Rrp43p só foi co-imunoprecipitada com PrtA-137p (Figura 14B). Esses dados confirmaram a interação entre Rrp43p e 137p.

PrtA-Rrp46p e His-Rrp43p não interagiram, o que pode ser devido a alguma mudança de conformação dessas proteínas, já que ambas fazem parte do mesmo complexo e interagiram no “two hybrid” nas duas fusões (“DNA binding domain”/“Activation domain”). Enquanto que a co-imunoprecipitação confirmou a interação entre 137p e a Rrp43p.

Figura 14. A. Imunoblot com anticorpo anti-coelho para detectar proteínas de fusão com ProtA que ligaram à coluna de IgG. **B.** Imunoblot com anticorpo anti-His para detecção de His-Rrp43p e análise de interação. Como demonstrado, unicamente 137p coimunoprecipitou com Rrp43p **FT**. “Flow through”; **EL**. Eluição; **1**. FT; **2,3**. Lavagens; **4,5**. Eluições.

A ORF *RRP43*, subunidade do complexo exossomo, foi clonada no vetor pBTM para produzir o híbrido BDlexA-Rrp43p. Este híbrido foi confrontado na levedura L40 com uma biblioteca de cDNAs, obtendo nesta análise de “two hybrid” três interações significativas. A Rrp43p interagiu positivamente com as proteínas: Rrp46p, subunidade do exossomo, eEF2, fator de tradução e 137p, codificada por uma ORF hipotética (*YHR034C*).

As transformações foram selecionadas diretamente para a expressão do primeiro gene repórter (*HIS3*), resultando em 450 clones crescendo em meio sem histidina, e confirmando 28 com o repórter *lacZ*. Nestes estudos de “two hybrid”, o uso de dois genes repórteres sob o controle de um mesmo promotor em diferentes lugares do genoma permite eliminar muitos falsos positivos e o gene *lacZ* oferece uma grande vantagem, já que a atividade de β -Galactosidase precisa de um alto nível de expressão para ser positiva, diferentemente de *HIS3*.

Para examinar as interações encontradas, os clones (contidos no pACT) que resultaram positivos com os repórteres *HIS3* e *lacZ* foram retransformados na L40/pBTM-RRP43, já que é provável que em algumas transformações, ingresse mais de um pACT, e só um deles expresse a proteína correta. A Rrp43p confirmou a interação com 12 clones, os quais foram seqüenciados e identificados pelo BLAST do *Saccharomyces Genome Database*. Algumas interações obtidas neste estudo, foram consideradas como inespecíficas, por formar parte de um grupo de proteínas freqüentemente encontradas no “two hybrid” independentemente do “bait” usado, como por exemplo citocromo oxidase, proteínas ribossomais, “heat shock proteins”, fatores de transcrição e subunidades de proteossoma (van Crielinge and Beyaert, 1999). Entretanto, seria necessário checar em outros estudos se estas interações com a Rrp43p são realmente inespecíficas. Estes dados são demonstrados na Tabela 6.

Como mencionado acima, o cDNA *RRP46* foi obtido no “two hybrid” através de um “screening” de uma biblioteca de cDNAs. Para confirmar esta interação a ORF *RRP46* amplificada por PCR foi clonada no pGADC₂ e o híbrido ADGal4-Rrp46p expresso interagiu positivamente com a proteína BDlexA-Rrp43p no mesmo sistema.

A interação entre estas duas subunidades do exossomo é um resultado inédito em relação à interação entre componentes deste complexo. A quantificação da força dessa

interação através do nível de expressão dos genes repórteres, é condizente com o fato de essas duas proteínas formarem parte de um complexo.

Adicionalmente, estudos de regiões de interação Rrp43 $\leftrightarrow$ Rrp46 realizados em "two hybrid" foram feitos usando mutantes em cada uma das duas proteínas. Analisando mutantes de deleção amino e carboxi terminal da Rrp46p foi demonstrado que esta precisa da região central para que a interação com a Rrp43p aconteça. A região amino-terminal de Rrp46p tem homologia com Ribonuclease PH-like protein de *C. elegans*, enquanto a porção carboxi-terminal tem homologia com poliribonucleotídeo nucleotidiltransferase de *E. coli*. Esses dois domínios de Rrp46p não são suficientes para interação com Rrp43p. Mutações na Rrp43p, resultaram mais sensíveis, já que ocorrendo mesmo a alteração de um único aminoácido a interação foi abolida (as mutações pontuais estavam situadas na parte central da proteína). Através dos dados demonstrados aqui, pode-se lançar a hipótese de que as regiões centrais das duas proteínas, Rrp43p e Rrp46p, são as partes envolvidas na interação entre elas. O papel dessa interação na função de cada uma só poderá ser elucidado uma vez que a atividade específica delas seja caracterizada.

A proteína Rrp43p, foi confrontada com as subunidades do complexo exossomo para a análise de interação através de "two hybrid", mas única interação positiva encontrada foi a já descrita com a Rrp46p, também isolada na biblioteca de cDNAs. A partir desses resultados, poderia ser lançada a hipótese de que Rrp43p interage com o exossomo através de Rrp46p. Para validarmos essa hipótese, e ainda, com a intenção de caracterizar as interações inter-subunidades do exossomo, foram realizadas análises de interação no "two hybrid" com a proteína de fusão BDlexA-Rrp46p. Nenhum componente exossômico demonstrou interação, além de ADGal4-Rrp43p, que ocorreu com a mesma intensidade das proteínas de fusão inversas (BDlexA-Rrp43p $\leftrightarrow$ ADGal4-Rrp46p), caracterizando essa interação como independente das fusões com domínios de outras proteínas. Para a determinação das outras interações entre as subunidades do exossomo, entretanto, serão necessárias análises posteriores, já que, provavelmente, uma ou mais das subunidades não devem ter sua conformação nativa em fusão com ADGal4p, pois em levedura, tanto Rrp43p, como Rrp46p fazem parte do complexo do exossomo como um todo, e não formam um sub-complexo entre essas duas proteínas.

Os resultados obtidos são bastante importantes, já que nos permitem ter um conhecimento preliminar na estrutura do complexo exossomo. Estes resultados confirmaram a interação Rrp43p $\leftrightarrow$ Rrp46p, mas seria necessária a confirmação dos resultados com os híbridos restantes produzidos, já que a estrutura da proteína nativa possivelmente foi modificada e isso impediu uma interação correta. Uma alternativa seria clonar domínios (“activation” ou “binding”) no carboxi-terminal da proteína de interesse ou usar domínios com outras características presentes em outros vetores de “two hybrid”.

Ainda neste mesmo “screening” com a biblioteca de cDNAs foi encontrada a interação da Rrp43p com eEF2p. Apesar de esta ser uma interação pouco provável, o número de clones (cinco) pegos no “two hybrid” nos impulsou a confirmar a interação com o gene completo (o cDNA obtido codifica só a porção C-terminal desta proteína). O resultado obtido não foi confirmado com a proteína completa na co-imunoprecipitação, nem usando o mesmo sistema de “two hybrid”. Com base nesses resultados, é bastante provável que a interação entre Rrp43p e eEF2 não ocorra na célula, mas seja somente um artefato da técnica, já que somente uma porção da proteína interage com Rrp43p, mas não a proteína inteira.

A Rrp43p mostrou interação com uma proteína codificada pelo gene *YHR034C*, 137p, com alta homologia em humanos e *D. melanogaster*, mas com função ainda desconhecida. A interação encontrada no “two hybrid” entre a Rrp43p e 137p foi claramente confirmada na co-imunoprecipitação feita usando proteínas de fusão diferentes. No “two-hybrid” foram BDlexA-Rrp43p $\leftrightarrow$ ADGal4-137p, e na co-imunoprecipitação, His-Rrp43p $\leftrightarrow$ PrtA-137p. Apesar de a interação entre Rrp43p $\leftrightarrow$ 137p ser fraca no “two hybrid”, sua confirmação por co-imunoprecipitação indica que essa interação seja transiente na célula, mas provavelmente específica.

Em outros estudos de “two hybrid” a 137p interage com Lsm8p, uma proteína envolvida no “splicing” através da sua interação com o snRNA U6. A interação entre Rrp43p e 137p poderá ser importante para o conhecimento de outros processos nos quais Rrp43p está envolvida, assim como o exossomo. Dados recentes obtidos por Tollervey e cols. indicam que o exossomo estaria atuando na degradação de pré-mRNA no núcleo

(mRNA que não sofreu “splicing”) (Bousquet-Antonelli et al., 2000). O fato de que 137p interaja com Rrp43p (subunidade exossômica) e com a Lsm8p (subunidade do spliceossomo) suporta a hipótese de que estes dois complexos atuariam juntos em outro processo importante na célula, como é o de degradação de pré-mRNA no núcleo. A regulação da expressão gênica teria um outro ponto de regulação e a 137p possivelmente seria uma das proteínas envolvidas nesta regulação.

Atualmente, a função do exossomo no processamento de rRNA, snRNAs, snoRNAs e degradação de mRNAs já está bem caracterizada, mas o controle dessas funções só será definido quando todos os fatores que interagem com o exossomo tiverem sido identificados. Os dados demonstrados aqui e outros obtidos na literatura, permite-nos uma visão preliminar da estrutura do exossomo e de suas interações na célula (Figura 14).

Figura 15. Interações entre algumas proteínas envolvidas em processamento de RNA determinadas através de “two-hybrid” e/ou co-purificação. Interações de Rrp43p mostradas foram identificadas em nosso laboratório. Na parte delimitada pela linha azul, estão representadas as interações identificadas no projeto proteoma de levedura. Setas sólidas indicam interações no “two-hybrid”. Subunidades do exossomo estão representadas em verde

1. Anderson,J.S.J., and Parker,R.P. (1998). *EMBO J.*, **17**, 1497-1506.
2. Allmang,C., Kuffel,J., Chanfreau,G., Mitchell,P., Petfalski,E., and Tollervey,D. (1999a). *EMBO J.*, **18**, 5399-5410.
3. Allmang,C., Petfalski,E., Podtelejnikov,A., Mann,M., Tollervey,D., and Mitchell,P. (1999b). *Genes Dev.*, **13**, 2148-2158.
4. Allmang,C., Mitchell,P., Petfalski,E, and Tollervey,D. (2000). *Nuc. Acids. Res.*, **28**, 1684-1691.
5. Baker,R.E., Harris,K., and Zhang,K. (1998). *Genetics*, **149**: 73-85.
6. Bartel,P.L., Chien,C.T., Sternglanz,R., and Fields,S. "Cellular interactions in Development: A Practical approach" (D. A. Hartley, ed.), p.153. Oxford University Press, Oxford, 1993.
7. Bartel,P.L., and Fields,S. (1995). *Methods Enzymol.*, **254**: 241-263.
8. Belasco,J., and Brawerman,G. (1993). Control of messenger RNA stability. Academic Press, Inc., New York
9. Birnboim,H.C., and Doly,J.A. (1979). *Nuc Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
10. Bolívar,F., and Backman,K. (1979). *Methods Enzymol.*, **68**: 245.
11. Bousquet-Antonelli,C., Presutti,C., and Tollervey,D. (2000). *Cell*, **102**, 765-775.
12. Briggs,M.W., Burkard,K.T., and Butler,J.S. (1998). *J.Biol.Chem.*, **273**, 13255-13263.
13. Brouwer,R., Allmang,C., Rajmakers,R., van Aarssen,Y., Egberts,W.V., Petfalsky,E., van Venrooij,W.J., Tollervey,D., and Pruijn,G.J.M. (2001). *J.Biol.Chem.*, **276**, 6177-6184.
14. Burkard,K.T., and Butler,J.S. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 604-616
15. Chen,O.C., Yang,B.C., Kuo,T.T. (1992). *Curr. Gen.* **21**, 83-84.
16. Chekanova,J.A., Shaw,R.J., Wills,M.A., and Belostotsky,D.A. (2000). *J.Biol.Chem.*, **275**, 33158-33166.
17. Chien,C.T., Bartel,P.L., Sternglanz,R., and Fields,S. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 9578.
18. Decker,J.C. (1998). *Curr. Biol.* **8**: R238-R240.
19. Dower,W.J., Miller,J.F., and Ragsdale,C.W. (1988). *Nuc. Acids Res.*, **16**: 6127.
20. Durfee,T., Becherer,K., Chen,P.L., Yeh,S.H., Yang,Y., Kilburn,A.E., Lee,W.H., and Elledge,S.J. (1993). *Genes Dev.*, **7**, 555-569.

21. Eichler,D.C., and Craig,N. (1994). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **49**, 179-239.
22. Elela,S.A., Igel,H., and Ares,M.,Jr (1996). *Cell*, **85**, 115-124.
23. Elledge,S.J., Mulligan,J.T., Ramer, S.W., Spottswood ,M., and Davis,R.W. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1731- 1735.
24. Estévez,A., Kempf,T., and Clayton,C. (2001). *EMBO J.*, **20**, 3831-3839.
25. Fields,S., and Song,O. (1989). *Nature*, **340**, 245-246.
26. Fromont-Racine,M., Mayes,A.E., Brunet-Simon,A., Rain,J.C., Colley,A., Dix,I., Decourty,L., Joly,N., Ricard,F., Beggs,J.D., and Legrain,P. (2000). *Yeast* **17**, 95-110.
27. Gietz,R.D., and Sugino,A. (1988). *Gene* **74**, 2, 527-534.
28. Grant,S., Jessee,J., Bloom,F., and Hanahan,D. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**,4645-4649.
29. Hadjiolov,A.A. (1985). *Cell Biology Monographs*. Springer-Verlag, Wien. pp 1-268.
30. Hanahan,D. (1983). *J.Mol.Biol.* **166**, 557.
31. Henry,Y., Wood,H., Morrisey,J.P., Petfalski,E., Kearsey,S., and Tollervey,D. (1994). *EMBO J.* **13**, 2452-2463.
32. Hope,I.A., and Struhl,K. (1986). *Cell*, **46**, 885-894.
33. James,P., Halladay,J., and Craig,E.A. (1996). *Genetics*, **144**: 1425-1436.
34. Keegan,L., Gill,G., and Ptashne,M. (1986). *Science*, **231**, 699-704.
35. Kiss-László,Z., Henry,Y., and Kiss,T. (1998). *EMBO J.*, **17**,797-807.
36. Koonin,E.V., Wolf,Y.I., and Aravind,L. (2001). *Genome Res.*, **11**: 240-252.
37. Kressler,D.,Linder,P.and de La Cruz,J. (1999). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7897- 7912.
38. Lafontaine,D., and Tollervey,D. (1995). *Biochem. Cell. Biol.*, **73**:803-812.
39. Lygerou,Z., Allmang,C., Tollervey,D., and Séraphin,B. (1994). *Science*, **272**, 268-270.
40. Maden,B.E.H. (1990). *Prog. Nucleic. Acids Res.*, **39**, 241-303.
41. Maxwell,E.S., and Fournier,M.J. (1995). *Annu. Rev.Biochem.*, **35**, 897-934.
42. Miller,J.H. (1972). *"Experiments in Molecular Genetics"*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
43. Mitchell,P., Petfalski,E. and Tollervey,D. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 502-513.
44. Mitchell,P., Petfalski,E., Shevchenko,A., Mann,M. and Tollervey,D. (1997). *Cell*, **91**, 457-466.
45. Oliveira,C.C., Gonzales,F.A., and Zanchin,N.I.T. (2001). submetido.

46. Petfalski,E., Dandekar,T., Henry,Y., and Tollervey,D. (1998). *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1181-1189.
47. Rubin,G. (1974). *Eur. J. Biochem.* **41**,197-202.
48. Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). "*Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Laboratory course manual for methods in yeast genetics*". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
49. Sherman,F., Fink,G.R., and Hicks,J.B. (1986). "*Laboratory course manual for methods in yeast genetics*". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
50. Shiomi,T.K., Fukushima,K., Suzuki,N., Nakashima,N., Noguchi,E., and Nishimoto,T. (1998). *J.Biochem.*, **123**, 883-890.
51. Stevens,A., Hsu,C.L., Isham,K.R., Larimer,F.W. (1991). *J. Bacteriol.*, **173**, 7024-7028.
52. Tharun,S., He,W.H., Mayes,A.E., Lennertz,P., Beggs,J.D., and Parker,R. (2000). *Nature*, **404**, 515-518.
53. Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
54. Udem,S.A., and Warner,J.R. (1973). *J.Biol.Chem.* **248**, 1412-1416.
55. van Criekinge,W., and Beyaert,R. (1999). *Biological Procedures Online*, Vol 2, No1, (www.science.uwaterloo.ca/bpo/).
56. van Hoof,A., Lennertz,P., and Parker,R. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 441-452.
57. Venema,J., and Tollervey,D. (1995). *Yeast* **11**, 1629-1650.
58. Venema,J., and Tollervey,D. (1999). *Annu. Rev. Gen.*, **33**, 261-311.
59. Vojtek,A.B., Hollenberg,S.M., and Cooper,J.A. (1993). *Cell*, **74**, 205.
60. Vojtek,A.B., and Hollenberg,S.M. (1995). *Methods in Enzimology*, **255**, 331-342.
61. Vreken P, Raue HA. (1992). *Mol Cell Biol.*, **12**, 2986-2996.
62. Zanchin,N.I.T., and Goldfarb,D.S. (1999a). *Nuc. Acids Res.*, **27**, 1283-1288.
63. Zanchin,N.I.T., and Goldfarb,D.S. (1999b). *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1518-1525.
64. Zervos,A.S., Gyuris,J., and Brent,R. (1993). *Cell*, **72**, 223.