### DIANA PELIZZARI RAYMUNDO

Análise de interação genética entre mutantes de eIF5A e de fatores de degradação de mRNA e busca de supressores extragênicos em *S. cerevisiae* 

ARARAQUARA

2011

### DIANA PELIZZARI RAYMUNDO

Análise de interação genética entre mutantes de eIF5A e

de fatores de degradação de mRNA e busca de

supressores extragênicos em S. cerevisiae

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

ARARAQUARA

2011

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Paulo Cesar, pois é por sua causa que iniciei e termino este curso.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada teria sido possível.

Aos meus pais, Ana Luiza e Paulo Cesar, e ao meu irmão, Lucas, pelo amor e apoio incondicionais, pelas conversas e orientações, respeitando minhas decisões e me conduzindo ao melhor caminho e que sempre compreenderam minhas ausências necessárias à realização deste trabalho

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, pela excelente orientação.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório muitos dos quais saíram do laboratório durante minha permanência e tantos outros que permaneceram após o término deste trabalho, pela importante formação profissional e pessoal que me proporcionaram.

À "Weekend Gang" (Hermano, Kadu e Laura) pelos divertidos fins de semana passados no laboratório

Às técnicas pelo suporte nas atividades laboratoriais.

Aos funcionários da FCF-UNESP.

À FCF-UNESP, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse

trabalho.

Aos amigos da UNESP pelo companheirismo, pelas conversas, pelas festas e pelo aprendizado que me proporcionaram.

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16	
2.	OBJETIVOS		
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	34	
	3.1. MATERIAIS	34	
	3.2. MÉTODOS	38	
	3.2.1. PREPARO DE PLASMÍDEOS A PARTIR DE <i>E. coli</i> EM PEQUENA ESCALA – MINIPREP (LISE ALCALINA)	38	
	3.2.2. TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS QUICK & EASY	39	
	3.2.3. CRUZAMENTO E ESPORULAÇÃO DE LEVEDURAS	40	
	3.2.3.1. CRUZAMENTO	40	
	3.2.3.2. ESPORULAÇÃO	40	
	3.2.4. DISSECÇÃO DE TÉTRADES E CARACTERIZAÇÃO DE HAPLÓIDES	41	
	3.2.5. TESTE DE SENSIBILIDADE A TEMPERATURA	41	
	3.2.6. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE LEVEDURA	42	
3.2.7. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)		43	
	3.2.8. TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS DE ALTA EFICIÊNCIA		
	3.2.9. ESTRATÉGIA DE DELEÇÃO BASEADA EM PCR	44	
	3.2.10. CLONAGEM EMPREGANDO REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	45	
	3.2.10.1. REAÇÃO DE PCR	45	
	3.2.10.2. CLONAGEM DO PRODUTO DE PCR	46	

3.2.10.3. REAÇÃO DE LIGAÇÃO 46	;
3.2.10.4. TRANSFORMAÇÃO EM <i>E.coli</i> 46	3
3.2.11 RASTREAMENTO DE SUPRESSOR EXTRAGÊNICO UTILIZANDO	
DELEÇÕES GENÔMICAS INDUZIDAS POR TRANSPOSON 46	;
3.2.12 SELEÇÃO DE HAPLÓIDES EM PLAQUEAMENTO: SGA - SYNTHETIC 47	,
GENETIC ARRAY	
3.2.13 SEQUENCIAMENTO 47	,
3.2.14 WESTERN BLOT 49	)
4. RESULTADOS 50	)
4.1. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÉTICA ENTRE MUTANTES DE elF5A E DE FATORES DE REPRESSÃO DA TRADUÇÃO E/OU DEGRADAÇÃO DE mRNA <sup>50</sup>	)
4.2. CLONAGEM DE GENES SUPRESSORES DE MUTANTES DE <i>TIF51A</i> EM S. CEREVISIAE ATRAVÉS DE DELEÇÕES GENÔMICAS INDUZIDAS POR TRANSPOSON	3
5. CONCLUSÕES 74	ŀ
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76	5

### $R \, E \, S \, U \, M \, O$

O provável fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado de arqueas a mamíferos e sofre uma modificação pós-traducional única e essencial chamada hipusinação. Este fator já foi relacionado ao transporte nucleocitoplasmático, à degradação de mRNA e à proliferação celular. Dados recentes restabelecem uma função para eIF5A na tradução e sugerem a sua atuação na etapa de elongação ao invés de início, como originalmente proposto. Uma vez que o envolvimento de eIF5A com a degradação de mRNA ainda não foi elucidado, tornou-se interessante estudar qual a natureza desta relação. O metabolismo de mRNA é um processo complexo que envolve as etapas da tradução, repressão da tradução e degradação de mRNA.

Na primeira parte deste trabalho, foi avaliada a existência de interação genética sintética entre os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* e mutantes de fatores envolvidos com a repressão da tradução e/ou degradação de mRNA. Foi revelada uma supressão parcial do fenótipo de termossensibilidade com nocautes dos genes *SBP1*, *DHH1* e *PAT1*, que codificam fatores ativadores da remoção do capacete de metilguanosina e repressores da tradução. Por outro lado, uma interação sintético doente (*"synthetic sick"*) entre os mutantes *tif51A-1* e *xrn1* $\Delta$  foi observada.Os dados obtidos reforçam o envolvimento de eIF5A com a elongação da tradução, mostram que o efeito de eIF5A na degradação de mRNA é secundário e sugerem uma função para eIF5A como ativador da tradução.

Na segunda etapa são apresentados os resultados do rastreamento de supressores extragênicos do mutante *tif51A-1* através de deleções genômicas induzidas por transposon. Foram rastreados aproximadamente 2,2x10<sup>5</sup> transformantes.

Ao final do rastreamento, apenas o #25 foi confirmado e se seguiu para a etapa de identificação do gene no qual o transposon está inserido, utilizando-se a estratégia de "Vectorette PCR". Após sequenciamento do fragmento obtido nessa análise, a região flanqueadora do transposon no genoma do clone #25 foi identificada como sendo o gene *TRS85*. O produto deste gene faz parte de um complexo de proteínas que agem como uma GEF (guanine nucleotide exchange factor) do gene *YPT1*.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina em eIF5A.	30
Figura 2. Principais vias de degradação do mRNA eucariótico.	31
Figura 3. Mutagênese utilizando transposon.	32
Figura 4. Os mutantes <i>tif51A-1</i> e <i>xrn1</i> ∆ são sintético doentes.	60
<b>Figura 5</b> . Os mutantes duplo <i>tif51A-1lsm1</i> ∆ e triplo <i>tif51A-1dcp1-2 ski8</i> ∆ não apresentam interação genética sintética.	61
<b>Figura 6</b> . Os mutantes duplos <i>tif51A-1</i> ou <i>tif51A-3</i> e <i>sbp1</i> $\Delta$ apresentam interações genéticas sintéticas por supressão parcial do defeito de crescimento.	62
<b>Figura 7</b> . O mutante duplo <i>tif51A-1 dhh1</i> ∆ apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento.	63
<b>Figura 8</b> . O mutante duplo <i>tif51A-3</i> e <i>pat1</i> $\Delta$ apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento.	64
Figura 9. Verificação da reversão do fenótipo de sensibilidade a temperatura dos candidatos obtidos após transformação com a biblioteca mutagenizada com transposon.	66
<b>Figura 10</b> . Teste de sensibilidade a temperatura dos haplóides obtidos do cruzamento dos clones da biblioteca de transposon com a linhagem contendo <i>tif51A-1</i> (VZL998)	68

Figura 11. Confirmação dos clones contendo deleção genômica induzida por	
transposon.	69
Figura 12. Ensaio de ligação dos fenótipos tr e Leu <sup>+</sup> para o clone #25.	70
Figura 13. Identificação da região genômica deletada pelo transposon	
mTn <i>lacZlLEU</i> 2 por "Vectorette PCR".	71
Figura 14. Realização da "Vectorette PCR".	72
Figura 15. Identificação da região do gene que flanqueia o sítio de inserção do	
transposon no clone #25.	73

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens utilizadas nos experimentos.	34
Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos.	36
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos.	37
Tabela 4. Resultados das interações genéticas sintéticas.	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IIA	microarama
μg	morograma

olitro
ĺ

- °C graus Celsius
- ATP adenosina trifosfatada
- C-terminal carboxi-terminal
- CRM Chromosome Region Maintenance 1
- Dcp1 mRNA DeCaPping 1
- Dcp2 mRNA DeCaPping 2
- Dhh1 DExD/H-box Helicase
- DNA ácido desoxirribonucleico

dNTPs mistura dos desoxirribonucleotídeos nucleotídeos trifosfatafos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eEF's	fatores de elongação da tradução
eEF1A	Eukaryotic translation Elongation Factor 1A
eEF2	Eukaryotic translation Elongation Factor 2
eEF3	Eukaryotic translation Elongation Factor 3
EF-P	Eubacterial Elongation Factor P

elF's	fatores de início de tradução
elF1	Eukaryotic translation Initiation Factor 1
elF1A	Eukaryotic translation Initiation Factor 1A
elF2	Eukaryotic translation Initiation Factor 2
elF3	Eukaryotic translation Initiation Factor 3
elF5	Eukaryotic translation Initiation Factor 5
elF5A	Eukaryotic translation Initiation Factor 5A
elF5B	Eukaryotic translation Initiation Factor 5B
g	grama
GFP	Green Fluorescent Protein
GIC1	GTPase Interactive Component
GTP	guanidina trifosfatafa
GTPase	hidrolase que se liga a GTP
h	hora
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana 1
HSP150	Heat Shock Protein 150
IRES	Internal Ribosome Entry Sites
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L11	proteína ribossomal da subunidade 60S
Lsm1-7	Like Sm1-7

Μ	molar
MAP	Mitogen-Activated signaling Pathway
Met-tRNA <sub>i</sub>	Methionin initiatior tRNA
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mRNP	messenger Ribonucleoprotein
Ν	normal
N-terminal	amino-terminal
ng	nanograma
nm	nanômetro
NMD	Non-sense Mediated Decay
Not1-5	(alias CDC39) Cell Division Cycle
ORF	Open Reading Frame
P0	proteína ribossomal da subunidade 60S
PAB1	Poly(A) Binding protein
Pat1	Protein Associated with Topoisomerase II
pb	pares de base

P bodies	Processing bodies
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCI	solução de fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Base
PEG	polietilenoglicol
рН	potencial hidrogeniônico
PKC1	Protein Kinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
poli(A) <sup>+</sup>	cauda de poliadenina do mRNA
Pop2	PGK promoter directed OverProduction 2
PRF	Programmed Ribosomal Frameshiting
Rev	proteína de propagação do vírus HIV-1
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	enzima que cliva RNA
rpm	rotação por minuto
S5	proteína ribossomal da subunidade 40S
Sbp1	provável proteína de ligação a RNA
SC	meio sintético completo para levedura
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS	dodecil sulfato de sódio

#### segundo s

SIA1	proteína envolvida na	ativação da H+-ATPase	Pma1 por glicose
		3	

- Ski3 SuperKiller 3
- SuperKiller 8 Ski8
- Suppressor of SIT4 Deletion SSD1
- TAE tampão conteno tris, ácido acético e EDTA
- tampão tris-EDTA ΤE
- tris-hidroximetilaminometano Tris

Triton X-100 polietilenoglicol-terc-octilfenil éter

tRNA	RNA transportador
tr	temperatura resistente
ts	temperatura sensível
U	unidade enzimática
YPD	Yeast extract, Peptone, Dextrosemedia
Ypt1	Yeast Protein Two
xg	aceleração gravitacional
Xrn1	(alias Kem1) Kar-Enhancing Mutations
WSC1	(alias Slg1) Synthetic Lethal with Gap 1
WSC2	cell Wall integrity and Stress response Component 2
WSC3	cell Wall integrity and Stress response Component 3
ZDS1	Zillion Different Screens 1

3

## 1.INTRODUÇÃO

### O fator elF5A

O provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A - <u>E</u>ukaryotic translation <u>I</u>nitiation <u>Factor 5A</u>) é altamente conservado desde arqueas a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de Saccharomyces cerevisiae e de mamíferos são 63% idênticas (SCHNIER et al., 1991; CHEN; LIU, 1997) e este alto grau de conservação entre as espécies analisadas sugere a importância de eIF5A em processos celulares comuns.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui dois genes parálogos que codificam para eIF5A, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*HYP1* ou *ANB1*), expressos em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente (SCHNIER et al., 1991; WOHL et al., 1993; VALENTINI et al., 2002). Um estudo mostrou que linhagens expressando apenas *TIF51A* ou *TIF51B* sob controle de um promotor induzível por galactose são capazes de crescer em aerobiose ou anaerobiose, portanto as proteínas expressas por estes genes são intercambiáveis *in vivo* (SCHWELBERGER; KANG; HERSHEY, 1993). Estes genes estão localizados em cromossomos diferentes (WOHL et al., 1992), e as ORF's de *TIF51A* e *TIF51B* possuem 90% de identidade. Como esperado, a deleção de *TIF51B* não afeta o crescimento de células haplóides em condições de aerobiose (WOHLet al., 1993). Em condições aeróbicas, eIF5A expressa por *TIF51A* pode ser encontrada em três isoformas, uma básica, uma ácida, e um produto de degradação sem os 10 primeiros aminoácidos (WOHL et al., 1993). E, uma vez que *TIF51A* é essencial para a viabilidade

celular na presença de oxigênio, vários mutantes condicionais foram isolados e caracterizados (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002; DIAS et al., 2008).

eIF5A sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas ocorre na forma acídica de eIF5A, e consiste na fosforilação do resíduo de serina acetilado da região N-terminal da proteína (KANG; SCHWELBERGER; HERSHEY, 1993; KLIER et al., 1993). A mutação neste resíduo (S2A em levedura) revelou que a forma não fosforilada de eIF5A não apresenta defeito de crescimento nem de viabilidade celular, além de ser suficiente para promover o crescimento de células tif51AA haplóides (KLIER et al., 1993), sugerindo que a fosforilação de elF5A não seja essencial para o seu funcionamento in vivo. A segunda modificação pós-traducional de eIF5A é única e essencial para sua atividade na célula. Esta modificação corresponde à hipusinação de um resíduo de lisina que é substituído pelo resíduo de aminoácido hipusina (CHEN; LIU, 1997; PARK; LEE; JOE, 1997). A formação do aminoácido hipusina [Nɛ-(4-amino-2hidroxibutil)-lisina] (hypusine: hydroxyputrescine-lysine) ocorre através da transferência, pela desoxi-hipusina sintase, de um grupamento 4-aminobutil da espermidina (uma poliamina) para o amino grupo livre de uma lisina específica, seguido da hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase. A hipusina é produzida logo após a tradução de eIF5A, sendo esta modificação irreversível e essencial (PARK; WOLFF; FOLK, 1993). A via de biossíntese da hipusina está representada no esquema da Figura 1. O grau de conservação, entre as diferentes espécies, dos resíduos flangueadores do sítio de hipusinação revela a grande importância deste aminoácido raro (MAGDOLEN et al., 1994; CHEN; LIU, 1997). A mutação deste resíduo (K51R em S. cerevisiae) leva à produção de eIF5A não hipusinado, que não complementa o fenótipo de células onde

*TIF51A* foi nocauteado (SCHNIER et al., 1991). Adicionalmente, o gene codificador da enzima desoxi-hipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae*(SASAKI; ABID; MIYAZAKI, 1996; PARK; LEE; JOE, 1997). Portanto, 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.

elF5A possui 17 kDa em levedura, podendo variar até 21 kDa dependendo da espécie (PARK; LEE; JOE, 1997). As estruturas tridimensionais de homólogos de elF5A foram resolvidas por cristalografia para as proteínas de diferentes organismos, inclusive a estrutura de eIF5A de humanos (PDB 3CPF) (Tong et al., 2009). Um trabalho recente de nosso laboratório gerou por cristalografia a estrutura terciária de eIF5A de S. cerevisiae, a qual está depositada no PDB 3ERO. Estas determinações estruturais revelaram várias características comuns entre as proteínas. Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios, predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como Translation Protein SH3-like motif, qual também está presente várias proteínas ribossomais 0 em (http://supfam.org/SUPERFAMILY) (GOUGH et al., 2001). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucléicos 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 (http://supfam.org/SUPERFAMILY) (GOUGH et al., 2001). De fato, dois trabalhos publicados tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém a extensão de tais estudos ainda necessita ser ampliada para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu; CHEN, 2001; Xu, JAO; CHEN, 2004). Interessantemente, embora não exista proteína homóloga de eIF5A em bactérias, o fator de elongação da tradução de bactérias EF-P é um homólogo estrutural de eIF5A de arqueas, sendo a estrutura de eIF5A bastante semelhante a dois domínios de EF-P (HANAWA-SUETSUGU et al., 2004). Portanto, esta conservação estrutural parece estar correlacionada à conservação funcional entre as proteínas.

O fator eIF5A foi inicialmente purificado a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho e recebeu esta denominação, pois foi considerado um fator de início de tradução, devido a sua capacidade de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro*(BENNE; HERSHEY, 1978). O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de Met-tRNA<sub>i</sub>, à puromicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes fatores no início da tradução.

Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionilpuromicina *in vitro* utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, também testados. Além disso, eIF5A não pareceu influenciar a formação *in vitro* de complexo ternário ou a ligação do mRNA de globina ou do MettRNA<sub>i</sub> à subunidade 40S (BENNE; HERSHEY, 1978). A possibilidade de eIF5A atuar na elongação da tradução também foi considerada, mas nenhum efeito positivo foi observado com a adição de eIF5A em um sistema de síntese protéica para polimerização de poli-fenilalanina a partir de ácido poli-uridílico, ribossomos 80S e fatores de elongação eEF1 e eEF2 purificados (BENNE; HERSHEY, 1978). Em concordância com esse trabalho inicial de caracterização funcional de eIF5A em sistemas *in vitro*, foram publicados posteriormente estudos mostrando que a inibição da maturação funcional de eIF5A não se correlaciona a uma repressão da tradução em células de mamífero, e que a depleção deste fator em *S. cerevisiae* leva a uma pequena diminuição (30%) da taxa de síntese protéica (DUNCAN; HERSHEY, 1986; KANG; HERSHEY, 1994; ZUK; JACOBSON, 1998). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

Uma função para eIF5A como fator geral da tradução foi descartada, uma vez que, a depleção *in vivo* deste fator em levedura causa uma pequena redução, de apenas 30%, nos níveis de síntese protéica total (KANG; HERSHEY, 1994). Interessantemente, neste estudo foi verificado que esta depleção de eIF5A gerou um aumento de células paradas em G1, sugerindo que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, como por exemplo, aqueles codificadores de proteínas envolvidas na transição G1/S do ciclo celular (KANG; HERSHEY, 1994). Essa hipótese foi levantada, pois vários autores mostraram que o bloqueio de qualquer uma das etapas envolvidas na hipusinação de eIF5A leva a uma inibição da proliferação celular de diferentes linhagens tumorais de células de mamíferos (HANAUSKE-ABEL et al., 1994; PARK et al., 1994; CHEN et al., 1996; SHI et al., 1996b).

Embora proposto previamente que eIF5A seja um cofator celular da proteína Rev de HIV-1 e esteja envolvido na exportação dos mensageiros tardios deste vírus (RUHL

et al., 1993; BEVEC et al., 1996; BEVEC; HAUBER, 1997; ELFGANG et al., 1999; ROSORIUS et al., 1999), outros estudos não evidenciam o envolvimento de elF5A com transporte nucleocitoplasmático (HENDERSON; PERCIPALLE, 1997; SHI; YIN; WAXMAN, 1997; JAO; CHEN, 2002; VALENTINI et al., 2002). Curiosamente, um trabalho recente, mostrou que a inibição da hipusinação provoca a inibição da expressão de HIV-1 (Hoque et al., 2009). Em outro trabalho, foi mostrado que elF5A possui um efeito regulatório positivo na expressão gênica independente da proteína Rev e na tradução do RNA de HIV-1, além de ser um co-fator que aumenta a tradução mediada por IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*) deste vírus (LIU et al., 2011). Portanto, elF5A poderia ter um papel na tradução específica desse tipo de vírus.

Uma análise da localização subcelular de Rev utilizando diferentes linhagens de células de mamíferos, revelou que esta proteína, produzida transientemente, está localizada no núcleo, e que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática que coincide com a do retículo endoplasmático (SHIet al., 1996a). Ainda, ao se inibir a transcrição, a localização de Rev é alterada completamente, enquanto que, a de eIF5A permanece inalterada. Entretanto, inibidores da tradução, alteram a localização subcelular de eIF5A, mas não de Rev. Esses dados sugerem que eIF5A não sofre translocação nucleocitoplasmática como ocorre com Rev (SHI; YIN; WAXMAN, 1997). Em *S. cerevisiae*, eIF5A é uma proteína que apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear (VALENTINI et al., 2002), o que está de acordo com sua localização em células de mamíferos, onde eIF5A localiza-se principalmente no citoplasma (SHI; YIN; WAXMAN, 1997; JAO; CHEN, 2002). A forma precurssora de eIF5A localiza-se em ambos, citoplasma e núcleo, enquanto que, a forma hipusinada está

predominantemente no citoplasma celular, local onde este fator pode atuar na tradução de uma maneira depentente da hipusinação (LEE et al., 2009).

O fator eIF5A está envolvido com a degradação de mRNA, pois foi demonstrado que o mutante temperatura sensível (*ts*) do gene *TIF51A*, o mutante *ts1159*, acumula mRNA sem o capacete de metilguanosina na temperatura não permissiva (*Z*UK; JACOBSON, 1998). Além deste, outros mutantes de eIF5A descritos por nosso laboratório (*tif51A-1, tif51A-2* e *tif51A-3*) também acumulam mRNAs na temperatura não permissiva (VALENTINI et al., 2002). Em outro estudo, foi mostrado que linhagens contendo formas mutadas de eIF5A de humano apresentaram fenótipo *ts* e síntese protéica diminuída. Estes mutantes apresentaram também acúmulo de mRNAs semelhante ao observado em linhagens deficientes para NMD (*Non-sense mediated decay*), além de aumento na meia-vida de alguns transcritos de genes dependentes de NMD (SCHRADER et al., 2006).

Diversos genes foram isolados como supressores em alto número de cópias do fenótipo *ts* do mutante *tif51A-1*. Entre estes genes estão: *PAB1*, *PKC1*, *WSC1*, *WSC2*, *WSC3*, *SIA1*, *HSP150*, *GIC1* e *ZDS1*(VALENTINI et al., 2002; ZANELLI; VALENTINI, 2005). O encontro desses genes levou à sugestão de uma nova via de sinalização celular a partir de Pkc1. A proteína Pkc1 participa da resposta a choque hipoosmótico, juntamente com as proteínas Wsc1, 2 e 3. Ainda, foi mostrado que a supressão por Pkc1 é independente da via de MAP quinases e foi descrita uma via de sinalização intracelular que atua abaixo de Pkc1 e que envolve as proteínas Zds1 e Gic1. Os genes supressores *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1* são importantes para a polaridade celular na levedura, e uma vez que, mutantes de eIF5A apresentam defeito na polarização do

citoesqueleto de actina na temperatura não permissiva (ZANELLI; VALENTINI, 2005). É provável que eIF5A esteja envolvido com a progressão no ciclo celular em levedura de maneira indireta, através do controle da expressão gênica em nível traducional.

Adicionalmente, um rastreamento de letalidade sintética foi realizado utilizando o mutante <sup>ts</sup>tif51A-3 e revelou letalidade sintética entre mutantes de elF5A e Ypt1 (FRIGIERI et al., 2007). Esta letalidade sintética entre tif51A-3 e ypt1 passa a envolver direta ou indiretamente o fator eIF5A com a via secretória, uma vez que a proteína Ypt1 trata-se de uma GTPase envolvida com o trânsito vesicular do retículo endoplasmático para o Golgi. Além disso, o dado de que os genes supressores PKC1, WSC1, WSC2 e WSC3 estão relacionados ao correto funcionamento da via secretória (GUSTIN et al., 1998) fortalecem o envolvimento de eIF5A nesta via do metabolismo celular. Interessantemente, foi observado que mutações na via secretória direcionam a uma rápida e específica atenuação do início de tradução. Isto ocorre como resposta primária da célula para preservação de energia e prevenção de acúmulo de proteínas não localizadas adequadamente devido à inativação do transporte vesicular (DELOCHE et al., 2004). Diante deste dado, foi sugerido por nosso laboratório que elF5A e Ypt1 trabalhem juntas na célula para garantir a síntese protéica apropriada e a secreção das proteínas necessárias para a formação do novo broto durante a fase G1/S em levedura (FRIGIERI et al., 2007; FRIGIERI et al., 2008).

Retornando ao cenário da tradução, resultados obtidos em nosso laboratório fortaleceram o envolvimento de eIF5A com a etapa de elongação ao invés de início da tradução. Em um primeiro trabalho, foi mostrado através de ensaios de copurificação seguidos de identificação por espectrometria de massas que eIF5A interage com as

proteínas ribossomais (P0, S5 e L11) e com o fator de elongação de tradução 2 (eEF2), componentes da maquinaria de tradução (ZANELLI et al., 2006). Ainda, foi observado que eIF5A interage especificamente com monossomos funcionalmente ativos, e que mutantes condicionais de eIF5A apresentam defeito no perfil polissomal (ZANELLI et al., 2006). Resultados de outro laboratório também sugerem o envolvimento de eIF5A com a etapa de elongação da tradução, pois foi verificado que eIF5A interage fisicamente com proteínas ribossomais (JAO; CHEN, 2006). Além disto, o análogo de eIF5A de eubactérias (EF-P) tem sua atividade especificamente afetada *in vitro* por inibidores da atividade peptidil-transferase (AOKI et al., 2008) e similarmente foi observada a sensibilidade dos mutantes de eIF5A de levedura a inibidores da tradução, como a esparsomicina e anisomicina (ZANELLI et al., 2006). Estes dados sugerem uma função para eIF5A na elongação da tradução.

Posteriormente, em outro trabalho de nosso laboratório, foram realizadas interações genéticas e análises de perfil polissomal de linhagens que combinam mutações em eIF5A e em fatores envolvidos na etapa de início (eIF4E) ou elongação (eEF2) da tradução, onde foi observada interação genética entre *TIF51A* e os genes analisados (GREGIO *et al.*, 2009). Neste estudo, foi mostrado que o perfil polissomal do mutante *ts tif51A-3* é bastante semelhante ao do dominante negativo de eEF2 (*eft2*<sup>H699K</sup>) e que a depleção de eIF5A provoca uma diminuição significativa na síntese protéica total e um aumento no tempo de trânsito ribossomal (GREGIO *et al.*, 2009).

Fortalecendo e complementando os dados publicados pelo nosso laboratório, foi mostrado que o mutante *ts tif51A*<sup>D63V</sup> apresentou defeito na capacidade de realizar a alteração na janela de leitura programada +1, chamada de PRF +1 (*Programmed* 

*Ribosomal Frameshiting*), efeito semelhante ao observado para linhagens selvagens tratadas com sordarina, um inibidor de eEF2. Ainda, a linhagem selvagem tratada com sordarina apresentam perfis polissomais semelhantes ao mutantes de eIF5A, com acúmulo de polissomos na temperatura não permissiva, reforçando a correlação entre eIF5A e eEF2 (SAINI *et al.*, 2009).

Um estudo realizado pelo nosso laboratório identificou dois mutantes, *tif51A*<sup>K56A</sup> e *tif51A*<sup>Q22H/L93F</sup>, que possuem eIF5A estável na temperatura não permissiva (DIAS et al., 2008). Foi mostrado mais recentemente que o mutante *tif51A*<sup>K56A</sup> apresenta uma interação genética do tipo sintético doente com o dominante negativo de eEF2 (*eft2*<sup>H699K</sup>) (DIAS et al., 2011). A superexpressão de eEF2 em *tif51A*<sup>K56A</sup> suprime os defeitos de crescimento, de morfologia celular, de síntese protéica total e melhora a resistência à droga higromicina B, a qual possui ação como inibidor da síntese protéica e promove alterações de PRF. Além disso, a superexpressão de eEF2 no mutante *tif51A*<sup>K56A</sup> corrige o defeito de elongação da tradução do mutante de eIF5A como verificado por ensaios de perfil polissomal. Estes resultados demonstram que eIF5A está intimamente correlacionado com a função de eEF2 na elongação da tradução fortalecendo a hipótese de eIF5A atuar nesta etapa da tradução.

### Tradução e degradação de mRNA

Durante os vários ciclos da tradução de um mRNA, ocorre o encurtamento da cauda de poli-A, após o que é disparada a remoção do capacete de metilguanosina da extremidade 5' do mRNA pelo complexo Dcp1/Dcp2 (Decker e Parker, 1993; Muhlrad e cols, 1994). Então, o mRNA é degradado no sentido 5' $\rightarrow$ 3' por Xrn1 (Hsu e Stevens,

1993) e, mais lentamente, no sentido 3'→5' pelo complexo do exossomo (Anderson e Parker, 1998; Cao e Parker, 2001; Muhlrad e cols., 1995). Juntamente com o complexo Dcp1/Dcp2, atuam fatores ativadores que incluem Dhh1, Pat1 e o complexo Lsm1-7 (Bonnerot e cols., 2000; Coller e cols., 2001; He e Parker, 2001; Tharun e cols., 2000; Tharun e Parker, 2001). Na Figura 2 estão descritas resumidamente as principais vias de degradação do mRNA e as enzimas e complexos envolvidos nestas etapas (adaptada de PARKER; SHETH, 2007). A remoção do capacete é uma etapa muito importante no decaimento de mRNA, pois permite a degradação rápida do transcrito e é alvo para regulação.

Baseado na análise dos *P bodies*, que são pequenos agregados citoplasmáticos que contêm mRNA que não estejam sendo traduzidos e os fatores de remoção do capacete (SHETH E PARKER, 2003; COUGOT E COLS., 2004), a tradução e a remoção do capacete parecem atuar competitivamente. Após a tradução, os mRNA acumulam nos *P bodies* para serem degradados, e ao se interferir no processo da tradução, foram observadas conseqüências no tamanho e número dos *P bodies* (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Estudos mostram que com a adição do inibidor de elongação ciclo-heximida, os mRNAs acumulam-se ligados a ribossomos, o que gera uma perda de *P bodies*, enquanto que ao bloquear o início da tradução, há um aumento em tamanho e número de *P bodies* e a remoção do capacete de metilguanosina é aumentada (BEELMAN AND PARKER, 1994; SCHWARTZ E PARKER, 1999; SHETH E PARKER, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Coller e Parker (2005) verificaram que ao interromper duas vias de repressão da tradução desencadeia na não formação de *P bodies*. Neste estudo é sugerido que os ativadores da remoção do capacete Dhh1 e Pat1 mediam a transição da tradução para

o decaimento de mRNA, e estes fatores atuariam independentemente na repressão da tradução (Coller e Parker, 2005). Portanto, a formação dos *P bodies* está fortemente relacionada com a tradução na célula.

Recentemente em nosso laboratório, o gene *SBP1* foi isolado como um supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A-1*. Apesar de não possuir função totalmente elucidada, Sbp1 possui motifs de ligação a RNA e foi descrito que a superexpressão de Sbp1 suprime defeitos no decaimento de mRNA em linhagens com bloqueio na remoção do capacete de metilguanosina. Nesse estudo foram utilizadas linhagens com mutações tanto em genes que codificam proteínas do complexo de retirada do capacete (Dcp1 ou Dcp2), como genes de proteínas necessárias para a degradação exonucleolítica  $3' \rightarrow 5'$  do mRNA (Ski8 ou Ski3), as quais funcionam como moduladores do exossomo no citoplasma. As linhagens *dcp2-7 ski3* $\Delta$  e *dcp1-2 ski8* $\Delta$  apresentam termossensibilidade a  $37^{\circ}$ C e  $33^{\circ}$ C, respectivamente, e *SBP1* em alto número de cópias permite seu crescimento nessas condições. Além disso, foi mostrado que a superexpressão de Sbp1 parcialmente recupera as taxas de decaimento em mutantes condicionais para a remoção do capacete (Segal e cols., 2006).

Assim, apesar de os dados recentes de nosso laboratório indicarem para uma relação funcional direta de eIF5A com elongação da tradução e, portanto, uma relação indireta com degradação de mRNA, a identificação de Sbp1 como supressor em alto número de cópias de *tif51A-1* sugere que estas relações são mais complexas que o descrito até o momento e este dado poderá contribuir para a melhor elucidação do papel de eIF5A no controle traducional.

### Supressores Extragênicos

As análises genéticas promovidas pelos supressores em alto número de cópias já realizadas anteriormente em nosso laboratório contribuiu consideravelmente para o entendimento da função de eIF5A. Desta forma, também é interessante a busca de supressores extragênicos. Este estudo possibilita a identificação de deleções genômicas dirigidas por transposon que levam ao crescimento da levedura mutante na temperatura não permissiva (HITCHCOOK *et al.*, 2001).

Para a realização deste estudo foi utilizada uma biblioteca genômica contendo deleções em genes de levedura. Essas deleções foram obtidas através da inserção randômica de um transposon artificial nesses genes. O DNA de levedura mutagenizado foi extraído da biblioteca e transformado em levedura. Os alelos contendo a inserção do transposon foram transferidos para o DNA cromossomal através de recombinação homóloga, e os clones contendo o transposon artificial foram selecionados a partir da marca LEU2, presente no transposon. A posição da inserção pode ser verificada por seqüenciamento do DNA adjacente ao transposon (VIDAN & SNYDER, 2001). Um esquema deste processo pode ser verificado na Figura 3. A levedura a ser utilizada para este estudo contém os genes TIF51A e TIF51B deletados e a sobrevivência desta levedura é garantida pela presença do alelo *tif51A-1* em plasmídeo com marca URA3. O interesse de deletar TIF51B é para evitar o seu isolamento como supressor. Esse gene já foi isolado em nosso laboratório em um rastreamento buscando supressores em alto número de cópias (ZANELLI, C. F., dados não publicados). O aparecimento de TIF51B como supressor em alto número de cópias, diferentemente de TIF51A, era inesperado, uma vez que a expressão de TIF51B é inibida transcricionalmente em condições aeróbicas (LOWRY AND ZITOMER, 1984; KLINKENBERG et al., 2005). Uma vez que a repressão gênica controlada por oxigênio em *S. cerevisiae* parece ser um processo complexo e bastante regulado, o aumento no número de cópias de *TIF51B* poderia ter levado à perda da repressão gênica. Ainda, foi verificado que em baixo número de cópias, em vetor centromérico, isto é, condições mais próximas daquelas normais na célula, *TIF51B* não leva à supressão do mutante de *TIF51A*, o que sugere fortemente que o aparecimento de *TIF51B* se deve ao fato da perda do controle da repressão gênica por algum tipo de saturação dos complexos envolvidos nesse processo pelo aumento do número de cópias de *TIF51B*. No estudo proposto, as deleções genômicas geradas por transposon são aleatórias podendo levar a uma perda do controle da repressão gênica de *TIF51B*, devido à deleção de algum gene cujo produto participe deste processo.

O rastreamento de supressor extragênico tem-se mostrado uma importante estratégia na busca da função de diferentes genes em *S. cerevisiae* (HITCHCOOK, 2001). Desta forma, a descoberta de supressores extragênicos do alelo *tif51A-1*, poderá contribuir para a continuidade do estudo da função de eIF5A, uma vez que, esse tipo de rastreamento genético poderá levar ao isolamento de formas mais ativas de fatores que regulam positivamente eIF5A ou formas menos ativas de fatores que regulam eIF5A negativamente.



**Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina em elF5A.** A modificação pós-traducional que ocorre em elF5A está mostrada simplificadamente. Um resíduo 4-aminobutil da poliamina espermidina é transferido para a lisina alvo em elF5A pela enzima desoxi-hipusina sintase. A forma intermediária de elF5A sofre a hidroxilação pela desoxi-hipusina hidroxilase formando elF5A madura e hipusinada (adaptada de PARK, 2006).



Figura 2. Principais vias de degradação do mRNA eucariótico. O mRNA é primeiramente submetido à remoção da cauda de poli(A)<sup>+</sup> pelo complexo Ccr4/Not1-5/Pop2, posteriormente este pode ser degradado por uma das vias mostradas. O capacete é removido pelo complexo Dcp1/Dcp2, então o mRNA é degradado no sentido 5' $\rightarrow$ 3' por Xrn1. Alternativamente, a degradação ocorre no sentido 3' $\rightarrow$ 5' pelo complexo do exossomo (adaptada de PARKER; SHETH, 2007).



**Figura 3. Mutagênese utilizando transposon.** Plasmídeos contendo DNA genômico de levedura são mutagenizados em bactéria utilizando o transposon artificial mTn*lacZ/LEU2*. O DNA mutagenizado é extraído do plasmídeo utilizando a enzima de restrição *Not*I. Os fragmentos gerados são transformados na linhagem de estudo e o alelo contendo a inserção do transposon é integrado ao genoma através de recombinação homóloga. Os transformantes são selecionados e submetidos à análise fenotípica

## 2. OBJETIVOS

No intuito de auxiliar o entendimento da relação de eIF5A com os processos de tradução e degradação de mRNA, foram propostos neste projeto a análise direta de interação genética entre mutantes de eIF5A e mutantes de fatores envolvidos com a degradação de mRNA, assim como a busca de deleções genômicas capazes de melhorar a fenótipo do mutante de *tif51A-1* de eIF5A na temperatura restritiva de crescimento. Os objetivos aqui propostos poderão contribuir de maneira significativa para o entendimento do papel de eIF5A no controle da expressão gênica.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 MATERIAIS

Os materiais (linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos) utilizados neste trabalho estão listados na tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Linhagens utilizadas nos experimentos.

Linhagem	Outros	Genótipo	Origem
	nomes		
SVL8		MAT <u>a</u> ade2 trp1 ura3 leu2 his can1 cyt1::HIS3	Coleção do
			laboratório
SVL10		MAT <u>a</u> ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1 cyt1::HIS3	Coleção do
		<i>tif51A-1 (tif51A</i> <sup>P83S</sup> )	laboratório
SVL17		MATα ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1 tif51A-1	Coleção do
		( <i>tif51A</i> <sup>P83S</sup> )	laboratório
SVL55		MAT <u>a</u> ura3 trp1 leu2	Pamela Silver
SV/I 82	W303	MATa ade2 trp1 ura3 leu2 his3 cap1	Coleção do
			laboratório
SVL100	PSY1190	MATα ade2 his3 leu2 lys2 trp1ura3 xrn1::URA3	Pamela Silver
SVL101	PSY1757	MAT <u>a</u> ade leu2 trp1 ura3 tif51A-1 (tif51A <sup>P83S</sup> )	Pamela Silver
		xrn1::URA3	
SVL132		MATα his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3	Coleção do
		[TIF51A/URA3/CEN]	laboratório
SVL272	BY4741	MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3	Anita Corbett
SVL323		MATα his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 [tif51A-	Coleção do
		1/LEU2/CEN] (tif51A <sup>P835</sup> )	laboratório

SVL445		MAT <u>a</u> ade2 ura3 his3 leu2 lys2 trp1 tif51A-	Coleção do
		3::URA3 (tif51A <sup>C39Y/G118D</sup> ) ssd1::LEU2	laboratório
SVL447		MATα ade2 ura3 his3 leu2 lys2 trp1 can1 tif51A-	Coleção do
		3::URA3 (tif51A <sup>C39Y/G118D</sup> ) ssd1::LEU2	laboratório
SVL513		MATα trp1 his3 leu2 ura3 ade2 tif51A-1	Coleção do
		(tif51A <sup>P83S</sup> ) ssd1::LEU2	laboratório
SVL595	yAS2324	MAT <u>a</u> ade2 his 3 leu2 trp1 ura3 lsm1::LEU2	Charles Cole
SVL596		MATα his3 leu2 ura3 pat1::kanMX4	Charles Cole
VZL781		MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3 dhh1::kanMX4	Coleção de
			nocautes
VZL784		MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3 sbp1::kanMX4	Coleção de
			nocautes
VZL801	yRP1345	MAT <u>a</u> his4 leu2 lys 2 ura3 dcp1-2::TRP1	(DUNCKLEY;
		ski8::URA3	TUCKER;
			parker, 2001)
V7I 838		MATα leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3	Coleção do
		tif51B::kanMX4 [TIF51A/CEN/TRP1]	laboratório
VZL907		MAT <u>a</u> leu2 ura3 his3 trp1 ade2 tif51A-	Coleção do
		1tif51B::kanMX4	laboratório
VZL996		MATα leu2 lys2 ura3 dcp1-2::TRP1 tif51A::HIS3	Este trabalho
		[tif51A-1/LEU2/CEN] (tif51A <sup>P83S</sup> )	
VZL997		MATα leu2 trp1 ski8::URA3 tif51A::HIS3 [tif51A- 1/LEU2/CEN]	Este trabalho
VZL998		MATα his3 ura3 leu2 trp1 tif51A-1	Este trabalho
V7I 1028		MATa ade2 his3 ura3 shn1::kanMX4 ssd1::I ELI2	Coleção do
			laboratório
VZL1172		MATα trp1 his3 leu2 ura3 ade2 tif51A-1	Este trabalho
		ssd1::LEU2_dhh1::kanMX4	

Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos.

Plasmídeo	Outros	Descrição	Origem
	nomes		
pSV57	pRS313	HIS3/CEN	Sikorski e Hieter, 1989
pSV58	pRS314	TRP1/CEN	Sikorski e Hieter, 1989
pSV59	pRS315	LEU2/CEN	Sikorski e Hieter, 1989
pSV60	pRS316	URA3/CEN	Sikorski e Hieter, 1989
pSV138		TIF51A/URA3/CEN	Coleção do laboratório
pSV384		SSD1/URA3/CEN	Uesono <i>et al.,</i> 1994
pVZ1193		DHH1/URA3/CEN	Este trabalho
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos.

Oligonucleotídeos	Sequência	Sítio
SVO49	GCCAATTCATCATAGACTCC	-
SVO50	GCGAAGAGTACATGATGTGA	-
SVO225	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	-
VZO566	CGCGGATCCCCAACATTTTGCGACG	<i>Bam</i> HI
VZO567	CGC <b>GGATCC</b> TACGCAAATATAACAG	<i>Bam</i> HI
VZO571	CCG <b>GAATTC</b> TTCGGCCGACTTGTTAC	EcoRI
VZO574	GCAGCAACAGGACTAGGATG	-
VZO575	CTTGACCAACGTGGTCACC	-
VZO810	CGCGGATCCCAACCAATATACCACGCTGC	<i>Bam</i> HI
VZO811	CCGCTCGAGGTGTCGATGAAACTGGGCAAG	EcoRI
VZO897	CAAGGAGGGTATTCTGGGCC	-
VZO898	CGCCTCGACATCATCTGCC	-

#### 3.2 MÉTODOS

Os procedimentos básicos de preparação de soluções e meios de cultivo, preparação de *Escherichia coli* competente, transformação de *E. coli*, preparação de plasmídeos a partir de *E. coli* em pequena escala, bem como outras metodologias utilizadas neste trabalho foram baseadas nos seguintes manuais de laboratório: (GUTHRIE; FINK, 1991;SAMBROOK; RUSSELL, 2001; AUSUBEL et al., 2004).

## 3.2.1 Preparo de plasmídeos a partir de *E. coli* em pequena escala – Miniprep (lise alcalina)

Linhagens de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo antibiótico adequado à seleção plasmidial e incubadas a  $37^{\circ}$ C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000 xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e então adicionadas de 200 µL de solução de lise (NaOH 0,2 M; SDS 1%). Os tubos são homogeinizados e foram adicionados 150 µL de solução acetato de sódio 3 M pH 4,8. O tubo foi invertido delicadamente por várias vezes e centrifugado por 6 minutos a 12.000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 mL de isopropanol foi adicionado. Após centrifugação a 12.000 *xg* por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% gelado. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q.

#### 3.2.2 Transformação de leveduras QUICK & EASY (Método rápido)

Inicialmente, uma colônia de S. cerevisiae foi inoculada em 5 mL de meio e incubada a 25°C sob agitação por toda a noite até atingir uma concentração de 1-2x107 células/mL. Então, a cultura foi diluída para a concentração de 2.0x10<sup>6</sup> células/mL e incubada novamente até a concentração de 0,5x10<sup>7</sup> células/mL. A seguir, a cultura foi centrifugada a 3.000 xg por 5 minutos e lavada com água estéril. Em seguida, as células foram lavadas com uma solução acetato de lítio/TE (acetato de lítio 100 mM; Tris 10 mM; EDTA 1 mM pH7,5). Finalmente, as células foram suspendidas em acetato de lítio/TE numa concentração de 2x10<sup>9</sup> células/mL. Em seguida, adicionou-se a 50 µL dessa suspensão de células competentes, 1 µg do DNA plasmidial, 50 µg de DNA carregador (DNA de esperma de salmão) e 300 µL da solução acetato de lítio/TE/PEG4000 (40% de PEG 4000 em acetato de lítio/TE) e agitou-se fortemente. Em seguida, as células foram incubadas a 30°C por 30 minutos sob agitação. Então, foram adicionados 35 µL de DMSO e as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 15 minutos. Por fim, as células foram centrifugadas a 13.000 xg por 10 segundos e suspendidas em 1 mL de TE pH7,5. A seguir, foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas na temperatura adequada até a obtenção de colônias.

#### 3.2.3 Cruzamento e esporulação de leveduras

#### 3.2.3.1 Cruzamento

As linhagens haplóides de *S. cerevisiae* de interesse foram cruzadas na superfície de ágar YPD e incubadas por uma noite a 25°C. A seleção dos diplóides foi realizada pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para uma placa de meio seletivo duplo, de acordo com as marcas auxotróficas dos haplóides de partida. As placas foram incubadas a 25°C. Após o crescimento, os diplóides foram isolados em meio seletivo.

#### 3.2.3.2 Esporulação

Os diplóides foram crescidos em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracil e tirosina; 20 mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100 mg de fenilalanina e 350 mg de treonina em 1 litro de água destilada) a 25°C, sob agitação até a formação de ascos.

Como alternativa aos diplóides que não cresciam em meio S-SPO líquido, foram utilizados os meios PSP2 (YNB 0,67%, extrato de levedura 0,1%, acetato de potássio 1%, ftalato de potássio pH5,0 50mM) e SPO (acetato de potássio 0,3%, rafinose 0,02%). Os diplóides foram crescidos em meio PSP2 líquido suplementado com aminoácidos (adenina, uracila, triptofano, histidina, leucina) sob agitação e temperatura adequada até atingir 0,8-1,2x10<sup>7</sup> células/mL. O inóculo foi centrifugado por 5 minutos a 1.300 x*g* e as células foram lavadas com água estéril. O sobrenadante foi desprezado e

as células suspendidas em meio SPO líquido. Incubou-se à temperatura adequada até a formação de ascos.

#### 3.2.4. Dissecção de tétrades e caracterização de haplóides

Foram centrifugados 200-1.000 µL da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, as células foram suspensas em 100 µL de sorbitol 20%. Então, foram adicionados 3 µL de zimoliase (10 mg/mL) e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 1 mL de sorbitol 20% e as células foram mantidas em gelo até a dissecção. Os ascos foram dissecados em microscópio de dissecção, utilizando placa de meio YPD, a qual foi incubada a 25°C até a obtenção de colônias. O genótipo das células haplóides obtidas foi caracterizado utilizando diferentes meios de cultura seletivos. O "mating type" foi definido através do cruzamento dos haplóides com linhagens de "mating type" conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo adequado. O fenótipo de sensibilidade a temperatura foi checado pelo crescimento em meio YPD em diferentes temperaturas de incubação.

#### 3.2.5. Teste de sensibilidade a temperatura

As linhagens de interesse foram inoculadas em 10 mL de meio apropriado e crescidas até atingir a concentração de  $1-2\times10^7$ células/mL (D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,6 a 0,9). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (600 *xg* por 7 minutos) e suspendidas para uma concentração final de 2,5x10<sup>8</sup> células/mL para todas as amostras testadas. Transferiu-se 200 µL da suspensão de células para o primeiro poço da microplaca (de 96 poços). Colocou-se 180 µL de meio de cultura líquido nos 5 poços seguintes. Fez-se 5 diluições seriadas utilizando um micropipetador multicanal para

pipetar 20  $\mu$ L da cultura do primeiro poço e transferir para o segundo poço, homogeneizou-se bem e repetiu-se o procedimento para os próximos poços. Aplicou-se 4  $\mu$ L de cada diluição (1x 10<sup>6</sup> células/mL) nas placas com os meios a serem testados e incubou-as por 1 a 3 dias na(s) temperatura(s) adequada(s).

#### 3.2.6. Extração de DNA genômico de levedura

As linhagens foram crescidas até a saturação em 10 mL de meio YPD líquido a 30°C, sob agitação. O volume total de cultura foi submetido à centrifugação a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 500 µL de água Milli-Q e transferidas para um tubo de microcentrífuga. O tubo foi submetido à centrifugação a 3.000 xg por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas no líquido residual. A esse tubo foram adicionados 200 µL de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM), 200 µL de PCI (Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico–25:24:1) e aproximadamente 300 mg de contas de vidro. A mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos (1 minuto no vórtex e 1 minuto no gelo). Posteriormente, foram adicionados 200 µL de TE pH 8,0. O tubo foi agitado em vórtex e submetido à centrifugação a 13.000 xg por 5 minutos. Após esse procedimento, a fase aguosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga ao gual foram adicionados 200 µL de PCI. A mistura foi agitada novamente e submetida à centrifugação 13.400 xg por 5 minutos e a fase aquosa transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Esse procedimento de extração foi repetido duas vezes. A seguir, foi adicionado ao tubo 1 mL de etanol absoluto gelado e o conteúdo homogeneizado por inversão. O tubo foi centrifugado a 13.400 xg por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 400 µL de TE pH 8,0 e foram adicionados 3

 $\mu$ L de RNase (10 mg/mL). A suspensão foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de PCI e o tubo foi agitado brevemente em vórtex. A mistura foi submetida à centrifugação a 13.000 *xg* por 5 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Ao tubo foram adicionados 10  $\mu$ L de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol absoluto gelado. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão e os tubos foram centrifugados a 13.400 *xg* por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400  $\mu$ L de etanol 75% gelado. Após a secagem, o precipitado foi suspenso em 50  $\mu$ L de TE pH 8,0. O DNA genômico foi armazenado em freezer a -20°C.

#### 3.2.7. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 µM de cada oligonucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2 µg de DNA molde, 2 U da enzima Taq Hifi DNA Polimerase (Invitrogen), em um volume final de reação de 100 µL. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e o tamanho de fragmento esperado. Após o último ciclo, as reações foram mantidas a 72°C por 5 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11 % e EDTA 1 mM) e então purificados utilizando o Kit "QIAquick PCR Purification" (Qiagen).

#### 3.2.8. Transformação de leveduras de alta eficiência

Inicialmente, uma colônia de levedura foi inoculada em 10 mL de meio adequado e incubada a 25 °C sob agitação por toda a noite. A partir desta cultura, foi feito o inóculo de 5,0x10<sup>6</sup> células/mL em 10 mL de meio pré-aquecido a 30 °C. As células foram incubadas a 25 °C até que a concentração atingisse 2,0x10<sup>7</sup> células/mL, centrifugadas a 3.000 *xg* por 5 minutos e lavadas com água. Após centrifugação, as células foram suspensas em 600 µL de solução de acetato de lítio 100 mM e incubadas por 15 minutos a 25°C. Coletaram-se novamente as células por centrifugação e removeu-se o sobrenadante. Foram adicionados, na seguinte ordem, 480 µL de PEG 50%, 72 µL de acetato de lítio 1 M, 50 µL de DNA de esperma de salmão, 10 µL da biblioteca de cDNA completando-se o volume de reação com 108 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 30°C por 30 minutos. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 42°C por 20 minutos, tomando-se cuidado de inverter o tubo a cada 5 minutos para equilíbrio da temperatura. As células foram centrifugadas como descrito acima, suspensas em 1 mL de água, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 25°C até o aparecimento das colônias.

#### 3.2.9. Estratégia de deleção baseada em PCR

Inicialmente, uma colônia de levedura foi inoculada em 10 mL de YPD e incubada a 25°C sob agitação por uma noite. A partir desta cultura, foi feito o inóculo de 1,0x10<sup>7</sup> células/mLem 50 mL de YPD. Esta cultura foi mantida a 25°C sob agitação até a concentração de 3 a 5x10<sup>7</sup> células/mL, centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e lavadas com 10 mL de água destilada estéril. Após centrifugação, as células foram ressuspendidas em 1 mL de água e transferidas para um microtubo. Coletou-se as células por 1minuto a 5000 rpm e ressuspendidos em 1,5 mL de solução TE/LiOAc 1 M.

As células foram coletadas novamente por centrifugação e suspensas em 200µL da solução TE/LiOAc. Misturou-se 25 µL de DNA de esperma de salmão com 5 µg do produto de PCR e adicionou-se 50 µL da suspensão de células TE/LiOAc e homogeinizou-se com cuidado (sem vortexar).

Em outro microtubo, preparou-se a solução estéril de 40% de PEG4000 e adicionou-se 300 µL desta na mistura de células. Incubou-se as células por 30 minutos sob agitação a 30 °C. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 42 °C por 15 minutos. Após este período, lava-se as células com 800 µL de água estéril e coletá-las por centrifugação. As células foram suspendidas em 1 mL de YPD e incubadas por 2 a 3 horas a 30 °C, coletou-as por centrifugação. As células foram suspendidas foram suspendidas em 200 µL de YPD e plaqueadas em meio seletivo.

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

3.2.10.1 Reação de PCR

O gene de interesse foi amplificado por reação de PCR, como descrito anteriormente.

3.2.10.2 Clonagem do produto de PCR

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição requeridas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Os produtos de digestão foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8 %, utilizando o kit "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen). Os fragmentos (vetor e inserto) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8-1 % para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos.

#### 3.2.10.3 – 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 µL, tampão apropriado, um excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200-400 unidades de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 4-24 horas.

#### 3.2.10.4 – Transformação em *E.coli*

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 metade da 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.

# 3.2.11 Rastreamento de supressor extragênico utilizando deleções genômicas induzidas por transposon

Uma biblioteca genômica de *S. cerevisiae*, mutagenizada *in vivo* em *Escherichia coli* com um minitransposon artificial possuindo a marca de seleção para levedura *LEU2* (mTn-*lacZ/LEU2*), foi digerida com a enzima de restrição *Not*l. O produto gerado foi

transformado na linhagem de interesse contendo o alelo *tif51A-1*. A busca por supressores foi realizada submetendo os transformantes ao crescimento na temperatura não permissiva. Após a confirmação da supressão, os candidatos selecionados foram testados quanto à dominância ou recessividade pelo cruzamento com as linhagens de interesse "mating type" oposto. Ainda, tétrades desse cruzamento foram dissecadas para confirmar a ligação entre o crescimento em meio desprovido de leucina (devido à presença do transposon) e a resistência a temperatura. Finalmente, o DNA genômico flanqueando o sítio de inserção do transposon foi identificado por sequenciamento a partir do transposon (Vidan e Snyder, 2001).

# 3.2.12 Seleção de haplóides em plaqueamento: SGA - Synthetic Genetic Array (Tong et al, 2001).

Um diplóide resultante de cruzamento em larga escala é submetido à esporulação em meio S-SPO. Foram centrifugados 200-1.000 µL da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, as células foram suspensas em 100 µL de sorbitol 20%. Então, foram adicionados 3 µL de zimoliase (10 mg/mL) e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A suspensão de células foi, então, plaqueada em meio seletivo para haplóides utilizando marcadores recessivos, além da seleção dos alelos de interesse marcados.

#### 3.2.13 Sequenciamento

As amostras de DNA para o seqüenciamento das bases foram derivadas de produtos de PCR purificados a partir de kit de purificação de PCR (Qiagen). A quantificação foi realizada no espectrofotômetro, respeitando sempre o limite de detecção do aparelho (Absorbância em 260 nm entre 0,2 e 0,8) e a razão entre as absorbâncias de 260 nm e 280 nm de 1,8 a 2,0

Molde		Quantidade de DNA
Produto de PCR:	200 – 500 pb	3 – 10 ng
	500 – 1000 pb	5 – 20 ng

A partir do DNA quantificado, realizou-se a reação de PCR para seqüenciamento. As condições da reação são mostradas abaixo:

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
96°C	1 minuto	1x
96°C	10 segundos	
Tm do primer	5 segundos	25x
60°C	4 minutos	
60°C	5 minutos	1x
4°C	Infinito	

O produto de PCR do sequenciamento foi purifcado por precipitação alcoólica. Para isto, as amostras foram transferidas para microtubo de 1,6 mL e adicionou-se, nesta ordem, 2  $\mu$ L de EDTA 125 mM, 2  $\mu$ L de NaAc 3 M e 50  $\mu$ L de etanol 100%, em cada tubo. Os tubos foram misturados por inversão 4 vezes e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 3000 *xg* por 30 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e os tubos foram submetidos à centrifugação. Foram adicionados, em cada tubo, 70  $\mu$ L de etanol 70% e centrifugados a 1650 *xg* por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos foram submetidos a centrifugação por 1 minuto a 200 *xg*. Após secar por uma noite, as amostras foram ressuspendidas em 10  $\mu$ L de formamida HiDi, vortexadas vigorosamente e centrifugadas. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e deixadas no gelo por pelo menos 2 minutos antes de aplicá-las na placa de 96 poços para levar ao sequenciador. Durante todo o procedimento, as amostras foram protegidas da luz.

#### 3.2.14 Western Blot

Separou-se as amostras protéicas com mesma concentração por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferiu-se para membrana de nitrocelulose. Bloqueou-se a membrana com tampão PBST (PBS 1X, 0,25% Tween-20) contendo leite desnatado a 5% por 1 hora. Em seguida, incubou-se a membrana com uma diluição adequada de anticorpo primário em PBST contendo 5% de leite desnatado por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, lavou-se a membrana três vezes com PBST e incubou-se novamente com anti-IgG, conjugado com peroxidase e diluído em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três novas lavagens com PBST, tratou-se a membrana com reagentes quimioluminescentes (ECL-Amersham) e expôs-se a filme autorradiográfico.

# 4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da interação genética entre mutantes de eIF5A e de fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA

A análise da interação genética sintética entre mutantes de eIF5A e de fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA visa contribuir para o estabelecimento das relações funcionais entre eIF5A e os processos de tradução, repressão e degradação de mRNA. Para isto, foram escolhidos sete genes de fatores que atuam em diferentes etapas da degradação de mRNA, como remoção do capacete de metilguanosina (*DCP1, PAT1, LSM1, DHH1 e SBP1*), degradação 5' $\rightarrow$ 3' (*XRN1*) e degradação 3' $\rightarrow$ 5' (*SKI8*). As proteínas Lsm1, Pat1, Dhh1 e Sbp1 atuam como fatores de repressão da tradução (BONNEROT; BOECK; LAPEYRE, 2000; THARUN et al., 2000; COLLER et al., 2001; THARUN AND PARKER, 2001; SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006).

A primeira análise genética realizada foi entre *TIF51A* e *XRN1*, utilizando as linhagens SVL8 (selvagem), SVL10 (*tif51A-1*), SVL100 (*xrn1* $\Delta$ ) e SVL101 (*xrn1* $\Delta$  *tif51A-1*). A linhagem *xrn1* $\Delta$  não apresenta fenótipo de sensibilidade a temperatura descrito na literatura, já o alelo *tif51A-1* é temperatura sensível (*ts*). Assim, a avaliação fenotípica da linhagem *xrn1* $\Delta$  *tif51A-1* poderia revelar piora ou melhora no fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante de *TIF51A*. Na Figura 4, pode-se observar que o duplo mutante *xrn1* $\Delta$  *tif51A-1* (SVL101) apresentou uma diminuição no crescimento a 35°C quando comparado com a linhagem SVL10 (*tif51A-1*), sendo que o painel a 36°C apenas ilustra a termossensibilidade do mutante *tif51A-1*. No entanto, apesar de sutil, esta diferença no crescimento se manteve nas três repetições do ensaio realizadas,

mostrando que ocorre uma interação entre os alelos *tif51A-1* e *xrn1* $\Delta$ , a qualacentua o defeito no fenótipo de sensibilidade a temperatura de *tif51A-1*. Portanto, conclui-se que existe interação genética do tipo sintético doente (*synthetic sick*) entre os mutantes *tif51A-1* e *xrn1* $\Delta$ , o que pode significar uma correlação funcional entre estes genes.

Em seguida, foi analisada a interação genética entre *TIF51A* e *LSM1*. Para isso, foram utilizadas as linhagens SVL17 (*tif51A-1*) e SVL595 (*lsm1* $\Delta$ ), sendo que a linhagem *lsm1* $\Delta$  é *ts*. No painel A da Figura 5, verifica-se que os haplóides contendo *lsm1* $\Delta$  têm seu crescimento diminuído já a 25°C, tanto na ausência, quanto na presença de *tif51A-1*. Portanto, não há interação genética entre os mutantes *lsm1* $\Delta$  e *tif51A-1*.

Na análise genética de *DCP1* e *SKI8* foi utilizado o duplo mutante *dcp1-2 ski8* $\Delta$ , o qual apresenta fenótipo *ts*. Inicialmente, foi gerada uma linhagem com genótipo *tif51A-1 dcp1-2* (VZL996) a partir do cruzamento da VZL801 (*dcp1-2 ski8* $\Delta$ ) e SVL323 (*tif51A-1*). Em seguida, essa linhagem foi cruzada com a linhagem parental VZL801 (*dcp1-2 ski8* $\Delta$ ). No painel B da Figura 5, verifica-se que o haplóide contendo *dcp1-2 ski8* $\Delta$  apresenta crescimento diminuído a 36°C, fenótipo já descrito na literatura (ANDERSON; PARKER, 1998). Entretanto, este fenótipo não foi alterado por *tif51A-1*, sugerindo que não ocorre interação genética entre o mutante *tif51A-1* e o duplo mutante *dcp1-2 ski8* $\Delta$ .

A análise da interação genética entre *SBP1* e *TIF51A* foi realizada pelo cruzamento da linhagem VZL784 (*sbp1* $\Delta$ ) com a linhagem SVL513 (*tif51A-1 ssd1* $\Delta$ ), uma vez que o fenótipo dos alelos de *TIF51A* são mais pronunciados na ausência de *SSD1* (ZANELLI; VALENTINI, 2005). No painel A da Figura 6, é possível observar que o haplóide *tif51A-1 sbp1* $\Delta$  apresenta melhora significativa no crescimento a 36°C, em comparação com o haplóide *tif51A-1* contendo *SBP1* selvagem, o que revelou uma

interação genética por supressão parcial do defeito de crescimento entre *TIF51A* e *SBP1*.

Para complementar, a análise da interação genética sintética utilizando o mutante *tif51A-3* de eIF5A também foi avaliada. Para isso, um cruzamento entre VZL784 (*sbp1* $\Delta$ ) e SVL447 (*tif51A-3 ssd1* $\Delta$ ) foi realizado. No painel B da Figura 6, podemos observar que o haplóide *tif51A-3 sbp1* $\Delta$  também demonstra melhora significativa no fenótipo *ts* a 36°C em comparação ao haplóide *tif51A-3 SBP1*. Este resultado reforça o dado da interação genética sintética entre *TIF51A* e *SBP1*, e uma vez que esta interação foi observada para os alelos *tif51A-1* e *tif51A-3*, a interação sintética não é alelo específica. É possível que a ausência de *SBP1* deva induzir estados fisiológicos favoráveis ao crescimento de mutantes de eIF5A, talvez devido a uma perda da regulação e consequente diminuição de repressão da tradução que pode ser induzida por Sbp1 (SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006), o que é discutido abaixo.

Para a análise genética entre *DHH1* e *TIF51A*, foi utilizada a linhagem VZL781 (*dhh1* $\Delta$ ) para cruzamento com o mutante de eIF5A. No entanto, após a realização do cruzamento, houve baixa taxa de esporulação e, após dissecção de tétrades, foi baixo o número de haplóides viáveis. Problemas na esporulação são descritos para nocautes de *DHH1* (ENYENIHI AND SAUNDERS, 2003). Então foi construído um cassete integrativo para deleção do gene *DHH1* na linhagem SVL513 (*tif51A-1 ssd1* $\Delta$ ). Após integração e confirmação do nocaute, a linhagem resultante obtida foi transformada com plasmídeos contendo os genes de cada uma das mutações, *TIF51A*, *DHH1* ou *SSD1*. Na Figura 7 é possível observar que o triplo mutante (*tif51A-1 dhh1* $\Delta$  *ssd1* $\Delta$ ) contendo *DHH1* plasmidial apresenta termossensibilidade a 36°C, enquanto que na linhagem contendo o vetor vazio foi observada uma termossensibilidade a 37°C. Portanto, houve uma

melhora no fenótipo de termossensibilidade da linhagem *tif51A-1dhh1* $\Delta$ *ssd1* $\Delta$  em relação ao mutante *tif51A-1 ssd1* $\Delta$ , indicando uma interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento entre *TIF51A* e *DHH1*.

Finalmente, a análise da interação genética entre *PAT1* e *TIF51A* foi realizada com as linhagens SVL596 (*pat1* $\Delta$ ) e SVL445 (*tif51A-3 ssd1* $\Delta$ ). Na Figura 8, podemos verificar que o duplo mutante *tif51A-3 pat1* $\Delta$  também apresenta melhora do crescimento a 35°C em relação ao haplóide *tif51A-3 PAT1* (termossensível a 35°C), indicando uma interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento entre *TIF51A* e *PAT1*.

Dessa forma nos ensaios de interações genética sintética realizados não foram observadas interações sintéticas entre mutantes de *TIF51A* e dos genes *LSM1*, *DCP1* e *SK18*, que atuam diretamente na degradação de mRNA. Curiosamente, a interação genética entre os mutantes *tif51A-1* e *xrn1* $\Delta$  revelou uma piora no crescimento (sintético doente). Por outro lado, as interações entre *tif51A-1* e *sbp1* $\Delta$ , *tif51A-3* e *sbp1* $\Delta$ , *tif51A-1* e *dhh1* $\Delta$  e *tif51A-3* e *pat1* $\Delta$  revelaram uma melhora no defeito do crescimento dos mutantes de eIF5A, sugerindo interação genética por supressão extragênica. Os resultados obtidos neste ensaios de interações genéticas estão resumidos na Tabela 4.

### 4.2 Clonagem de genes supressores de mutantes de *TIF51A* em *S. cerevisiae* através de deleções genômicas induzidas por transposon

Para complementar os estudos em *S. cerevisiae* sobre o papel biológico de eIF5A, também foi proposta a busca de supressores extragênicos através de deleções genômicas induzidas por transposon (HITCHCOCK *et al.*, 2001).

A linhagem de partida utilizada para este rastreamento foi a VZL907, a qual possui o alelo *tif51A-1* e nocaute em *TIF51B* (*tif51B::kanMX4*). Como apresentado na Introdução, o gene *TIF51B* também codifica para eIF5A e é expresso apenas em anaerobiose. Assim, a utilização do nocaute *tif51B::kanMX4* se dá para evitar o aparecimento de mutantes extragênicos que levem à ativação da transcrição de *TIF51B* em aerobiose.

Inicialmente, aproximadamente 2,2x10<sup>5</sup> transformantes foram rastreados a partir da primeira transformação da linhagem VZL907 com a biblioteca genômica de *S. cerevisiae* contendo deleções induzidas por transposon, obtendo-se 49 clones iniciais. Estes foram submetidos a teste de sensibilidade a temperatura para confirmação da reversão de fenótipo de sensibilidade a temperatura para resistência a 36°C. Dos 49 candidatos iniciais, 46 clones foram confirmados, como mostrado na Figuras 9, painéis A e B.

Na etapa seguinte, para a verificação da ligação entre o fenótipo de resistência a temperatura (tr) e a presença do transposon (fenótipo de prototrofia para leucina - Leu<sup>+</sup>) nos clones obtidos, uma linhagem contendo o alelo *tif51A-1* e "mating type" oposto à da VZL907 foi gerada a partir do cruzamento da SVL17 (*tif51A-1*) e SVL55 (selvagem). O haplóide gerado (VZL998) possui fenótipo de sensibilidade à canavanina (*CAN1*), marcas de auxotrofia para os aminoácidos leucina (*leu2*) e histidina (*his3*), sensibilidade à temperatura de 37°C (ts) devido a *tif51A-1* e a combinação dos genes *ADE2 ADE3*, que confere coloração branca, em oposição à combinação *ade2 ADE3* (presente na VZL907), que confere cor vermelha. As marcas auxotróficas permitem a realização do cruzamento desta linhagem com os clones obtidos na transformação com a biblioteca,

enquanto que a ausência de *CAN1* permite que seja empregada a estratégia do SGA, facilitando a seleção de haplóides, como explicado em materiais e métodos. Além da marca *CAN1*, a seleção do haplóide nesta etapa também utilizou as marcas *MFA1prHIS3* e *Iyp1* $\Delta$  para a metodologia SGA, presentes na linhagem de partida VZL907. O gene *LYP1* codifica para uma lisina permease e para seleção negativa de *LYP1* utiliza-se o análogo tialisina, que entra na célula via lisina permease e induz morte celular. Por outro lado, o gene *HIS3* sob controle do promotor do "mating type" a (*MFA1prHIS3*) permite que apenas haplóides deste "mating type" adquiram o fenótipo de prototrofia para histidina(His<sup>+</sup>). Todas estas marcas permitem apenas a seleção positiva de haplóides e a possibilidade de se utilizar um maior número de marcas aumenta a segurança na análise genética, evitando falsos positivos.

Assim, após cruzamento de todos os clones (background da VZL907) com a linhagem VZL998 (*tif51A-1*), os diplóides foram esporulados e submetidos à técnica do SGA para seleção de haplóides, a qual consistiu no tratamento do produto da esporulação com zimoliase e plaqueamento em meio sintético com ausência dos aminoácidos arginina e lisina e suplementado com canavanina e tialisina (SC-arg,-lys,+can,+tialisina). Após a seleção das leveduras vermelhas que cresceram nesse meio, três haplóides de cada clone foram genotipados e submetidos a teste de sensibilidade a temperatura. Dos 46 clones analisados, 15 apresentaram co-segregação entre os fenótipos Leu+ e termorresistência, assim como Leu- e termossensibilidade (Figura 10).

Para analisar a estabilidade da proteína eIF5A do mutante *tif51A-1*,os clones restantes foram submetidos ao ensaio de western blot para eIF5A. As linhagens

VZL838 (controle de eIF5A selvagem), VZL907 (controle de eIF5A instável a 37°C) e os clones obtidos neste rastreamento foram crescidos a 25°C até atingirem D.O.<sub>600</sub>=0,5 e, em seguida, transferidos para 37°C por 3 horas. As culturas foram utilizadas para preparar os extratos protéicos, os quais foram quantificados pelo método de Bradford, para aplicação de 10 µg de proteína total em gel de poliacrilamida e, subsequentemente, realizar o ensaio de western blot. A Figura 11A mostra o resultado do western blot, sendo a linha superior de bandas correspondente ao controle de carregamento das amostras, Pub1 (banda de 57 kDa), que, por ser uma proteína não relacionada, não apresenta variações em seus níveis de expressão nas linhagens e nas condições testadas; a linha inferior de bandas corresponde a elF5A (banda de 17 kDa). Como pode ser visto, a linhagem controle do alelo de TIF51A, VZL838, apresenta eIF5A estável na temperatura de 37°C, uma vez que mostra bandas de mesma intensidade nas duas condições de crescimento. A linhagem controle do alelo tif51A-1, VZL907, apresenta diferença na intensidade da banda de eIF5A a 37°C, mostrando a degradação de eIF5A na temperatura não permissiva. De maneira esperada, os clones analisados apresentam eIF5A instável na temperatura não permissiva. Além da confirmação da instabilidade da proteína eIF5A mutada presente nos clones, a mutação pontual (P83S) foi checada por seguenciamento de DNA genômico para verificar a presença do alelo *tif51A-1* nos clones candidatos. Para isso, foi extraído DNA genômico dos clones #1, #2, #3, #4, #10, #13, #16, #18, #19, #21, #25, #31 e submetido à reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores SVO49 e SVO50, que hibridizam nas regiões flanqueadoras de TIF51A. A Figura 11B apresenta o alinhamento das sequências obtidas com o gene TIF51A do banco de dados SGD (Saccharomyces

Genome Database). As primeiras sequências de cada alinhamento correspondem ao TIF51A obtido no banco de dados, enquanto que a segunda corresponde ao gene obtido do sequenciamento dos clones #2 e #25, exemplificando o resultado obtido no sequenciamento de todos os clones. O asterisco representa total pareamento entre as sequências. O sítio da mutação pontual do alelo tif51A-1 (P83S) está representado em caixa vermelha. Após confirmação do alelo tif51A-1 de todos os clones por sequenciamento, estes seguiram para a próxima etapa do rastreamento, o da confirmação da segregação Leu+/TR por análise convencional. Sendo assim, os clones foram submetidos a cruzamento com a linhagem VZL998 (tif51A-1), seguido de seleção de diplóides, esporulação e dissecção de tétrades. Os haplóides obtidos foram genotipados e submetidos a teste de sensibilidade a temperatura. A partir da caracterização das tétrades, observando as marcas tr e Leu<sup>+</sup>, podemos inferir se o transposon está ligado ao fenótipo de termorresistência, demonstrado quando dois haplóides de uma mesma tétrade mostram co-segregação das marcas tr e Leu<sup>+</sup>. Através desses dados é possível selecionar os clones que apresentam deleção genética induzida por transposon responsável pela resistência à temperatura não permissiva para o mutante tif51A-1. De todos os clones analisados, apenas o clone #25 apresentou co-segregação entre os fenótipos tr e Leu<sup>+</sup>. A Figura 12 apresenta 1 tétrade deste clone, mostrando a ligação fenotípica de resistência à temperatura não permissiva (tr) com a capacidade de crescer em meio desprovido de leucina (Leu<sup>+</sup>), mostrando, por fim, que a deleção genética provocada pela integração do transposon no genoma desse candidato confere a reversão fenotípica de crescimento em temperatura não permissiva para o mutante tif51A-1. Todos os outros clones que não apresentaram este tipo de segregação foram descartados.

Assim, o clone #25 seguiu para a próxima etapa do rastreamento, que consiste no isolamento de seu DNA genômico e identificação por sequenciamento da região do gene que flanqueia o sítio de inserção do transposon (VIDAN AND SNYDER, 2001).

Para identificação do gene deletado pelo transposon foi adotada neste trabalho a estratégia de "Vectorette PCR" (AUSUBEL *et al.*, 2000). Um resumo esquemático dessa estratégia está mostrado na Figura 13. Inicialmente, é feita a digestão do DNA genômico do clone candidato com enzimas de restrição que não cortam na região do transposon (*Alul* ou *Dral*), seguida da ligação dos oligonucleotídeos "Anchor Bubble" dupla fita (VZO558 e VZO559) nas extremidades desses fragmentos (Figura 13A painel A). A reação de PCR que se segue usa como molde o produto da ligação entre DNA genômico digerido e "Anchor Bubble", e os oligonucleotídeos iniciadores mTn (VZO560) e UV (VZO561), como apresentado nos painéis B e C da Figura 13A. A especificidade da amplificação ocorre devido à ligação do oligonucleotídeo iniciador mTn ao gene *lacZ* do transposon (sequência presente apenas no transposon) de um lado, e devido ao fato de o oligonucleotídeo iniciador UV se ligar apenas à fita complementar da região "bubble" (isto é, região não complementar dentro do "Anchor Bubble") do oligonucleotídeo "Anchor Bubble 2", a qual é formada no primeiro ciclo da PCR após extensão a partir do oligonucleotídeo iniciador mTn (Figura 13B).

Após padronização utilizando *Alu*l ou *Dra*l e diferentes condições de reação de ligação e de PCR, foi possível obter um único fragmento amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores mTn e UV. Na Figura 14A são mostradas as condições de reação da "Vectorette PCR" que geraram o fragmento único e na Figura 14B é mostrado o produto de PCR resultante utilizando como molde o DNA genômico do

clone #25 digerido com a enzima de restrição *Dra*l. As canaletas 1 e 2 da Figura 14B mostram, respectivamente, os resultados da reação controle de PCR (sem DNA genômico) e a reação a partir de DNA genômico do clone #25 digerido com a enzima *Dra*l. Este controle se faz necessário, uma vez que a banda obtida tem tamanho pequeno e poderia ser resultado de anelamento dos próprios oligonucleotídeos ("primer dimer"). Como não houve amplificação na ausência do DNA genômico extraído do clone confirmado, seguiu-se para a próxima etapa, que consiste na identificação da região gênica que flanqueia o sítio de inserção do transposon por sequenciamento. Assim, o fragmento obtido por PCR foi submetido à reação de sequenciamento e, através das sequências analisadas, foi identificado o gene *TRS85*. O mapa que apresenta a região gênica encontrada é mostrado na Figura 15.

O produto do gene *TRS85* é descrito como uma subunidade do complexo TRAPPIII. Os complexos de TRAPP são GEFs (guanine nucleotide exchange factors) que ativam a Rab GTPase Ypt1, a qual é requerida para a etapa de fusão de vesículas do retículo endoplasmático ao Golgi, e já foi descrita anteriormente em nosso laboratório a letalidade sintética entre mutantes de eIF5A e de Ypt1 (FRIGIERI *et al.*, 2008). Desse modo, o gene identificado neste trabalho fortalece os resultados obtidos em rastreamentos anteriores de nosso grupo.



**Figura 4. Os mutantes** *tif51A-1* e *xrn1* $\Delta$  são sintético doentes. Teste de sensibilidade a temperatura de diluições seriadas (1:10) das linhagens selvagem (SVL8), *tif51A-1* (SVL10), *xrn1::URA3* (SVL100) e *xrn1::URA3 tif51A-1* (SVL101) foram aplicadas em meio YPD e incubadas a 25°C, 35°C e 36°C por 3 dias.

А

			2	5°C					30	)°C					3	8°C		
TIF51A LSM1	۲				12	$\{ \boldsymbol{u}_{i}^{*} \}$	۲			۲	4	1	۲		0	3	10	÷. I
tif51A-1 LSM1	0	0				4	0		0	•	*		0	-07	18	-2		
TIF51A lsm1∆	0	0		5	=11		0	0		100				14				
tif51A-1 lsm1∆	0	Ő	0	÷	ie:		0	0	6	8			tur.					

В



Figura 5. Os mutantes duplo *tif51A-1lsm1* $\Delta$  e triplo *tif51A-1dcp1-2 ski8* $\Delta$  não apresentam interação genética sintética. Painel A: Diluições seriadas (1:10) de 4 haplóides de uma tétrade do cruzamento *lsm1* $\Delta$  x *tif51A-1* foram aplicadas em meio YPD e incubadas a 25°C, 30°C e 38°C por 3 dias. Painel B: Diluições seriadas (1:10) das linhagens *dcp1-2 tif51A-1* (VZL996), *dcp1-2 ski8* $\Delta$  (VZL801) e dos haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento *dcp1-2 tif51A-1* x *dcp1-2 ski8* $\Delta$  foram aplicados em YPD e incubadas a 25°C, 36°C e 37°C por 3 dias.



В



Figura 6. Os mutantes duplos *tif51A-1* ou *tif51A-3* e *sbp1* $\Delta$  apresentam interações genéticas sintéticas por supressão parcial do defeito de crescimento.Painel A: Diluições seriadas (1:10) das linhagens *tif51A-1 ssd1* $\Delta$  (SVL513), *sbp1* $\Delta$  (VZL784) e haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento entre SVL513 e VZL784. Painel B: Diluições seriadas (1:10) das linhagens *tif51A-3 ssd1* $\Delta$  (SVL447), *sbp1* $\Delta$  (VZL784) e haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento entre SVL513 e VZL784) e haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento entre SVL5447), *sbp1* $\Delta$  (VZL784) e haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento entre SVL447 e VZL784. Em ambos experimentos, culturas líquidas das linhagens foram aplicadas em meio YPD e incubadas a 25°C, 36°C e 37°C por 3 dias.

62



Figura 7. O mutante duplo *tif51A-1 dhh1* $\Delta$  apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento. Diluições seriadas (1:10) da linhagem duplo mutante *tif51A-1 dhh1* $\Delta$ resultante da deleção de *DHH1* na linhagem SVL513 (*DHH1 tif51A-1*) com os genes selvagens para cada mutação complementados por plasmídeos. As culturas foram aplicadas em meio SC-ura e incubadas a 25°C, 36°C e 37°C por 3 dias.



Figura 8. O mutante duplo *tif51A-3* e *pat1* $\Delta$  apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento. Diluições seriadas (1:10) de 4 haplóides de uma mesma tétrade foram aplicadas em meio YPD e incubadas 25°C, 35°C e 36°C por 3 dias. As linhagens parentais, *tif51A-3* (SVL445) e *pat1* $\Delta$ (SVL596), foram usadas como controle de crescimento nas temperaturas testadas.

Tabela 4. Resultados das interações genéticas sintéticas.

Tipo de interação	Mutantes utilizados	Funções das proteínas				
genética		envolvidas*				
Sem interação	lsm1∆ e tif51A-1	degradação de mRNA e				
		remoção do capacete				
Sem interação	dcp1-2 ski8∆ e tif51A-1	degradação de mRNA e				
		remoção do capacete				
Sintético doente	xrn1∆ e tif51A-1	degradação de mRNA				
Supressão extragênica	sbp1∆ e tif51A-1	degradação de mRNA e				
		repressão da tradução				
Supressão extragênica	sbp1∆ e tif51A-3	degradação de mRNA e				
		repressão da tradução				
Supressão extragênica	dhh1∆ e tif51A-1	degradação de mRNA e				
		repressão da tradução				
Supressão extragênica	pat1∆ e tif51A-3	degradação de mRNA e				
		repressão da tradução				

\*Exceto para eIF5A.



**Figura 9.** Verificação da reversão do fenótipo de sensibilidade a temperatura dos candidatos obtidos após transformação com a biblioteca mutagenizada com transposon. Diluições seriadas (1:10) dos clones foram aplicadas em meio SC-Leu e incubadas a 25°C e 36 °C por 3 dias As linhagens contendo o alelo selvagem de *TIF51A* (SVL82) e o alelo *tif51A-1* (VZL907) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os clones 1 a 24 estão mostrados no painel A enquanto os clones 25 a 49 são mostrados no painel B.

.

25°C								
SVL82		۲	۲	۲		٠	۲	•
VZL907		•	۲	•	ф,	3.	0.	
#25	•	•	•		ħ.	•	•	•
#26	•	•	•	•	- 31	s.	•	•
#27	•	•	•	8	3	3	•	•
#28	•	•	•	0	13	•:	•	•
#29		•	•		4	-	•	0
#30	•	•	•	9	2		•	0
#31	•	•	•	0	1	÷,	٠	0
#32		۰	۲	۹	*		۹	
#33		•	•	0	4		•	•
#34	•	•	•	۲	*	:	•	•
#36	•	•	۲	•	¢	:		•
#37	•	۰	۲	6	: ja	:	•	•
#38	•	•	•	۲	-	.:	۲	•
#39	0.	•	•	0			•	0
#40	•	۰	۲	۲	9	. 3.	0	•
#41		•	۲	۲	*	•	•	•
#42		0	۲		Ş,	•	•	•
#43		۲	۲	۲	4	.i.,	•	•
#44	0	۲	0	0	30	2,		•
#45		0	۲	۲	÷	45	۲	•
#46	0	•	۲		30	.3	•	•
#47	۲	•	•	۲	*	Å	•	•
#48		•	۲	۲	~?		•	
#49	1	•	•	0	:2	<b>t</b> *	•	۲

	•	۲	۲		•
0					
	•	0			
۲	٠		49		
•	•	•		4	
۰	•	۲	-		
	•	•		ti di	
۲	۰	۲	8		
۲	۰				
0	۰	۲	-10	1	
۲	۰	۲			
•	۰	۲	13	- 20	
۲	۰	۲	0	÷ġł	
	۲	0	3		
•	•	•	0		
0	•	•	•	8	. 8.
۲	۰	۲	- 69		
•	•	0	- 33		
0	•	3	8		
•	•	0	3		
•	•	۲		1	
0	0	0	192	- 31	
	0	•	(Br		
		0			

36°C



Figura 10. Teste de sensibilidade a temperatura dos haplóides obtidos do cruzamento dos clones da biblioteca de transposon com a linhagem contendo *tif51A-1* (VZL998). Diluições seriadas (1:10) dos clones e da linhagem VZL907 transformada com pSV59 (utilizada como controle negativo de crescimento a 36 °C). As células foram plaqueadas em YPD e SC-leu e incubadas a 25°C e 36 °C por 3 dias.

Β.



PROBI TOTCTCCATCTACTCACAACATGGAAGTTCCAGTTGTCAAGAGAAACGAATACCAATTGT

TOTETCEATETACTEACAACATGGAAGTITEADTTOTCAAGAGAAACGAATACCAATTOT

SER



TIF51A

#25

### Figura 11. Confirmação dos clones contendo deleção genômica induzida por transposon. A. Análise da expressão de eIF5A nos clones candidatos do rastreamento. 10µg de extrato proteico total das linhagens VZL838 (controle da expressão de elF5A selvagem), VZL907 (controle de eIF5A instável a 37°C) e clones #1, #2, #3, #4, #10, #13, #16, #18, #19, #21, #25, #31, crescidos a 25°C e transferidas para 37°C por 3 horas, foram aplicados em gel de poliacrilamida e submetidos a ensaio de western blot utilizando os anticorpos anti-eIF5A (banda de 17 KDa) e anti-Pub1 (banda de 57kDa). A detecção da proteína Pub1 foi usada como controle de carregamento das amostras. B. Sequenciamento do gene TIF51A nos clones candidatos do rastreamento. DNA genômico dos clones #1, #2, #3, #4, #10, #13, #16, #18, #19, #21, #25, #31 foi submetido a reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores flanqueadores de TIF51A. É apresentado o alinhamento das seguências obtidas com o gene TIF51A do banco de dados SGD (Saccharomyces Genome Database). As primeiras sequências de cada alinhamento correspondem ao TIF51A obtido no banco de dados, enquanto que a segunda corresponde ao gene obtido das linhagens utilizadas no estudo. O asterisco aparece em baixo de cada nucleotídeo pareado entre as duas seguências. O sítio da mutação pontual do alelo tif51A-1 está representado em caixa vermelha. O alinhamento das sequências dos clones #2 e #25 são exemplos dos resultados obtidos para todos os clones.



**Figura 12. Ensaio de ligação dos fenótipos tr e Leu<sup>+</sup> para o clone #25.** Diluições seriadas de 4 tétrades do clone foram plaqueadas e cultivadas por 3 dias a 25 e 37°C em meio rico (YPD) e apenas a segunda diluição foi cultivada em meio SC-leu a 25°C.



**Figura 13. Identificação da região genômica deletada pelo transposon mTn-***lacZ/LEU2* **por "Vectorette PCR".A. Pequenos fragmentos de DNA genômico mutagenizado com mTn***lacZ/LEU2***, digeridos com enzima de restrição que não cortam no transposon (***Alul* **ou** *Dral***), são ligados aos oligonucleotídeos "Anchor Bubble" dupla fita (Painel A). A amplificação desse produto de ligação é seletiva usando o oligonucleotídeo iniciador mTn (Painel B), que se liga no gene** *lacZ* **do transposon, e o oligonucleotídeo iniciador UV, que por possuir sequência idêntica ao oligonucleotídeo "Anchor Bubble" 2 na região que não hibridiza ao oligonucleotídeo "Anchor Bubble" 1 (região de formação do "bubble"), anela somente no fragmento amplificado no primeiro ciclo da reação. O Painel C mostra o fragmento amplificado, contendo a região genômica de interesse em vermelho. <b>B.** Sequência do oligonucleotídeos "Anchor Bubble" formando dupla-fita, mostrados na mesma disposição que no painel A ("Anchor Bubble 2" em cima).

Reação de Ligação	PCR
400 U de T4 DNA	92°C – 2'
ligase	92°C – 20"
+ PEG 50%	Tm – 30" > 35x
16°C – 24h	72°C – 45"
	72°C – 90"
+ PEG 50% 16°C – 24h	Tm – 30" 72°C – 45" 72°C – 90"

Β.



**Figura 14. Realização da "Vectorette PCR". A.** Tabela mostrando as condições padronizadas para a estratégia de "Vectorette PCR" para amplificação da região flanqueada pelo transposon. **B.** Confirmação do fragmento gerado por "Vectorette PCR". As canaletas 1 e 2 correspondem, respectivamente, ao produto de PCR da reação controle (sem DNA genômico), e a partir de DNA genômico digerido com *Dra*l e ligado ao "Anchor Bubble", utilizando as mesmas condições de reação PCR com os oligonucleotídeos iniciadores mTn e UV. A canaleta 3 contém o padrão de peso molecular 100 bp ("ladder 100 bp").


**Figura 15. Identificação da região do gene que flanqueia o sítio de inserção do transposon no clone #25.** É mostrada a região do gene que flanqueia o sítio de inserção do transposon. Este resultado foi obtido a partir de busca utilizando a ferramenta "BLAST nucleotide search" contra o genoma de *S. cerevisiae* a partir da sequência obtida na reação de sequenciamento do produto de PCR proveniente da técnica de "Vectorette PCR".

## CONCLUSÕES

- Não existe interação genética sintética entre mutantes de eIF5A e mutantes dos genes LSM1, DCP1 e SKI8, os quais codificam proteínas que atuam diretamente na degradação de mRNA.
- Nocaute do gene codificador da exonuclease Xrn1 intensifica o fenótipo de termossensibilidade do mutante de eIF5A (*tif51A-1*).
- Nocauteamento dos genes codificadores das proteínas Sbp1, Dhh1 e Pat1 envolvidos na repressão da tradução suprime parcialmente o fenótipo de termossensibilidade de mutantes de eIF5A, evidenciando que eIF5A tem uma função oposta a estes fatores, uma vez que é um fator de elongação da tradução.
- Resultados preliminares do rastreamento de supressores extragênicos indicam que uma possível deleção no gene *TRS85*, o qual codifica uma subunidade da GEF de Ypt1, suprime o fenótipo ts do mutante *tif51A-1* de eIF5A.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. S.; PARKER, R. P. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. **EMBO J.**, v. 17 ,n. 5, p. 1497-1506, 1998.

AOKI, H.; XU, J.; EMILI, A.; CHOSAY, J. G.; GOLSHANI, A.; GANOZA, M. C. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. **FEBS J.**, v. 275, n. 4, p. 671-681, 2008.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Willey, 2004.

BEELMAN, C. A.; PARKER, R. Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. **J. Biol. Chem.**,v. 269, n. 13, p. 9687-9692, 1994.

BENNE, R.; HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 9, p. 3078-3087, 1978.

BEVEC, D.; JAKSCHE, H.; OFT, M.; WOHL, T.; HIMMELSPACH, M.; PACHER, A.; SCHEBESTA, M.; KOETTNITZ, K.; DOBROVNIK, M.; CSONGA, R.; LOTTSPEICH, F.; HAUBER, J.Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. **Science**, v. 271, n. 5257, p. 1858-1860, 1996.

BEVEC, D.; HAUBER, J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 124-133, 1997.

BONNEROT, C.; BOECK, R.; LAPEYRE, B. The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact *in vivo*, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 16, p. 5939-5946, 2000.

CAO, D.; PARKER, R. Computational modeling of eukaryotic mRNA turnover. **RNA**, v. 7, n. 9, p. 1192-1212, 2001.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 105-109, 1997.

CHEN, Z. P.; YAN, Y. P.; DING, Q. J.; KNAPP, S.; POTENZA, J. A.; SCHUGAR, H. J.; CHEN, K. Y. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 1996.

COLLER, J.; PARKER, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 875-886, 2005.

COLLER, J. M.; TUCKER, M.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; PARKER, R. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. **RNA**, v. 7, n. 12, p. 1717-1727, 2001.

DECKER, C. J.; PARKER, R. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. **Genes Dev.**, v. 7, n. 8, p. 1632-1643, 1993.

DELOCHE, O.; DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; DOÈRE, M.; LINDER, P. A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell**, v. 13, n. 3, p. 357-366, 2004.

DENIS, C. L.; CHIANG, Y. C.; CUI, Y.; CHEN, J. Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 627-634, 2001.

DIAS, C. A.; CANO, V. S.; RANGEL, S. M.; APPONI, L. H.; FRIGIERI, M. C.; MUNIZ, J. R.; GARCIA, W.; PARK, M. H.; GARRATT, R. C.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R.Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **FEBS** Journal, v. 275, n. 8, p. 1874-1888, 2008.

DIAS, C. A. O.; GREGIO, A. P. B.; ROSSI, D.; GALVÃO, F. C.; WATANABE, T. F.; PARK, M. H.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. eIF5A functionally interacts with eEF2. **Aminoacids**, 2011. In press.

DUNCAN, R. F.; HERSHEY, J. W. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 27, p. 12903-12906, 1986.

DUNCKLEY, T.; TUCKER, M.; PARKER, R. Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 157, n. 1, p. 27-37, 2001.

ELFGANG, C.; ROSORIUS, O.; HOFER, L.; JAKSCHE, H.; HAUBER, J.; BEVEC, D. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 11; p. 6229-6234, 1999.

ENYENIHI, A. H.; SAUNDERS, W. S. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 47-54, 2003.

FRIGIERI, M. C.; JOÃO LUIZ, M. V.; APPONI, L. H.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. **Mol. Genet. Genomics**, v. 280, n. 3, p. 211-221, 2008.

FRIGIERI, M. C.; THOMPSON, G. M.; PANDOLFI, J. R.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genet. Mol. Res.**, v. 6, n. 1, p. 152-165, 2007.

GOUGH, J.; KARPLUS, K.; HUGHEY, R.; CHOTHIA, C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **J. Mol. Biol.**, v. 313, n. 4, p. 903-919, 2001.

GREGIO, A. P. B.; CANO, V. S. P.; AVACA, J. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 380, n. 4, p. 785-790, 2009.

GUSTIN, M. C.; ALBERTYN, J.; ALEXANDER, M.; DAVENPORT, K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1264-1300, 1998.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. E. Guide to yeast genetics. New York: Academic Press, 1991.

HANAUSKE-ABEL, H. M.; PARK, M. H.; HANAUSKE, A. R.; POPOWICZ, A. M.; LALANDE, M.;FOLK, J. E. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1221, n. 2, p. 115-124, 1994.

HANAWA-SUETSUGU, K.; SEKINE, S.; SAKAI, H.; HORI-TAKEMOTO, C.; TERADA, T.;UNZAI, S.; TAME, J. R.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 26, p. 9595-9600, 2004.

HENDERSON, B. R.; PERCIPALLE, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. **J. Mol. Biol.**, v. 274, n. 5, p. 693-707, 1997.

HITCHCOCK, A. L.; KREBBER, H.; FRIETZE, S.; LIN, A.; LATTERICH, M.; SILVER, P. A. The conserved Np14 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Molecular Biology of the Cell.*, v. 12, p. 3226-41, 2001.

HOQUE, M.; HANAUSKE-ABEL, H. M.; PALUMBO, P.; SAXENA, D.; D'ALLIESSI GANDOLFI, D.; PARK, M. H.; PE'ERY, T.; MATHEWS, M. B. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, p. 90, 2009.

HSU, C. L.; STEVENS, A. Yeast cells lacking 5'-->3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 8, p. 4826-4835, 1993.

JAO, D. L.;CHEN, K. Y. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. **J. Cell. Biochem.**, v. 86, n. 3, p. 590-600, 2002.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. J. **Cell. Biochem.**,v. 97, n. 3, p. 583-98, 2006.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 6, p. 3934-3940, 1994.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 20, p. 14750-14756, 1993.

KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V.; LOTTSPEICH, F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Lett.**, v. 334, n. 3, p. 360-364, 1993.

KLINKENBERG LG, MENNELLA TA, LUETKENHAUS K, ZITOMER RS. Combinatorial repression of the hypoxic genes of saccharomyces cerevisiae by dna binding proteins rox1 and mot3.**Eukaryot Cell**., Apr;4(4):649-60, 2005

LEE, S. B.; PARK, J. H.; KAEVEL, J.; SRAMKOVA, M.; WEIGERT, R.; PARK, M. H. The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 383, n. 4, p. 497-502, 2009.

LIU, J.; HENAO-MEJIA, J.; LIU, H.; ZHAO, Y.; HE, J. J. Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. J. Neuroimmune Pharmacol., v. 6, n. 2, p. 308-321, 2011.

LOWRY, C. V., AND R. S. ZITOMER. Oxygen regulation of anaero bic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 6129–6133, 1984

MAGDOLEN, V.; KLIER, H.; WOHL, T.; KLINK, F.; HIRT, H.; HAUBER, J.; LOTTSPEICH, F.The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Mol. Gen. Genet.**, v. 244, n. 6, p. 646-652, 1994.

MUHLRAD, D.; DECKER, C. J.; PARKER, R. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-->3' digestion of the transcript. **Genes Dev.**, v. 8, n. 7, p. 855-866, 1994.

MUHLRAD, D.; DECKER, C. J.; PARKER, R. Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 4, p. 2145-2156, 1995.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **J. Biochem.**, v. 139, n. 2, p. 161-169, 2006.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 115-123, 1997.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **Biofactors**, v. 4, n. 2, p. 95-104, 1993.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; LEE, Y. B.; FOLK, J. E. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 45, p. 27827-27832, 1994.

PARKER, R.; SHETH, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Mol. Cell**, v. 25, n. 5, p. 635-646, 2007.

PILKINGTON, G. R.; PARKER, R. Pat1 contains distinct functional domains that promote Pbody assembly and activation of decapping. **Mol. Cell. Biol.**, v. 28, n. 4, p. 1298-1312, 2008.

ROSORIUS, O.; REICHART, B.; KRATZER, F.; HEGER, P.; DABAUVALLE, M. C.; HAUBER, J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. Pt 14, p. 2369-2380, 1999.

RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G. M.; HAMMERSCHMID, F.; JAKSCHE, H.; WOLFF, B.; ASCHAUER, H.; FARRINGTON, G. K.; PROBST, H.; BEVEC, D.; HAUBER, J.Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 6 Pt 1, p. 1309-1320, 1993.

SAINI, P.; EYLER, D. E.; GREEN, R.; DEVER, T. E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 118-121, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASAKI, K.; ABID, M. R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 384, n. 2,p. 151-154, 1996.

SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H. G.; SMIT-MCBRIDE, Z.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11, n. 6, p. 3105-3114, 1991.

SCHRADER, R.; YOUNG, C.; KOZIAN, D.; HOFFMANN, R.; LOTTSPEICH, F. Temperaturesensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 46, p. 35336-35346, 2006.

SCHWARTZ, D. C.; PARKER, R. Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 8, p. 5247-5256, 1999.

SCHWELBERGER, H. G.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. 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.**, v. 268, n. 19, p. 14018-14025, 1993.

SEGAL, S. P.; DUNCKLEY, T.; PARKER, R. Sbp1p affects translational repression and decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, n. 13, p. 5120-5130, 2006.

SHETH, U.; PARKER, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 805-808, 2003.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; WAXMAN, L. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the subcellular distribution of the eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, and the HIV-1 Rev protein. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 143-149, 1997.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; ZIMOLO, Z. A.; STERN, A. M.; WAXMAN, L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. **Exp. Cell Res.**, v. 225, n. 2, p. 348-356, 1996a.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; AHERN, J.; DAVIS, L. J.; STERN, A. M.; WAXMAN, L. Effects of N1guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1310, n. 1, p. 119-126, 1996b.

SIKORSKI, R. S.; HIETER, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 122, n. 1, p. 19-27, 1989.

TEIXEIRA, D.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; BRENGUES, M.; PARKER, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 371-382, 2005.

THARUN, S.;PARKER, R. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. **Mol. Cell**, v. 8, n. 5, p. 1075-1083, 2001.

THARUN, S.; HE, W.; MAYES, A. E.; LENNERTZ, P.; BEGGS, J. D.; PARKER, R. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. **Nature**, v. 404, n. 6777, p. 515-518, 2000.

TONG AH, EVANGELISTA M, PARSONS AB, XU H, BADER GD, PAGÉ N, ROBINSON M, RAGHIBIZADEH S, HOGUE CW, BUSSEY H, ANDREWS B, TYERS M, BOONE C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. **Science**. Dec 14;294(5550):2364-8., 2001

TONG, Y.; PARK, I.; HONG, B. S.; NEDYALKOVA, L.; TEMPEL, W.; PARK, H. W. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. **Proteins**, v. 75, n. 4, p. 1040-1045, 2009.

TUCKER, M.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; STAPLES, R. R.; CHEN, J.; DENIS, C. L.; PARKER, R. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major

cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell**, v. 104, n. 3, p. 377-386, 2001.

VALENTINI, S. R.; CASOLARI, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; SILVER, P. A.; MCBRIDE, A. E. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, n. 2, p. 393-405, 2002.

VIDAN, S.; SNYDER, M. Large-scale mutagenesis: yeast genetics en the genome era. Current Opinion in Biotechnology, v. 12, p. 28-34, 2001

WOHL, T.; BAUR, M.; FRIEDL, A. A.; LOTTSPEICH, F. Chromosomal localization of the HYP2-gene in *Saccharomyces cerevisiae* and use of pulsed-field gel electrophoresis for detection of irregular recombination events in gene disruption experiments. **Electrophoresis**, v. 13, n. 9-10, p. 651-653, 1992.

WOHL, T.; KLIER, H.; AMMER, H.; LOTTSPEICH, F.; MAGDOLEN, V. 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.**, v. 241, n. 3-4, p. 305-311, 1993.

XU, A.;CHEN, K. Y. 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.**, v. 276, n. 4, p. 2555-2561, 2001.

XU, A.; JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. **Biochem. J.**, v. 384, n. Pt 3, p. 585-590, 2004.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. **Genetics**, v. 171, n. 4, p. 1571-1581, 2005.

ZANELLI, C. F.; MARAGNO, A. L.; GREGIO, A. P.; KOMILI, S.; PANDOLFI, J. R.; MESTRINER, C. A.; LUSTRI, W. R.; VALENTINI, S. R. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 348, n. 4, p. 1358-1366, 2006.

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **EMBO J.**, v. 17, n. 10, p. 2914-2925, 1998.