

UNESP

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

Caracterização de mutantes condicionais do  
gene da desoxi-hipusina sintase em  
*Saccharomyces cerevisiae*

***Fábio Carrilho Galvão***

**Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli**

2011

UNESP

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

Caracterização de mutantes condicionais do  
gene da desoxi-hipusina sintase em  
*Saccharomyces cerevisiae*

***Fábio Carrilho Galvão***

**Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli**

Trabalho apresentado à  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
– UNESP, Araraquara, para a Defesa  
de Dissertação, no curso de pós-  
graduação em Biociências e  
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

2011

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

G182c Galvão, Fábio Carrilho  
Caracterização de mutantes condicionais do gene da desoxi-hipusina sintase em *Saccharomyces cerevisiae* / Fábio Carrilho Galvão. – Araraquara, 2011  
72 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia  
Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Desoxi-hipusina sintase. 2. eIF5A. 3. Hipusinação. 4. Biologia molecular. I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, pelo amor, amizade, constante apoio nas decisões por mim tomadas e grande contribuição na minha formação pessoal.*

*Aos meus familiares pelo suporte, incentivo e, acima de tudo, amor incondicional.*

*Aos professores Clelei e Sandro pela orientação que tornou possível a realização deste trabalho e grande contribuição que me fizeram amadurecer como cientista.*

*Aos amigos de laboratório Ana Paula, Camila, Diana, Daniella, Danuza, Eric, Hermano, Juliana, Kdu, Laura, Paulo, Rodolfo, Taís, Tati, Tati Maria, Tuca, Veri pelo convívio, aprendizado diário e contribuições durante a realização deste trabalho.*

*À minha namorada Bruna pelo incentivo, compreensão e carinho com qual sempre me apoiou.*

*Aos todos os amigos pelo companheirismo diário, conversas e felicidade proporcionada em vários momentos da minha vida.*

*As técnicas Danieli, Tamires, Maíara, Bruna, Érika e Sílvia pelo suporte nas atividades laboratoriais.*

*À todos os professores que de alguma forma contribuíram em minha formação.*

*Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas À FCF-UNESP, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.*

*A Deus, pela paz proporcionada em minha vida.*

## 1. RESUMO

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado de arqueas a mamíferos e é essencial para a viabilidade celular. Este fator é a única proteína conhecida que sofre uma modificação pós-traducional única e necessária para a função de eIF5A, em que uma lisina específica é convertida em um resíduo de hipusina pela ação das enzimas desoxi-hipusina sintase (Dys1) e desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1). Inicialmente, eIF5A foi relacionada à etapa do início da tradução, porém, dados recentes sugerem a sua atuação na etapa de alongação ao invés de início. No entanto, além do fato de a função específica de eIF5A na célula não ser conhecida, o papel da hipusinação para o funcionamento de eIF5A também não é conhecido. Diante disso, o objetivo deste trabalho é caracterizar mutantes condicionais para o gene da desoxi-hipusina sintase e, dessa forma, contribuir para o entendimento não só da função da hipusinação sobre eIF5A, mas também para o entendimento da função específica de eIF5A na célula. Para isso, foram iniciadas análises de caracterização fenotípica com os alelos *dys1*<sup>Δ1-28</sup> e *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup> (*dys1-1*). Inicialmente, foi realizada a subclonagem do alelo *dys1*<sup>Δ1-28</sup>, uma vez que, por ter sido identificado em um rastreamento de duplo-híbrido, este alelo estava em fusão com a região codificadora do domínio de ativação de Gal4. Porém, após realização da subclonagem, ou seja, quando na ausência do domínio de ativação, este alelo não apresentou o fenótipo condicional de crescimento inicialmente observado. Portanto, o mutante se tornou impróprio para a realização dos ensaios subsequentes e foi descartado. Em seguida, foram iniciadas as análises com o alelo *dys1-1*, nas quais foi observada diminuição nos níveis totais de Dys1 mutada, e conseqüentemente, diminuição nos níveis de hipusinação. Devido a isso, o alelo apresenta diminuição na taxa de crescimento celular e parada de crescimento celular após 24 horas de crescimento em meio desprovido de regulador osmótico. No entanto, esta parada de crescimento não é seguida de lise celular. Além disso, o mutante *dys1-1* demonstrou defeitos em sua morfologia celular, caracterizados pelo grande aumento do volume celular. Por outro lado, não foi possível observar alterações no conteúdo e deposição de quitina da parede celular do alelo *dys1-1* em ensaio utilizando calcofluor white. Interessantemente, uma análise preliminar do citoesqueleto de actina do mutante *dys1-1* em condição

permissiva sugere um atraso na progressão do ciclo celular e novos ensaios serão realizados no futuro para investigar essa possibilidade. Por fim, na busca de possíveis interações genéticas, apesar de alguns dos supressores de *tif51A-1* apresentarem alguma melhora do crescimento do mutante *dys1-1* a 25°C sem sorbitol (*BEM1*, *PCL1*, *WSC1* e *WSC3*), o nível de supressão é praticamente questionável quando comparado àqueles observados para o mutante *tif51A-1* (VALENTINI *et al.* 2002; ZANELLI and VALENTINI 2005). Além disso, nenhuma supressão pode ser vista para a condição de 36°C com sorbitol. Assim, os resultados aqui apresentados corroboram a correlação funcional entre eIF5A/Dys1 e a via de sinalização por Pkc1 e dão início à caracterização do mutante *dys1-1*, o qual será muito útil em análises futuras do papel da hipusinação na função de eIF5A.

## 2. SUMMARY

The translation initiation factor 5A (eIF5A) is highly conserved from archaea to mammals and is essential for cell viability. This factor is the only known protein that undergoes an unique and essential post-translational modification, in which a specific lysine residue is converted into hypusine by the action of the enzymes deoxyhypusine synthase (Dys1) and deoxyhypusine hydroxylase (Lia1). Initially, eIF5A was related to the initiation step of translation, however, recent data suggest a role in the elongation step of translation. However, besides the fact that the specific function of eIF5A in the cell is still obscure, the role of hypusination in eIF5A function is unknown. Thus, the goal of this project is to characterize conditional mutants of the deoxyhypusine synthase gene and thereby contribute to the understanding not only the function of hypusination in eIF5A, but also of the specific role of eIF5A in the cell. We started a phenotypic characterization of two different alleles: *dys1*<sup>Δ1-28</sup> and *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup> (*dys1-1*). Initially, we performed a subcloning of the allele *dys1*<sup>Δ1-28</sup>, once the allele was fused with the coding region of GAL4 activation domain, due to the fact that this allele is derived of a two-hybrid screening. However, after performing the subcloning, that is, in the absence of the activation domain, this allele showed no conditional growth phenotype as originally observed. Therefore, this mutant has become improper to carry out the subsequent analysis and was discarded. Then, the analyses with *dys1-1* allele were initiated, in which it was observed a decrease in total levels of Dys1 and, consequently, a decrease in the hypusination levels. Because of that, this allele shows a decrease in cell growth rate and growth arrests after 24 hours in medium lacking the osmotic regulator. However, this growth arrest is not followed by cell lysis. Furthermore, the mutant *dys1-1* showed defects in cell morphology, characterized by a great increase of cell volume. Moreover, it was not possible to observe changes in content and deposition of cell wall chitin in the *dys1-1* allele using calcofluor white. Interestingly, a preliminary analysis of the actin cytoskeleton of the mutant *dys1-1* at the permissive condition suggests a delay in cell cycle progression and other assays will be done in the future to investigate this possibility. Finally, in search of possible genetic interactions, although some of the suppressors of the *tif51A-1* generated some improvement in growth of the mutant *dys1-1* at 25 °C without sorbitol (*BEM1*, *PCL1*, *WSC1*

and *WSC3*), the level of suppression is practically questionable when compared with those observed to the mutant *tif51A-1* (VALENTINI *et al.* 2002; ZANELLI and VALENTINI 2005). Furthermore, no suppression could be seen for the condition of 36 °C in medium containing sorbitol. Therefore, the results presented here further support a functional link between eIF5A/Dys1 and the Pkc1 signaling pathway and be the basis for the characterization of the mutant *dys1-1*, which will be very useful in future studies of the role of hypusination in the function of eIF5A.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tridimensional de eIF5A e de EF-P	20
Figura 2	Esquema das modificações pós traducionais de eIF5A e EF-P	21
Figura 3	Avaliação da sensibilidade à temperatura dos mutantes <i>dys1</i> <sup>Δ1-28</sup> e <i>dys1</i> <sup>Δ1-8</sup>	38
Figura 4	Caracterização da construção plasmidial pVZ1008	41
Figura 5	Avaliação da sensibilidade a temperatura do mutante <i>dys1</i> <sup>Δ1-28</sup>	42
Figura 6	Caracterização da construção plasmidial pVZ1017	43
Figura 7	Avaliação da sensibilidade a temperatura do mutante <i>dys1</i> <sup>Δ1-28</sup>	44
Figura 8	Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de Dys1 da linhagem depositada no banco de dados (BY) e da linhagem W3O3	46
Figura 9	Supressão do mutante <i>dys1</i> <sup>W75R/T118A/A147T</sup> ( <i>dys1-1</i> ) por sorbitol	47
Figura 10	Análise dos níveis de Dys1 no mutante <i>dys1-1</i>	48
Figura 11	Avaliação dos níveis de hipusinação do alelo mutante <i>dys1-1</i> e do alelo selvagem ( <i>DYS1</i> )	50
Figura 12	Curva de crescimento da linhagem selvagem ( <i>DYS1</i> ) e da linhagem mutante ( <i>dys1-1</i> )	52
Figura 13	Determinação do crescimento celular do alelo <i>dys1-1</i> na ausência de sorbitol	53
Figura 14	Avaliação da viabilidade celular do alelo <i>dys1-1</i>	54
Figura 15	Análise da lise celular do alelo mutante ( <i>dys1-1</i> )	56
Figura 16	Análise da integridade da parede celular do alelo <i>dys1-1</i>	57
Figura 17	Esquema ilustrativo da polaridade celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao longo do ciclo de divisão celular	59
Figura 18	Análise do citoesqueleto de actina alelo <i>dys1-1</i>	59
Figura 19	Análise dos níveis de Nis1-TAP	62
Figura 20	Avaliação da sensibilidade à temperatura da linhagem <i>dys1::HIS3 nis1::KanMX4</i>	63
Figura 21	Caracterização da construção plasmidial pVZ1177 e análise da supressão em alto número de cópias	63

- Figura 22 Avaliação da sensibilidade à temperatura da linhagem *dys1-1* 65  
quando superexpressos diferentes formas de Pkc1
- Figura 23 Análise de supressão em alto número de cópias do mutante 67  
*dys1-1* utilizando os supressores do mutante *tif51A-1*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho	26
Tabela 2	Plasmídeos utilizados neste trabalho	27
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	28

## ABREVIATURAS

%	porcentagem
$\lambda$	comprimento de onda
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celcius
$\mu\text{Ci}$	microCurie
$\mu\text{M}$	milimolar
5-FOA	ácido 5-flúor-orótico
AD	domínio de ativação (activation domain)
C-terminal	carboxi-terminal
D.O.	densidade ótica
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20

PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação de polimerase em cadeia)
PDB	“Protein Data Bank”
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
qsp	quantidade suficiente para
SGD	Saccharomyces genoma databank
RNA	ácido ribonucléico
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
S-SPO	“ super-sporulation” (meio para esporulação de levedura)
TE	Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade enzimática
V	volt
xg	aceleração gravitacional
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	5
<b>2. SUMMARY</b>	7
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>4. OBJETIVOS</b>	22
<b>4.1.OBJETIVO GERAL</b>	22
<b>4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	22
4.2.1 Clonagem de <i>dys1</i> <sup>Δ1-28</sup> sem o domínio de ativação Gal4	22
4.2.2. Caracterização fenotípica dos novos mutantes condicionais de <i>DYS1</i>	22
4.2.2.1. Curva de crescimento e determinação da viabilidade celular	22
4.2.2.2. Morfologia de morte do mutante <i>dys1-1</i> na ausência de sorbitol	23
4.2.2.3. Análise de fenótipo de lise celular	23
4.2.2.4. Verificação da integridade da parede celular	23
4.2.2.5. Análise do citoesqueleto de actina	23
4.2.3. Determinação dos níveis de hipusinação	24
4.2.4. Busca de possíveis interações genéticas	24
4.2.5. Confirmação da interação física entre Nis1 e Dys1	24
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
<b>5.1. MATERIAL</b>	26
<b>5.2. MÉTODOS</b>	29
5.2.1. Clonagem empregando Reação de Polimerase em Cadeia	29
5.2.1.1. Reações de PCR	29
5.2.1.2. Clonagem do produto de PCR	29
5.2.2. Subclonagem de DNA	30
5.2.2.1. Digestão de plasmídeos	30
5.2.2.2. Desfosforilação do vetor	30
5.2.2.3. Purificação de inserto e vetor	30
5.2.2.4. Reação de ligação	30
5.2.3. Transformação de bactéria	31

5.2.4. Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria	31
5.2.4.1. Em pequena escala – Miniprep	31
5.2.4.2. Em média escala – Midiprep	32
5.2.5. Transformação de leveduras	32
<b>5.2.6. Teste de diluição seriada</b>	<b>33</b>
5.2.7. Obtenção de curvas de crescimento	33
5.2.8. Microscopia de crescimento celular em lâmina	33
5.2.9. Ensaio de lise celular	33
5.2.10. Verificação da morfologia de parede celular	34
5.2.11. Western blot	34
5.2.12. Ensaio de hipusinação <i>in vivo</i>	35
5.2.13. Visualização do citoesqueleto de actina	35
5.2.14. Análise de morfologia celular por citometria de fluxo	36
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>6.1. Análise do mutante <i>dys1</i><sup>Δ1-28</sup></b>	<b>37</b>
6.1.1. Identificação do mutante <i>dys1</i> <sup>Δ1-28</sup>	37
6.1.2. Avaliação do fenótipo de <i>dys1</i> <sup>Δ1-28</sup> sem o domínio de ativação de Gal4	39
<b>6.2. Mutante <i>dys1</i><sup>W75R/T118A/A147T</sup> (<i>dys1-1</i>)</b>	<b>45</b>
6.2.1. Análise dos níveis totais da proteína Dys1	48
6.2.2. Análise dos níveis de hipusinação <i>in vivo</i>	49
6.2.3. Determinação da curva de crescimento	51
6.2.4. Morfologia de morte do mutante <i>dys1-1</i> na ausência de sorbitol	53
6.2.5. Determinação da viabilidade celular	54
6.2.6. Análise de fenótipo de lise celular	55
6.2.7. Verificação da integridade da parede celular	57
6.2.8. Análise do citoesqueleto de actina	58
6.2.9. Análise de correlação funcional entre Dys1 e Nis1	60
6.2.10. Análise de correlação funcional entre Dys1 e Pkc1	64
6.2.11. Análise de supressão em alto número de cópias	66
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>

### 3. INTRODUÇÃO

O provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada de arqueas a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas (CHEN and LIU 1997; SCHNIER *et al.* 1991). Ainda, a proteína humana substitui completamente a proteína de levedura, mostrando que eIF5A humana e de levedura não são apenas conservadas em sua sequência, mas também funcionalmente (SCHWELBERGER *et al.* 1993). Por outro lado, eIF5A não é encontrado em eubactérias. No entanto, eubactérias possuem um homólogo estrutural de eIF5A, EF-P, um provável fator de alongação de tradução (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A possui 17 kDa e é codificada por dois genes, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*). Em condições aeróbicas, somente *TIF51A* é expresso, enquanto em condições anaeróbicas *TIF51B* é expresso (KANG *et al.* 1993; SCHNIER *et al.* 1991; TOME and GERNER 1997). *TIF51A* é essencial para o crescimento em condições aeróbicas conforme mostrado por diferentes trabalhos (SCHNIER *et al.* 1991; VALENTINI *et al.* 2002; WOHL *et al.* 1993). As proteínas codificadas pelos dois genes de *S. cerevisiae* são altamente similares, compartilhando 90% de identidade, sendo que a expressão apenas de *TIF51A* ou *TIF51B* promove o crescimento tanto em condições aeróbicas, quanto em condições anaeróbicas, sendo, portanto, funcionalmente intercambiáveis (SCHWELBERGER *et al.* 1993).

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de espécies de arqueas, de protozoários e, mais recentemente, de humanos e de levedura foram determinadas e revelaram várias características comuns (KIM *et al.* 1998; PEAT *et al.* 1998; TONG *et al.* 2009; YAO *et al.* 2003). Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta (Figura 1A). A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal possui um dobramento classificado como "Translation Protein SH3-like motif". Esse dobramento também está presente em várias proteínas ribossomais e fatores de alongação de tradução (GOUGH *et al.* 2001). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples ("Single-stranded Oligonucleotide



Binding Fold"), o qual está presente em proteínas de diferentes funções celulares que se ligam a RNA ou DNA fita simples (GOUGH *et al.* 2001). De fato, dois estudos tentaram correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém tais estudos ainda necessitam ser ampliados para se estabelecer um papel biológico de eIF5A na interação física direta com mRNAs (XU and CHEN 2001; XU *et al.* 2004).

Originalmente, a proteína eIF5A foi purificada a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho e, devido à sua capacidade de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro*, foi considerada como um fator de início de tradução (BENNE and HERSHEY 1978). No entanto, estudos em *S. cerevisiae* mostraram que a depleção deste fator causa uma redução de apenas 30% nos níveis de síntese protéica, sugerindo não ser um fator essencial na síntese protéica de forma geral (KANG and HERSHEY 1994; ZUK and JACOBSON 1998). Alternativamente, foi proposto que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, por exemplo, fatores envolvidos na transição G1/S do ciclo celular (PARK *et al.* 1997; PARK *et al.* 1993a), uma vez que a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* também leva a um aumento no número de células paradas na fase G1 do ciclo celular (KANG and HERSHEY 1994).

Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução nunca ter sido claramente demonstrada, a comprovação recente de que eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução e que mutantes condicionais de eIF5A, apresentam defeitos claros na síntese de proteínas, trouxeram eIF5A de volta ao cenário da tradução (DIAS *et al.* 2008; JAO and CHEN 2006; ZANELLI *et al.* 2006). Interessantemente, defeitos observados nos perfis polissomais de mutantes sensíveis à temperatura, sugeriram um papel para eIF5A na etapa da elongação da tradução ao invés do início (ZANELLI *et al.* 2006), o que recentemente foi confirmado com novos dados obtidos por nosso laboratório e por outro grupo (GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009).

Entretanto, o mecanismo crucial pelo qual eIF5A afeta a tradução e se este efeito ocorre na tradução global ou de um grupo específico de mRNAs são questões ainda em aberto.

Além de ser uma proteína altamente conservada ao longo da evolução, eIF5A sofre uma modificação pós-traducional totalmente específica, a qual

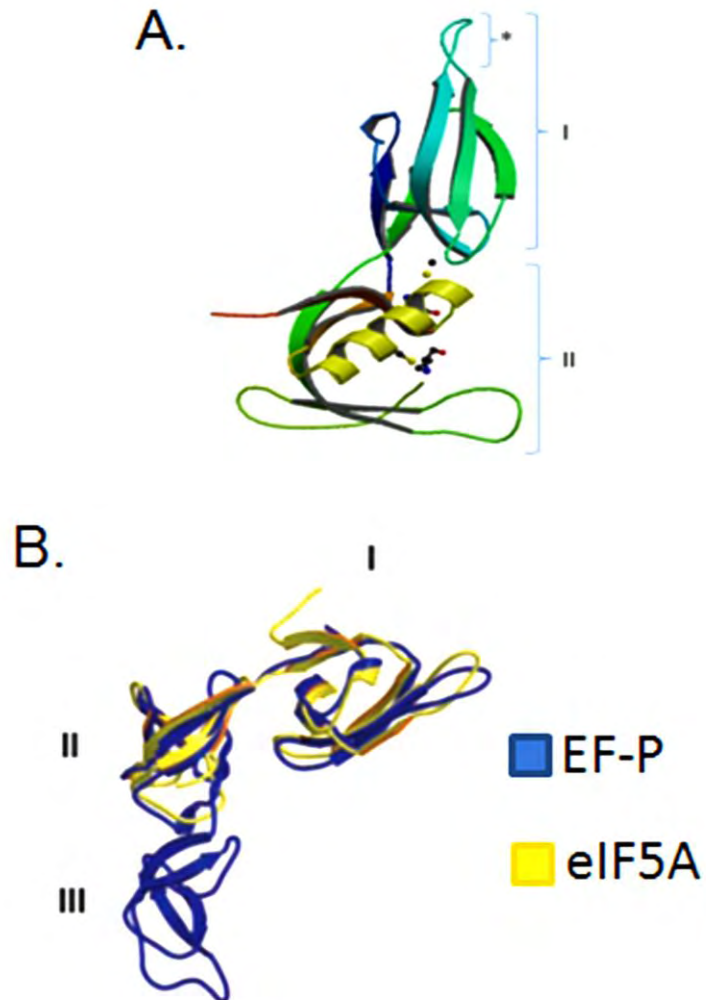
também é conservada, chamada de hipusinação. Como mostrado na Figura 2 A, a hipusinação é uma modificação pós-traducional incomum, ocorrendo em duas etapas: inicialmente, a enzima desoxi-hipusina sintase (*DYS1* em *S. cerevisiae* e *DHPS* em mamíferos) transfere a parte aminobutil da poliamina espermidina para o aminogruppo de um resíduo específico de lisina de eIF5A (K51 em *S. cerevisiae*; K50 em eIF5A1 de *Homo sapiens*) para formar o resíduo de desoxi-hipusina. A seguir, outra enzima, chamada desoxi-hipusina hidroxilase (*LIA1* em levedura e *DOHH* em mamíferos), termina a formação do aminoácido hipusina (ABID *et al.* 1997; CHEN and LIU 1997; KANG *et al.* 1993; KLIER *et al.* 1993; PARK *et al.* 1993a; SCHNIER *et al.* 1991). O termo “hipusina” é derivado de hidroxiputrescina-lisina (PARK *et al.* 1993a). O resíduo de lisina específico de eIF5A é modificado logo após a proteína eIF5A ser sintetizada, e o resíduo de hipusina não é alterado ou removido até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade dessa reação (PARK *et al.* 1993b).

Assim como mencionado anteriormente, apesar de eIF5A não estar presente em eubactérias, estas apresentam um homólogo estrutural, o provável fator de alongação da tradução EF-P, sendo os dois primeiros domínios de EF-P sobreponíveis à estrutura de eIF5A de arquea (Figura 1B) (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004). Curiosamente, foi observado que EF-P de um sub-grupo de bactérias sofre uma modificação pós-traducional em um resíduo específico de lisina na posição 34, correspondente ao sítio de hipusinação de eIF5A. Esta modificação, denominada lisilação, é análoga à hipusinação e envolve a incorporação de uma lisina através da carbonila do grupamento amino da lisina 34 de EF-P pelas enzimas YjeA (GenX) e YjeK (Figura 2B) (BAILLY and DE CRÉCY-LAGARD 2010; NAVARRE *et al.* 2010; YANAGISAWA *et al.* 2010). Apesar de EF-P ser essencial e o sítio alvo da modificação pós-traducional ser altamente conservado, esta modificação parece não ser essencial para função de EF-P em todas as bactérias, uma vez que, como mencionado anteriormente, esta modificação foi observada apenas em um subgrupo de bactérias (BAILLY and DE CRÉCY-LAGARD 2010; BROCHIER *et al.* 2004).

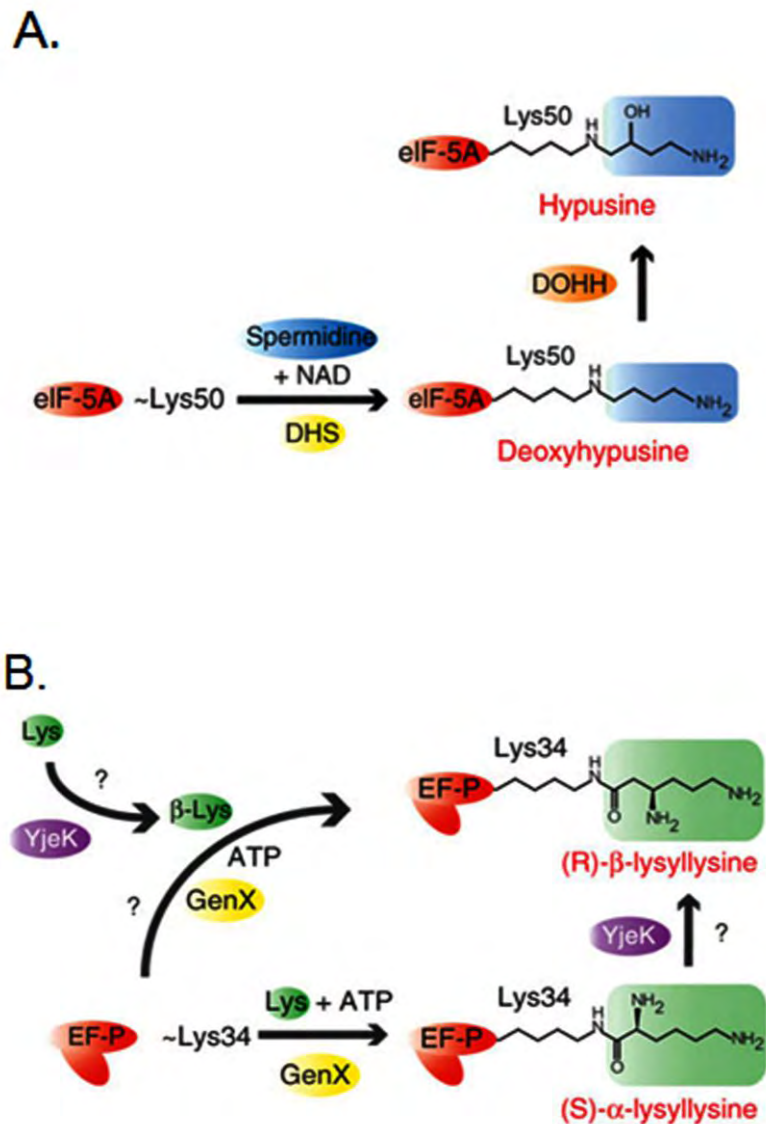
Enquanto ortólogos de eIF5A, assim como da enzima desoxi-hipusina sintase, são encontrados desde arqueas até mamíferos, arqueas parecem não possuir ortólogos para a enzima desoxi-hipusina hidroxilase. Além disso, o

gene para desoxi-hipusina hidroxilase não é essencial em *S. cerevisiae* para crescimento em nenhuma condição testada até o momento (THOMPSON *et al.* 2003), enquanto o ortólogo de *Schizosaccharomyces pombe* é necessário para o crescimento em temperaturas acima de 37°C (WEIR and YAFFE 2004). Por outro lado, o gene para desoxi-hipusina hidroxilase é essencial para o desenvolvimento tanto em *Drosophila melanogaster* como em *Caenorhabditis elegans* (PARK *et al.* 2010). Portanto, a primeira etapa da hipusinação é essencial em todas as espécies que possuem eIF5A, mas a segunda etapa parece se tornar mais importante funcionalmente apenas ao longo da progressão evolutiva. Dessa forma, a substituição do resíduo de lisina específico de eIF5A, em *S. cerevisiae*, por arginina (K51R) leva à produção de eIF5A não hipusinado, sendo este incapaz de permitir o crescimento celular quando é a única fonte de eIF5A na célula (SCHNIER *et al.* 1991). Além disso, eIF5A recombinante, não hipusinado, não é funcional no ensaio de síntese de metionil-puromicina, sendo que, após modificação *in vitro* pela desoxi-hipusina sintase, a eIF5A recombinante passa a ser funcional neste ensaio (PARK 1989; SMIT-MCBRIDE *et al.* 1989). Por fim, a região flanqueadora do sítio de hipusinação é extremamente conservada ao longo da evolução, sendo formada por uma sequência de doze aminoácidos: STSKTG-HIPUSINA-HGHAK (CHEN and LIU 1997; MAGDOLEN *et al.* 1994; PARK *et al.* 1993b). Portanto, todos estes dados mostram que a hipusinação ou, ao menos sua primeira etapa, é essencial para a função *in vivo* de eIF5A. O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação fortalece a idéia de que este fator seja de fundamental importância no metabolismo celular.

No entanto, além do fato de a função específica de eIF5A na célula não ser conhecida, o papel da hipusinação para o funcionamento de eIF5A também não é conhecido. Uma vez que o gene *DYS1* é essencial para o crescimento celular (SASAKI *et al.* 1996), até o momento não foi possível o estudo da função específica da hipusinação em *S. cerevisiae* pela inexistência de mutantes condicionais desse gene. Com esse intuito, este trabalho teve como objetivo caracterizar mutantes condicionais do gene *DYS1* através de diferentes ensaios funcionais e, dessa forma, contribuir para o entendimento não só da função da hipusinação sobre eIF5A, mas também para o entendimento da função específica de eIF5A na célula.



**Figura 1. Estrutura tridimensional de eIF5A e de EF-P. (A)** Estrutura cristalográfica de eIF5A de *Leishmania mexicana* (Protein Data Bank: 1XTD). I: Domínio N-terminal (“Translation protein SH3-like motif”); \*: alça de hipusinação e II: Domínio C-terminal (“Single-stranded oligonucleotide binding fold”). **(B)** Sobreposição dos dois primeiros domínios de EF-P na estrutura de eIF5A (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004).



**Figura 2. Esquema das modificações pós-traducionais de eIF5A e EF-P** (YANAGISAWA *et al.* 2010). (A) Etapas da hipusinação, modificação pós-traducional ocorrida em eIF5A. O grupo aminobutil da espermidina é transferido para o aminogruppo do resíduo específico de lisina pela enzima desoxi-hipusina sintase. Posteriormente, o intermediário de eIF5A é hidroxilado, pela desoxi-hipusina hidroxilase, formando assim eIF5A hipusinado. (B) Etapas da lisilação de EF-P. Incorporação de uma lisina através da carbonila do grupamento amino de uma lisina específica pelas enzimas YjeA e YjeK.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Uma vez que eIF5A e as enzimas modificadoras de levedura e de mamífero são altamente conservadas e que levedura constitui um modelo de estudo extremamente útil, este trabalho tem como objetivo geral avaliar e caracterizar mutantes condicionais de *DYS1*, gene que codifica a enzima desoxi-hipusina sintase, responsável pela primeira etapa da hipusinação de eIF5A em *Saccharomyces cerevisiae*.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **4.2.1. Clonagem de *dys1*<sup>Δ1-28</sup> sem o domínio de ativação Gal4**

Apesar de o alelo selvagem de *DYS1* em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (AD) complementar o nocaute *dys1::HIS3* em todas as condições testadas (assim como o alelo selvagem sem a fusão), para evitar qualquer possibilidade de artefatos gerados pela fusão, foi clonado o alelo *dys1*<sup>Δ1-28</sup> em vetor centromérico e em alto número de cópias sem a fusão com AD, sob o comando do promotor endógeno de *DYS1*.

#### **4.2.2. Caracterização fenotípica dos novos mutantes condicionais de *DYS1***

Com o objetivo de analisar os mutantes obtidos em nosso laboratório, foi realizada a análise fenotípica, uma vez que os fenótipos mostrados pelos mutantes podem estar intimamente relacionados à função desempenhada por *DYS1* e, conseqüentemente, pela hipusinação de eIF5A na célula.

Para isso foram propostos os seguintes ensaios:

##### **4.2.2.1. Curva de crescimento e determinação da viabilidade celular**

Uma vez identificado o mutante condicional de *DYS1*, a determinação de sua curva de crescimento e dos níveis de viabilidade celular nas diferentes temperaturas são necessários para a determinação do comportamento do mutante.

#### **4.2.2.2. Morfologia de morte do mutante *dys1-1* na ausência de sorbitol**

Considerando que o mutante *dys1-1* cresce apenas na presença de sorbitol 1 M, foi analisada sua morfologia de parada de crescimento celular utilizando-se visualização microscópica de uma mesma célula após intervalos definidos de tempo. Para isso, foram utilizadas lâminas cobertas com uma fina camada de meio de cultura sólido, como descrito em Materiais e Métodos.

#### **4.2.2.3. Análise de fenótipo de lise celular**

Como apresentado na Introdução, o fenótipo do mutante *dys1-1* de supressão por sorbitol é semelhante ao do mutante *pkc1Δ*. Por sua vez, o mutante *pkc1Δ* tem sua morte causada por lise celular decorrente de rompimento da parede celular (Heinisch *et al.* 1999). Assim, a análise de defeitos da parede celular nos mutantes de *DYS1* pode contribuir para a descrição fenotípica desses mutantes.

#### **4.2.2.4. Verificação da integridade da parede celular**

Como tratado no item anterior, defeitos relacionados com parede celular podem estar correlacionados com o fenótipo de supressão por sorbitol do mutante *dys1-1*, de maneira que a verificação da integridade da parede celular poderá revelar tais defeitos. Essa verificação foi realizada utilizando-se um marcador de quitina, o Calcofluor White.

#### **4.2.2.5. Análise do citoesqueleto de actina**

Uma vez que já foi demonstrado que mutantes de eIF5A possuem defeitos na polarização do citoesqueleto de actina (Zanelli e Valentini, 2005), essencial para organização celular e progressão no ciclo celular em *S. cerevisiae* (Pruyne *et al.* 2004), torna-se importante definir se o mesmo defeito ocorre em mutantes de *DYS1*. Esse defeito, além de se correlacionar com problemas no ciclo celular, também se correlaciona com defeitos da integridade de parede celular, pois também são apresentados por mutantes de *PKC1* (Zanelli e Valentini, 2005).

#### **4.2.3. Determinação dos níveis de hipusinação**

Considerando-se o fato de que *DYS1* é essencial na célula devido à sua ação sobre eIF5A na hipusinação, o ensaio para avaliação dos níveis de hipusinação no mutante *dys1-1* foi necessário para o entendimento da causa dos defeitos apresentados por esse mutante.

#### **4.2.4. Busca de possíveis interações genéticas**

A busca de interações genéticas entre mutantes de eIF5A e outros fatores celulares já contribuiu em nosso laboratório para um grande avanço no entendimento da função celular de eIF5A (Valentini *et al.*, 2002; Zanelli e Valentini, 2005; Frigieri *et al.*, 2007; Frigieri *et al.*, 2008). Entre os estudos citados, está a identificação de uma série de supressores em alto número de cópias do mutante *tif51A-1*, os quais relacionaram eIF5A à via de manutenção de integridade celular e progressão do ciclo celular em *S. cerevisiae* (Valentini *et al.*, 2002; Zanelli e Valentini, 2005). Para entender se defeitos relacionados à hipusinação também se correlacionam com estas vias, foi proposto testar a supressão em alto número de cópias do mutante condicional de *DYS1* pelos supressores de eIF5A já descritos anteriormente.

Além disso, recentemente em nosso laboratório, a proteína Nis1 foi identificada como um ligante físico de Dys1 por duplo-híbrido. Nis1 é uma proteína localizada na região de septo durante a transição G2/M do ciclo celular, provavelmente envolvida em uma via de sinalização mitótica (Iwase e Toh-e, 2001). Assim, foi testada a capacidade de supressão em alto número de cópias dos mutantes de *DYS1* por *NIS1*, e também a letalidade sintética entre os mutantes de *DYS1* e o nocaute de *NIS1*, uma vez que este gene não é essencial em *S. cerevisiae*.

#### **4.2.5. Confirmação da interação física entre Nis1 e Dys1**

Como explicitado no item anterior, a proteína Nis1 foi identificada como um ligante físico de Dys1 por duplo-híbrido. Para confirmação desta interação física por outros métodos, foi proposta a realização de experimentos de copurificação entre Nis1 e Dys1 utilizando uma estratégia com proteínas de fusão com GST ou TAP. Esses ensaios são essenciais para a confirmação da



interação física, que, uma vez confirmada, poderá contribuir para revelar mecanismos de regulação de Dys1 e, portanto, da hipusinação.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. MATERIAL

**Tabela 1.** Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Origem</b>
SVL82 (W303)	<i>MAT<sub>a</sub> ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ssd1-d</i>	Coleção do laboratório
SVL95 (DL376)	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 trp1 ura3 his4 can1 pkc1::LEU2</i>	Coleção do laboratório
SVL452	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	Coleção do laboratório
SVL613	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN - pSV520]</i>	Coleção do laboratório
SVL614	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1<sup>W75R/T118A/A147T</sup>/TRP1/CEN - pSV730]</i>	Coleção do laboratório
SVL647	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/LEU2/2<math>\mu</math> - pSV558]</i>	Coleção do laboratório
SVL651	<i>MAT<sub>a</sub> trp1 leu2 ura3 his3 dys1::HIS3 [Gal4AD-dys1<sup><math>\Delta</math>1-8</sup>/LEU2/2<math>\mu</math> - pSV559]</i>	Coleção do laboratório
SVL652	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [Gal4AD-dys1<sup><math>\Delta</math>1-28</sup>/LEU2/2<math>\mu</math> - pSV557]</i>	Coleção do laboratório
VZL893	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 ura3 NIS1-TAP</i>	Coleção do laboratório
VZL894	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 ura3 DYS1-TAP</i>	Coleção do laboratório
VZL1170	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 ura3 his3 met15 nis1::KanMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1171	<i>MAT<sub>a</sub> leu2 ura3 his3 met15 nis1::KanMX4 dys1::HIS3</i>	Este trabalho

Obs.: Como descrito no texto (página 45), para simplificação, o alelo *dys1<sup>W75R/T118A/A147T</sup>* passou a ser chamado *dys1-1*.

**Tabela 2.** Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Origem
pSV20	pYGEx-2T/ vetor de expressão em levedura de proteína de fusão com GST sob comando de promotor de GAL1, <i>URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV58 (pRS314)	<i>TRP1, CEN</i>	Coleção do laboratório
pSV60 (pRS316)	<i>URA3, CEN</i>	Coleção do laboratório
pSV63 (pRS424)	<i>TRP1, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV65 (pRS426)	<i>URA3, 2μ</i>	(CHRISTIANSON <i>et al.</i> 1992)
pSV115	<i>WSC1, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV116	<i>WSC2, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV117	<i>WSC3, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV149 (pACT)	vetor de expressão em levedura de proteína de fusão com Gal4-AD, <i>LEU2, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV181	<i>PKC1, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV223	Promotor de GAL1- <i>PKC1, URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV224	Promotor de GAL1- <i>pkc1<sup>K853R</sup>, URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV225	Promotor de GAL1- <i>pkc1<sup>R398A</sup>, URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV304	<i>GIC1, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV352	<i>BNI1, URA3, 2μ</i>	(HELLIWELL <i>et al.</i> 1998)
pSV384	<i>SSD1, URA3, 2μ</i>	(UESONO <i>et al.</i> 1994)
pSV401	<i>BEM1, URA3, 2μ</i>	(GLADFELTER <i>et al.</i> 2002)
pSV411	<i>PCL1, URA3, 2μ</i>	(LENBURG and O'SHEA 2001)

pSV431	promotor de GAL1 - GST-Dys1, <i>URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV508	<i>DYS1,URA3,2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV520	<i>DYS1, TRP1, CEN</i>	Coleção do laboratório
pSV526	<i>DYS1, URA3, CEN</i>	Coleção do laboratório
pSV557	Gal4-AD- <i>dys1<sup>Δ1-28</sup></i> , <i>LEU2, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV558	Gal4-AD- <i>DYS1, LEU2, 2μ</i>	(Yu <i>et al.</i> 1996)
pSV559	Gal4-AD- <i>dys1<sup>Δ1-8</sup></i> , <i>LEU2, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV588	<i>ZDS2, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV589	<i>ZDS1, URA3, 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV730	<i>dys1<sup>W75R/T118A/A147T</sup></i> , <i>TRP1,CEN</i>	Coleção do laboratório
pVZ1007	promotor de <i>DYS1, TRP1, CEN</i>	Este Trabalho
pVZ1008	<i>dys1<sup>Δ1-28</sup></i> , <i>TRP1, CEN</i>	Este Trabalho
pVZ1017	<i>dys1<sup>Δ1-28</sup></i> , <i>TRP1, 2μ</i>	Este Trabalho
pVZ1177	<i>NIS1, URA3, 2μ</i>	Este Trabalho

**Tabela 3** - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Descrição	Sítio de restrição
SVO180	CCG <u>GAA TTC</u> CAA GTA ATT GTC TCT CTG C	<i>EcoRI</i>
SVO596	CGG <u>GAT CCC</u> ACA TAC TTG TGG GAA C	<i>BamHI</i>
SVO616	CCG <u>CTC GAG</u> GCA TCT TTT TTG CTT TGA C	<i>Xho I</i>
SVO743	CGG <u>GAT CCC</u> TAC TGC GTT AAA TTA G	<i>BamHI</i>

\*Os sítios de restrição estão sublinhados.

## **5.2. MÉTODOS**

A manutenção, o cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e de *E. coli*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e os protocolos das técnicas utilizados neste trabalho seguiram procedimentos padrão descritos nos manuais de laboratório: (AMBERG 2005; AUSUBEL 2004; GUTHRIE and FINK 1991).

### **5.2.1. Clonagem empregando Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)**

#### **5.2.1.1. Reações de PCR**

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo com os respectivos sítios das enzimas de restrição, 40 ng de DNA, 2 U da enzima Vent DNA polimerase (New England Biolabs) e 2  $\mu$ L de uma mistura de desoxiribonucleotídeos (10 mM cada), num volume final de reação de 100  $\mu$ L. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 5 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Então, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e a solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido a voltagem de 80 V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho Alphamager 2200 (Alpha Innotech Corporation).

#### **5.2.1.2. Clonagem do produto de PCR**

O produto amplificado foi submetido a digestão com enzima de restrição requerida, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). O vetor foi também digerido com as enzimas adequadas e tratado com fosfatase alcalina por 30 minutos. Em seguida, os produtos das digestões foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o Kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN). Por fim, foi preparada a reação de ligação

num volume de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando tampão apropriado, com um excesso de 10 vezes de inserto em relação ao vetor, e 200U de T4 DNA ligase. A reação foi então incubada a 16°C por 16 horas.

## **5.2.2. Subclonagem de DNA**

### **5.2.2.1. Digestão de plasmídeos**

Os plasmídeos de interesse foram digeridos em um volume de 20  $\mu\text{L}$ , utilizando as condições recomendadas para as diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs).

### **5.2.2.2. Desfosforilação do vetor**

Após digestão do vetor, foram adicionadas 2 unidades de fosfatase alcalina (CIAP-Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e a reação incubada a 37°C por 30 minutos e em seguida, purificado.

### **5.2.2.3. Purificação de inserto e vetor**

Após digestão dos plasmídeos e realização das modificações necessárias, os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos desejados foram purificados utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da Qiagen, seguindo as orientações do fabricante.

### **5.2.2.4. Reação de ligação**

Os fragmentos (vetor e inserto), após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , tampão apropriado, um excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200 U de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 16 horas.

### **5.2.3. Transformação de bactéria**

#### **- Competência**

Uma colônia de *E.coli* foi inoculada em 10 mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; triptona 10 g/L) e incubada a 37°C sob agitação por uma noite. A cultura foi então diluída em 250 mL de meio SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 10 mM e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10 mM) até atingir D.O.<sub>600nm</sub> 0,6. A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.500xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 80 mL de solução TB (Pipes pH7,0 10 mM, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 55 mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 15 mM e KCl 250 mM) gelada e incubadas no gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas e suspensas em 20 mL de TB gelado adicionado de 1,5 mL de DMSO. As células foram novamente incubadas em gelo por 10 minutos. Para armazenamento, 200 µL de células foram alíquotados e congelados a -80°C.

#### **- Transformação**

As células de *E. coli* competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100 µL das células competentes e 50–250 ng de DNA plasmidial ou a reação de ligação. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL) e incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

### **5.2.4. Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria**

#### **5.2.4.1. Em pequena escala – Miniprep**

Bactérias contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0). Foram adicionados 200 µL de solução

NaOH/SDS (NaOH 0,2M, SDS 1%), incubando-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8 e o tubo foi invertido várias vezes. Após centrifugação por 6 minutos a 12.000xg, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A seguir, foi adicionado isopropanol (3 vezes o volume da amostra). Após incubação de 5 minutos a 37°C, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 50 µL de TE pH 8,0.

#### **5.2.4.2. Em média escala – Midiprep**

Uma colônia de bactéria transformada com o plasmídeo desejado foi inoculada em 50 mL de meio seletivo (LB adicionado de ampicilina 50 µg/mL) e incubada a 37°C durante a noite, sob agitação. Os plasmídeos foram extraídos e purificados por lise alcalina, utilizando o kit “QIAfilter Plasmid Midi” da QIAGEN, seguindo as orientações do fabricante.

#### **5.2.5. Transformação de leveduras**

Uma colônia da levedura desejada foi inoculada em 5 mL de meio adequado e incubada a 25°C sob agitação por toda a noite. 1,5 mL da cultura foram centrifugados na velocidade máxima por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com 1 mL de água estéril, suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio 100 mM e então incubadas por 5 minutos a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem, 240 µL de PEG 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de DNA de esperma de salmão, 5 µL de DNA plasmidial, completando-se o volume de reação com 45 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 42°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas na velocidade máxima por 10 segundos. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 150 µL de água estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas nas temperaturas adequadas até o aparecimento de colônias.



### **5.2.6. Teste de diluição seriada**

As leveduras a serem analisadas foram crescidas a 25°C em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente  $1-2 \times 10^7$  células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de  $2,5 \times 10^8$  células/mL. 200 µL da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca e a suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas foram incubadas nas temperaturas adequadas até a observação de crescimento.

### **5.2.7. Obtenção de curvas de crescimento**

As linhagens desejadas foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados sob agitação constante por uma noite. No dia seguinte as células foram diluídas para uma D.O<sub>600nm</sub> 0,2. A partir deste momento, as culturas foram monitoradas através da absorbância a 600 nm e através da contagem celular em camara de Neubauer a cada 2 horas em um período de 16 horas.

### **5.2.8. Microscopia de crescimento celular em lâmina**

Uma lâmina de microscopia foi coberta por uma fina camada de meio de cultura sólido apropriado. Em seguida, foi adicionada uma suspensão de células sobre o meio e coberto com uma lamínula. Utilizando um microscópio, focalizou-se uma célula e foi acompanhado seu crescimento, fotografando o campo, em intervalos de tempo como indicado na Figura 13.

### **5.2.9. Ensaio de lise celular**

As células a serem analisadas foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados e então as células foram concentradas por centrifugação a 4500xg por 1 minuto, lavadas e ressuspensas em PBS 1x (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; ajustar pH 7,3) em uma concentração de  $5 \times 10^7$  células/mL. Foi então adicionado iodeto de propídeo, que marca apenas células mortas com a membrana citoplasmática permeabilizada, na concentração final de 3 µg/ml. As células foram incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente, no escuro, e então foi realizada a

análise da lise celular utilizando microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse TE300).

#### **5.2.10. Verificação da morfologia de parede celular**

As leveduras a serem analisadas foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados. Em seguida, em um volume contendo  $1 \times 10^7$  células/mL foi adicionado Calcofluor White (25  $\mu$ M) e as células foram incubadas a 25°C por 60 minutos no escuro. Logo em seguida, realizaram-se duas lavagens com PBS 1X e então foi realizada a análise utilizando-se microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse TE300).

#### **5.2.11. Western blot**

As linhagens de interesse foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados por 12-16 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas sob agitação em 250  $\mu$ L de tampão (Tris HCl pH 7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease; EDTA 2 mM) e aproximadamente 5 mg de “glass beads”. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford.

As amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada à temperatura ambiente por 60 minutos em tampão PBST (PBS 1X, 0.25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado, sob agitação. A membrana foi então incubada por 2 horas à temperatura ambiente com uma diluição adequada de anticorpo primário em PBST contendo 5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 45 minutos com anti-IgG (anticorpo secundário) de coelho conjugado com peroxidase em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-Amersham Biosciences) e exposta a filme autorradiográfico.

### **5.2.12. Ensaio de hipusinação *in vivo***

As células a serem analisadas foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados até atingir D.O<sub>600nm</sub> 0,8. Em seguida, as células foram diluídas para uma D.O<sub>600nm</sub> 0,01 e então foram adicionados 30 µCi de espermidina-[H<sup>3</sup>] em 5 mL de meio de cultura líquido. Após atingirem D.O<sub>600nm</sub> 0,8, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS 1X e então congeladas a - 80°C. Em seguida, as células foram ressuspendidas, lisadas e a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford, e então, foi realizado imunoprecipitação de eIF5A. Após eluição da proteína, foi realizado SDS-PAGE, sendo o gel de poliacrilamida corado e fixado (Coomassie) para a identificação e quantificação de eIF5A total. Em seguida, o gel de poliacrilamida foi incubado em uma solução de amplificação de sinal (Amplify-Amersham Biosciences), seco sobre papel de filtro e exposto a um filme autorradiográfico, o qual revelou apenas eIF5A hipusinada (marcada radioativamente) que foi quantificada, determinando os níveis de hipusinação (relação eIF5A total/eIF5A hipusinada).

### **5.2.13. Vizualização do citoesqueleto de actina**

As células a serem analisadas foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados até atingir D.O<sub>600nm</sub> 0,8. Em seguida foi adicionado formaldeído para uma concentração de 4%. Após pré-fixação de 10 minutos na temperatura em que se encontrava a cultura inicialmente, as células foram centrifugar, suspendidas em formaldeído 4% e incubadas à temperatura ambiente por 1 hora.

Em seguida, aproximadamente 10<sup>7</sup> células foram centrifugadas, lavadas três vezes em PBS 1X, e então suspendidas em 100 µL de PBS 1X. A suspensão foi adicionada 1,5 µM de faloidina-rodamina, o qual se liga a filamentos de actina, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas, cinco vezes, com PBS 1x, e ressuspendidas em solução contendo p-fenilenodiamino (9,2 mM pfenilenodiamino; PBS 1X pH 8,0; glicerol qsp 100 mL), ajustando para o pH 9,0 com carbonato de sódio 0,5 M, e então foi realizada a análise utilizando-se microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse TE300).

#### **5.2.14. Análise de morfologia celular por citometria de fluxo**

As linhagens de interesse foram cultivadas a 25°C em meio YPD acrescido de sorbitol 1 M até atingirem  $D.O_{600nm}=0,6$ , e, em seguida, analisadas em um citômetro de fluxo Canto (Becton Dickson - BD). Foram analisados os parâmetros físicos de espalhamento de luz lateral (SSC - “side light scatter”) e espalhamento de luz frontal (FSC- “foward light scatter”). Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software Diva.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

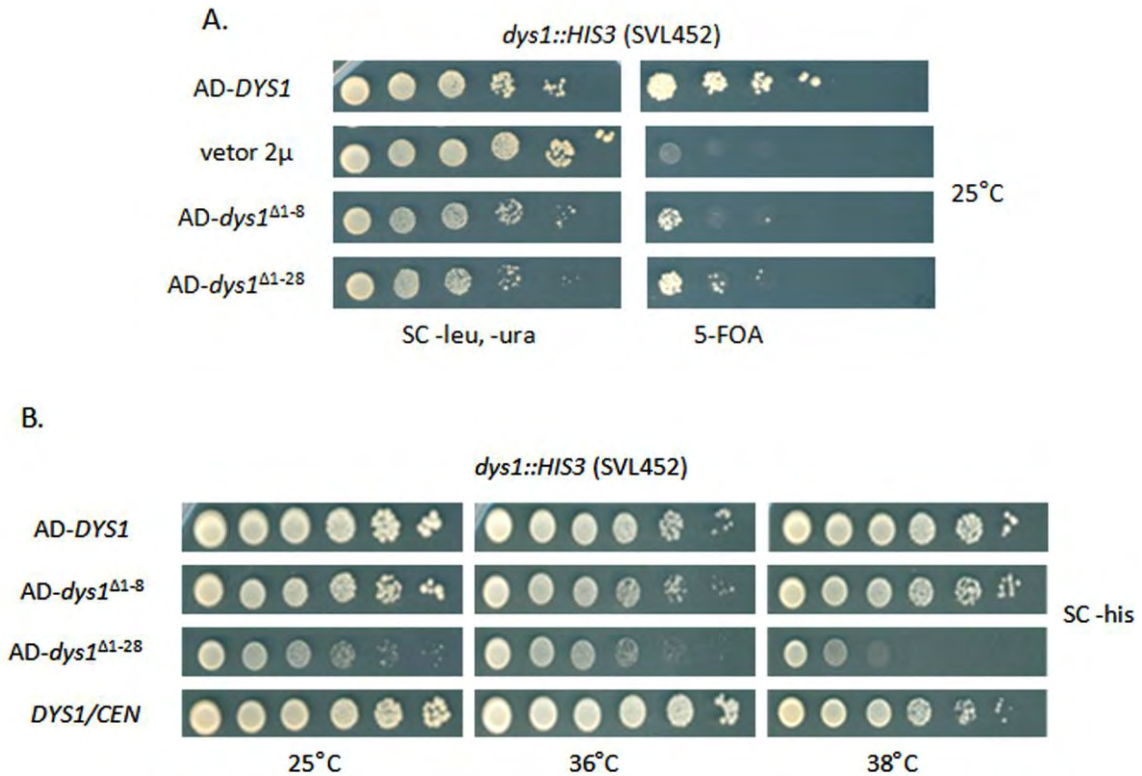
### 6.1. Análise do mutante *dys1*<sup>Δ1-28</sup>

#### 6.1.1. Identificação do mutante *dys1*<sup>Δ1-28</sup>

Um rastreamento de duplo-híbrido usando eIF5A como isca levou à identificação de diferentes clones contendo a região codificadora do gene *DYS1* completa ou possuindo deleções na região 5' do gene, sendo eles: *DYS1* (região codificadora completa), *dys1*<sup>Δ1-8</sup> (deleção que leva à perda dos 8 primeiros resíduos de aminoácidos) e *dys1*<sup>Δ1-28</sup> (deleção que leva à perda dos 28 primeiros resíduos de aminoácidos). Curiosamente, a deleção *dys1*<sup>Δ1-28</sup> leva à maior intensidade de interação física com eIF5A (THOMPSON *et al.* 2003), o que pode ocorrer devido à deleção de uma α-hélice do N-terminal, anteriormente sugerida como regulador negativo do acesso ao sítio catalítico de *DYS1* (LIAO *et al.* 1998).

Uma vez que ambas as deleções não reduzem a interação física com eIF5A, decidiu-se testar sua funcionalidade, verificando-se a capacidade destas deleções de *DYS1* de complementar o nocaute deste gene em *S. cerevisiae*. Como estas deleções estão clonadas em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (AD), necessário para o duplo-híbrido, foi também testada a fusão AD-*DYS1* (região codificadora completa). Para isso, a linhagem SVL452 (*dys1::HIS3* [*DYS1/URA3/CEN*]) foi transformada com os plasmídeos pSV558 (AD-*DYS1*), pSV559 (AD-*dys1*<sup>Δ1-8</sup>), pSV557 (AD-*dys1*<sup>Δ1-28</sup>) e pSV520 (*DYS1*). Em seguida, dois transformantes de cada foram submetidos ao ensaio de troca de plasmídeos ("plasmid shuffle"): foram cultivados em meio contendo ácido 5-flúor-orótico (5-FOA), o qual faz a seleção negativa do plasmídeo contendo a marca *URA3*. Após "plasmid shuffle", verificou-se que todos os plasmídeos testados são capazes de complementar o nocaute de *DYS1* (Figura 3A). Em seguida, para verificar a existência de fenótipo condicional de crescimento dependente da temperatura, os mesmos transformantes descritos acima foram cultivados em diferentes temperaturas, como mostrado na Figura 3B. Como pode ser observado, ambas as fusões AD-*DYS1* e AD-*dys1*<sup>Δ1-8</sup> foram capazes de sustentar o crescimento da linhagem *dys1::HIS3* nas diferentes temperaturas, de maneira semelhante ao *DYS1* selvagem sem fusão.

Interessantemente, a deleção AD-*dys1*<sup>Δ1-28</sup> leva a um fenótipo brando de menor crescimento já na temperatura permissiva, que é bastante acentuado com o aumento da temperatura, o que o caracteriza como um mutante sensível a temperatura.



**Figura 3. Avaliação da sensibilidade a temperatura dos mutantes *dys1*<sup>Δ1-28</sup> e *dys1*<sup>Δ1-8</sup>.** (A) Ensaio de “plasmid shuffle” realizado com a linhagem *dys1::HIS3* coberta com os plasmídeos pSV558 (AD-*DYS1*), pSV557 (AD-*dys1*<sup>Δ1-28</sup>), pSV559 (AD-*dys1*<sup>Δ1-8</sup>), assim como, com o vetor vazio utilizado como controle negativo. (B) Diluição seriada da linhagem *dys1::HIS3* coberta com os plasmídeos pSV558 (AD-*DYS1*), pSV557 (AD-*dys1*<sup>Δ1-28</sup>), pSV559 (AD-*dys1*<sup>Δ1-8</sup>), assim como, com o gene para *DYS1* selvagem (pSV520), utilizado como controle positivo), foram crescidas em meio SC (Synthetic Complete) desprovido de histidina nas temperaturas de 25°C, 36°C e 38°C.

### 6.1.2. Avaliação do fenótipo de *dys1*<sup>Δ1-28</sup> sem o domínio de ativação de Gal4

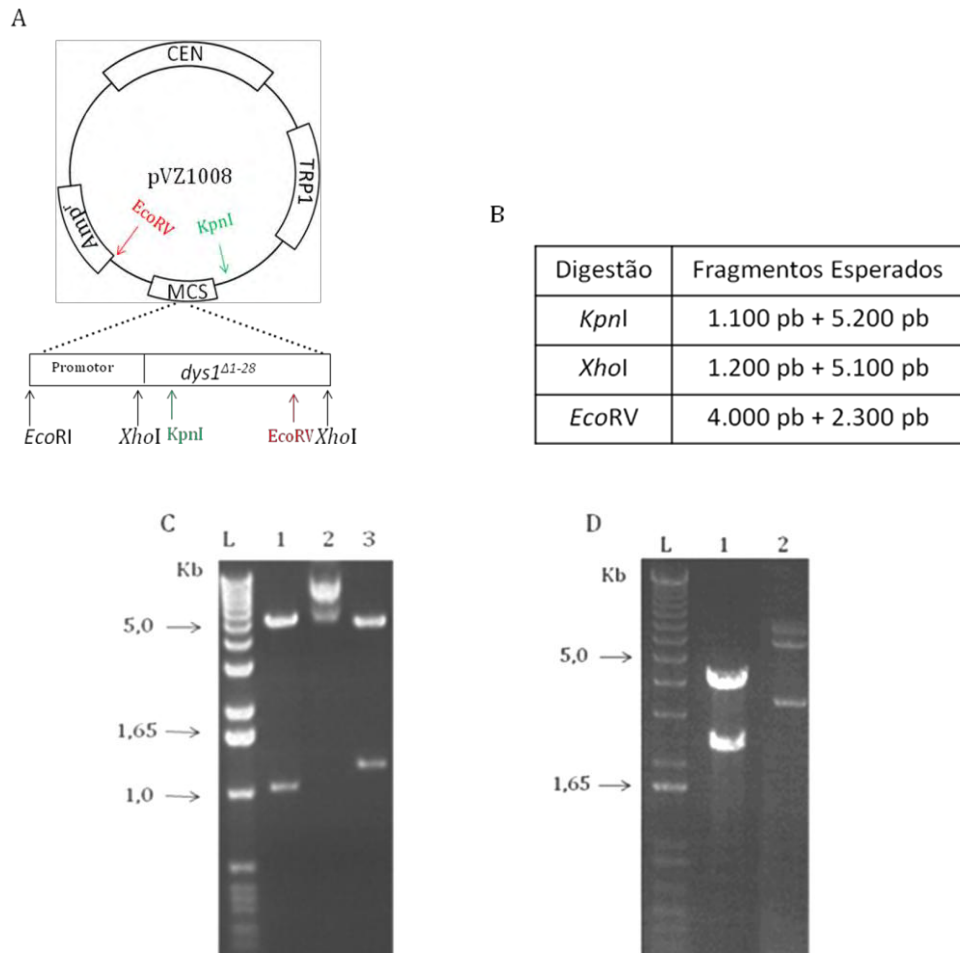
Para realização deste ensaio, inicialmente foi amplificado por PCR o promotor endógeno do gene *DYS1* utilizando os oligonucleotídeos SVO180 e SVO616, contendo, respectivamente, os sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* nas extremidades, gerando um produto de PCR com tamanho esperado de 320 pb. Após digestão com *EcoRI* e *XhoI*, o fragmento foi ligado ao vetor pSV58 previamente digerido com as mesmas enzimas e o produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli*. Após seleção de alguns transformantes, foi realizada extração do plasmídeo contendo o promotor de *DYS1*, seguido de diagnóstico de restrição com as enzimas *EcoRI/XhoI* e *SpeI*, independentemente, gerando os fragmentos esperados e confirmando a primeira etapa da clonagem (dados não mostrados), que resultou no plasmídeo pVZ1007.

Em seguida, para obter a região codificadora da deleção *dys1*<sup>Δ1-28</sup> (aproximadamente 1.200 pb), foi realizada a digestão do pSV557 (pACT-*dys1*<sup>Δ1-28</sup>) utilizando a enzima de restrição *XhoI*. O plasmídeo pVZ1007 foi também digerido com *XhoI* e utilizado para subclonar o fragmento com a região codificadora de *dys1*<sup>Δ1-28</sup>. O produto desta ligação foi então transformado em *E. coli* e alguns transformantes foram selecionados para realização de diagnóstico de restrição após extração plasmidial. A Figura 4C da mostra o resultado da análise de diagnóstico de restrição utilizando as enzimas *KpnI* e *XhoI*, que gerou fragmentos de aproximadamente 1.100 pb + 5.200 pb e 1.200 pb + 5.100 pb, respectivamente; enquanto que a Figura 4D mostra o resultado da análise de diagnóstico de restrição utilizando a enzima *EcoRV*, que gerou fragmentos de aproximadamente 4.000 pb + 2.300 pb. Assim, tanto a presença do promotor endógeno de *DYS1*, quanto a presença do fragmento *dys1*<sup>Δ1-28</sup> e sua orientação correta com relação ao vetor pVZ1007, foram confirmados por diagnóstico de restrição. Após a confirmação, o plasmídeo, então nomeado pVZ1008 foi utilizado para transformar a linhagem SVL452 (*dys1::HIS3*). Alguns transformantes foram então utilizados para realização do “plasmid shuffle” (ensaio de troca plasmidial): foram cultivados em meio contendo ácido 5-flúor-orótico (5-FOA), o qual faz a seleção negativa do plasmídeo contendo a marca *URA3*, para substituição da cópia selvagem de *DYS1* por *dys1*<sup>Δ1-28</sup> como

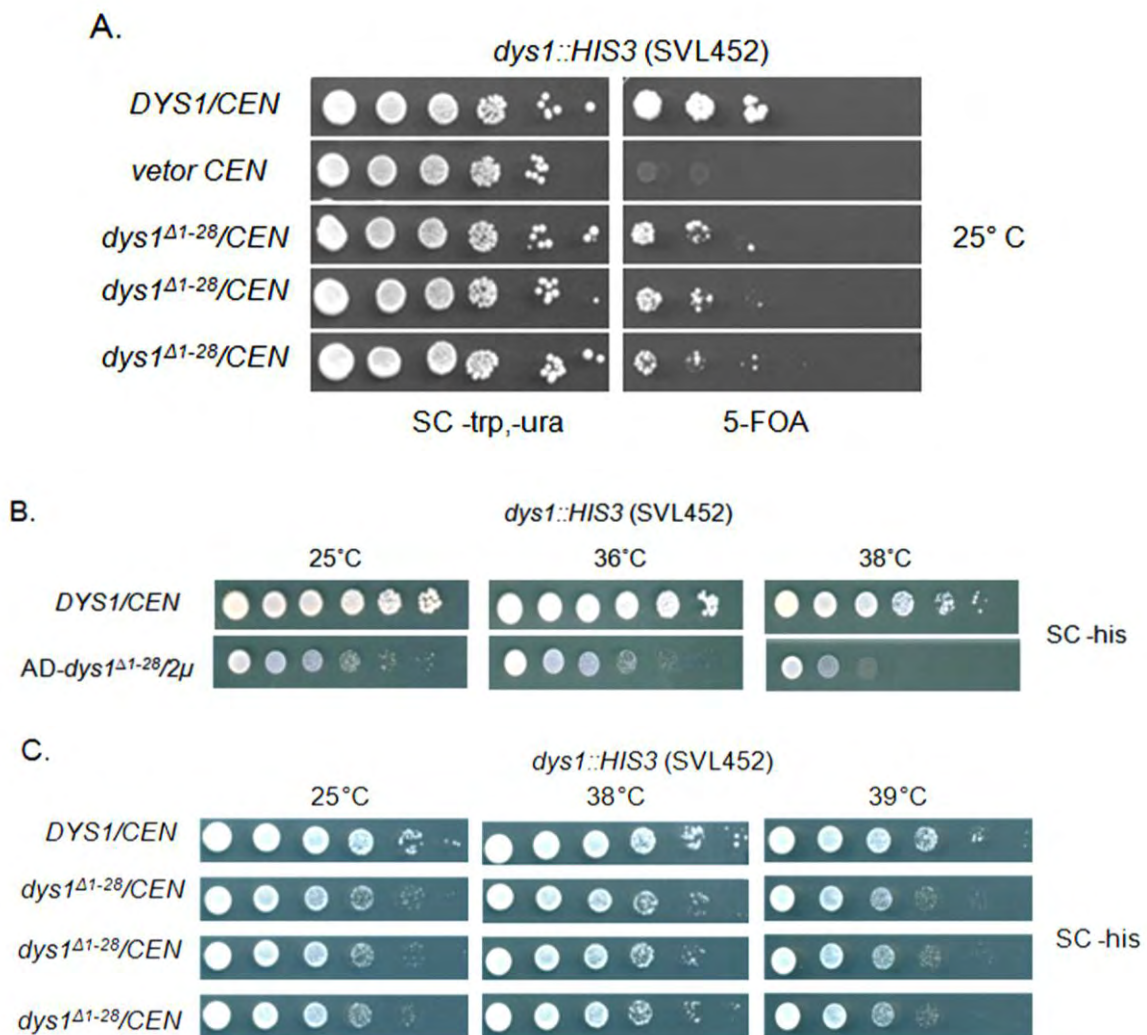
única fonte de Dys1 na célula (Figura 5A). Após a confirmação da troca plasmidial, alguns transformantes foram utilizados para verificação do fenótipo condicional antes apresentado pelo alelo mutante na presença do domínio de ativação por Gal4 (Figura 5B). Como pode ser visto na Figura 5C, a construção contendo o alelo *dys1*<sup>Δ1-28</sup> na ausência do domínio de ativação por Gal4 apresentou um fenótipo brando de crescimento quando comparado ao alelo selvagem. Como o mutante *dys1*<sup>Δ1-28</sup> originalmente identificado estava presente em um plasmídeo 2μ (alto número de cópias), questionou-se se a diminuição de severidade de fenótipo de crescimento deste mutante se devia à ausência do domínio Gal4-AD ou à sua presença em vetor *CEN* (baixo número de cópias). Procedeu-se então à subclonagem do alelo *dys1*<sup>Δ1-28</sup> em vetor 2μ. Para isso, foi realizada a digestão do plasmídeo pVZ1008 utilizando a enzima de restrição *PvuII*. O plasmídeo pSV63 foi também digerido com a enzima *PvuII* e utilizado para subclonagem. O produto da ligação foi então transformado em *E. coli* e alguns transformantes foram selecionados para realização de diagnóstico de restrição após extração plasmidial. A Figura 6B mostra o resultado da análise do diagnóstico, onde apenas a liberação do inserto de aproximadamente 2 Kb confirmou a clonagem. Uma vez confirmada a construção, chamada de pVZ1017, este foi utilizado para transformar a linhagem SVL452 (*dys1::HIS3*). Alguns transformantes foram então utilizados para realização do “plasmid shuffle” (Figura 7A) e, em seguida, análise do fenótipo de crescimento celular. Como mostra a Figura 7B, a construção plasmidial contendo o alelo *dys1*<sup>Δ1-28</sup>, sem o Gal4-AD e contido em um plasmídeo de alto número de cópias, também não foi capaz de apresentar o fenótipo antes observado no alelo identificado no rastreamento de duplo-híbrido, demonstrando fenótipo nas diferentes temperaturas ainda mais similares ao selvagem que a construção *dys1*<sup>Δ1-28</sup>/*CEN*. (Figura 3B). A ausência do fenótipo, provavelmente, se deve ao fato do domínio de ativação por Gal4, além de apresentar um aumento em torno de 2/3 na proteína, está presente na região N-terminal, a qual está presente a α-hélice descrita como responsável pelo bloqueio do sítio de interação entre eIF5A e Dys1 (THOMPSON *et al.* 2003). Dessa forma, o domínio de ativação por Gal4 pode estar ocasionando uma alteração conformacional da proteína, o que acarretaria em alteração na sua atividade e conseqüentemente defeitos no crescimento celular.



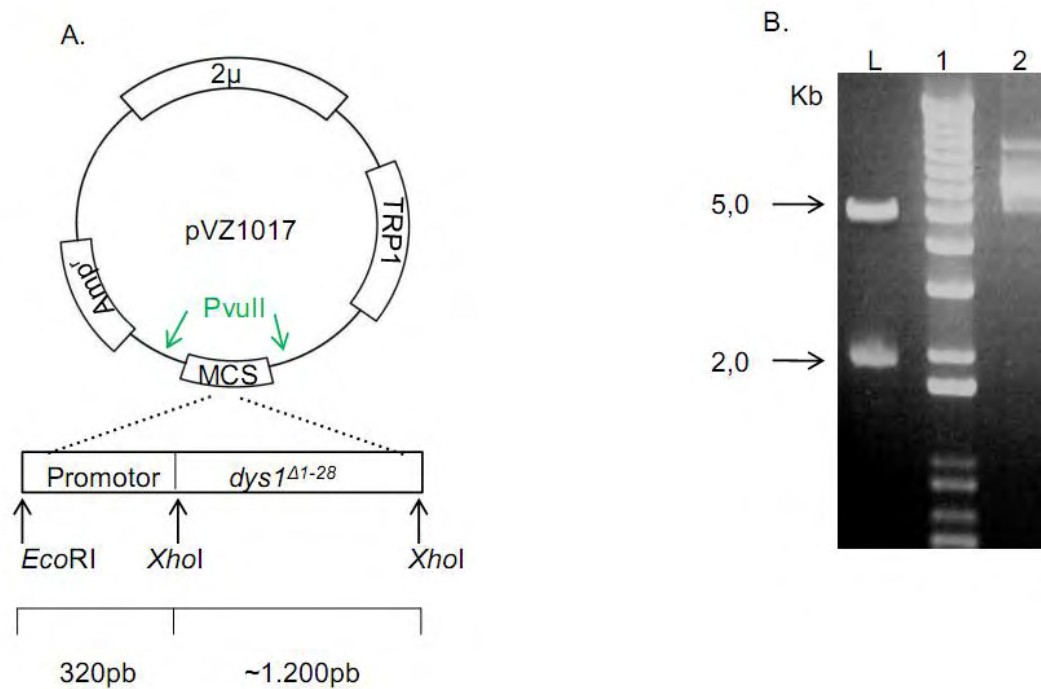
Devido ao fato de o fenótipo apresentado na ausência da proteína de fusão com Gal4-AD não ser o mesmo observado anteriormente para com a fusão Gal4-AD, este alelo foi então desconsiderado nos ensaios subsequentes.



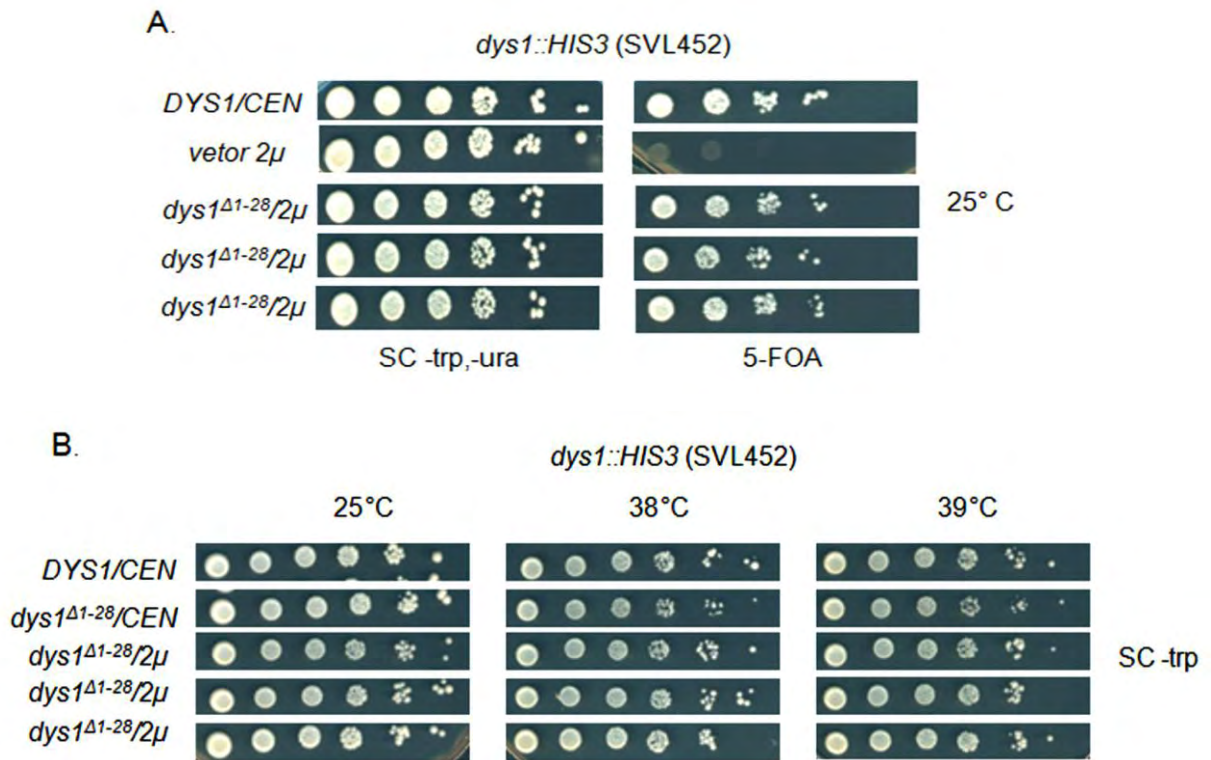
**Figura 4. Caracterização da construção plasmidial pVZ1008. (A)** Mapa simplificado da construção plasmidial. **(B)** Tabela com os tamanhos esperados dos fragmentos gerados após a digestão. **(C)** Confirmação por diagnóstico de restrição após eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pVZ1008. L: padrão de tamanho molecular “1 kb Ladder Plus” (Invitrogen); canaleta 1: pVZ1008 digerido com a enzima *KpnI* (setas em verde na Figura 4A); canaleta 2: pVZ1008 sem digerir; canaleta 3: pVZ1008 digerido com a enzima *XhoI*. **(D)** Confirmação por diagnóstico de restrição do plasmídeo pVZ1008. L: padrão de tamanho molecular “1 kb Ladder Plus” (Invitrogen); canaleta 1: pVZ1008 digerido com a enzima *EcoRV* (setas em vermelho na Figura 4A); canaleta 2: pVZ1008 sem digerir.



**Figura 5. Avaliação da sensibilidade a temperatura do mutante *dys1<sup>Δ1-28</sup>*.** **(A)** Ensaio de “plasmid shuffle” realizado com a linhagem *dys1::HIS3 (SVL452)* transformada com o plasmídeo pVZ1008 (*dys1<sup>Δ1-28</sup>*), utilizando *DYS1* selvagem como controle positivo (pSV520) e vetor vazio como controle negativo (pSV58), realizado na temperatura de 25°C, em meio sintético completo (SC) desprovido de triptofano e uracila, e em meio 5-FOA. **(B)** Diluição seriada de linhagem *dys1::HIS3* coberta com os plasmídeos pSV558 (AD-*DYS1*), pSV557 (AD-*dys1<sup>Δ1-28</sup>*), crescidas em meio SC desprovido de histidina, nas temperaturas de 25°C, 36°C e 38°C. **(C)** Diluição seriada de linhagem *dys1::HIS3* coberta com o plasmídeo pVZ1008 (*dys1<sup>Δ1-28</sup>*), utilizando *DYS1* selvagem como controle positivo (pSV520), crescidas em meio SC desprovido de histidina, nas temperaturas de 25°C, 38°C e 39°C.



**Figura 6. Caracterização da construção plasmidial pVZ1017. (A)** Mapa simplificado da construção plasmidial. **(B)** Confirmação por diagnóstico de restrição após eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pVZ1017. L: padrão de tamanho molecular “1 kb Ladder Plus” (Invitrogen); canaleta 1: pVZ1017 digerido com a enzima *PvuII* (setas em verde na Figura 6A); canaleta 2: pVZ1017 sem digerir.



**Figura 7. Avaliação da sensibilidade a temperatura do mutante *dys1* $\Delta^{1-28}$ .** **(A)** Ensaio de “plasmid shuffle” realizado com a linhagem *dys1::HIS3* (SVL452) transformada com o plasmídeo pVZ1017 (*dys1* $\Delta^{1-28}/2\mu$ ), utilizando *DYS1* selvagem como controle positivo (pSV520) e vetor vazio como controle negativo (pSV63), realizado na temperatura de 25°C, em meio SC desprovido de triptofano e uracila e em meio 5-FOA. **(B)** Diluição seriada da linhagem *dys1::HIS3* coberta com o plasmídeo pVZ1017 (*dys1* $\Delta^{1-28}/2\mu$ ) e coberta com o plasmídeo pVZ1008 (*dys1* $\Delta^{1-28}/CEN$ ), utilizando *DYS1* selvagem como controle positivo (pSV520) crescidas em meio SC desprovido de triptofano nas temperaturas de 25°C, 38°C e 39°C.

## 6.2. Mutante *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup> (*dys1-1*)

Uma vez que foi anteriormente demonstrado que Dys1 pode ser fosforilado *in vitro* por proteína quinase C (PKC) de mamífero (KANG *et al.* 2002) e o gene ortólogo de levedura *PKC1* é um supressor em alto número de cópias do alelo *tif51A-1* de eIF5A (VALENTINI *et al.* 2002), foi realizada em nosso laboratório a análise de interação funcional entre Pkc1 e Dys1 em *S. cerevisiae*.

Um dos objetivos dessa análise foi a utilização de mutagênese sítio-dirigida para substituir os possíveis sítios de fosforilação de Pkc1 em Dys1, seguido da análise da capacidade de complementação dos alelos mutantes de *DYS1* gerados. O primeiro alelo mutante gerado deveria conter apenas uma mutação para levar à substituição T118A; no entanto, com o seu sequenciamento, verificou-se que o alelo de *DYS1* naturalmente presente na linhagem W303, utilizado como molde para a mutagênese sítio-dirigida, também continha as substituições W75R e A147T, quando comparado com a sequência disponível no banco de dados do genoma de *S. cerevisiae* (Saccharomyces Genome Database) (Figura 8). Em seguida, quando realizado o teste de complementação do nocaute *dys1::HIS3* com os alelos de *DYS1* contendo as substituições W75R/A147T (alelo da W303) e W75R/T118A/A147T (novo alelo gerado), por “plasmid shuffle”, verificou-se que o alelo W75R/A147T (*DYS1*) é capaz de complementar o nocaute de *dys1* em todas as temperaturas testadas, enquanto que o alelo W75R/T118A/A147T não foi capaz de complementar a linhagem nocaute de *dys1* (Figura 9A).

Uma vez que defeitos relacionados à via de sinalização por Pkc1 são suprimidos pela utilização de um estabilizador osmótico (LEVIN and BARTLETT-HEUBUSCH 1992), como o sorbitol, por exemplo, e mutantes sensíveis a temperatura de eIF5A também são suprimidos por sorbitol (VALENTINI *et al.* 2002), o ensaio de “plasmid shuffle” foi repetido, utilizando-se meio 5-FOA contendo também sorbitol 1 M. Curiosamente, desta vez, foi observado crescimento da linhagem contendo apenas o alelo *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup> no meio contendo sorbitol (Figura 9A). Este resultado foi repetido, provando ser um efeito específico de supressão do sorbitol com relação ao alelo *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup>.

Com o intuito de facilitar a citação do alelo *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup>, ele foi então nomeado *dys1-1*. Em seguida, foi testado se a supressão promovida pelo sorbitol para o crescimento do mutante *dys1-1* também ocorre em temperaturas maiores que 25°C e, como mostrado na Figura 9B, além de se tratar de um mutante que somente cresce na presença de sorbitol, tal crescimento é inibido pelo aumento da temperatura.

```

BY      MSD INEKLPELLQDAVLKASVPI PDD FVKVQIGIDYSK PEATNMRATDLIEAMKTMGFQA 59
W303    MSD INEKLPELLQDAVLKASVPI PDD FVKVQIGIDYSK PEATNMRATDLIEAMKTMGFQA

BY      SSVG TACEI I I D S M R S W R G K H I D E L D D H E K K G C F D E E G Y Q K T T I F M G Y T S N L I S S G V R E T L 119
W303    SSVG TACEI I I D S M R S R R G K H I D E L D D H E K K G C F D E E G Y Q K T T I F M G Y T S N L I S S G V R E A L

BY      R Y L V Q H K M V D A V V T S A G G V E E D L I K C L A P T Y L G E F A L K G K S L R D Q G M N R I G N L L V P N D N Y 176
W303    R Y L V Q H K M V D A V V T S A G G V E E D L I K C L I T P T Y L G E F A L K G K S L R D Q G M N R I G N L L V P N D N Y

BY      C K F E E W I V P I L D K M L E E Q D E Y V K K H G A D C L E A N Q D V D S P I W T P S K M I D R F G K E I N D E S S V 239
W303    C K F E E W I V P I L D K M L E E Q D E Y V K K H G A D C L E A N Q D V D S P I W T P S K M I D R F G K E I N D E S S V

BY      L Y W A H K N K I P I F C P S L T D G S I G D M L F F H T F K A S F K Q L R V D I V G D I R K I N S M S M A A Y R A G M 299
W303    L Y W A H K N K I P I F C P S L T D G S I G D M L F F H T F K A S F K Q L R V D I V G D I R K I N S M S M A A Y R A G M

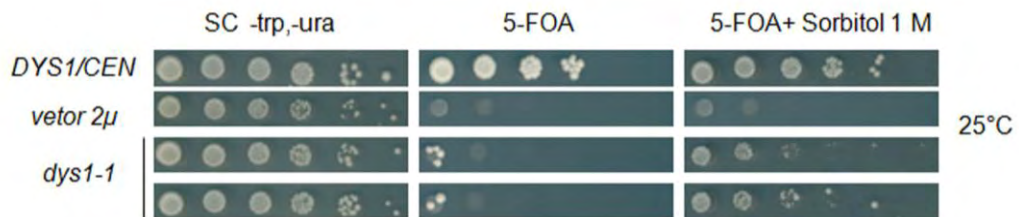
BY      I I L G G G L I K H H I A N A C L M R N G A D Y A V Y I N T G Q E Y D G S D A G A R P D E A V S W G K I K A E A K S V K 359
W303    I I L G G G L I K H H I A N A C L M R N G A D Y A V Y I N T G Q E Y D G S D A G A R P D E A V S W G K I K A E A K S V K

BY      L F A D V T T V L P L I V A A T F A S G K P I K K V K N 387
W303    L F A D V T T V L P L I V A A T F A S G K P I K K V K N

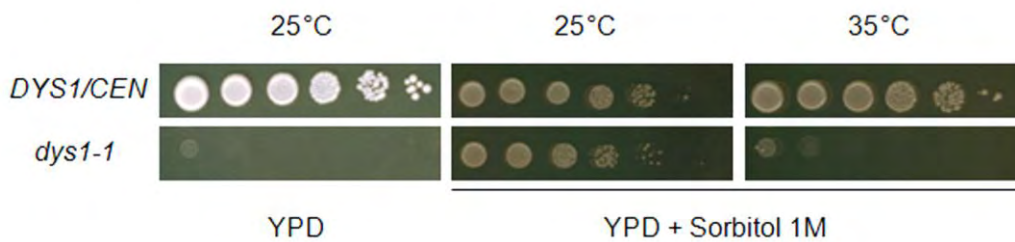
```

**Figura 8 – Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de Dys1 da linhagem depositada no banco de dados (BY) e da linhagem W303. Em destaque estão os possíveis sítios de fosforilação em Dys1: não conservados em humanos (amarelo) e conservados (vermelho); em azul as substituições W75R e A147T que ocorrem naturalmente na linhagem W303 e a mutação T118A em um possível sítio de fosforilação por Pkc1.**

A.



B.



**Figura 9. Supressão do mutante *dys1*<sup>W75R/T118A/A147T</sup> (*dys1-1*) por sorbitol.** (A) Ensaio de “plasmid shuffle” realizado com a SVL452 (*dys1::HIS3*) transformada com o plasmídeo pSV730 (*dys1-1*), utilizando *DYS1* selvagem como controle positivo (pSV520), assim como com o vetor vazio (pSV58), realizado na temperatura de 25°C em meio SC desprovido de triptofano e uracila, em meio 5-FOA e em meio 5-FOA acrescido de sorbitol 1 M. (B) Teste de sensibilidade a temperatura realizado com a linhagem contendo *DYS1* selvagem e a linhagem SVL452 (*dys1::HIS3*), transformada com o plasmídeo pSV730 (*dys1-1*) nas temperaturas de 25°C e 35°C em meio YPD acrescido de sorbitol 1 M.

### 6.2.1. Análise dos níveis totais da proteína Dys1

Como mencionado anteriormente, o alelo *dys1-1* foi gerado a partir de mutação sítio-dirigida em *DYS1* proveniente da linhagem W303, o qual apresenta naturalmente as substituições W75R e A147T, quando comparado com a sequência de *DYS1* depositada no SGD (proveniente de linhagens BY). Apesar de a mutação induzida em *DYS1* do alelo *dys1-1* ter sido realizada em um possível sítio de fosforilação de PKC (T118A), a mesma mutação feita em alelo de *DYS1* não contendo as substituições W75R e A147T não gerou qualquer fenótipo diferente do selvagem em linhagem complementada por *dys1<sup>T118A</sup>* (W. S. Silveira, dados não publicados). Isto sugere que uma possível perda de fosforilação por Pkc1 no resíduo T118 de Dys1 apenas não seria capaz de gerar o fenótipo causado por *dys1-1*. Por isso, foi sugerido que possíveis eventos, como perda de estrutura da proteína seguida de degradação de Dys1 na linhagem *dys1-1*, poderiam estar envolvidos na perda de função desta proteína. Devido a isso, decidiu-se analisar os níveis de Dys1 na linhagem *dys1-1*. Para isso, as linhagens de interesse foram crescidas e então foi realizado SDS-PAGE, seguido de Western Blot, utilizando eEF2 como controle de carregamento. Conforme observado na Figura 10, a linhagem *dys1-1* apresenta uma grande diminuição nos níveis totais de Dys1 na célula quando comparada com a linhagem selvagem.

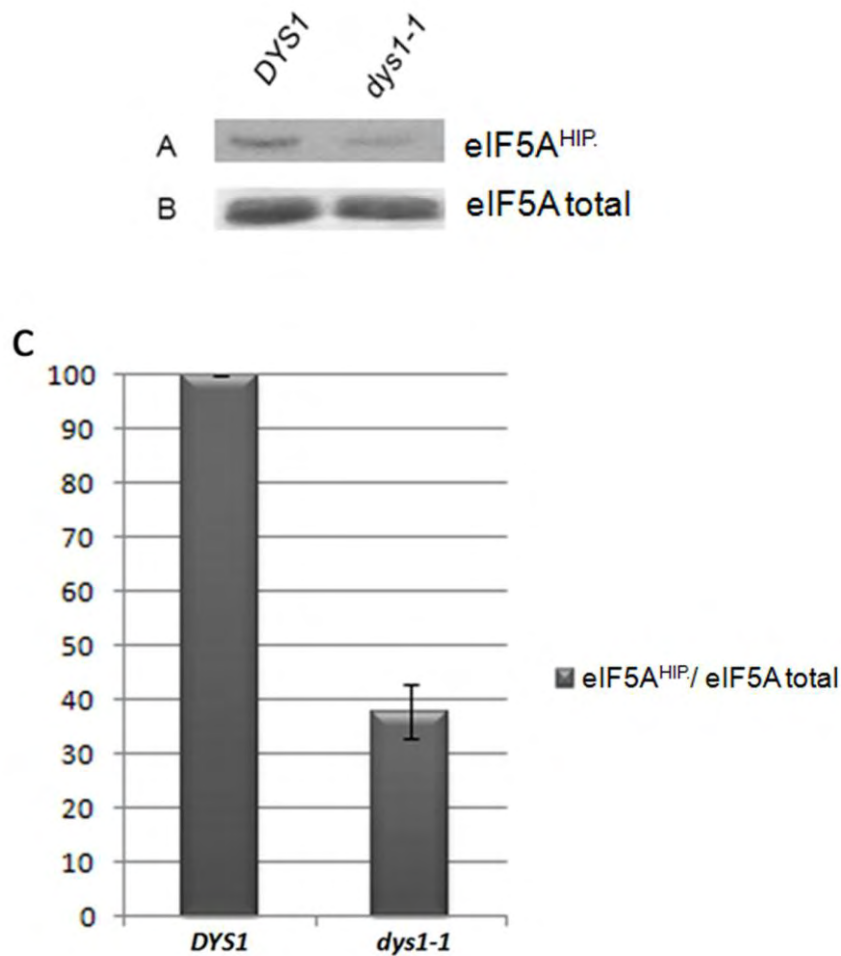


**Figura 10. Análise dos níveis de Dys1 no mutante *dys1-1*.** Ensaio de Western Blot realizado com a linhagem *dys1-1* e com a linhagem selvagem utilizando anticorpo anti-Dys1. A proteína eEF2 foi utilizada como controle de carregamento do ensaio.



### 6.2.2. Análise dos níveis de hipusinação *in vivo*

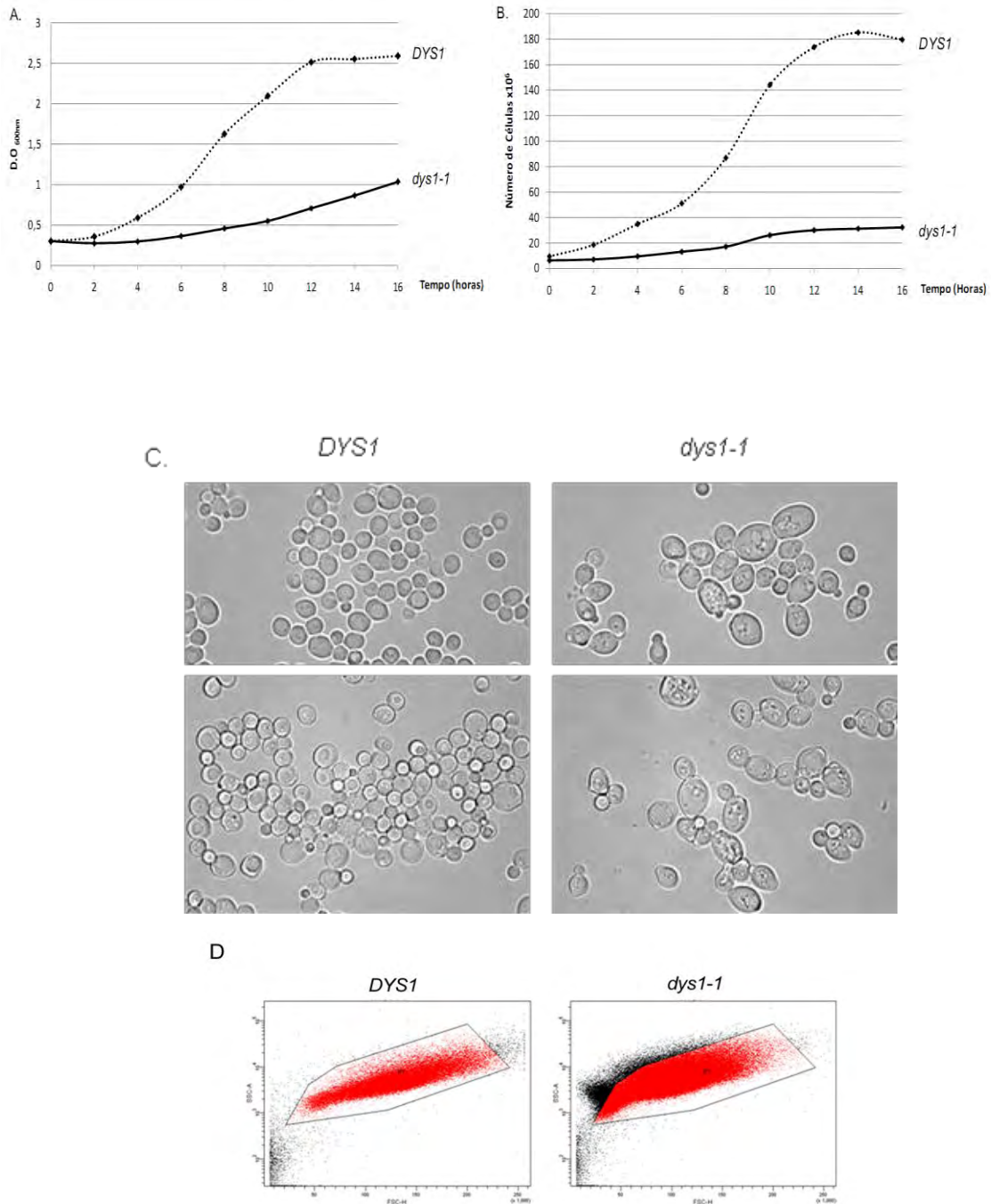
Uma vez identificada a diminuição nos níveis de Dys1 na linhagem *dys1-1*, foi realizado o ensaio para determinação nos níveis de hipusinação desta linhagem. Para isso, a linhagem foi crescida na presença de espemidina-[H<sup>3</sup>], a qual foi identificada posteriormente no extrato protéico após incorporação em eIF5A devido à modificação pós traducional hipusinação. Para isso, foi realizada dosagem dos extratos protéicos pelo método de Bradford (Bio-Rad) e então, os extratos normalizados foram submetidos a imunoprecipitação seguido de SDS-PAGE. Em seguida, foi realizada a quantificação da imunoprecipitação de eIF5A e, então o gel foi exposto a um filme autorradiográfico após fixação e desidratação, o que revelou apenas eIF5A hipusinada. Conforme observado na Figura 11A, após exposição e revelação do filme autorradiográfico, a identificação de eIF5A hipusinada na linhagem *dys1-1* é muito inferior à observada na linhagem selvagem, uma vez os níveis totais de eIF5A (hipusinado e não hipusinado) não se mostraram alterados, ficando evidenciada apenas a diminuição da modificação pós-traducional. Adicionalmente, a diminuição nos níveis de hipusinação também é evidenciada na Figura 11C, ao analisarmos a quantificação de eIF5A hipusinada (Figura 11A) por eIF5A total (Figura 11B).



**Figura 11. Avaliação dos níveis de hipusinação do alelo mutante *dys1-1*.** **(A)** Análise dos níveis de hipusinação das linhagens, contendo eIF5A hipusinado marcada radioativamente, através de exposição do gel de poli-acrilamida a um filme autorradiográfico. **(B)** Análise da quantificação de eIF5A total após realização de imunoprecipitação. **(C)** Quantificação dos níveis de hipusinação relativa após análise das bandas de eIF5A hipusinado versus eIF5A total.

### 6.2.3. Determinação da curva de crescimento

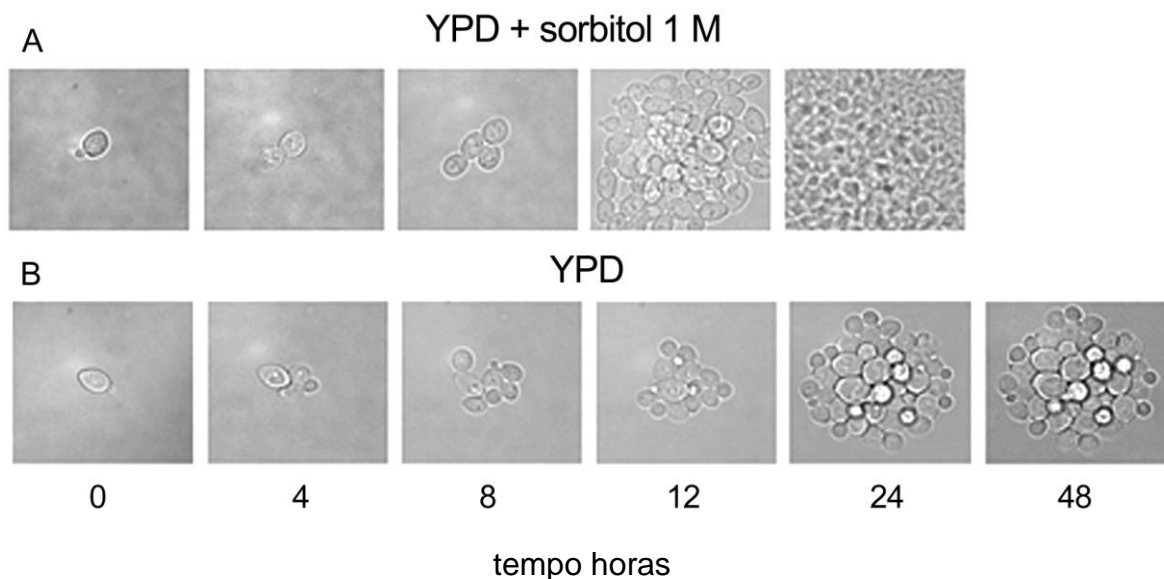
Uma vez que as funções desempenhadas pelos genes estão intimamente relacionados com os fenótipos apresentados por seus mutantes, este trabalho visa caracterizar funcionalmente o mutante *dys1-1*. Para melhor entendermos o comportamento deste mutante, foi realizada a curva de crescimento. Para isso, a linhagem selvagem (*DYS1*) e a linhagem mutante (*dys1-1*) foram crescidas em YPD acrescido de 1 M do regulador osmótico sorbitol a 25°C, uma vez que o mutante *dys1-1* só apresenta crescimento nestas condições. As linhagens foram então deixadas sob agitação por uma noite e diluídas no dia seguinte para uma D.O.<sub>600nm</sub> 0,2. A partir de então, a taxa de crescimento foi monitorada por um período de 16 horas, sendo realizada a contagem celular em câmara de Neubauer, bem como a medida da densidade óptica (absorbância a 600nm). Como podemos observar na Figura 12A, a linhagem *dys1-1* apresenta uma diminuição na taxa de crescimento celular em torno de 2,5 vezes a linhagem selvagem (*DYS1*), quando comparada a densidade óptica, porém quando levamos em conta o número de células (Figura 12B), o alelo *dys1-1* apresenta uma diminuição na taxa de crescimento celular em torno de 6 vezes a linhagem selvagem. Essa diferença nas medidas de densidade óptica e número de células é explicada pelo maior volume celular do mutante *dys1-1*, o que pode ser observado na Figura 12C. Portanto, o alelo *dys1-1*, além de apresentar uma diminuição na taxa de crescimento, apresenta ainda um aumento em seu tamanho celular. Com o intuito de quantificarmos esse aumento celular apresentado pelo alelo *dys1-1*, foi realizada análise utilizando citometria de fluxo. Como observado na Figura 12D, fica evidente o aumento de tamanho celular do alelo *dys1-1*, sendo observado pela dispersão dos pontos no gráfico em que foi analisado o volume celular em relação à granulosidade, através da citometria de fluxo.



**Figura 12. Curva de crescimento da linhagem selvagem (*DYS1*) e da linhagem mutante (*dys1-1*).** As linhagens foram crescidas em YPD acrescido de 1M de sorbitol e a taxa de crescimento foi monitorada por 16 horas através da densidade óptica à 600nm **(A)** e através da contagem celular **(B)**. **(C)** Análise da diferença no tamanho celular das linhagens por microscopia de campo claro. **(D)** Análise da diferença no tamanho celular das linhagens através de citometria de fluxo analisando os parâmetros físicos de espalhamento de luz lateral (SSC) e de espalhamento de luz frontal (FSC).

#### 6.2.4. Morfologia de morte do mutante *dys1-1* na ausência de sorbitol

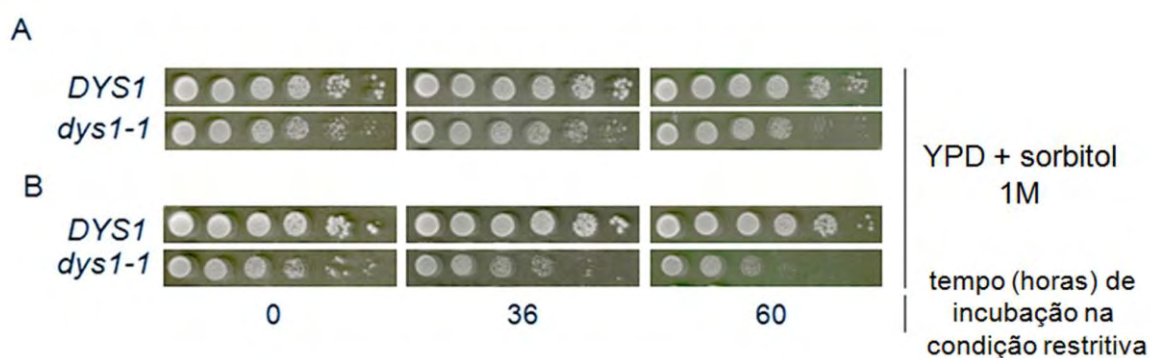
Devido ao fato de o alelo *dys1-1* ser um mutante condicional, o qual apresenta crescimento apenas na presença de um regulador osmótico, como o sorbitol, decidiu-se verificar como ficaria a morfologia celular deste mutante na ausência do sorbitol. Para tanto, uma lâmina foi coberta por uma fina camada de meio de cultura apropriado (YPD adicionado ou não de 1 M de sorbitol) e então uma suspensão do alelo *dys1-1* foi adicionada sobre estes meios e cobertos por uma lamínula. Estas lâminas foram então visualizadas por microscopia de campo claro e fotografadas em diferentes intervalos de tempo. Como mostra a Figura 13A, o alelo *dys1-1* após 24 horas de crescimento em meio contendo 1 M de sorbitol foi capaz de crescer por todo o campo de visão do microscópio. Por outro lado, em meio desprovido de sorbitol (Figura 13B), após 24 horas de crescimento, o alelo *dys1-1* não apresentou mais diferenças em seu crescimento celular.



**Figura 13. Determinação do crescimento celular do alelo *dys1-1* na ausência de sorbitol.** Uma suspensão do alelo foi aplicada sobre uma lâmina contendo meio de cultura acrescido de sorbitol (A) e desprovido de sorbitol (B). Uma única célula foi focalizada e fotografada em diferentes intervalos de tempo para o acompanhamento de seu crescimento celular.

### 6.2.5. Determinação da viabilidade celular

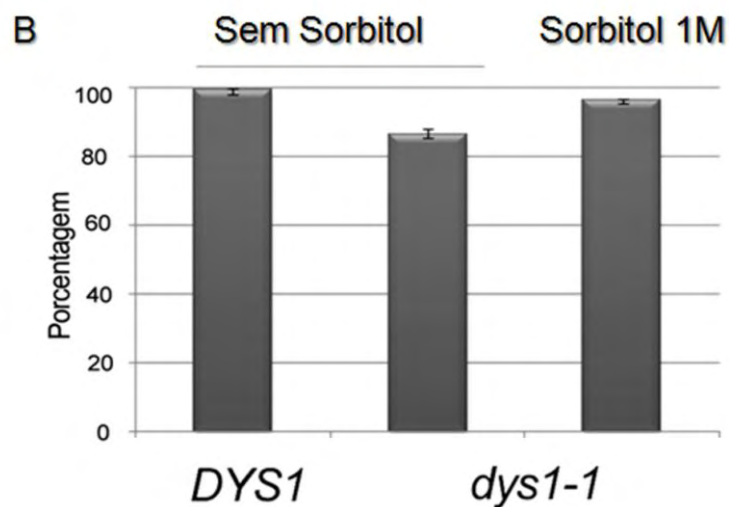
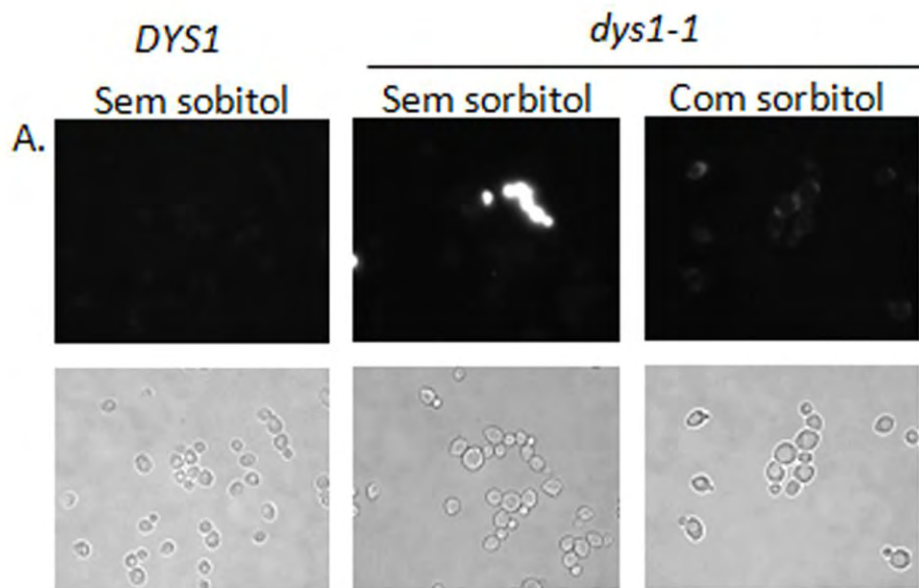
Como descrito no item acima, após 24 horas de crescimento, o alelo *dys1-1* não apresentou aumento na taxa de crescimento celular. Devido a isso, decidimos analisar a taxa de viabilidade celular do alelo em diferentes condições restritivas para seu crescimento. Para isso, as linhagens foram crescidas em meio YPD acrescido de sorbitol 1 M. Após crescimento das células, parte da cultura foi submetida a condições não permissivas de crescimento (ausência de sorbitol e a 36°C), nos intervalos de tempo indicados na Figura 14 e, então, plaqueadas e incubadas na condição permissiva. Interessantemente, é observada apenas uma pequena diminuição na taxa de viabilidade celular quando o alelo foi submetido à ausência do regulador osmótico, juntamente com aumento de temperatura (Figura 14B), ao compararmos com a linhagem crescida na condição permissiva (Figura 14A). Curiosamente, não foi observado crescimento significativo quando analisada a densidade óptica (absorbância a 600<sub>nm</sub>) das culturas quando realizado o “shift” (dados não mostrados).



**Figura 14. Avaliação da viabilidade celular do alelo *dys1-1* após incubação em condições restritivas. (A)** Diluição seriada da linhagem *dys1-1*, crescida na condição permissiva. **(B)** Diluição seriada da linhagem *dys1-1*, após submetida a “shift” de temperatura e ausência do regulador osmótico.

### 6.2.6. Análise de fenótipo de lise celular

Como descrito na literatura, mutantes suprimidos pela presença de um regulador osmótico, como o sorbitol, muitas vezes apresentam fenótipo de lise celular, como é o caso do mutante *pkc1Δ* (HEINISCH *et al.* 1999). Sendo o alelo *dys1-1* um mutante condicional que necessita da presença do sorbitol para o crescimento, e com o intuito de analisarmos defeitos de parede celular neste mutante, foi realizada a análise de lise celular do alelo *dys1-1*, utilizando a linhagem selvagem como controle. Para isso, as linhagens de interesse foram crescidas a 25°C nas condições descritas na Figura 15 e tratadas com iodeto de propídeo, o qual marca apenas células com membrana citoplasmática rompida. Conforme observado na Figura 15A, o alelo *dys1-1*, na ausência do regulador osmótico, apresenta lise celular. Por outro lado, ao analisarmos na presença do regulador osmótico, este alelo apresenta-se como a linhagem selvagem, ou seja, não é visualizada presença de lise celular. Com o intuito de quantificar o fenótipo de lise celular apresentado pelo alelo *dys1-1*, foi realizada a contagem de células coradas com azul de metileno, o qual cora, em azul, apenas as células inviáveis. Conforme observado na Figura 15B, é baixa a frequência com a qual é observada lise celular do alelo *dys1-1* na ausência do regulador osmótico, sendo observado um aumento em torno de 10%, quando comparado na presença do regulador osmótico. Interessantemente, este resultado está de acordo com o que observamos no item anterior, onde mesmo após o alelo *dys1-1* ser submetido a condições restritivas para o crescimento celular, ao retornar a condição permissiva, este retomou seu crescimento. Portanto, a baixa taxa de crescimento celular deste alelo observada no item 6.2.3, não é devido a lise celular.

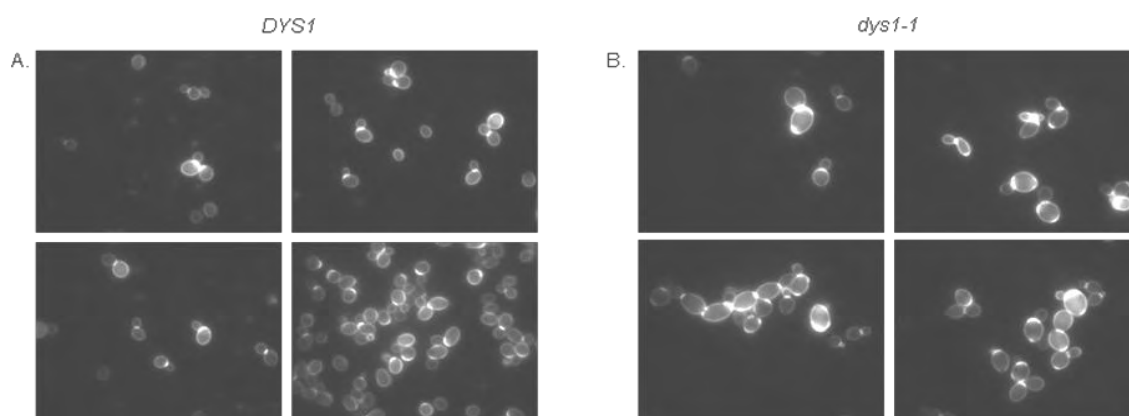


**Figura 15. Análise da lise celular do alelo mutante (*dys1-1*).** (A) As linhagens foram tratadas com iodeto de propídeo e então visualizadas e fotografadas através de microscopia de campo claro e de fluorescência. (B) As linhagens foram coradas com azul de metileno e realizada a contagem celular para quantificação da lise celular. A quantificação é mostrada relativamente à linhagem selvagem (100%).



### 6.2.7. Verificação da integridade da parede celular

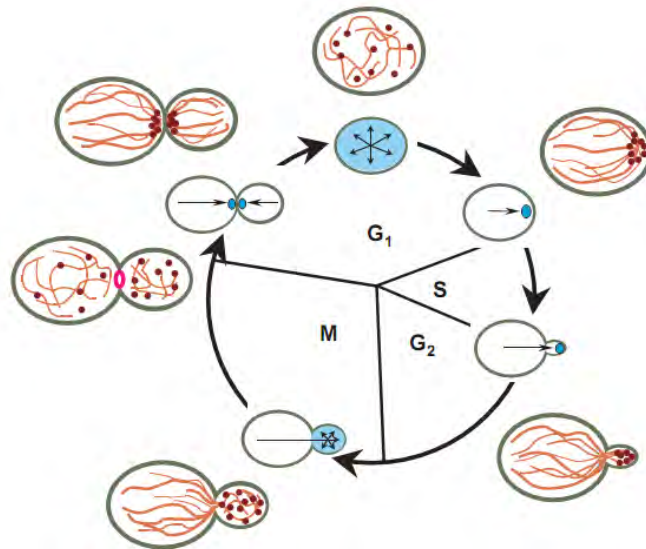
Devido ao fato de o alelo *dys1-1* apresentar aumento no tamanho celular e necessitar do regulador osmótico para o crescimento, características relacionadas com defeitos na parede celular, decidiu-se verificar a integridade da parede celular do alelo *dys1-1*. Para tanto, as linhagens foram crescidas em meio contendo sorbitol, lavadas e incubadas com Calcofluor White, o qual se liga à quitina da parede celular. Conforme mostra a Figura 16, podemos observar que não existem diferenças significativas entre o alelo *dys1-1* (Figura 16B) e à linhagem selvagem (Figura 16A), quando se analisam alterações no conteúdo e deposição de quitina da parede celular. Porém, ficam evidenciadas, assim como descrito no item 6.2.3., alterações na morfologia celular, onde o alelo *dys1-1* (Figura 16B) apresenta células maiores quando comparada a linhagem selvagem (Figura 16A). Curiosamente, já foram observadas alterações morfológicas em linhagens mutantes de *TIF51A* que apresentam depleção de eIF5A (KANG and HERSHEY 1994), bem como em células com depleção de poliaminas (BALASUNDARAM *et al.* 1991). O estudo futuro das causas deste fenótipo de aumento do volume celular poderá contribuir para o entendimento do papel da hipusinação na célula. Além disso, esses dados confirmam que a hipusinação constitui uma das principais funções das poliaminas na célula.



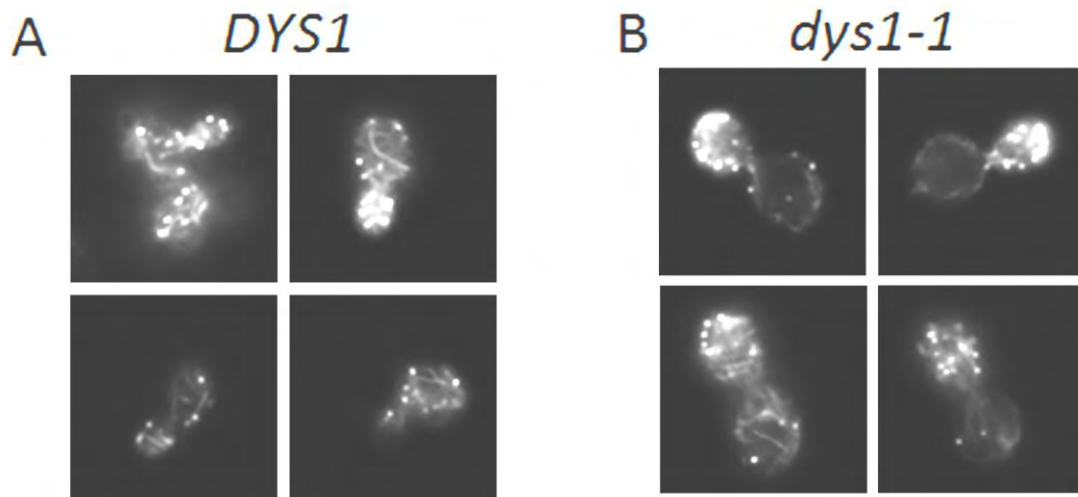
**Figura 16. Análise da integridade da parede celular do alelo *dys1-1*.** A linhagem selvagem (A) e a linhagem mutante (B) foram tratadas com Calcofluor White, visualizadas e fotografadas através de microscopia de fluorescência.

### 6.2.8. Análise do citoesqueleto de actina

Uma vez que já foi demonstrado que mutantes de eIF5A possuem defeitos na polarização do citoesqueleto de actina (ZANELLI and VALENTINI 2005), essencial para organização celular e progressão no ciclo celular em *S. cerevisiae* (PRUYNE *et al.* 2004), decidimos analisar se o mesmo defeito ocorre no alelo *dys1-1*. Esse defeito, além de se correlacionar com problemas no ciclo celular, também se correlaciona com defeitos da integridade de parede celular, as quais também são apresentados por mutantes de *PKC1* (ZANELLI and VALENTINI 2005). Durante o ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, a organização do citoesqueleto de actina é essencial para coordenação dos eventos de brotamento e crescimento do broto, como ilustrado na Figura 17. Para isso, as linhagens de interesse foram crescidas em meio apropriado, fixadas, lavadas e incubadas com Rodamina-Faloidina, a qual se liga a filamentos de actina, e, então, visualizadas e fotografadas. Como mostra a Figura 18, é possível observarmos diferenças na formação dos filamentos de actina no alelo *dys1-1* (Figura 18B), quando comparado com a linhagem selvagem (Figura 18A). Apesar de o mutante *dys1-1* mostrar uma clara polarização do citoesqueleto de actina na transição G1/S (painéis superiores da Figura 18B), essa polarização parece se manter por mais tempo, quando o broto já mostra morfologia de células progredindo em G2. Dessa forma, pode estar ocorrendo um atraso na progressão do ciclo celular deste mutante, o que se correlaciona com o aumento de volume celular, principalmente em células com morfologia de progressão em G2. No entanto, essas análises precisam ser ampliadas utilizando microscopia de melhor resolução e no futuro serão também realizados ensaios de determinação de conteúdo de DNA por citometria de fluxo para se evidenciar possíveis problemas de atraso no ciclo celular.



**Figura 17. Esquema ilustrativo da polaridade celular em *Saccharomyces cerevisiae* ao longo do ciclo de divisão celular.** Os pontos em vermelho representam os “actin patches”, os quais constituem um local de organização e determinação da polarização dos cabos de actina (linhas vermelhas). As setas indicam a direção de polarização do crescimento. (Modificado de PRUYNE and BRETSCHER 2000)



**Figura 18. Análise do citoesqueleto de actina alelo *dys1-1*.** A linhagem selvagem (A) e a linhagem mutante (B) foram tratadas com Rodamina Faloidina, visualizadas e fotografadas através de microscopia de fluorescência.

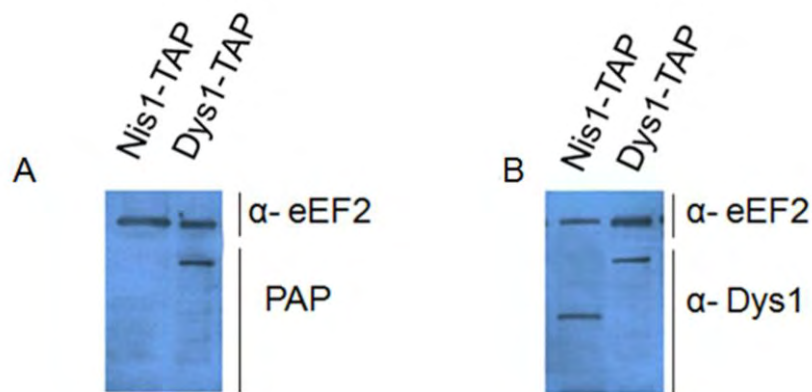
### 6.2.9. Análise de correlação funcional entre Dys1 e Nis1

Um rastreamento de duplo-híbrido realizado em nosso laboratório utilizando a proteína Dys1 como isca, levou à identificação do gene *NIS1* (dados não publicados). O gene *NIS1* (“Neck protein Interacting with Septins”) codifica para uma proteína localizada no núcleo durante os estágios G1/S, e no “bud neck” no estágio G2/M do ciclo celular. Esta proteína está provavelmente envolvida na sinalização do ciclo celular e na formação do broto, já que foram demonstradas interações físicas de Nis1 com várias septinas (IWASE and TOH-E 2001). Devido ao fato de rastreamentos por duplo-híbrido gerarem artefatos, as interações evidenciadas devem ser validadas por outros ensaios. Dessa forma, foi realizado o ensaio de copurificação *in vivo* (GST pulldown). Para isso, foi realizada clonagem do gene codificador de Nis1 em um vetor de expressão pYGEX, o qual permite a produção de proteínas em fusão com GST. No entanto, a proteína de fusão GST-Nis1 mostrou-se muito instável, uma vez que, no final do processo de copurificação *in vivo*, toda proteína de fusão mostrava-se degradada, o que inviabilizou a confirmação da interação física utilizando a proteína Nis1 em fusão com GST (Veridiana Soares Pereira Cano, dados não publicados). Como alternativa, foi adquirida uma linhagem a qual contém a proteína Nis1 em fusão no C-terminal com TAP (“tandem affinity purification” tag: peptídeo ligante de calmodulina - sítio de TEV - Proteína A). O “tag” fusionado a Nis1 seria, então, necessário para identificação da proteína após copurificação *in vivo* utilizando GST-Dys1, ou, então, utilizado para a copurificação puxando via TAP e buscando Dys1 através de anticorpo específico disponível em nosso laboratório. Isso se fez necessário devido à ausência de anticorpo contra a proteína Nis1. Porém, ao serem realizados testes de produção de Nis1-TAP, podemos observar que a linhagem não apresenta expressão desta fusão (Figura 19A). Como mostra a Figura 19B, ao analisarmos a linhagem que contém a fusão Nis1-TAP, foi possível observarmos níveis de expressão da proteína Dys1, a qual foi utilizada como controle, idênticos ao da linhagem controle. Por outro lado, ao analisarmos a expressão da proteína de fusão, não foi possível identificarmos a produção da mesma (Figura 19A).

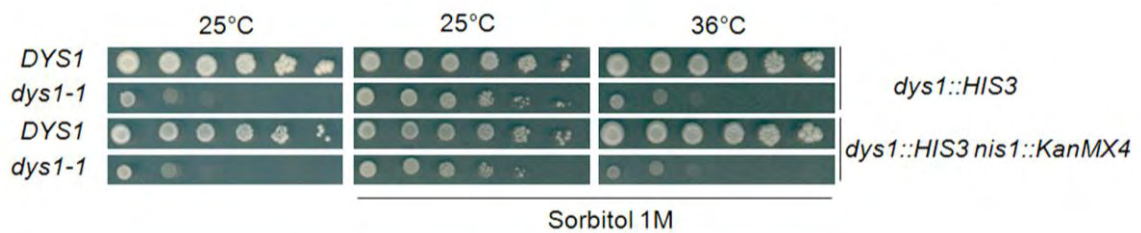
Porém, com o intuito de identificar uma possível relevância biológica desta interação, fomos analisar a existência de interação genética entre *Nis1* e *Dys1*, uma vez que esta abordagem genética tem sido utilizada com sucesso na caracterização funcional de proteínas (BENDER and PRINGLE 1991; COSTA and ARNDT 2000; COSTIGAN *et al.* 1992; FRIGIERI *et al.* 2008; FRIGIERI *et al.* 2007; SHEN *et al.* 1998). Para isso, utilizamos uma linhagem proveniente da coleção de nocautes *nis1::KanMX4*, juntamente com uma linhagem *dys1::HIS3 [DYS1/CEN/URA3]*, para testar o fenótipo da linhagem *dys1-1* na ausência de *Nis1*. O gene *NIS1* não é essencial e o seu nocaute não apresenta defeitos óbvios de crescimento. Para realizar esta análise, foi gerada uma linhagem, por cruzamento, esporulação e dissecação de tétrades, que combinou as duas mutações. Considerando a essencialidade de *Dys1* em levedura, não é possível obter o nocaute de *DYS1* na ausência de uma cópia funcional do gene, logo, foi usada a linhagem *dys1::HIS3* contendo *DYS1* selvagem em plasmídeo com marca de seleção *URA3* (pSV526), a qual permitiu a realização da troca plasmidial. Após obtida a linhagem de interesse, foi possível transformá-la com os plasmídeos pSV58 (*TRP1/CEN*), pSV520 (*DYS1/TRP1/CEN*) e pSV730 (*dys1-1/TRP1/CEN*) e, em seguida, realizar o ensaio de troca plasmidial (“plasmid shuffle”). Foi observado que, tanto o gene selvagem, como o alelo *dys1-1*, são capazes de complementar o duplo nocaute (*dys1::HIS3 nis1::KanMX4*) na presença do regulador osmótico (dados não mostrados), da mesma forma que quando na presença apenas do nocaute de *DYS1* (Figura 8A). Em seguida, para verificar se o fenótipo condicional de crescimento do alelo *dys1-1* seria dependente de *Nis1*, foi realizado teste de sensibilidade a temperatura. Como mostra a Figura 20, não é observada diferença no fenótipo de crescimento da linhagem *dys1-1*, bem como da linhagem selvagem, na ausência de *Nis1*, quando comparada com as mesmas linhagens contendo *Nis1*.

Por fim, para a realização do teste de supressão do fenótipo de *dys1-1* por *NIS1* em alto número de cópias, foi realizada a clonagem de *NIS1* em vetor  $2\mu$ . Após confirmação da clonagem por diagnóstico de restrição (dados não mostrados), o plasmídeo, então nomeado pVZ1177, foi utilizado para transformar a linhagem *dys1-1*, juntamente com o pSV65 (vetor) e com o pSV526 (*DYS1*), utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo

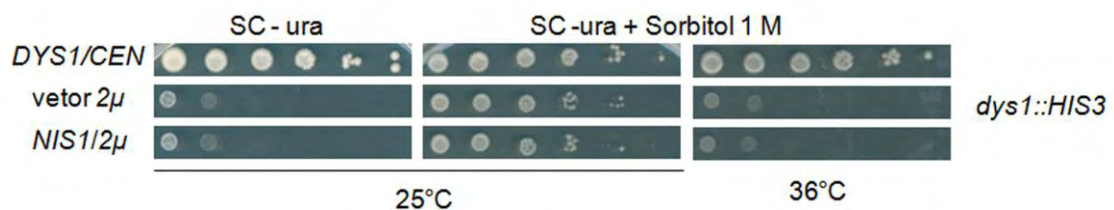
de crescimento. Como mostra a Figura 21, podemos observar que nenhuma supressão foi encontrada ao analisarmos tanto o aumento de temperatura, quanto a necessidade do regulador osmótico. Dessa forma, apesar de não ter sido possível confirmar a interação física Dys1-Nis1, sua correlação funcional não pôde ser estabelecida por interações genéticas. Outros ensaios de confirmação da interação física serão realizados no futuro, no intuito de se esclarecer a possibilidade de correlação funcional entre Dys1 e Nis1 em levedura.



**Figura 19. Análise dos níveis de Nis1-TAP.** Ensaio de Western Blot realizado com a linhagem Nis1-TAP e com a linhagem Dys1-TAP (utilizada como controle), utilizando PAP (peroxidase - anti - peroxidase) **(A)** e anti-Dys1 **(B)**. A proteína eEF2 foi utilizada como controle de carregamento do ensaio.



**Figura 20. Avaliação da sensibilidade à temperatura da linhagem *dys1::HIS3 nis1::KanMX4*.** Diluição seriada da linhagem *dys1::HIS3* e da linhagem *dys1::HIS3 nis1::KanMX4* cobertas com os pSV526 (controle positivo), e com o pSV730 (*dys1-1*). As linhagens foram crescidas em meio SC (Synthetic Complete) desprovido de uracila nas temperaturas de 25°C sem adição de sorbitol e a 25°C e 36°C com adição de sorbitol.

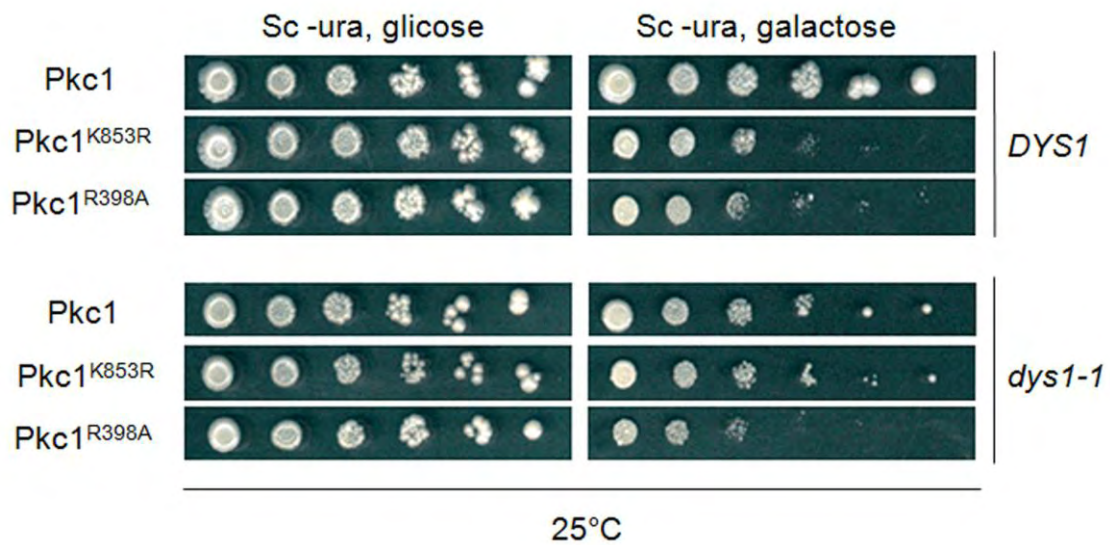


**Figura 21. Análise da supressão em alto número de cópias de *NIS1* no mutante *dys1-1*.** O alelo *dys1-1* foi transformado com o gene *DYS1* selvagem (controle positivo de crescimento), vetor vazio (controle negativo de crescimento nas condições restritivas) e com o plasmídeo pVZ1177, e submetido à diluição seriada. Os transformantes foram então plaqueados em meio SC (Synthetic Complete) desprovido de uracila e de 1 M de sorbitol e incubados a 25°C ou em meio SC (Synthetic Complete) desprovido de uracila com 1 M de sorbitol e incubados a 25°C e a 36°C por 3 dias

### 6.2.10. Análise de correlação funcional entre Dys1 e Pkc1

Como descrito anteriormente, PKC de mamífero é capaz de fosforilar, *in vitro*, Dys1 (KANG *et al.* 2002), além disso, quando em alto número de cópias, o gene ortólogo de levedura, *PKC1*, é supressor dos alelos mutantes de eIF5A (ZANELLI and VALENTINI 2005). Devido a essa correlação, decidimos analisar se a superexpressão de variantes de Pkc1 interfeririam na viabilidade celular da linhagem *dys1-1*. Para isso, as linhagens foram transformadas com diferentes formas da proteína Pkc1: a forma selvagem da proteína, Pkc1; a forma quinase inativa, Pkc1<sup>K853R</sup>; e a forma quinase constitutivamente ativa, Pkc1<sup>R398A</sup>, todas controladas por promotor induzível por galactose. Interessantemente, a superexpressão da forma selvagem da proteína não acarretou nenhuma alteração no crescimento celular do alelo *dys1-1* bem como do alelo selvagem, por outro lado, a superexpressão da forma inativa ou da forma constitutivamente ativa da proteína alteram, de maneira diferenciada, a viabilidade celular das linhagens. Conforme observado na Figura 22, a viabilidade celular do alelo *dys1-1* não é alterada, quando ocorre a superexpressão da forma inativa de Pkc1 (Pkc1<sup>K853R</sup>), por outro lado, o alelo selvagem apresenta diminuição no crescimento celular. Porém, quando ocorre a superexpressão da forma constitutivamente ativa de Pkc1 (Pkc1<sup>R398A</sup>), o alelo mutante, bem como o alelo selvagem, apresentaram diminuição na taxa de crescimento celular. Este dado reforça a idéia de correlação funcional entre eIF5A/Dys1 e Pkc1 e sugere que a diminuição dos níveis de hipusinação induzem uma condição celular de resistência aos danos causados pela inativação de Pkc1.

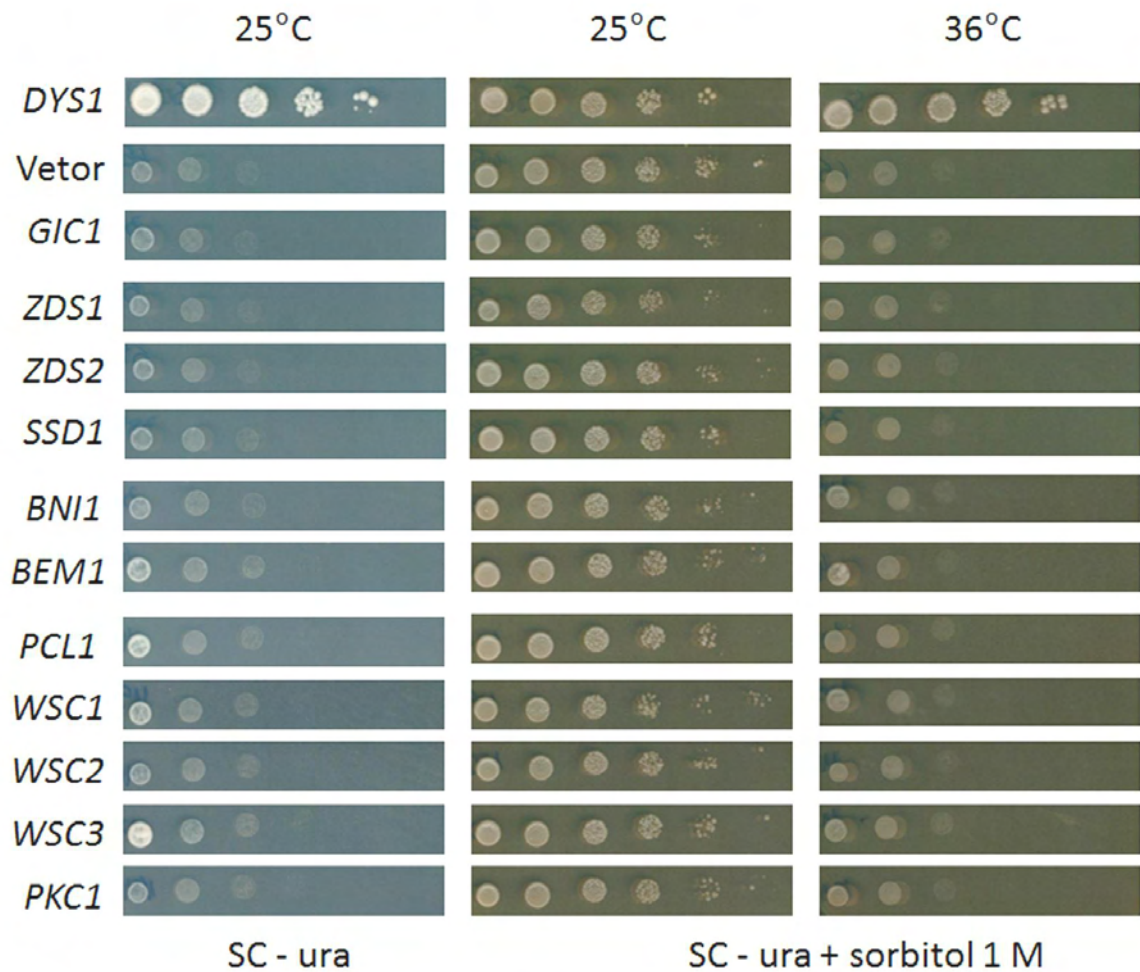




**Figura 22. Avaliação de crescimento da linhagem *dys1-1* quando superexpressas diferentes formas de Pkc1.** As linhagens selvagem e *dys1-1* foram transformadas com os plasmídeos contendo: Pkc1 selvagem; Pkc1<sup>K853R</sup>, quinase inativa; e a forma constitutivamente ativa, Pkc1<sup>R398A</sup>, todas controladas por promotor induzível por galactose, e submetidas à diluição seriada. Os transformantes foram então plaqueados em meio SC (Synthetic Complete) desprovido de uracila sem a adição de galactose (controle de crescimento); e com a adição de 2% de galactose (indução de expressão), na presença de sorbitol 1M e incubados até crescimento das colônias.

### 6.2.11. Análise de supressão em alto número de cópias

Os rastreamentos genéticos em levedura são métodos promissores na identificação de proteínas que interagem entre si ou que participam de um mesmo processo metabólico. Assim, um extenso rastreamento de supressores em alto número de cópias do alelo *tif51A-1* foi realizado em nosso laboratório, gerando dados bastante interessantes para o estudo de eIF5A (VALENTINI *et al.* 2002; ZANELLI and VALENTINI 2005). Nesse estudo, diversos supressores em alto número de cópias foram encontrados e relacionados à via de manutenção de integridade celular e progressão do ciclo celular e para entendermos se defeitos relacionados à hipusinação também se relacionam com os defeitos observados no mutante de eIF5A (*tif51A-1*), foi proposto testar se supressores em alto número de cópias do alelo *tif51A-1* também suprimiriam os fenótipos apresentados pelo mutante *dys1-1*. Como mostra a Figura 23, foi testado se os genes supressores em alto número de cópias do alelo *tif51A-1* também suprimiriam o alelo *dys1-1*, tanto na ausência de 1 M de sorbitol à 25°C, quanto ao aumento da temperatura na presença de 1 M de sorbitol (ambas condições restritivas para o mutante *dys1-1*). Para isto, foi realizada transformação do alelo *dys1-1* (SVL614) com os plasmídeos contendo os genes supressores de *tif51A-1*. Como pode ser observado na Figura 23 foi realizada diluição seriada dos transformantes nos meios de cultura e temperaturas indicados e, apesar de alguns dos supressores de *tif51A-1* apresentarem alguma melhora do crescimento do mutante *dys1-1* a 25°C sem sorbitol (*BEM1*, *PCL1*, *WSC1* e *WSC3*), o nível de supressão é praticamente questionável quando comparado com aqueles observados para o mutante *tif51A-1* (VALENTINI *et al.* 2002; ZANELLI and VALENTINI 2005). Além disso, nenhuma supressão pode ser vista para a condição de 36°C com sorbitol. Esses resultados sugerem que ou o mutante *dys1-1* possui defeitos de alguma forma diferentes daqueles presentes no mutante de eIF5A, ou a severidade do alelo *dys1-1* não pode ser nem parcialmente compensada pelos supressores do mutante *tif51A-1*.



**Figura 23. Análise de supressão em alto número de cópias do mutante *dys1-1* utilizando os supressores do mutante *tif51A-1*.** O alelo *dys1-1* foi transformado com o gene *DYS1* selvagem (controle positivo de crescimento), vetor vazio (controle negativo de crescimento nas condições restritivas) e os plasmídeos de alto número de cópias contendo os genes indicados, e submetida à diluição seriada. Os transformantes foram então plaqueados em meio YPD desprovido de 1 M de sorbitol e incubados a 25°C ou em meio YPD com 1 M de sorbitol e incubados a 25°C e a 36°C por 3 dias.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que:

- O alelo *dys1-1* apresenta diminuição nos níveis totais de Dys1 na célula o que acarreta diminuição nos níveis de hipusinação de eIF5A.
- Apesar da necessidade do regulador osmótico para o crescimento celular, não foram identificados defeitos relacionados à integridade da parede celular.
- De forma semelhante como observado para os mutantes de eIF5A, o alelo *dys1-1* apresenta fenótipos relacionados à progressão do ciclo celular, como alterações no citoesqueleto de actina e aumento no volume celular.
- Interessantemente, foi observada correlação funcional entre eIF5A/Dys1 e Pkc1, sugerindo que a diminuição dos níveis de hipusinação induzem uma condição celular de resistência aos danos causados pela inativação de Pkc1.
- Apesar de não ter sido possível confirmar a interação física entre Nis1 e Dys1, os resultados de interação genética entre eles não sugerem uma correlação funcional e outros ensaios serão necessários no intuito de esclarecer se realmente estas proteínas interagem fisicamente e qual o papel biológico dessa interação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, R., K. UEDA and M. MIYAZAKI, 1997 Novel features of the functional site and expression of the yeast deoxyhypusine synthase. *Biol Signals* **6**: 157-165.
- AMBERG, D., 2005 *Methods in yeast genetics*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp., edited by D. BURKE and S. JN.
- AUSUBEL, F., 2004 *Current protocols in molecular biology*, New York, pp., edited by R. BRENT, R. KINGSTON, D. MOORE, J. SEDMAN, J. SMITH *et al.*
- BAILLY, M., and V. DE CRÉCY-LAGARD, 2010 Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct* **5**: 3.
- BALASUNDARAM, D., C. W. TABOR and H. TABOR, 1991 Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5872-5876.
- BENDER, A., and J. R. PRINGLE, 1991 Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressible mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 1295-1305.
- BENNE, R., and J. W. HERSHEY, 1978 The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**: 3078-3087.
- BROCHIER, C., P. LÓPEZ-GARCÍA and D. MOREIRA, 2004 Horizontal gene transfer and archaeal origin of deoxyhypusine synthase homologous genes in bacteria. *Gene* **330**: 169-176.
- CHEN, K. Y., and A. Y. LIU, 1997 Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* **6**: 105-109.
- CHRISTIANSON, T. W., R. S. SIKORSKI, M. DANTE, J. H. SHERO and P. HIETER, 1992 Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**: 119-122.
- COSTA, P. J., and K. M. ARNDT, 2000 Synthetic lethal interactions suggest a role for the *Saccharomyces cerevisiae* Rtf1 protein in transcription elongation. *Genetics* **156**: 535-547.
- COSTIGAN, C., S. GEHRUNG and M. SNYDER, 1992 A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol* **12**: 1162-1178.
- DIAS, C. A., V. S. CANO, S. M. RANGEL, L. H. APPONI, M. C. FRIGIERI *et al.*, 2008 Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *Febs J* **275**: 1874-1888.
- FRIGIERI, M. C., M. V. JOAO LUIZ, L. H. APPONI, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2008 Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics* **280**: 211-221.
- FRIGIERI, M. C., G. M. THOMPSON, J. R. PANDOLFI, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2007 Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Mol Res* **6**: 152-165.
- GLADFELTER, A. S., I. BOSE, T. R. ZYLA, E. S. BARDES and D. J. LEW, 2002 Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J Cell Biol* **156**: 315-326.
- GOUGH, J., K. KARPLUS, R. HUGHEY and C. CHOTHIA, 2001 Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol* **313**: 903-919.
- GREGIO, A. P., V. P. CANO, J. S. AVACA, S. R. VALENTINI and C. F. ZANELLI, 2009 eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **380**: 785-790.
- GUTHRIE, C., and G. R. E. FINK, 1991 *Guide to Yeast Genetics*. Academic Press, New York, NY.
- HANAWA-SUETSUGU, K., S. SEKINE, H. SAKAI, C. HORI-TAKEMOTO, T. TERADA *et al.*, 2004 Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9595-9600.

- HEINISCH, J. J., A. LORBERG, H. P. SCHMITZ and J. J. JACOBY, 1999 The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**: 671-680.
- HELLIWELL, S. B., A. SCHMIDT, Y. OHYA and M. N. HALL, 1998 The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr Biol* **8**: 1211-1214.
- IWASE, M., and A. TOH-E, 2001 Nis1 encoded by YNL078W: a new neck protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **76**: 335-343.
- JAO, D. L., and K. Y. CHEN, 2006 Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* **97**: 583-598.
- KANG, H. A., and J. W. HERSHEY, 1994 Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 3934-3940.
- KANG, H. A., H. G. SCHWELBERGER and J. W. HERSHEY, 1993 Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 14750-14756.
- KANG, K. R., J. S. KIM, S. I. CHUNG, M. H. PARK, Y. W. KIM *et al.*, 2002 Deoxyhypusine synthase is phosphorylated by protein kinase C in vivo as well as in vitro. *Exp Mol Med* **34**: 489-495.
- KIM, K. K., L. W. HUNG, H. YOKOTA, R. KIM and S. H. KIM, 1998 Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10419-10424.
- KLIER, H., T. WOHL, C. ECKERSKORN, V. MAGDOLEN and F. LOTTSPREICH, 1993 Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. *FEBS Lett* **334**: 360-364.
- LENBURG, M. E., and E. K. O'SHEA, 2001 Genetic evidence for a morphogenetic function of the *Saccharomyces cerevisiae* Pho85 cyclin-dependent kinase. *Genetics* **157**: 39-51.
- LEVIN, D. E., and E. BARTLETT-HEUBUSCH, 1992 Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol* **116**: 1221-1229.
- LIAO, D. I., E. C. WOLFF, M. H. PARK and D. R. DAVIES, 1998 Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure* **6**: 23-32.
- MAGDOLEN, V., H. KLIER, T. WOHL, F. KLINK, H. HIRT *et al.*, 1994 The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol Gen Genet* **244**: 646-652.
- NAVARRE, W. W., S. B. ZOU, H. ROY, J. L. XIE, A. SAVCHENKO *et al.*, 2010 PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* **39**: 209-221.
- PARK, M. H., 1989 The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* **264**: 18531-18535.
- PARK, M. H., Y. B. LEE and Y. A. JOE, 1997 Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals* **6**: 115-123.
- PARK, M. H., K. NISHIMURA, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2010 Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* **38**: 491-500.
- PARK, M. H., E. C. WOLFF and J. E. FOLK, 1993a Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* **4**: 95-104.
- PARK, M. H., E. C. WOLFF and J. E. FOLK, 1993b Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? *Trends Biochem Sci* **18**: 475-479.
- PEAT, T. S., J. NEWMAN, G. S. WALDO, J. BERENDZEN and T. C. TERWILLIGER, 1998 Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* **6**: 1207-1214.

- PRUYNE, D., and A. BRETSCHER, 2000 Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113 ( Pt 4)**: 571-585.
- PRUYNE, D., A. LEGESSE-MILLER, L. GAO, Y. DONG and A. BRETSCHER, 2004 Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 559-591.
- SAINI, P., D. E. EYLER, R. GREEN and T. E. DEVER, 2009 Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**: 118-121.
- SASAKI, K., M. R. ABID and M. MIYAZAKI, 1996 Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **384**: 151-154.
- SCHNIER, J., H. G. SCHWELBERGER, Z. SMIT-MCBRIDE, H. A. KANG and J. W. HERSHEY, 1991 Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 3105-3114.
- SCHWELBERGER, H. G., H. A. KANG and J. W. HERSHEY, 1993 Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* **268**: 14018-14025.
- SHEN, E. C., M. F. HENRY, V. H. WEISS, S. R. VALENTINI, P. A. SILVER *et al.*, 1998 Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* **12**: 679-691.
- SMIT-MCBRIDE, Z., J. SCHNIER, R. J. KAUFMAN and J. W. HERSHEY, 1989 Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J Biol Chem* **264**: 18527-18530.
- THOMPSON, G. M., V. S. CANO and S. R. VALENTINI, 2003 Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett* **555**: 464-468.
- TOME, M. E., and E. W. GERNER, 1997 Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. *Biol Signals* **6**: 150-156.
- TONG, Y., I. PARK, B. S. HONG, L. NEDYALKOVA, W. TEMPEL *et al.*, 2009 Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* **75**: 1040-1045.
- UESONO, Y., A. FUJITA, A. TOH-E and Y. KIKUCHI, 1994 The MCS1/SSD1/SRK1/SSL1 gene is involved in stable maintenance of the chromosome in yeast. *Gene* **143**: 135-138.
- VALENTINI, S. R., J. M. CASOLARI, C. C. OLIVEIRA, P. A. SILVER and A. E. MCBRIDE, 2002 Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* **160**: 393-405.
- WEIR, B. A., and M. P. YAFFE, 2004 Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **15**: 1656-1665.
- WOHL, T., H. KLIER, H. AMMER, F. LOTTSPEICH and V. MAGDOLEN, 1993 The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. *Mol Gen Genet* **241**: 305-311.
- XU, A., and K. Y. CHEN, 2001 Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem* **276**: 2555-2561.
- XU, A., D. L. JAO and K. Y. CHEN, 2004 Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* **384**: 585-590.
- YANAGISAWA, T., T. SUMIDA, R. ISHII, C. TAKEMOTO and S. YOKOYAMA, 2010 A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1136-1143.
- YAO, M., A. OHSAWA, S. KIKUKAWA, I. TANAKA and M. KIMURA, 2003 Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem (Tokyo)* **133**: 75-81.

- YU, Y., Y. W. JIANG, R. J. WELLINGER, K. CARLSON, J. M. ROBERTS *et al.*, 1996 Mutations in the homologous ZDS1 and ZDS2 genes affect cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **16**: 5254-5263.
- ZANELLI, C. F., A. L. MARAGNO, A. P. GREGIO, S. KOMILI, J. R. PANDOLFI *et al.*, 2006 eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 1358-1366.
- ZANELLI, C. F., and S. R. VALENTINI, 2005 Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* **171**: 1571-1581.
- ZUK, D., and A. JACOBSON, 1998 A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *Embo J* **17**: 2914-2925.