

MARIANA CARINA FRIGIERI

Análise da interação funcional entre as proteínas eIF5A e Ypt1 em *S. cerevisiae*

Tese apresentada ao Instituto de Química – UNESP, Araraquara, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara – SP

2007

Trabalho realizado no laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, com apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

"Sei que meu trabalho é uma gota no oceano. Mas sem ele, o oceano seria menor..."

(Madre Teresa de Calcutá)

A DEUS, meu grande companheiro.

Ao meu marido Marcos, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu filho Lucas, pela alegria e pela força que trouxe ao meu viver.

Aos meus pais, Mario e Madalena, pelos ensinamentos, eterno carinho e amor, e pelo grande incentivo aos meus sonhos.

Aos meus irmãos Mário Júnior e Mateus, pelo amor e pela amizade sempre constante.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini,

pelas oportunidades, pela confiança e pela imensa contribuição para o meu crescimento científico.

A todos os amigos do laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos,

que este trabalho represente mais um passo na busca da sabedoria e da amizade, pois, é o resultado do esforço e cooperação de todos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp, em especial ao Departamento de Ciências Biológicas, onde foi realizada toda parte experimental deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Cleslei, peça fundamental para a realização desse trabalho;

Aos amigos José Rodrigo e Wilton Rogério pelo apoio, disposição e incentivo sempre constantes;

À amiga Ivone, que embora longe, sempre incentivou o meu trabalho;

À Silvia, Joselma e Daniele pelo carinho e pela amizade;

Aos estagiários e demais profissionais do Laboratório de Microbiologia pelo apoio técnico;

A todos os amigos que passaram por minha vida e que deixaram muitas saudades, pela amizade e pela ajuda sempre presente;

Aos estagiários Renata, Érika, Vanessa, Raul, Kátia, Aline e Marcus Vinícius pela dedicação, confiança e apoio pessoal;

Às secretárias da seção de pós-graduação do Instituto de Química–Unesp pela paciência, atenção e ajuda;

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O provável fator de início de tradução 5A (eIF5A) é uma proteína abundante e altamente conservada em todos os organismos eucarióticos e também está presente em arqueobactérias. eIF5A é essencial para a viabilidade celular e esse fator é a única proteína descrita que contém o resíduo de aminoácido hipusina. Em *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A é codificada pelo gene *TIF51A* em condições aeróbicas. Esse fator tem sido envolvido com início de tradução, proliferação celular, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de RNA mensageiro e polarização de actina, mas a função biológica de eIF5A ainda não foi elucidada. Entretanto, estudos recentes têm fortalecido o papel de eIF5A na tradução. Com o objetivo de identificar parceiros celulares de eIF5A, foi realizado um rastreamento de letalidade sintética, utilizando o mutante temperatura-sensível *tif51A-3* e mutagênese química. O gene essencial *YPT1*, cujo produto está envolvido na via secretória, participando do transporte vesicular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, foi revelado como letal sintético de *TIF51A*. Uma vez revelada a interação genética entre esses genes, a relação funcional entre eIF5A e Ypt1 foi investigada. Inicialmente, foi confirmada a ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de *YPT1*, denominado neste estudo de *ypt1-G80D*. Verificou-se que o alelo mutado *ypt1-G80D*, o qual codifica Ypt1 estável na condição restritiva, confere fenótipos condicionais (ts e cs) e defeito na via secretória, avaliado pela distribuição subcelular das diferentes formas da glicoproteína CPY. A seguir, foram investigadas as possibilidades funcionais resultantes da situação de letalidade sintética entre os dois genes. A ausência de similaridade estrutural entre eIF5A e Ypt1 pressupõe que essas proteínas não executam função redundante na célula. Ainda, não foi mostrado interação física através de experimentos de copurificação entre essas proteínas. Adicionalmente, eIF5A não revelou relação direta com a via secretória. Por outro lado, alguns dos mutantes de *YPT1* apresentaram sensibilidade a um inibidor de síntese protéica (paromomicina). Interessantemente, foi verificado que eIF5A está presente tanto na fração citoplasmática quanto associado a membranas, e sua ligação a membranas é dependente da atividade de ribossomos na tradução. Esses resultados estão em concordância com os dados recentes do laboratório, os quais fortalecem novamente a participação de eIF5A no mecanismo da tradução. Finalmente, novas interações genéticas foram reveladas entre *TIF51A* e *YPT1*. Esses dados fortalecem a ligação funcional entre fatores envolvidos com via secretória e tradução, e nós sugerimos que a letalidade sintética entre esses dois genes pode estar revelando uma conexão entre a tradução e a distribuição polarizada dos componentes de membrana, essencial para o processo de brotamento e progressão no ciclo celular em leveduras.

ABSTRACT

The putative translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly abundant and conserved protein in all eukaryotes and archaeobacteria. This factor is essential for cell viability and is the only cellular protein known to contain the unusual amino acid residue hypusine. In *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A is expressed in aerobic conditions by the gene *TIF51A*. eIF5A has been implicated in translation initiation, cell proliferation, nucleocytoplasmic transport, mRNA decay and actin polarization, but its biological function is not clear yet. However, recent studies have reemphasized a role for eIF5A in translation. In order to identify cellular partners of eIF5A, a screen for synthetic lethal gene was performed using the temperature-sensitive mutant *tif51A-3* and chemical mutagenesis. The essential gene *YPT1* was revealed as synthetic lethal with *TIF51A*. The protein encoded by *YPT1* is involved with secretion, participating in the vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi. Once described the genetic interaction between these genes, the functional interaction between eIF5A and Ypt1 was investigated. Initially, it was confirmed the linkage between the synthetic lethality and the *YPT1* mutated allele, named in this study *ypt1-G80D*. It was verified that the mutated allele *ypt1-G80D*, which encodes stable Ypt1 at the restrictive temperature, confers conditional phenotypes (ts and cs) and defect in the secretory pathway as judged by the subcellular distribution of the different forms of the glycoprotein CPY. Then, it was investigated the functional possibilities resulting from a synthetic lethality between these genes. The absence of structural similarity between eIF5A and Ypt1 presumes that these proteins do not have redundant function in the cell. Moreover, it was not shown physical interaction between these proteins by GST-pulldown experiments. Additionally, eIF5A did not show direct relationship with the secretory pathway. On the other hand, some of the *YPT1* mutants were sensitive to a protein synthesis inhibitor (paromomycin). Interestingly, it was verified that eIF5A is present in both cytoplasmic and membrane fractions, and its binding to membranes is dependent on translational activity of ribosomes. These results are in agreement with the recent data from our laboratory, in which the participation of eIF5A in the translation mechanism was reconsidered. Finally, new genetic interactions were revealed between *TIF51A* and *YPT1*. These results strengthen the functional link between factors involved in translation and vesicular trafficking, and we suggest that the synthetic lethality between *TIF51A* and *YPT1* may be revealing a connection between translation and the polarized distribution of membrane components essential for budding and cell cycle progression in yeast.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema simplificado da ação das proteínas Ypt/Rabs.....	30
FIGURA 2.	Mecanismo de ação e regulação das Ypt/Rab GTPases.....	32
FIGURA 3.	Esquema da ação de GDI.....	33
FIGURA 4.	Esquema da estratégia utilizada para a integração do gene <i>LEU2</i> ao lado de <i>YPT1</i>	57
FIGURA 5.	Confirmação da integração <i>YPT1::LEU2</i> através do ensaio de Southern blot.....	58
FIGURA 6.	Esquema do ensaio utilizado para obter uma levedura contendo apenas o alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>) sinteticamente letal com <i>tif51A-3</i>	59
FIGURA 7.	Análise de tétrades e identificação de uma levedura contendo apenas o alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>).....	60
FIGURA 8.	Esquema do ensaio utilizado para a confirmação da ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>).....	62
FIGURA 9.	Confirmação da ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>).....	63
FIGURA 10.	Mutação revelada no alelo do gene <i>YPT1</i> (<i>ypt1-G80D</i>) sinteticamente letal com <i>tif51A-3</i>	67
FIGURA 11.	Verificação de fenótipos condicionais e confirmação da recessividade do alelo <i>ypt1-G80D</i>	68
FIGURA 12.	Produção e purificação da proteína de fusão GST-Ypt1.....	69
FIGURA 13.	Produção e purificação da proteína Ypt1.....	70
FIGURA 14.	Avaliação do anticorpo policlonal anti-Ypt1 produzido em coelho.....	71
FIGURA 15.	Avaliação da estabilidade de Ypt1 no mutante <i>ypt1-G80D</i>	72
FIGURA 16.	Checação da funcionalidade da construção contendo o gene <i>YPT1</i> em fusão com GST.....	75
FIGURA 17.	Teste de expressão do gene da proteína de fusão GST-Ypt1 em leveduras.....	76
FIGURA 18.	Análise da interação física entre eIF5A e a proteína de fusão GST-Ypt1 por copurificação.....	77
FIGURA 19.	Análise da interação física entre Ypt1 e a proteína de fusão GST-eIF5A por copurificação.....	78
FIGURA 20.	Esquema da compartimentalização e processamento de CPY <i>in vivo</i>	81

FIGURA 21.	Análise do processamento de CPY produzida constitutivamente pelos mutantes <i>ypt1-G80D</i> , <i>tif51A-1</i> e <i>tif51A-2</i>	82
FIGURA 22.	Localização subcelular de eIF5A e Ypt1 e alteração da associação de eIF5A com membranas na presença de EDTA ou RNase A.....	84
FIGURA 23.	Análise da sensibilidade dos mutantes de <i>YPT1</i> à paromomicina, um inibidor de síntese protéica.....	85
FIGURA 24.	Avaliação da supressão do alelo nocauteado de <i>TIF51A</i> (<i>tif51A::HIS3</i>) por <i>YPT1</i> em alto número de cópias.....	93
FIGURA 25.	Confirmação por PCR do nocauteamento do gene <i>YPT1</i> , utilizando primers flanqueadores de <i>YPT1</i>	94
FIGURA 26.	Confirmação por PCR do nocauteamento do gene <i>YPT1</i> , utilizando primer interno de <i>HIS3</i>	95
FIGURA 27.	Obtenção de uma levedura contendo o gene <i>YPT1</i> nocauteado (<i>ypt1::HIS3</i>).....	96
FIGURA 28.	Confirmação por PCR do nocauteamento do gene <i>YPT1</i> após esporulação do diplóide, utilizando primer interno de <i>HIS3</i>	97
FIGURA 29	Avaliação da supressão do alelo nocauteado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1::HIS3</i>) por <i>TIF51A</i> em alto número de cópias.....	98
FIGURA 30.	Avaliação da letalidade sintética entre os mutantes de <i>YPT1</i> e de <i>TIF51A</i>	100
FIGURA 31.	Avaliação da supressão do fenótipo temperatura-sensível dos mutantes de <i>YPT1</i> por <i>TIF51A</i> expresso em alto número de cópias.....	102
FIGURA 32.	Avaliação da supressão do fenótipo temperatura-sensível dos mutantes de <i>TIF51A</i> por <i>YPT1</i> expresso em alto número de cópias.....	103
FIGURA 33.	Modelo esquemático da situação de letalidade sintética entre eIF5A e Ypt1.....	112
FIGURA 34.	Modelo esquemático da situação de aumento do número de cópias do gene <i>TIF51A</i> no mutante <i>ypt1-G80D</i>	113
FIGURA 35.	Modelo esquemático da situação de aumento do número de cópias do gene <i>YPT1</i> no mutante <i>tif51A-3</i>	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Localização e função das proteínas Ypts e Rabs identificadas em leveduras e mamíferos, respectivamente.....	31
TABELA 2.	Leveduras utilizadas nos experimentos.....	49
TABELA 3.	Plasmídeos utilizados nos experimentos.....	51
TABELA 4.	Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos.....	52
TABELA 5.	Características fenotípicas e interações genéticas dos mutantes de <i>YPT1</i> utilizados neste estudo.....	99
TABELA 6.	Características fenotípicas e interações genéticas dos mutantes de <i>TIF51A</i> utilizados neste estudo.....	101

ABREVIações UTILIZADAS

°C: graus Celcius
µg: micrograma
µL: microlitro
bp: “base pair”
CPY: carboxipeptidase Y
cs: sensibilidade à baixas temperaturas
DNA: ácido desoxirribonucleico
D.O.: densidade optica
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
EMS: etilmetanossulfonato
5-FOA: ácido 5-fluor-orótico
FT: flowthrough
g: gravidade
GAP: “GTPase activating protein”
GDF: “GDI displacent factor”
GDI: “GDP dissociation inhibitor”
GEF: “guanine nucleotide exchange factor”
GFP: “green fluorescent protein”
GGTrII: geranilgeranil transferase tipo II
GST: glutathione S- transferase
HIV-1: vírus da imunodeficiência humana
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Kb: kilobase
kDa: kilodalton
LB: meio Luria-Bertani
mCPY: forma totalmente processada de CPY
mL: mililitro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
ND: não determinado
ng: nanograma
NSF: “N-ethylmaleimide-sensitive factor”

P1: forma imatura de CPY encontrada no RE
P2: forma imatura de CPY encontrada no Golgi
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PBST: PBS + Tween 20
PCI: Fenol : clorofórmio : álcool isoamílico
PCR: reação de polimerase em cadeia
PEG: polietilenoglicol
pH: potencial de hidrogênio
PMSF: “phenylmethylsulfonyl fluoride”
ProCPY: CPY contendo o propeptídeo
RE: retículo endoplasmático
REP: “Rab Escort Protein”
RNA: ácido ribonucléico
RNase A: ribonuclease pancreática A
RRF: “Rab recycling factor”
SC: meio sintético completo
SDS: dodecil Sulfato de Sódio
SNAP: “soluble NSF attachment protein”
SNARE: “soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor acceptor receptor”
SSC: solução salina/citrato de sódio
TAE: tris-acetato-EDTA
TE: tris/EDTA
Tris: “tris (hydroxymethyl)aminomethane”
Triton X-100: polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
ts: sensibilidade à altas temperaturas
t-SNARE: SNARE presente na membrana alvo
Tween 20: monolaurato de polioxietilenosorbitana
V: volt
v-SNARE: SNARE presente na vesícula
wt: “wild-type”
YPD: “yeast extract-peptone-dextrose”

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	24
2 – OBJETIVOS.....	34
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 – MATERIAL.....	36
3.2 –MÉTODOS.....	36
3.2.1 – <i>Subclonagem de DNA.....</i>	37
3.2.1.1 – Digestão de plasmídeos.....	37
3.2.1.2 – Desfosforilação do vetor.....	37
3.2.1.3 – Purificação de inserto e vetor.....	37
3.2.1.4 – Reação de ligação.....	38
3.2.2 – <i>Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR).....</i>	38
3.2.3 – <i>Transformação bacteriana.....</i>	38
3.2.3.1 – Preparação de <i>E. coli</i> competente.....	38
3.2.3.2 – Transformação.....	39
3.2.4 – <i>Preparação de plasmídeos a partir de E. coli.....</i>	39
3.2.4.1 – Em pequena escala - Miniprep.....	39
3.2.4.2 – Em média escala - Midiprep.....	39
3.2.5 – <i>Transformação de leveduras.....</i>	40
3.2.6 – <i>Extração de DNA genômico de leveduras.....</i>	40
3.2.7 – <i>Sequenciamento de DNA.....</i>	41
3.2.8 – <i>Southern blot.....</i>	41
3.2.9 – <i>Western blot.....</i>	42
3.2.10 – <i>Cruzamento e esporulação de leveduras.....</i>	42
3.2.10.1 - Cruzamento.....	42
3.2.10.2 - Esporulação.....	42
3.2.11 – <i>Dissecção e caracterização de tétrades.....</i>	43
3.2.12 – <i>Ensaio de expressão do gene de proteína de fusão com GST em bactéria.....</i>	43
3.2.13 – <i>Produção e purificação de proteína em fusão com GST.....</i>	43
3.2.14 – <i>Produção de anticorpo policlonal anti-Ypt1 em coelhos.....</i>	44
3.2.15 – <i>Ensaio da expressão do gene de proteína de fusão com GST em levedura.....</i>	45

3.2.16 – Ensaio de interação física por copurificação.....	45
3.2.17 – Ensaio de monitoração do processamento da proteína carboxipeptidase Y (CPY)....	46
3.2.18 – Fracionamento subcelular.....	46
3.2.19 – Extração de ribossomos das membranas do retículo endoplasmático.....	47
3.2.20 – Teste de sensibilidade a inibidores de síntese protéica.....	47
3.2.21 – Nocauteamento do gene <i>YPT1</i> em <i>S. cerevisiae</i>	47
3.2.22 – Teste de supressão do fenótipo temperatura-sensível.....	48
4 – RESULTADOS.....	53
4.1 – Obtenção de uma levedura contendo apenas o alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>) sinteticamente letal com <i>tif51A-3</i>	54
4.2 – Confirmação da ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>)..	61
4.3 – Caracterização do novo alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>).....	64
4.3.1 – Identificação da mutação presente no novo alelo mutado de <i>YPT1</i> (<i>ypt1</i>).....	64
4.3.2 – Verificação da presença de fenótipos condicionais no novo mutante de <i>YPT1</i> (<i>ypt1-G80D</i>).....	64
4.3.3 – Confirmação da recessividade do alelo mutante <i>ypt1-G80D</i>	65
4.3.4 – Verificação da estabilidade de <i>Ypt1</i>	65
4.3.4.1 – Produção e purificação da proteína <i>Ypt1</i> recombinante.....	65
4.3.4.2 – Obtenção do anticorpo policlonal anti- <i>Ypt1</i> em coelhos	66
4.3.4.3 – Análise da estabilidade de <i>Ypt1</i>	66
4.4 – Verificação da existência de interação física entre <i>Ypt1</i> e <i>eIF5A</i>	73
4.4.1 – Copurificação utilizando <i>GST-Ypt1</i>	73
4.4.2 – Copurificação utilizando <i>GST-eIF5A</i> e <i>GST-eIF5A_{K51R}</i>	74
4.5 – Análise do funcionamento da via secretória nos mutantes condicionais de <i>Ypt1</i> e <i>eIF5A</i>	79
4.6 – Avaliação da localização subcelular de <i>eIF5A</i> e <i>Ypt1</i>	83
4.7 – Avaliação da localização subcelular de <i>eIF5A</i> na presença de EDTA ou RNase A....	83
4.8 – Análise da sensibilidade dos mutantes de <i>YPT1</i> a inibidores de síntese protéica.....	86
4.9 - Verificação da existência de novas interações genéticas entre <i>YPT1</i> e <i>TIF51A</i>	88
4.9.1 – Avaliação da supressão da inviabilidade dos genes envolvidos na letalidade sintética.....	88
4.9.1.1 – Supressão da inviabilidade de <i>TIF51A</i>	88

4.9.1.2 – Supressão da inviabilidade de <i>YPT1</i>	88
4.9.2 – Avaliação da letalidade sintética entre <i>tif51A-3</i> e outros mutantes de <i>YPT1</i>	90
4.9.3 – Avaliação da letalidade sintética entre <i>ypt1-G80D</i> e outros mutantes de <i>TIF51A</i>	90
4.9.4 – Avaliação da supressão dos mutantes condicionais de <i>YPT1</i> por <i>TIF51A</i> em alto número de cópias.....	91
4.9.5 – Avaliação da supressão dos mutantes condicionais de <i>TIF51A</i> por <i>YPT1</i> em alto número de cópias.....	91
5 – DISCUSSÃO.....	104
6 – CONCLUSÕES.....	115
7 – REFERÊNCIAS.....	117

1- INTRODUÇÃO

O provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) foi isolado de ribossomos extraídos de lisados de reticulócitos de coelho (BENNE e HERSHEY, 1978). eIF5A foi classificada como um fator de início de tradução devido ao seu efeito estimulatório na síntese *in vitro* de metionil-puromicina, atividade utilizada para avaliar fatores envolvidos na formação da primeira ligação peptídica (BENNE e HERSHEY, 1978). eIF5A é uma proteína pequena (16 a 18 kDa), abundante, altamente conservada entre as espécies (CHEN e LIU, 1997; KANG et al., 1993; PARK et al., 1997) e está presente em todas as células eucarióticas (PARK et al., 1993a; PARK et al., 1997) e arquea (KLIER et al., 1993; PARK et al., 1997), mas não em bactérias. Em *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A é codificada pelo gene essencial *TIF51A* (*HYP2*) em condições aeróbicas. eIF5A sofre uma modificação pós-traducional incomum, hipusinação, a qual foi demonstrada como sendo essencial para a viabilidade celular (PARK et al., 1993b; PARK et al., 1997; SHI et al., 1996).

A hipusinação de eIF5A ocorre em duas etapas. Inicialmente, a enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em levedura) transfere a parte aminobutil da poliamina espermidina para o aminogruppo de um resíduo específico de lisina (resíduo 51 na proteína de levedura) para formar desoxi-hipusina. A seguir, uma outra enzima, chamada desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura), termina a formação do aminoácido hipusina e a maturação de eIF5A (CHEN e LIU, 1997; KANG et al., 1993; KLIER et al., 1993; PARK et al., 1993a). O termo hipusina foi originado a partir da relação com dois compostos: hidroxiputrescina e lisina (PARK et al., 1993a). O resíduo de lisina é modificado logo após a proteína eIF5A ser sintetizada, e o aminoácido hipusina não é alterado ou removido até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade de tal reação (PARK et al., 1993b).

eIF5A tem sido associada com vários processos celulares, mas a função biológica mais precisa desse fator e seu modo de ação não foram totalmente elucidados até o momento. Os primeiros estudos sugeriram o envolvimento de eIF5A na síntese de proteínas. No entanto, este envolvimento foi comprometido com o estudo do efeito promovido na tradução pela depleção de eIF5A em *S. cerevisiae*. A análise da taxa de síntese protéica, durante a rápida depleção de eIF5A, revelou uma diminuição de apenas 30% na síntese protéica total (KANG e HERSHEY, 1994). Esses dados comprometem a definição de eIF5A como um fator geral de início de tradução em eucariotos. Entretanto, foi proposto que este fator poderia estar envolvido na

tradução de mRNA específicos, provavelmente, mRNAs que codificam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (KANG e HERSHEY, 1994; PARK et al., 1997).

Esse envolvimento de eIF5A na proliferação celular foi sugerido pela observação de que a inibição de qualquer etapa da hipusinação resulta no bloqueio da proliferação celular em cultura de células de mamíferos (CARAGLIA et al., 2001). Em *S. cerevisiae*, foi verificado que a depleção de eIF5A provoca um aumento de células paradas na fase G1 do ciclo celular (KANG e HERSHEY, 1994) e mutantes condicionais de *TIF51A* apresentaram defeito na polimerização de actina, a qual é essencial para a transição G1/S nesse organismo (ZANELLI e VALENTINI, 2005). Ainda, o envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular em leveduras foi confirmado utilizando o mutante temperatura-sensível tsL102A (CHARTTERJEE et al., 2006).

eIF5A também foi envolvida com o trânsito de macromoléculas através do poro nuclear. Diversos estudos mostraram que eIF5A seria um cofator celular da proteína Rev de HIV-1, proteína envolvida na exportação dos mensageiros tardios deste vírus (RUHL et al., 1993; BEVEC e HAUBER, 1997; ELFGANG et al., 1999; ROSORIOUS et al., 1999). Esse envolvimento tem sido muito questionado, pois, outros estudos não evidenciaram a relação de eIF5A com transporte nucleocitoplasmático (SHI et al., 1997; HENDERSON e PERCIPALE, 1997; VALENTINI et al., 2002; JAO e CHEN, 2002).

Ainda, foi mostrado que eIF5A pode estar envolvida no decaimento de RNA mensageiros. Essa evidência surgiu em um rastreamento de leveduras temperatura-sensíveis que apresentavam o fenótipo de estabilização de mRNAs na temperatura não permissiva (ZUK e JACOBSON, 1998). Os mutantes gerados no nosso laboratório *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* também acumulam mRNA na temperatura não permissiva. Entretanto, os nossos resultados sugerem que esse possível papel de eIF5A seja secundário, pois o fenótipo de inibição do crescimento não se correlaciona diretamente com o defeito na degradação de RNA mensageiros (VALENTINI et al., 2002).

Recentemente, foi demonstrado que eIF5A associa-se com a maquinaria de tradução e afeta a síntese protéica em leveduras (ZANELLI et al., 2006). Esse trabalho reconsidera o papel de eIF5A na tradução e sugere que a função desse fator esteja relacionada à etapa de elongação ao invés do início da tradução. A relação de eIF5A com a tradução foi fortalecida por outros resultados semelhantes de interação de eIF5A com ribossomos 80S (JAO e CHEN, 2006).

Com o objetivo de contribuir para a determinação da função desse importante fator, foi realizado um rastreamento de letalidade sintética, buscando encontrar fatores celulares de função conhecida que interagem geneticamente com eIF5A. O estudo foi realizado utilizando o mutante

temperatura-sensível *tif51A-3* e revelou o gene *YPT1* como sendo sinteticamente letal com *TIF51A* (FRIGIERI, 2002).

O gene *YPT1* (“yeast protein transport 1”) de *S. cerevisiae*, inicialmente chamado de *YP2* (“yeast protein 2”), foi identificado em 1983 (GALLWITZ et al., 1983). Este gene está presente no cromossomo VI e codifica uma proteína formada por 206 aminoácidos, a qual exibe similaridade com as proteínas Ras de mamíferos (SEGEV e BOTSTEIN, 1987). Devido a esse fato, as proteínas codificadas pelos genes *YPT* são também conhecidas como “Ras-like GTPases”. Os genes *YPT* possuem homólogos em mamíferos chamados de *rab* (“ras-like in rat brain”), os quais codificam proteínas envolvidas no transporte vesicular e relacionadas com a dinâmica de organelas (MARTINEZ e GOUD, 1998).

Nas vias exocítica e endocítica de células eucarióticas, proteínas e membranas são transportadas através de uma série de compartimentos. Esse transporte sucessivo entre os diferentes compartimentos é mediado por vesículas que emergem do compartimento doador e se fundem ao compartimento alvo (SEGEV, 2001). A vesícula deve reconhecer especificamente a membrana alvo, através de interações entre pares únicos de proteínas envolvidas com transporte vesicular. As proteínas codificadas pelos genes *YPT/Rabs* estariam envolvidas na etapa de reconhecimento específico da membrana alvo (Figura 1).

Mais de 60 proteínas Rabs foram identificadas em mamíferos (LAFOURCADE et al, 2004). Em leveduras, apenas 11 proteínas Ypts foram identificadas, sendo elas: Ypt1, Sec4, Ypt6, Ypt7, Ypt10, Ypt11, Ypt31, Ypt32, Ypt51 Ypt52 e Ypt53 (MARTINEZ e GOUD, 1998; SEGEV, 2001). Na Tabela 1 é possível conferir a localização destas proteínas na via secretória. A proteína Ypt1 foi envolvida no transporte de vesículas que emergem do retículo endoplasmático e fundem com o complexo de Golgi (CLAGUE, 1998). Somente duas das proteínas Ypts (Ypt1 e Sec4) são essenciais para o crescimento celular em leveduras (ALORY e BALCH, 2001).

Ypt/Rab GTPases são modificadas pós-traducionalmente pela adição de grupos geranyl-geranyl (20 carbonos) em duas cisteínas presentes na região carboxi-terminal. Essa modificação possibilita uma forte associação das Ypt/Rab GTPases com a membrana. Assim como outras GTPases, as proteínas Ypt/Rab circulam entre um estado ativo, quando ligadas a GTP, e um estado inativo, quando ligadas a GDP. A ligação das proteínas Ypt/Rab com GTP/GDP é controlada por outras proteínas: as GAPs (“GTPase activating proteins”), que aceleram a hidrólise de GTP, as GEFs (“guanine nucleotide exchange factors”), que catalisam a troca de GDP por GTP, e as GDIs (“GDP dissociation inhibitor”), as quais inibem a dissociação de GDP (SEACHRIST e FERGUSON, 2003).

Um esquema do mecanismo de ação e regulação das proteínas Ypt/Rabs pode ser verificado na Figura 2. Na etapa 1, a proteína Ypt/Rab nascente forma um complexo estável com a proteína REP (“Rab Escort Protein”). Esse complexo é reconhecido por uma enzima prenil transferase heterodimérica, a geranilgeranil transferase tipo II (GGTrII), a qual cataliza a ligação de grupos geranil. Quando são adicionados esses grupos na segunda cisteína, a enzima perde a afinidade e se desliga do complexo. REP, então, direciona a proteína Rab para a membrana (PEREIRA-LEAL et al., 2001). Numa segunda etapa, uma GEF catalisa a troca de GDP por GTP tornando Ypt/Rab ativa (JONES et al., 1998; MARTINEZ e GOUD, 1998). Na membrana alvo, ocorre a terceira etapa, Ypt/Rab interage com seus efetores ativando direta ou indiretamente t-SNARE, recrutando fatores de “docking” e ativando receptores para ligação com fatores de “tethering” (SAPPERSTEIN et al., 1996; FERRO-NOVICK e KAISER, 1998). Durante ou após a ação das proteínas Ypt/Rabs, uma GAP estimula a hidrólise do GTP, completando a quarta etapa. A seguir, uma GDI reconhece essa forma inativa e se liga a ela (etapa 5). O recrutamento de GDI provavelmente ocorre por ação do fator RRF (“Rab recycling factor”) (ALORY e BALCH, 2001). Esse complexo fica estável no citosol até que é reconhecido por um GDF (“GDI displacant factor”) que desfaz o complexo. Dessa forma, Ypt/Rab GDP expõe seus grupos geranil e se associa novamente com a membrana doadora para iniciar um novo ciclo (RAK et al., 2003) (etapa 6). Durante o reconhecimento de Ypt/Rab GDP por GDI, ocorre a formação de uma cavidade hidrofóbica que abriga a porção isoprenóide e a consequente solubilização da Ypt/Rab GTPase (Figura 3).

Vários alelos mutados de *YPT1* foram obtidos e caracterizados, entre eles, *ypt1-1*, *ypt1-2*, *ypt1-3* e *ypt1-A136D* (SEGEV e BOTSTEIN, 1987; BACON et al., 1989; JEDD et al., 1995; FINGER e NOVICK, 2000; DU e NOVICK, 2001). O estudo desses mutantes mostrou que alterações no gene *YPT1* inibem o crescimento celular (vegetativo e a viabilidade dos esporos), a secreção de proteínas e causam acúmulo intracelular de vesículas (SEGEV e BOTSTEIN, 1987; JEDD et al., 1995).

O encontro da letalidade sintética entre *tif51A-3* e *ypt1* é interessante, pois passa a envolver direta ou indiretamente a proteína eIF5A com via secretória. A situação de letalidade sintética pode revelar que as proteínas codificadas por esses genes possuem funções redundantes ou interagem fisicamente, ou ainda, fazem parte de um mesmo processo metabólico. Desta forma, eIF5A poderia estar envolvida com a via secretória, e por essa razão, a ocorrência de uma mutação em um outro gene relacionado com esta via, *YPT1*, geraria a letalidade sintética observada. Dessa forma, o presente estudo envolveu a análise funcional entre esses dois fatores,

procurando verificar a relação funcional entre eIF5A, fator envolvido no processo de tradução, e Ypt1, fator associado com a via secretória.

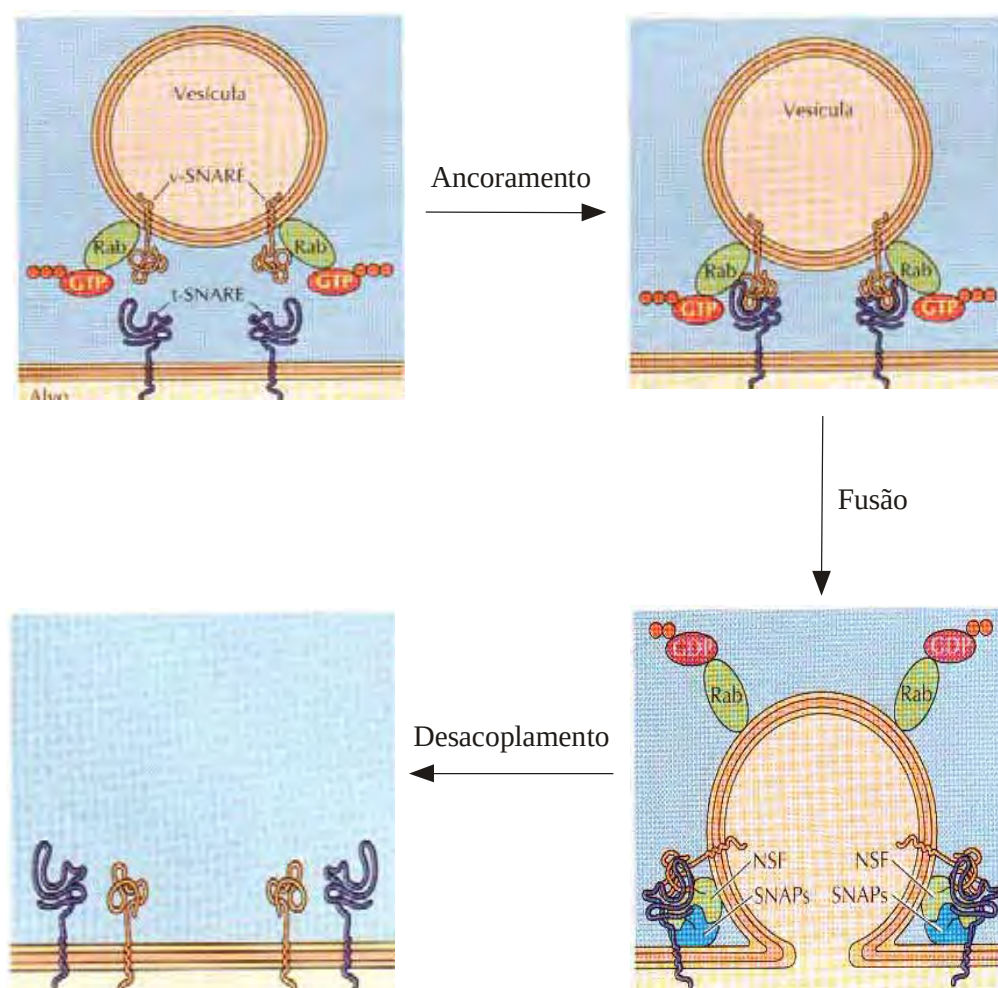


FIGURA 1 - Esquema simplificado da ação das proteínas Ypt/Rabs. A fusão vesicular é mediada pela formação do complexo SNARE (“soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor acceptor receptor”), no qual ocorre a ligação entre pares específicos de v-SNAREs (vesicular) e t-SNAREs (target) na vesícula e na membrana alvo, respectivamente. Proteínas Rab/Ypt que ligam GTP são necessárias para facilitar a formação de complexos v-SNARE/t-SNARE. Após a fusão das membranas, as proteínas NSF (“*N*-ethylmaleimide-sensitive factor”)/SNAP (“soluble NSF attachment protein”) desacoplam o complexo SNARE (COOPER, 2001).

TABELA 1 - Localização e função das proteínas Ypts e Rabs identificadas em leveduras e mamíferos, respectivamente.

Função/Localização	Ypts	Rabs
Exocitose		
RE-Golgi	Ypt1	Rab1a, Rab1b, Rab2
Golgi-RE		Rab6, Rab6b
Intra-Golgi	Ypt6	Rab1, Rab6, Rab6b
Trans-Golgi-Membrana Plasmática	Ypt31, Ypt32, Sec4	Rab11a,b
Associadas ao Golgi (etapa desconhecida)		Rab10, Rab12, Rab30, Rab33b
Endocitose		
Membrana Plasmática-Endossomo Primário		Rab5a,b,c
Endossomo Primário-Membrana Plasmática		Rab4, Rab15, Rab18
Endossomo Primário-Endossomo Tardio	Ypt51/Vps21, Ypt52, Ypt53	Rab7
Trans-Golgi- Endossomo Tardio	Ypt51/Vps21, Ypt52, Ypt53	
Endossomo Tardio-Lisossomo	Ypt7	Rab7
Endossomo Tardio-Trans-Golgi	Ypt6	Rab9, Rab11a,b
Associadas ao Endossomo (etapa desconhecida)		Rab22a,b Rab25
Funções Especializadas		
Regulação da secreção		
Fusão da Vesícula Sináptica com a Membrana Plasmática		Rab3a,b,c,d
Exocitose de grânulos		Rab8b
Associadas a secreção de grânulos		Rab26, Rab37
Secreção Polarizada		
Trans-Golgi-Membrana Basolateral		Rab8
Trans-Golgi-Membrana Apical		Rab21
Tight Junction		Rab13
Transcitose		Rab17
Associadas ao Fagossomo		Rab14
Transporte de Melanossomo		Rab27a,b
Funções desconhecidas	Ypt10 (Golgi), Ypt11 (Mitocôndria, Broto)	Rab4b, Rab19, Rab20, Rab24, Rab28, Rab7L1/ Rab29, Rab30, Rab31, Rab32, Rab33a, Rab/Rab34, Rab35, Rab36, Rab38, Rab39, CAB09136/Rab40a, AAA17031/Rab40b

Fonte: SEGEV, 2001.

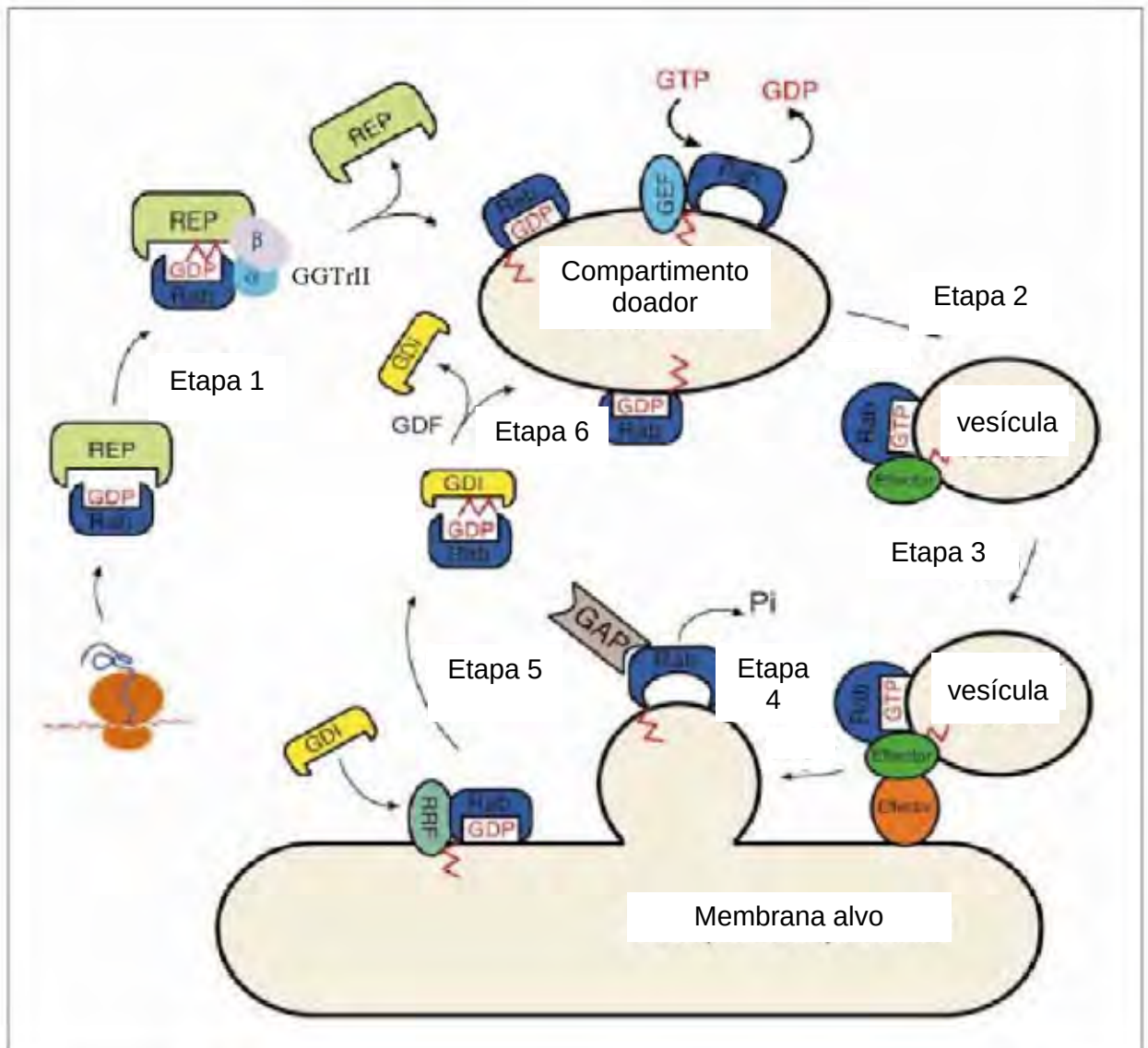


FIGURA 2 - Mecanismo de ação e regulação das Ypt/Rab GTPases. Inicialmente, a proteína Ypt/Rab nascente forma um complexo estável com a proteína REP, o qual é reconhecido pela enzima geranylgeranyl transferase tipo II (GGTrII), catalizando a ligação de grupos geranyl e, assim, a proteína Rab é direcionada para a membrana (etapa 1). A seguir, ocorre a troca de GDP para GTP por ação de uma GEF (etapa 2). A forma ativada das proteínas YPT/Rab recruta fatores que auxiliarão na etapa de fusão (etapa 3). Durante a fusão, ocorre a hidrólise de GTP, por ação de uma proteína GAP (etapa 4). Ocorre o recrutamento de GDI (provavelmente através de RRF), o qual retira as proteínas YPT/Rab da membrana (etapa 5). Finalmente, as proteínas YPT/Rab citosólicas complexadas com GDI e ligadas a GDP são transferidas para a membrana com o auxílio de um fator (GDF) e um novo ciclo é iniciado (Adaptado de ALORY e BALCH, 2001).

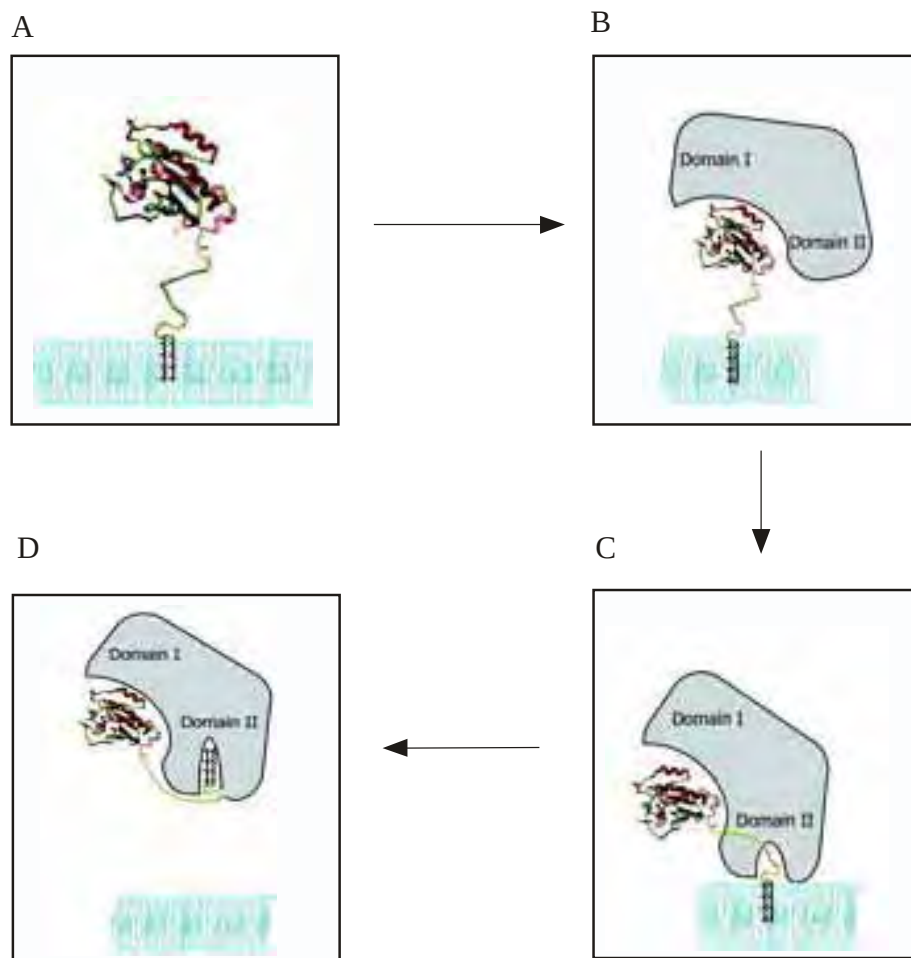


FIGURA 3 - Esquema da ação de GDI. (A) Proteína Ypt/Rab ligada a GDP associada com a membrana. (B) Interação com GDI e início da mudança conformacional. (C) Formação de uma cavidade que abriga a porção isoprenóide e a solubilização da Ypt/Rab GTPase. (D) Formação do complexo solúvel Rab/GDI (RAK et al., 2003).

2– OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

O objetivo geral do projeto foi contribuir para a determinação da função do fator de início de tradução 5A (eIF5A), através do estudo da interação genética revelada por letalidade sintética entre *TIF51A* e *YPT1*.

2.2- Objetivos Específicos:

2.2.1 - Confirmação da letalidade sintética entre o alelo mutado de *YPT1* e *tif51A-3*;

2.2.2- Caracterização do mutante contendo o alelo de *YPT1* revelado como letal sintético com *tif51A-3*;

2.2.3- Verificação da existência de interação física entre Ypt1 e eIF5A;

2.2.4- Análise do funcionamento da via secretória no novo mutante de *YPT1* e nos mutantes de *TIF51A*;

2.2.5- Avaliação da localização subcelular de eIF5A e Ypt1;

2.2.6- Análise da sensibilidade a inibidores de tradução dos mutantes de *YPT1*;

2.2.7- Verificação da existência de novas interações genéticas entre *TIF51A* e *YPT1*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL:

As leveduras utilizadas nos experimentos descritos nesta tese estão listadas na Tabela 2. Da mesma forma, os plasmídeos e os oligonucleotídeos utilizados estão listados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

O preparo de meios de cultura, soluções e o cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* seguiram procedimentos padrão (GUTHRIE e FINK, 1991; SAMBROOK et al., 2001; AUSUBEL et al., 2004).

3.2 - MÉTODOS:

3.2.1 – Subclonagem de DNA

3.2.1.1- Digestão de plasmídeos:

Os plasmídeos de interesse foram digeridos em um volume de 20µL, utilizando as condições recomendadas para as diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs).

3.2.1.2- Desfosforilação do vetor (quando necessário):

Após digestão do vetor, foram adicionadas 5-10 unidades de fosfatase alcalina (CIAP-Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e a reação incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 75°C por 10 minutos.

3.2.1.3- Purificação de inserto e vetor:

Após digestão dos plasmídeos e realização das modificações necessárias, os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40mM; ácido acético glacial 0,11%; EDTA 1mM), contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%; xileno cianol 0,125%; glicerol 50%) e a solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido a voltagem de 80V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho AlphaImager 2200 (Alpha Innotech Corporation). Os fragmentos desejados foram purificados utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da Qiagen.

3.2.1.4- Reação de ligação:

Os fragmentos (vetor e inserto) após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 10 μ L, 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.

3.2.2 – Clonagem gênica

As reações de amplificação foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,2mL contendo 1 μ M de cada oligonucleotídeo; 20 a 40ng de DNA plasmidial ou 1 μ L, de DNA genômico de levedura resultante da preparação descrita no item 3.2.6; 0,4 μ L da enzima Hifi (Invitrogen) e 2 μ L de uma mistura de desoxirribonucleotídeos (10mM cada), num volume final de reação de 50 μ L. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados nas diferentes reações. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 5 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o Kit “QIAquick PCR Purification” da Qiagen e submetidos à digestão com as enzimas de restrição, de acordo com o sítio de restrição gerados pelos oligonucleotídeos e 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” da Qiagen. A reação de ligação com o vetor adequado foi realizada de acordo com o item 3.2.1.4.

3.2.3 – Transformação bacteriana

3.2.3.1 – Preparação de *E. coli* competente:

Uma colônia da cepa de *E. coli* desejada foi crescida em 5mL de meio LB (extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L; triptona 10g/L) a 37°C, durante 16 horas e sob agitação. No outro dia, a cultura foi diluída (1:100) em 100mL de meio fresco e crescida a 37°C, sob agitação até atingir D.O._{600nm}=0,3-0,5. A cultura bacteriana foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 1.600xg a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 20mL de cloreto de cálcio 100mM gelado. As células foram incubadas no gelo por 20 minutos. A seguir, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 1.600xg por 10 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 2-4mL de cloreto de cálcio 100mM gelado. Novamente, as células foram mantidas no gelo por 1-24 horas. A suspensão celular foi congelada em alíquotas individuais de 100-200µL a -80°C, em glicerol 20%.

3.2.3.2- Transformação:

As células de *E. coli* competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100µL das células competentes e 50–250ng de DNA plasmidial ou metade do volume 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, 1mL 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 50µg/mL) e incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

3.2.4 – Preparação de plasmídeos a partir de *E. coli*

3.2.4.1- Em pequena escala – Miniprep:

Bactérias contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3mL de meio LB contendo 50µg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. Um volume da cultura (1,5mL) foi centrifugado por 1 minuto a 12.000xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Foram adicionados 200µL de solução NaOH/SDS (NaOH 0,2M; SDS 1%), incubando-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 150µL de acetato de sódio 3M pH 4,8. O tubo foi invertido várias vezes e centrifugado por 6 minutos a 12.000xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, a seguir, foi adicionado isopropanol (3 vezes o volume da amostra). Após incubação de 5 minutos a 37°C, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 50µL de TE pH 8,0.

3.2.4.2- Em média escala – Midiprep:

Uma colônia de bactéria transformada com o plasmídeo desejado foi inoculada em 25mL de meio seletivo (LB adicionado de ampicilina 50µg/mL) e incubada a 37°C durante 16 horas, sob agitação. Os plasmídeos foram extraídos e purificados por lise alcalina, utilizando o kit “QIAfilter Plasmid Midi” da Qiagen.

3.2.5 – Transformação de leveduras

Inicialmente, uma colônia de levedura foi inoculada em 10mL de meio de cultura apropriado e incubada a 25°C sob agitação até atingir a concentração de $2,0 \times 10^7$ células/mL. A seguir, 1mL da cultura foi centrifugado a 3.000xg por 5 minutos e as células lavadas com água estéril. Após centrifugação, as células foram suspensas em 1mL de solução 100mM de acetato de lítio e incubadas por 15 minutos a 25°C. Coletou-se novamente as células por centrifugação e em cada tubo foram adicionados, na seguinte ordem, 240μL de polietilenoglicol 50%, 36μL de acetato de lítio 1M, 50μL de DNA de espermatozoides de salmão, 5μL de plasmídeo e 20μL de água. Os tubos foram então agitados vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubados a 25°C por 30 minutos. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 37°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas e o sobrenadante removido. A seguir, as mesmas foram suspensas em 200μL de água estéril, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 25°C até o aparecimento das colônias.

3.2.6 - Extração de DNA genômico de leveduras

Leveduras foram crescidas até a saturação em 10mL de meio YPD líquido a 30°C, sob agitação. O volume total de cultura foi submetido à centrifugação à 3.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 500μL de água Milli-Q e transferidas para um tubo de microcentrífuga. O tubo foi submetido à centrifugação a 13.000xg por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas no líquido residual. A esse tubo foram adicionados 200μL de tampão de lise (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100mM; Tris-HCl pH 8,0 10mM; EDTA 1mM), 200μL de PCI (Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico–25:24:1) e aproximadamente 300mg de contas de vidro. A mistura foi agitada em vortex por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200μL de TE pH 8,0. O tubo foi agitado em vortex e submetido a centrifugação a 13.400xg por 5 minutos. Após esse procedimento, a fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga ao qual foram adicionados 200μL de PCI. A mistura foi agitada novamente e submetida à centrifugação 13.400xg 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 1mL de etanol absoluto gelado e o conteúdo foi homogeneizado por inversão. O tubo foi centrifugado a 13.400xg por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em 400μL de TE pH 8,0 e foram adicionados 3μL de RNase A (10mg/mL). A suspensão foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 200μL de PCI e o tubo foi

agitado brevemente em vortex. A mistura foi submetida a centrifugação por 13.400xg por 5 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Ao tubo foram adicionados 10µL de acetato de amônio 4M e 1mL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram misturados por inversão e centrifugados a 13.400xg por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400µL de etanol 75% gelado. Após a secagem o precipitado foi suspenso em 50µL de TE pH 8,0. O DNA genômico foi armazenado em freezer a -20°C.

3.2.7 – Sequenciamento de DNA

Amostras de DNA genômico foram submetidas a reação de PCR utilizando primers que hibridizam nas regiões flanqueadoras de *YPT1* (SVO195 e SVO196). O produto da reação de amplificação foi submetido ao sequenciamento utilizando o kit “Big Dye Terminator” e o sequenciador semi-automático ABI 377 (Applied Biosystems).

3.2.8 – Southern blot

Diferentes amostras de DNA genômico previamente digeridas com diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs) foram separadas em gel de agarose 0,8%. Após fotodocumentação, o gel foi tratado com solução de despurinação (HCl 250 mM) por 10-12 minutos, seguido de lavagem com água destilada. A seguir, o gel foi tratado com solução desnaturante (NaCl 1,5 mM; NaOH 0,5 mM), lavado em água destilada e neutralizado com solução neutralizante (NaCl 1,5 mM; Tris-HCl 0,5M pH 7,5). Os DNAs fracionados foram transferidos por capilaridade para uma membrana de nylon (Hybond N⁺ - Amersham). Após fixação do DNA com luz ultravioleta, por 2 minutos, as membranas foram incubadas por 1 hora a 42°C em solução de pré-hibridização (Kit ECLTM – Amersham). A sonda foi preparada, seguindo as recomendações do fabricante (Kit ECLTM – Amersham), utilizando um fragmento contendo o gene *YPT1*, obtido por PCR através do emprego dos oligonucleotídeos SVO193 e SVO194. A reação de hibridização foi realizada por 16 horas a 42°C. A seguir, a membrana foi lavada uma vez por 20 minutos e duas vezes por 10 minutos em condições diferenciadas de rigor (42°C em tampão de lavagem primário 0,2X SSC contendo uréia ou a temperatura ambiente em tampão de lavagem primário 1X SSC sem uréia). Posteriormente, a membrana foi lavada duas vezes por 5 minutos a temperatura ambiente em solução 20X SSC. A seguir, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (Kit ECLTM – Amersham) e submetida à autorradiografia.

3.2.9- Western blot

As amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (Tris-HCl 24,8mM; glicina 192mM) e tensão de 100V por 60 minutos. A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau-S. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 60 minutos em tampão PBST (PBS 1X; Tween-20 0,25%) contendo 5% de leite desnatado sob agitação. A membrana foi então incubada por 1 hora a temperatura ambiente com uma diluição adequada de soro imune em PBST contendo 5 % de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 45 minutos com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, em PBST contendo 5 % de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-Amersham Biosciences) e exposta a filme de raios-X.

3.2.10 – Cruzamento e esporulação de leveduras

3.2.10.1- Cruzamento:

As cepas haplóides de *S. cerevisiae* desejadas foram cruzadas na superfície de ágar YPD e incubadas por 16 horas a 25°C. A seleção dos diplóides foi realizada pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para a placa de meio duplo seletivo, de acordo com as marcas auxotróficas. As placas foram incubadas a 25°C. Após o crescimento, os diplóides foram isolados em meio seletivo duplo.

3.2.10.2- Esporulação:

Os diplóides foram crescidos em meio S-SPO líquido (2,5g de extrato de levedura; 15g acetato de potássio; 40mg de adenina, uracil e tirosina; 20mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100mg de fenilalanina e 350mg de treonina em 1 litro de água destilada) a 25°C, sob agitação até a formação de ascos. O aparecimento de ascos ocorreu após 3-5 dias.

3.2.11 - Dissecção e caracterização de tétrades

Foram centrifugados momentaneamente 200-1000 μ L da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, as células foram suspensas em 100 μ L de sorbitol 20%. Então, foram adicionados 3 μ L de zimoliase (10mg/mL) e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 1mL 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 fator de acasalamento foi definido através do cruzamento com cepas de fator de acasalamento conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo. O fenótipo temperatura-sensível foi checado pelo crescimento em meio YPD em diferentes temperaturas de incubação.

3.2.12 - Ensaio de expressão do gene de proteína de fusão com GST em bactéria

Um pré-inóculo de 5mL de meio LB líquido contendo o antibiótico de seleção plasmidial adequado foi feito com uma colônia de *E. coli* transformada com o plasmídeo que permite a expressão de proteína de fusão com GST. Após crescimento a 37°C sob agitação por 16 horas, a cultura foi diluída 1:200 em 25mL de meio de cultura fresco e crescida nas mesmas condições até atingir a D.O._{600nm} = 0,6. Após esse crescimento, uma amostra de 400 μ L foi retirada da cultura, as células coletadas por centrifugação 12.000xg por 1 minuto e suspensas em 40 μ L de tampão de amostra para proteína. No restante da cultura foi induzida a expressão do gene recombinante com 0,4mM de IPTG e 400 μ L de amostra foram retirados após 1, 2 e 3 horas de crescimento. Da mesma forma, as células foram coletadas por centrifugação e suspensas em 60 μ L, 80 μ L e 110 μ L de tampão de amostra para proteína, respectivamente. As amostras foram fervidas a 96°C por 5 minutos e submetidas a SDS-PAGE.

3.2.13 - Produção e purificação de proteína em fusão com GST

Foi utilizado um pré-inóculo de 50mL de meio LB líquido, acrescido de ampicilina (50 μ g/mL), a 37°C durante 16 horas sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída 1:10 em 1000mL de meio de cultura fresco e crescida nas mesmas condições até atingir a D.O._{600nm} = 0,6. Neste momento, a cultura foi induzida com 0,4mM de IPTG e, após 3 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 4.000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. A seguir, as células foram lavadas em 250mL de PBS gelado e centrifugadas a 4.000xg por 20

minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida. As células foram armazenadas a -80°C.

As células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise (Tris-HCl pH7,5 50mM; DTT 2mM; EDTA 10mM; PMSF 2mM; 1X coquetel de inibidores de proteases - Roche). Para a lise celular, a suspensão foi submetida à sonicação, em gelo, a ciclos de 4s de sonicação e 10s de repouso, durante 2 minutos, numa amplitude de 60%. O lisado foi então centrifugado a 20.000xg por 20 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45µm. O lisado clarificado e filtrado foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna de glutationa-Sepharose GSTrap 5mL e o sistema cromatográfico ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences). O procedimento para purificação foi realizado como descrito pelo fabricante. Resumidamente, após a aplicação da amostra na coluna, esta foi lavada com aproximadamente 50mL de tampão PBS pH7,4. Em seguida, foi feita a eluição da proteína de fusão com 25mL de tampão de eluição (Tris-HCl pH8,0 100mM; glutationa reduzida 10mM). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE em gel de acrilamida 12% e coradas com Coomassie. As frações obtidas da cromatografia que continham a proteína foram reunidas e submetidas à diálise em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção de 12-14.000Da em 2L de tampão PBS pH7,4 por 16 horas a 4°C. Após diálise, amostras de proteína foram submetidas à clivagem por trombina. Para isso, foi adicionado 0,5 U de trombina por mg de proteína e a reação incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O produto da digestão foi submetido à nova cromatografia de afinidade para a remoção de GST e purificação da proteína livre.

3.2.14 - Produção de anticorpo policlonal anti-Ypt1 em coelhos

A proteína Ypt1 purificada foi utilizada na imunização de coelhos, utilizando o seguinte esquema:

- Primeira inoculação: Um volume de solução contendo 300µg de proteína foi homogeneizado com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund. A emulsão obtida foi inoculada na região dorsal do coelho por via intradérmica, em diferentes pontos.

- Segunda inoculação: 21 dias após a primeira inoculação, um volume de solução contendo 300µg de proteína foi homogeneizado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund. O material foi inoculado na região dorsal do coelho por via subcutânea, em diferentes pontos.

- Primeira sangria: 11 dias após a segunda inoculação foram coletados 15mL de sangue periférico do coelho.
- Terceira inoculação: 10 dias após a primeira sangria, a mesma quantidade de proteína foi inoculada no coelho da mesma forma como descrito na segunda inoculação.
- Segunda sangria: 11 dias após a terceira inoculação foram coletados 15mL de sangue periférico do coelho.
- Quarta inoculação: 10 dias após a segunda sangria, a mesma quantidade de proteína foi inoculada no coelho da mesma forma como descrito na segunda inoculação.
- Terceira sangria: 11 dias após a quarta inoculação foram coletados 50mL de sangue periférico do coelho.

Os soros obtidos das três sangrias foram preparados e testados em diferentes diluições por western blot utilizando extrato total de levedura selvagem.

3.2.15 - Ensaio de expressão do gene de proteína de fusão com GST em levedura

Inicialmente, as linhagens de *S. cerevisiae*, contendo as construções plasmidiais para expressão dos genes de interesse em fusão com GST, foram incubadas em 5mL de meio SC-Ura, acrescido de glicose 2%, a 30°C por 24 horas. As culturas foram diluídas em 100mL de meio SC-Ura contendo 2% de rafinose para obtenção da D.O._{600nm}=0,016 e, em seguida, incubadas a 30°C. O crescimento foi acompanhado até que atingisse D.O._{600nm}=0,4-0,5. Uma alíquota de 10mL foi retirada da cultura de maior densidade óptica, sendo as outras normalizadas em relação a esta. A expressão do gene da proteína de fusão com GST foi então induzida pela adição, ao restante da cultura, de galactose na concentração final de 2%. As culturas foram incubadas a 30°C por 3 horas. Uma nova alíquota de volume normalizado foi removida para obter a mesma quantidade de células presentes nas alíquotas anteriores. As alíquotas, por sua vez, foram centrifugadas e os sobrenadantes removidos. Para checar a expressão das proteínas de fusão com GST através de ensaio de western blot, as alíquotas foram adicionadas de 200μL de tampão de amostra (2X) e de 300mg de pérolas de vidro, submetidas à agitação vigorosa por 10 minutos a 4°C e então fervidas por 5 minutos.

3.2.16 - Ensaio de interação física por copurificação

O gene *YPT1* foi clonado em fusão com o gene que codifica a proteína GST em um plasmídeo que possui regulação de expressão por galactose, marca auxotrófica *URA3* e origem de replicação 2μ. A linhagem de interesse foi transformada com esse plasmídeo e crescida em meio

sólido seletivo com glicose 2%. Então, foi feita pré-cultura desta levedura em meio líquido seletivo com glicose 2%, a 30°C durante 16 horas. Esta foi diluída para D.O._{600nm}=0,016, em 500ml de meio líquido seletivo com rafinose 2% e incubada a 30°C até atingir D.O._{600nm}= 0,4-0,5. Em seguida foi feita então a indução da produção da proteína de fusão, pela adição de 50ml de galactose a 20%, por 3 horas. As células foram centrifugadas a 2.500xg por 7 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10,1mM; KH₂PO₄ 1,8mM pH7,4) gelado. Após pesagem, as células foram congeladas a -80°C. Após o descongelamento em gelo, as células foram suspensas (volume em mL igual ao peso em gramas) em Tampão A (Hepes 30mM pH7,5; acetato de potássio 100mM; acetato de magnésio 2mM) acrescido de β-mercaptoetanol 7mM, PMSF 1mM e 5μg/mL dos seguintes inibidores de protease: pepstatina, leupeptina, aprotinina e quimostatina (Sigma). Pérolas de vidro foram adicionadas em quantidade igual ao peso das células. Para romper as células o tubo foi agitado vigorosamente (agitação manual) durante um minuto, descansando no gelo por um minuto e o processo repetido por 4 vezes. O extrato foi clarificado por centrifugação a 23.000xg por 20 minutos a 4°C e quantificado pelo método de Bradford (BioRad).

Em tubo de 1,5mL gelado contendo 300μL de resina glutationa-sepharose (suspensão 50%) foram adicionados 5-10mg de extrato celular. Após incubação de uma hora a 4°C com agitação lenta, a resina foi lavada 5 vezes com 1mL de Tampão A. A resina foi fervida com 100μL de tampão de amostra (2X) para SDS-PAGE. Um volume de 10μL foi aplicado em gel SDS-PAGE 12% e a copurificação checada por western blot.

3.2.17 – Ensaio de monitoração do processamento da proteína carboxipeptidase Y (CPY)

A levedura selvagem e os mutantes de interesse foram crescidos na temperatura permissiva e não permissiva por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas e lisadas com contas de vidro. Os lisados celulares obtidos foram submetidos ao ensaio de western blot, usando anticorpo policlonal anti-CPY (ROCKLAND Immunochemicals for Research).

3.2.18 – Fracionamento subcelular

As leveduras de interesse foram cultivadas durante 16 horas. As células foram centrifugadas a 2.500xg por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10,1mM; KH₂PO₄ 1,8mM pH7,4) gelado. A seguir, as células foram

congeladas a -80°C . Após o descongelamento em gelo, as células foram suspensas em 1mL de tampão RB (Hepes 20mM pH7,5; acetato de potássio 50mM; cloreto de magnésio 5mM; DTT 1mM; sorbitol 200mM; EDTA 1mM) acrescido de inibidores de protease (“EDTA-free, Complete Protease Inhibitors Cocktail” – Roche). Para romper as células, pérolas de vidro foram adicionadas e o tubo foi colocado no aparelho Fastprep (velocidade 6,0 e dois ciclos de 20 segundos). O extrato foi clarificado por centrifugação a $5.000\times g$ por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante obtido foi centrifugado a $100.000\times g$, por 30 minutos a 4°C em ultracentrífuga Beckman, rotor 50Ti. Os precipitados obtidos foram suspensos em 100 μL de tampão RB e quantificados pelo método de Bradford (BioRad).

3.2.19 - Extração de ribossomos das membranas do retículo endoplasmático

Em três tubos de microcentrífuga foram adicionados 50mg de proteínas de membranas da levedura selvagem, obtidas no fracionamento subcelular. Essas membranas foram suspensas em 1mL de tampão B88 (Hepes 20mM pH6,8; cloreto de potássio 150mM; acetato de magnésio 5mM; sorbitol 250mM), tampão B88 adicionado de 10mM de EDTA ou tampão B88 adicionado de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase A. As amostras foram incubadas na temperatura ambiente, por 20 minutos e centrifugadas a $100.000\times g$, por 30 minutos a 4°C em ultracentrífuga Beckman, rotor 50Ti. Ao precipitado foram adicionados 150 μL de tampão de amostra. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com ácido tricloroacético e suspensas em 150 μL de tampão de amostra. A seguir, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE e western blot.

3.2.20 - Teste de sensibilidade a inibidores de síntese protéica

As leveduras foram crescidas em 10mL de meio de cultura até aproximadamente $1-2\times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a $3.000\times g$ por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de $2,5\times 10^8$ células/mL. Então, foram transferidos 200 μL da suspensão para um poço de microplaca. A suspensão foi diluída seriadamente (1:10). Utilizando um pipetador multicanal, 4 μL da suspensão original e das diluições foram aplicados em placas de meio de cultura YPD e YPD contendo anisomicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cicloheximida (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou paromomicina (1mg/mL). A seguir, as placas foram incubadas até a observação de crescimento.

3.2.21 – Nocauteamento do gene *YPT1* em *S. cerevisiae*

O nocaute do gene *YPT1* foi realizado através de uma estratégia envolvendo PCR (BAUDIN et al., 1993). O gene *HIS3*, presente na construção plasmidial pSV42, foi amplificado utilizando oligonucleotídeos contendo sequências flanqueadoras do gene *YPT1*, SVO283 e SVO284. Posteriormente, o produto amplificado foi utilizado para transformar uma cepa diplóide de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura desprovido de histidina. O nocauteamento do gene *YPT1* foi confirmado por PCR.

3.2.22 - Teste de supressão do fenótipo temperatura-sensível

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

TABELA 2 – Leveduras utilizadas nos experimentos.

Linhagem	Genótipo	Origem
SVL14	<i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1 tif51A-1</i>	VALENTINI et al., 2002
SVL26	<i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1 tif51A-2</i>	VALENTINI et al., 2002
SVL32	<i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1 tif51A-3</i>	VALENTINI et al., 2002
SVL55	<i>MATa ura3 trp1 leu2</i>	Dra. Pamela Silver
SVL82	<i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1</i>	Dra. Pamela Silver
SVL80	<i>MATa/α ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 TRP1/trp1</i>	VALENTINI et al., 2002
SVL83	<i>MATα ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1</i>	Dra. Pamela Silver
SVL102	<i>MATα ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1 tif51A-3</i>	FRIGIERI, 2002
SVL105	linhagem SVL55 contendo o plasmídeo <i>pYGEX</i>	THOMPSON et al., 2003
SVL106	linhagem SVL55 contendo o plasmídeo <i>pYGEX-TIF51A</i>	THOMPSON et al., 2003
SVL110	linhagem SVL55 contendo o plasmídeo <i>pYGEX-TIF51A_{K51R}</i>	THOMPSON et al., 2003
SVL114	<i>MATα ade2 ade3 ura3 leu2 his3 trp1 can1 tif51A-3</i>	FRIGIERI, 2002
SVL132	<i>MATα ura3 leu2 his3 tif51A::HIS3</i> (pSV138)	VALENTINI et al., 2002
SVL248	<i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 tif51A-ts1159</i>	Coleção do laboratório
SVL338	<i>MATα ade2 ade3 ura3 leu2 his3 lys1 can1</i> <i>tif51A-3 ypt1-G80D</i> (pSV99)	FRIGIERI, 2002
SVL339	<i>MATα ade2 ade3 ura3 leu2 his3 lys1 can1</i> <i>tif51A-3 ypt1-G80D</i> (pSV254)	FRIGIERI, 2002
SVL355	<i>MATα ura3 leu2 his3 ypt1-2</i>	DU e NOVICK, 2001
SVL357	<i>MATa leu2 ypt1-3</i>	FINGER e NOVICK, 2000
SVL360	<i>MATα ura3 leu2 ypt1-ts</i>	FINGER e NOVICK, 2000

Tabela 2 – Continuação.

Linhagem	Genótipo	Origem
SVL398	<i>MATα ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1 YPT1::LEU2</i>	Este estudo
SVL401	<i>MATα ade2 ura3 leu2 his3 trp1 YPT1::LEU2</i>	Este estudo
SVL403	<i>MATα ura3 his4 ypt1-A136D</i>	Dra. Nava Segev
SVL404	<i>MATα ura3 leu2 his3 ypt1-1</i>	Dra. Nava Segev
SVL422	<i>MATα ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1 ypt1-G80D</i>	Este estudo
SVL440	<i>MATα ade2 ade3 ura3 leu2 his3 tif51A-3 YPT1::LEU2</i>	Este estudo
SVL441	<i>MATα ura3 leu2 his3 ypt1::HIS3 (pSV428)</i>	Este estudo
SVL579	<i>MATα ura3 his4 lys2 ypt1-Q67L</i>	Dra. Nava Segev

TABELA 3 – Plasmídeos utilizados nos experimentos .

Plasmídeo	Características	Origem ou Referência
pSV20	vetor de expressão de proteína de fusão com GST em levedura, <i>URA3/2μ</i> , Ap ^R (pYGEX)	Dra. Pamela Silver
pSV28	construção plasmidial <i>URA3/2μ</i> contendo o gene <i>ADE3</i>	Dra. Pamela Silver
pSV43	vetor de expressão de proteína de fusão com GST em bactéria, Ap ^R (pGEX-4T)	Amersham Biosciences
pSV42	construção plasmidial contendo o gene <i>HIS3</i>	Dra. Pamela Silver
pSV60	Vetor <i>URA3/CEN</i> (pRS316)	SIKORSKI e HIETER, 1989
pSV64	Vetor <i>LEU2/2μ</i> (pRS425)	CHRISTIANSON et al., 1992
pSV65	Vetor <i>URA3/2μ</i> (pRS426)	CHRISTIANSON et al., 1992
pSV71	Vetor <i>LEU2</i> integrativo (pRS305)	SIKORSKI e HIETER, 1989
pSV75	construção plasmidial <i>LEU2/2μ</i> contendo o gene <i>ADE3</i>	Dra. Pamela Silver
pSV99	<i>TIF51A</i> clonado no vetor pSV28	FRIGIERI, 2002
pSV107	<i>TIF51A</i> clonado no vetor pSV65	VALENTINI et al., 2002
pSV108	<i>TIF51A</i> clonado no vetor pSV64	VALENTINI et al., 2002
pSV138	<i>TIF51A</i> clonado no vetor pSV60	Coleção do laboratório
pSV234	<i>SEC63-GFP</i> clonado no vetor pSV60	PRINZ et al., 2000
pSV254	<i>TIF51A</i> clonado no vetor pSV75	Este estudo
pSV428	<i>YPT1</i> clonado no vetor pSV60	Este estudo
pSV450	<i>YPT1</i> clonado no vetor pSV64	Este estudo
pSV451	<i>YPT1</i> clonado no vetor pSV65	Este estudo
pSV468	<i>YPT1</i> clonado no vetor pSV71	Este estudo
pSV471	<i>YPT1</i> clonado no vetor pSV43	Este estudo
pSV489	<i>YPT1</i> clonado no vetor pSV20	Este estudo

TABELA 4 – Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos.

Oligo	Sequência (5'-3')*	Sítio
SVO 19	GCC TCA TCC AAA GGC GC	-
SVO 193	GCT CTA GAT GTA GTA GCT GCT ATG TCA	<i>XbaI</i>
SVO 194	GCT CTA GAG CAA GAG GAC GTG GAA GAA A	<i>XbaI</i>
SVO 195	CTC GCG TGT GTC TTA TTT AC	
SVO 196	CCA GTT TTG AGG AGG ATA TC	
SVO 240	CGC GGA TCC ATG AAT AGC GAG TAC GAT TAC	<i>BamHI</i>
SVO 283	CTG TTA GGC CCA GGT TGA AAT AAA TAA AAC AAG AAA AGG ACT AAT GGC CTC CTC TAC TAC ACT C	-
SVO 284	TTA GTT ATT ATA TTA TAT GGG TCT GCA AGG TAG AGG CGC GCT TGT GCG CGC CTC GTT CAG AAT G	-

*Os sítios de restrição introduzidos estão em negrito

4 – RESULTADOS

4.1 - Obtenção de uma levedura contendo apenas o alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*) sinteticamente letal com *tif51A-3*

Em um rastreamento por letalidade sintética realizado com o mutante temperatura-sensível *tif51A-3* foi revelado o gene *YPT1* como sendo sinteticamente letal com *TIF51A* (FRIGIERI, 2002). Neste rastreamento foi gerada uma levedura contendo os dois alelos mutados dos genes sinteticamente letais (*tif51A-3* e *ypt1*), mantida pela presença da cópia selvagem de *TIF51A* (pSV99). Para a caracterização do novo alelo gerado e estudo do significado funcional da letalidade sintética, foi necessária a obtenção de uma levedura contendo apenas a mutação no gene *YPT1* (*ypt1*).

Inicialmente, a marca *LEU2* foi integrada ao lado de *YPT1* em uma levedura contendo cópias selvagens de *YPT1* e *TIF51A*. Para isto, o gene *YPT1* foi amplificado por PCR e introduzido no vetor integrativo pSV71 (*LEU2*). A construção foi confirmada por diagnóstico de restrição e recebeu o nome pSV468.

A construção obtida foi linearizada com a enzima *Bgl*II, pois o gene *YPT1* possui um sítio para essa enzima na região não codificadora (5'-UTR). O fragmento de 6,8kb gerado foi introduzido na levedura selvagem SVL83, a qual foi plaqueada em meio desprovido de leucina. Os candidatos foram selecionados e quatro deles foram testados. DNA genômico foi obtido e digerido com a enzima *Hind*III. A confirmação da integração do gene *LEU2* ao lado de *YPT1* foi realizada através de ensaios de Southern blot, utilizando a enzima *Hind*III e uma sonda contendo o gene *YPT1*. Um esquema simplificado da estratégia de confirmação da integração correta pode ser observado na Figura 4. O resultado de um experimento de Southern blot realizado para a confirmação da integração pode ser observado na Figura 5. Um dos haplóides Leu⁺ confirmados foi selecionado e recebeu o nome de SVL398. Devido ao fato da levedura obtida possuir o mesmo tipo de acasalamento da levedura utilizada no rastreamento por letalidade sintética (SVL338), foi necessária a realização de um cruzamento com a levedura selvagem de tipo de acasalamento oposto (SVL82). O diplóide resultante foi esporulado e as tétrades dissecadas. A canaleta 1 da Figura 5 apresenta a levedura haplóide selvagem, revelando a presença de uma banda de 3,8kb. Na canaleta 2 é possível observar a levedura haplóide integrada (SVL398), confirmada pela presença de uma banda de 2,6kb e uma de 8,0kb. O diplóide gerado pelo cruzamento da levedura SVL398 com a SVL82 está apresentado na canaleta 3, sendo possível observar a presença das três bandas esperadas. As canaletas 4, 5, 6 e 7 apresentam as quatro

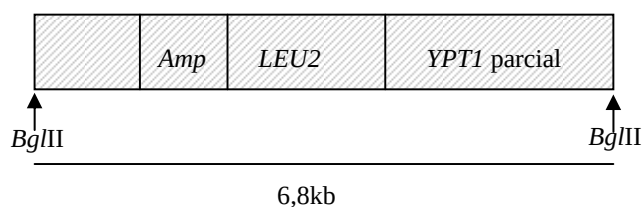
colônias derivadas de uma tétrade dissecada do diplóide da canaleta 3. Como esperado no caso de integração correta, duas revelaram apenas uma banda de 3,8kb (alelo selvagem) e duas revelaram uma banda de 2,6kb e uma de 8,0kb (alelo marcado). A levedura de interesse (derivada do esporo b) foi selecionada e recebeu o nome de SVL401.

Por possuir tipo de acasalamento *a*, essa levedura pôde ser cruzada com a levedura originada no rastreamento por letalidade sintética (SVL338), possuindo a dupla mutação (*tif51A-3*, *ypt1*) e sendo mantida pela presença do plasmídeo pSV99 (*TIF51A/ADE3/URA3/2μ*). O diplóide gerado foi cultivado em meio contendo 5-FOA para possibilitar a eliminação do referido plasmídeo. A seguir, o diplóide foi transformado com um plasmídeo contendo o gene *YPT1* e a marca *URA3* (pSV451). Este plasmídeo foi obtido pela subclonagem de um fragmento contendo *YPT1* de 1,3kb, removido com a enzima *XbaI* da construção pSV428 e introduzido no vetor pSV65 aberto com a enzima compatível *SpeI*. A construção obtida (pSV451) foi diagnosticada e teve sua funcionalidade confirmada (dados não mostrados). A transformação do diplóide com pSV451 foi necessária, pois a presença deste gene é indispensável para a viabilidade dos esporos (SEGEV e BOTSTEIN, 1987). O diplóide foi dissecado e as tétrades resultantes foram analisadas. Um esquema ilustrativo da estratégia utilizada na separação das mutações pode ser verificado na Figura 6. No painel B desse esquema é possível observar que uma levedura contendo apenas o alelo mutato de *YPT1* seria obtida em tétrades apresentando segregação ditipo não-parental e tetratipo.

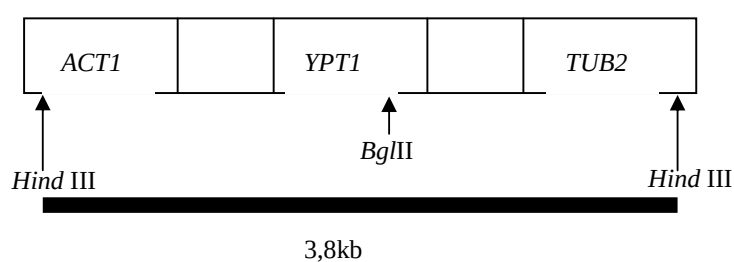
Os diferentes tipos de segregação apenas podem ser verificados no meio contendo 5-FOA. O gene *URA3* codifica a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase, requerida para a biossíntese de UTP e dTTP. O 5-FOA é uma substância capaz de ser assimilada pela levedura e ser metabolizada a 5-flúor-uracila, que é um potente inibidor da enzima timidilato sintase. Assim, a levedura que possuir a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase (*Ura3*), necessária para que o 5-FOA se torne tóxico, não sobreviverá na presença deste composto. Por outro lado, leveduras não possuindo o gene *URA3* funcional, sobrevivem normalmente na presença de 5-FOA. Assim, em meio contendo 5-FOA são selecionadas leveduras que não possuem o plasmídeo com o gene *URA3*. Desta forma, após o crescimento nesse meio, são selecionadas as leveduras onde o plasmídeo pSV451 foi perdido durante as sucessivas divisões celulares. O painel A da Figura 7 mostra o crescimento dos esporos gerados em meio YPD, meio sintético desprovido de leucina e meio 5-FOA. Nesta análise de tétrades, foi possível observar a segregação correta da marca *LEU2* (2:2) e definir as tétrades apresentando a segregação de interesse em meio 5-FOA. A tétrade 4, apresentando a segregação tetratipo, foi escolhida. O esporo inviável na segregação

tetratipo corresponde à situação de letalidade sintética entre *tif51A-3* e *ypt1*. As três leveduras viáveis derivadas desta tétrade foram cultivadas em meio YPD a 25°C, a 36°C, para permitir a identificação da levedura contendo apenas a mutação *ypt1*, uma vez que *tif51A-3* é sensível a 36°. Os resultados estão verificados no painel B da mesma figura. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que a levedura derivada do esporo 4a apresenta os alelos selvagens dos dois genes analisados. Por outro lado, a levedura originada do esporo 4b contém apenas o alelo mutado de *YPT1*, a qual recebeu o nome de SVL422. Finalmente, a levedura derivada do esporo 4d possui o alelo *tif51A-3* e o alelo marcado de *YPT1* (*YPT1::LEU2*). Esta levedura recebeu o nome de SVL440.

A



B



C

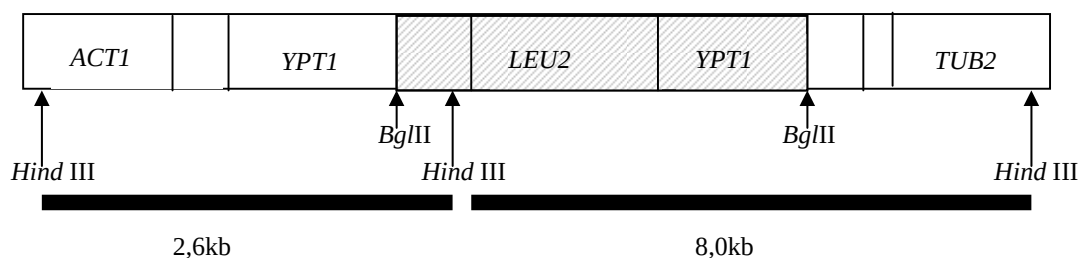


FIGURA 4 - Esquema da estratégia utilizada para a integração do gene *LEU2* ao lado de *YPT1*. (A) pSV468 linearizado com a enzima *Bgl*II. (B) e (C) Mapa parcial simplificado do cromossomo VI, mostrando os fragmentos obtidos quando DNA genômico da levedura contendo *YPT1* selvagem ou *YPT1* marcado com *LEU2* (*YPT1::LEU2*) é submetido à digestão com *Hind*III, enzima utilizada nos ensaios de Southern blot.

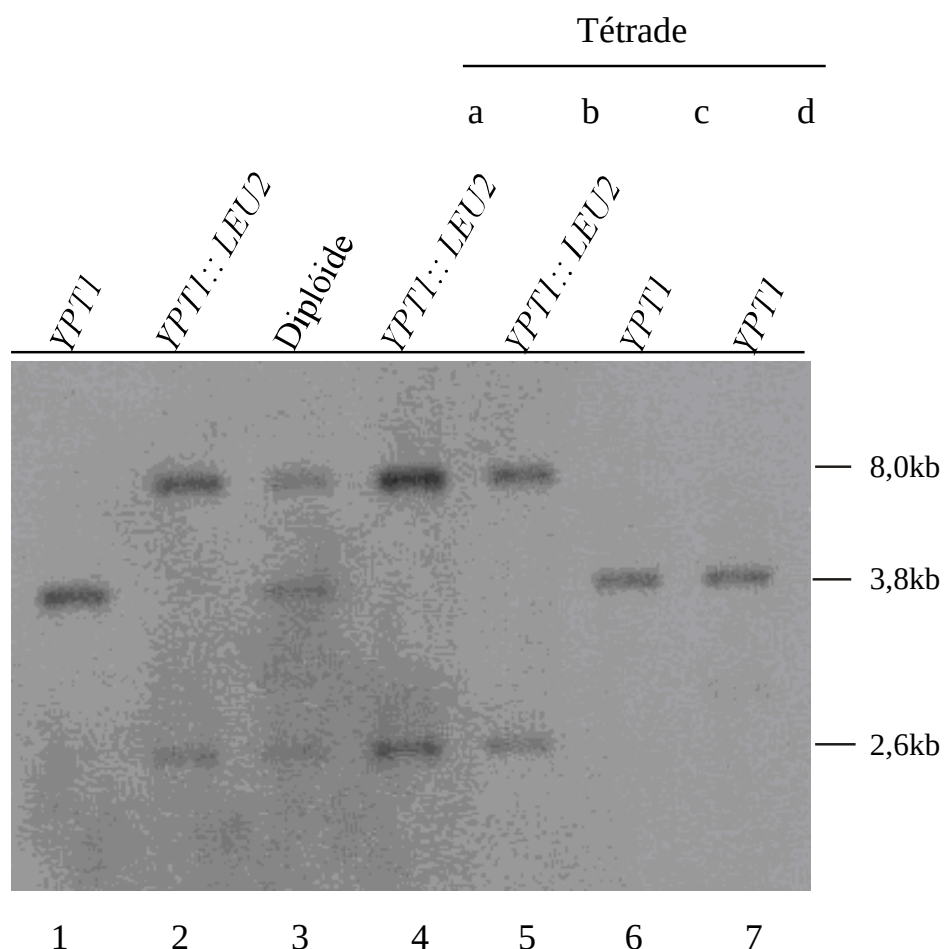


FIGURA 5 – Confirmação da integração *YPT1::LEU2* através do ensaio de Southern blot.

Amostras de DNA genômico obtidas a partir da levedura SVL83, contendo o alelo selvagem de *YPT1* (canaleta 1), da levedura SVL398, possuindo o alelo do gene *YPT1* marcado (canaleta 2), do diplóide resultante do cruzamento da SVL398 com a levedura selvagem SVL82 (canaleta 3) e das leveduras derivadas de uma das tétrades deste diplóide (canaletas 4, 5, 6, e 7) foram digeridas com a enzima *HindIII* e submetidas ao ensaio de Southern blot, utilizando como sonda um fragmento de DNA contendo o gene *YPT1*.

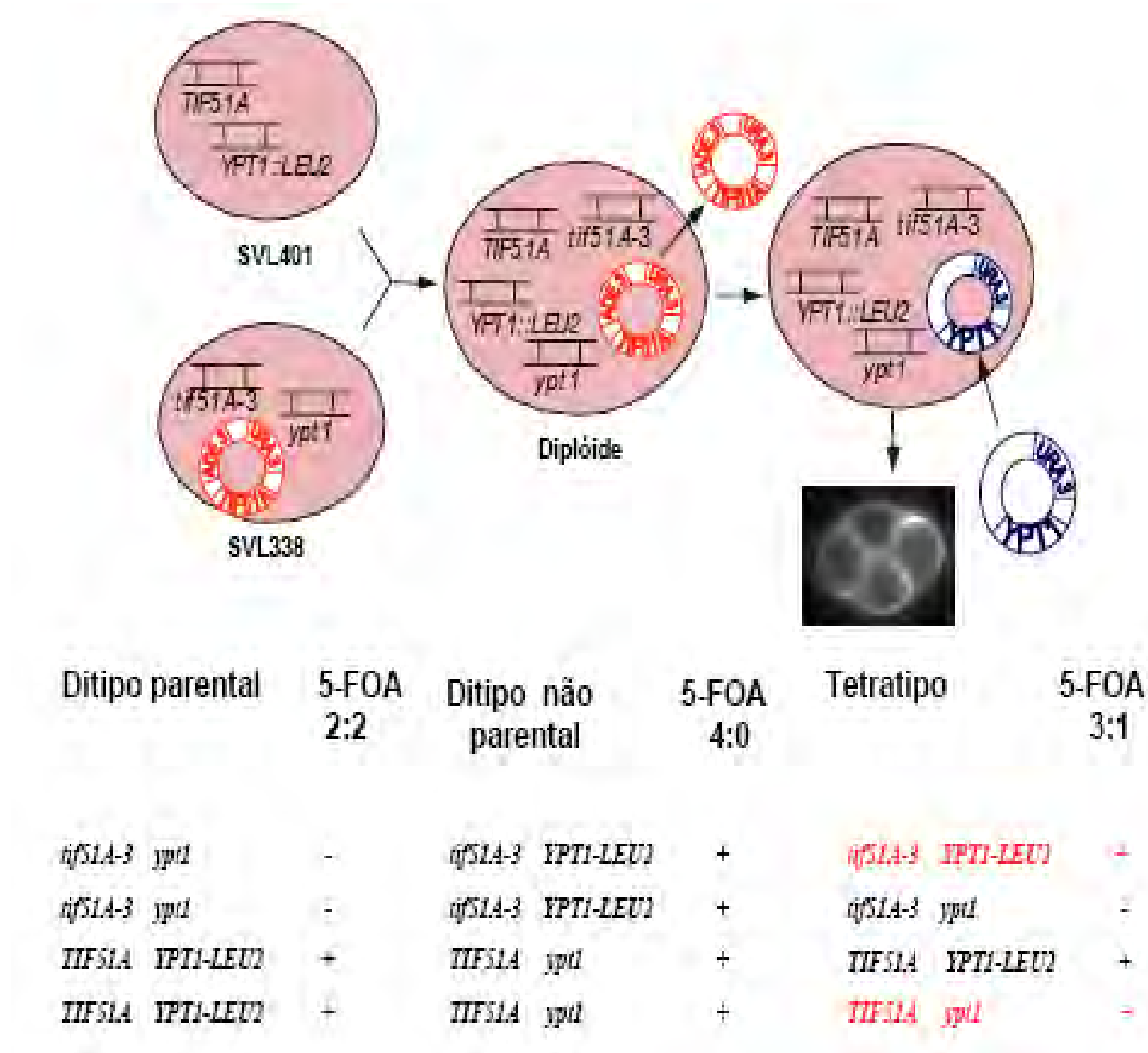


FIGURA 6 – Esquema do ensaio utilizado para obter uma levedura contendo apenas o alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*) sinteticamente letal com *tif51A-3*. (A) A levedura SVL401 contendo *YPT1* marcado com *LEU2* (*YPT1::LEU2*) foi cruzada com a levedura possuindo a dupla mutação SVL338 (*tif51A-3, ypt1*) e o plasmídeo pSV99 (*TIF51A/ADE3/URA3/2μ*). Foi feita a troca deste plasmídeo pelo pSV451(*YPT1/URA3/2μ*). O diploide foi dissecado e as tétrades foram analisadas. (B) Esquema ilustrando os tipos de segregação de acordo com o crescimento em meio 5-FOA, para permitir a definição do mutante durante a análise de tétrades.

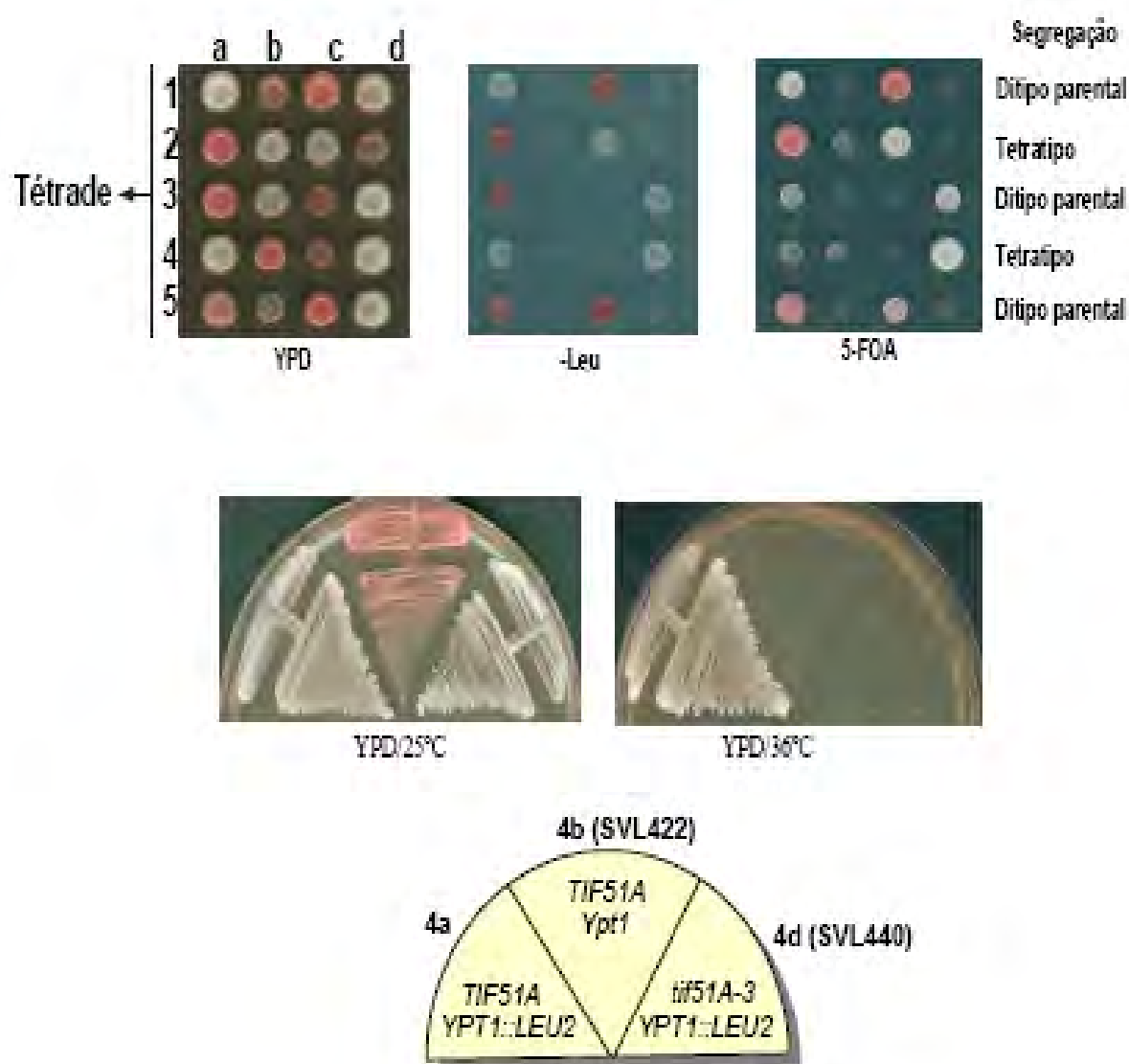


FIGURA 7 – Análise de tétrades e identificação de uma levedura contendo apenas o alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*). (A) Cinco tétrades obtidas no cruzamento descrito na figura anterior foram cultivadas em meio YPD, meio sintético desprovido de leucina e em meio contendo 5-FOA. A tétrade 4 foi escolhida. (B) Para a identificação definitiva da levedura contendo apenas o gene *YPT1* mutado (*ypt1*), as leveduras desta tétrade, que foram capazes de crescer em meio 5-FOA, foram cultivadas em YPD a 25°C e a 36°C.

4.2 – Confirmação da ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*)

A levedura SVL440 gerada do esporo 4d, obtida na análise de tétrades anterior, contendo o gene *YPT1* marcado (*YPT1::LEU2*) além do gene *TIF51A* mutado (*tif51A-3*), foi cruzada com a levedura resultante do rastreamento (SVL338), contendo dupla mutação (*tif51A-3* e *ypt1*) e mantida pela presença do plasmídeo pSV99 (*TIF51A/ADE3/URA3/2μ*). Novamente, devido a essencialidade do gene *YPT1* para a viabilidade dos esporos, o diplóide gerado foi cultivado em meio contendo 5-FOA e, a seguir, foi transformado com um plasmídeo contendo o gene *YPT1* e a marca *URA3* (pSV451). Então, o diplóide foi dissecado e teve suas tétrades analisadas. Um esquema dessa análise pode ser verificado na Figura 8. Na análise de tétrades apresentada na Figura 9, é possível verificar que apenas os esporos contendo a marca *LEU2* (*YPT1* selvagem) foram capazes de crescer em meio contendo 5-FOA. Dessa forma, ficou comprovado que a letalidade sintética observada com *tif51A-3* é realmente devido a presença do alelo mutado gerado no gene *YPT1* (*ypt1*).

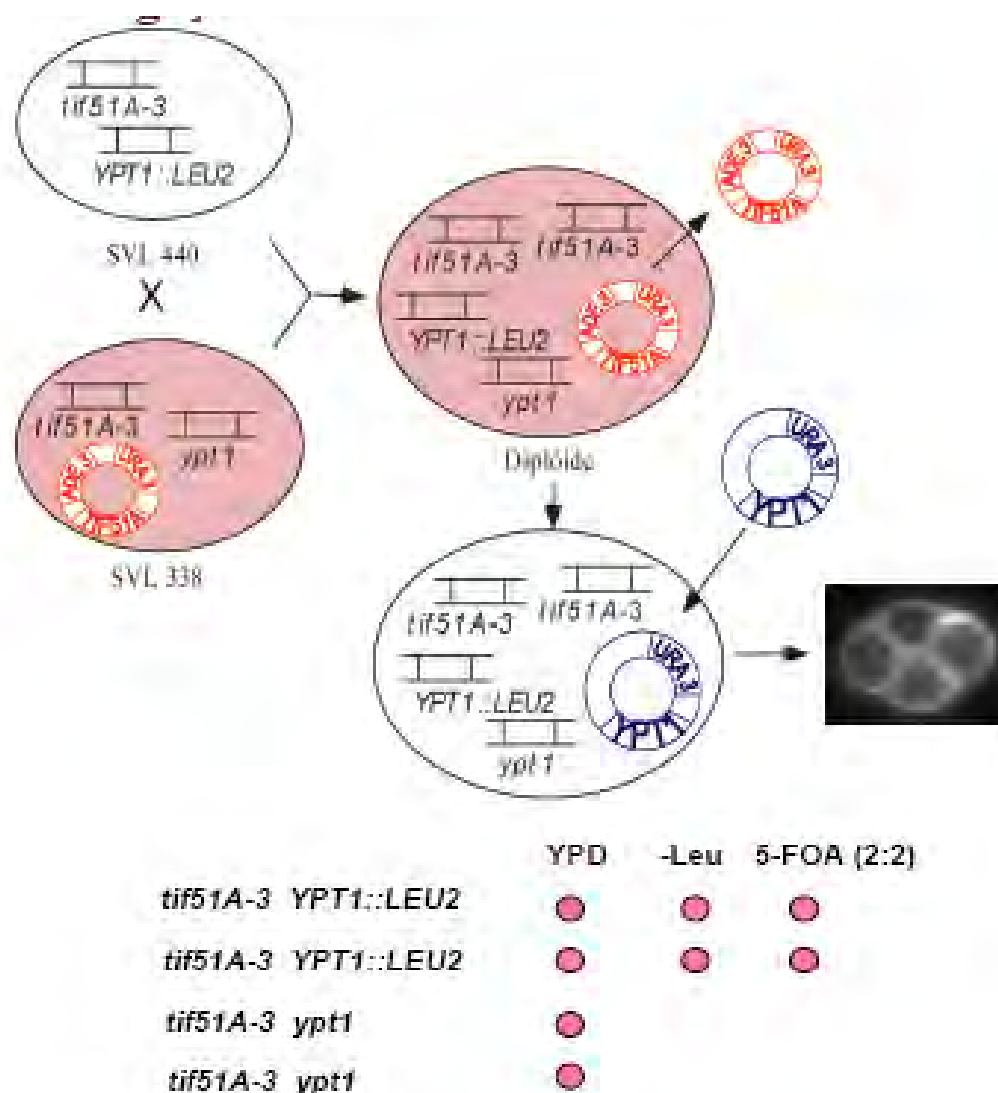


FIGURA 8 – Esquema do ensaio utilizado para a confirmação da ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*). A levedura SVL440, contendo *YPT1* marcado com *LEU2* (*YPT1::LEU2*) e a mutação *tif51A-3*, foi cruzada com a levedura SVL338 possuindo a mutação dupla (*tif51A-3*, *ypt1*) e o plasmídeo pSV99 (*TIF51A/ADE3/URA3/2μ*). A seguir, foi realizada a troca deste plasmídeo pelo pSV451(*YPT1/URA3/2μ*). O diploide foi dissecado e as tétrades foram analisadas.

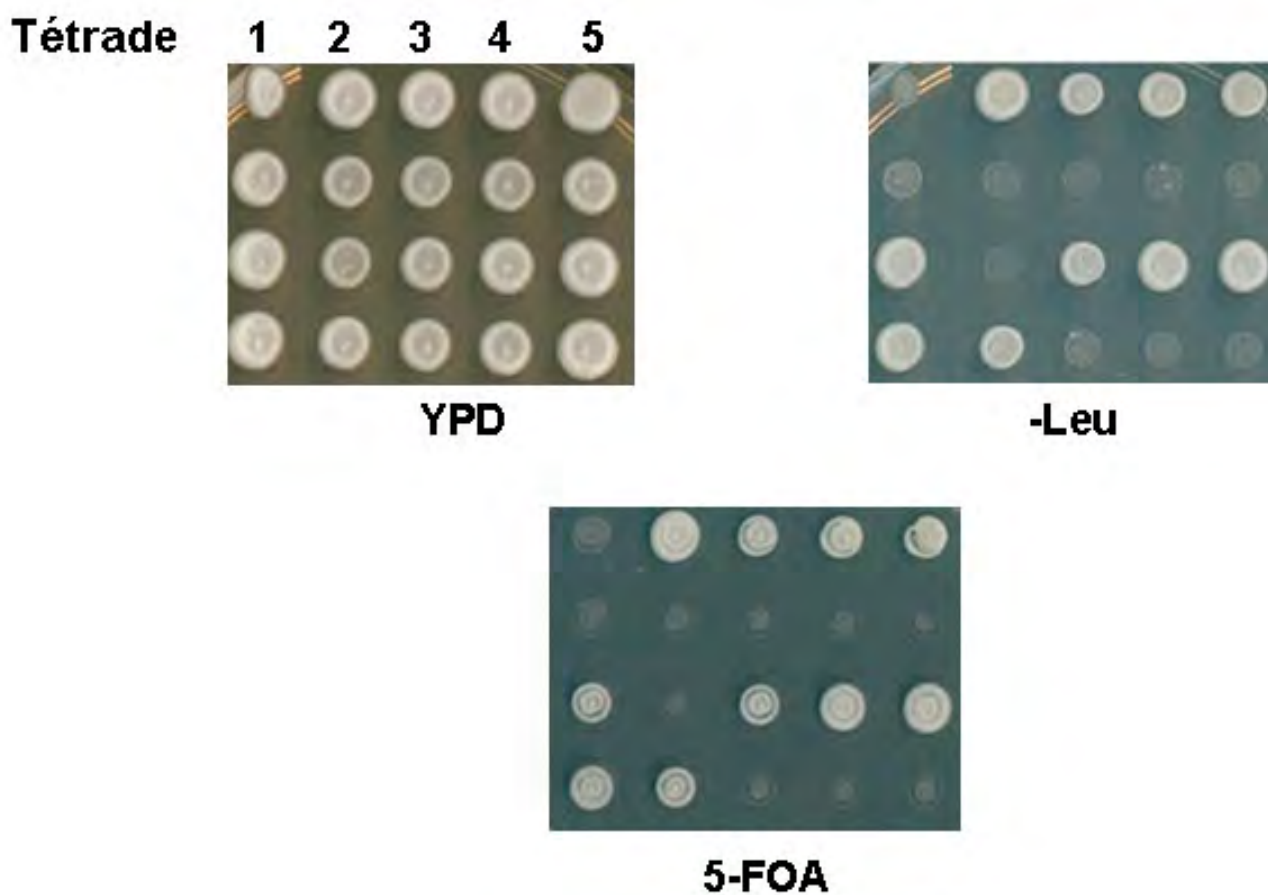


FIGURA 9 – Confirmação da ligação entre a letalidade sintética e o alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*). Cinco tétrades obtidas no cruzamento descrito na figura anterior foram cultivadas em meio YPD, meio sintético desprovido de leucina e em meio contendo 5-FOA.

4.3 – Caracterização do novo alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*)

4.3.1 – Identificação da mutação presente no novo alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*)

Para identificar a mutação presente no alelo mutado de *YPT1*, DNA genômico foi extraído da levedura apresentando a situação de letalidade sintética (SVL338, clone #370 do rastreamento de letalidade sintética, realizado durante o Mestrado) e da levedura parental para *YPT1* SVL114. Foi, então, realizada uma amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos SVO195 e SVO196, os quais hibridizam na região flanqueadora do gene *YPT1*. A seguir, o produto da reação de amplificação de 759pb foi submetido ao sequenciamento de DNA.

A sequência de DNA do alelo presente no mutante foi comparada com aquela obtida para o alelo da levedura selvagem para *YPT1*. Foi revelada a mudança de uma guanina para uma adenina. Este tipo de mutação é esperado para o agente mutagênico utilizado, o etilmetanossulfonato (EMS). Durante o processo mutagênico, o grupamento etil do EMS liga-se à guanina, a qual passa a fazer duas pontes de hidrogênio e se pareia com timina no lugar de citocina. Assim, a mutação incorporada por EMS envolverá sempre a troca de uma guanina para uma adenina. No caso da mutação em *YPT1* (*ypt1*), foi verificada a alteração do códon GGT para GAT. Essa mudança resulta, na proteína, na troca de uma glicina para um ácido aspártico na posição 80 (Figura 10). Dessa forma, o novo alelo mutado de *YPT1* (*ypt1*) passou a ser chamado de *ypt1-G80D*.

4.3.2. – Verificação da presença de fenótipos condicionais no novo mutante de *YPT1* (*ypt1-G80D*).

Para verificar a presença de fenótipos condicionais no novo mutante gerado *ypt1-G80D* (SVL422) foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura utilizando culturas diluídas seriadamente. O painel A da Figura 11 mostra o crescimento em YPD do mutante *ypt1-G80D* e da levedura selvagem a 14°C, 25°C e a 36°C. Os resultados obtidos mostram que o mutante *ypt1-G80D* possui sensibilidade a temperaturas alta (36°C) e baixa (14°C). O fenótipo de sensibilidade a altas temperaturas já havia sido mostrado na Figura 7 e foi confirmado. Dessa forma, o mutante gerado neste estudo (*ypt1-G80D*), apresenta fenótipos de crescimento muito parecidos com aqueles observados no mutante *ypt1-1*, ou seja, sensibilidade tanto a baixas quanto a elevadas temperaturas e crescimento dificultado mesmo na temperatura permissiva (SEGEV et al., 1988).

4.3.3 – Confirmação da recessividade do alelo mutante *ypt1-G80D*.

Para testar se o baixo número de cópias do gene *YPT1* é capaz de complementar o fenótipo temperatura-sensível, o mutante *ypt1-G80D* (SVL422) foi transformado com pSV428 (*YPT1/URA3/CEN*) e com o vetor vazio pSV60 (*URA3/CEN*). A seguir, foi realizado novamente o teste de sensibilidade a temperatura a 36°C. Foi observado que o mutante passava a crescer em meio seletivo, mesmo na presença do vetor vazio na temperatura não permissiva (dados não apresentados). Desta forma, foram testadas temperaturas mais elevadas e foi possível definir a temperatura de 38°C como temperatura não permissiva para o mutante em meio seletivo. Tal fato pode ser devido a diferença de osmolaridade dos meios YPD e sintético. No painel B da Figura 11 é possível observar que a levedura mutante (SVL422) passa a crescer a 38°C quando transformada com o plasmídeo pSV428 (*YPT1/URA3/CEN*) e não cresce na presença do vetor vazio. Isto confirma que a mutação *ypt1-G80D* é recessiva.

4.3.4 - Verificação da estabilidade de *Ypt1*

Inicialmente, o anticorpo policlonal anti-*Ypt1* foi obtido a partir da proteína recombinante GST-*Ypt1* produzida e purificada por cromatografia de afinidade.

4.3.4.1 - Produção e purificação da proteína *Ypt1* recombinante

A sequência codificadora do gene *YPT1* foi amplificada por PCR. O fragmento obtido foi clonado no sítio da enzima de restrição *Bam*HI do vetor induzível por IPTG pGEX (pSV43). A construção obtida recebeu o nome de pSV471. Esta construção plasmidial obtida foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli*. Uma colônia obtida da transformação foi analisada quanto à expressão da proteína recombinante. No painel A da Figura 12, as canaletas de 2 a 5 apresentam, nessa ordem, as amostras da cultura antes e após 1, 2 e 3 horas de indução com IPTG. Nesta figura é possível observar um aumento significativo da banda correspondente à GST-*Ypt1* de aproximadamente 48kDa.

A proteína de fusão foi então produzida com o crescimento da bactéria de interesse em 1L de meio. Após lise celular, o lisado obtido foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna glutational-Sepharose. Como pode ser observado no painel B da Figura 12, a proteína de fusão foi eluída na fração correspondente à canaleta 5. As canaletas 2 e 3 contêm amostra do extrato antes da cromatografia e amostra da fração não ligada à coluna de afinidade (FT= Flowthrough), respectivamente. Ainda, a canaleta 4 contém amostra obtida durante a lavagem da coluna antes da eluição.

A proteína purificada foi dialisada em tampão PBS pH7,4 e digerida com 0,5U trombina/mg de proteína. No painel A da Figura 13 é possível observar que a proteína de fusão GST-Ypt1 foi completamente digerida (canaleta 2). Após digestão a proteína Ypt1 foi separada novamente por cromatografia em coluna de glutathione-Sepharose para a remoção de GST. O painel B da mesma figura mostra a proteína Ypt1 purificada (canaleta 1). A canaleta 3 contém a proteína GST eluída da coluna de afinidade.

4.3.4.2 - Obtenção do anticorpo policlonal anti-Ypt1 em coelhos

A partir da proteína Ypt1 purificada foi iniciada a imunização de coelho para obtenção do anticorpo policlonal anti-Ypt1. Após 11 dias da segunda, da terceira e da quarta inoculação, foram retirados aproximadamente 15mL de sangue do animal e o soro foi recuperado. Então, foi utilizado extrato de levedura selvagem para os ensaios de western blot com os soros obtidos. Na Figura 14, as canaletas de 1 a 11 contêm extrato de levedura selvagem. O soro pré-imune do coelho foi utilizado nas diluições 1:500 e 1:1.000 (canaletas 1 e 2). O soro da primeira sangria foi testado nas diluições de 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 (canaletas 3 a 5), da segunda sangria nas diluições 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 (canaletas 6 a 8) e da terceira sangria nas diluições 1:1.000, 1:2.000 e 1:5.000 (canaletas 9 a 11). É possível observar o aumento do título do anticorpo anti-Ypt1 nas diferentes sangrias durante o processo de imunização do coelho. O soro obtido na terceira sangria apresenta um alto título para o anticorpo, detectando adequadamente uma banda de aproximadamente 23kDa, correspondente à proteína Ypt1 endógena de *S. cerevisiae*, numa diluição de 1:5.000.

4.3.4.3 – Análise da estabilidade de Ypt1

Com o objetivo de verificar se o mutante gerado (*ypt1-G80D*) produz Ypt1 instável na temperatura não permissiva, foi realizado ensaio de western blot com extratos celulares obtidos deste mutante crescido na temperatura permissiva e não permissiva. Como controle, foi utilizada a levedura selvagem (SVL82) submetida às mesmas condições. Como pode ser visto na Figura 15, os níveis da proteína Ypt1 não se alteram com o crescimento do mutante *ypt1-G80D* na temperatura não permissiva, indicando que a proteína produzida pelo alelo *ypt1-G80D* é estável.



FIGURA 10 - Mutação revelada no alelo do gene *YPT1* (*ypt1-G80D*) sinteticamente letal com *tif51A-3*. Estrutura tridimensional da proteína Ypt1 quando ligada a GDP (RAK et al., 2003) utilizada para apontar a alteração de uma glicina (G) para um ácido aspártico (D) no resíduo 80 da proteína produzida pelo novo alelo de *YPT1*.

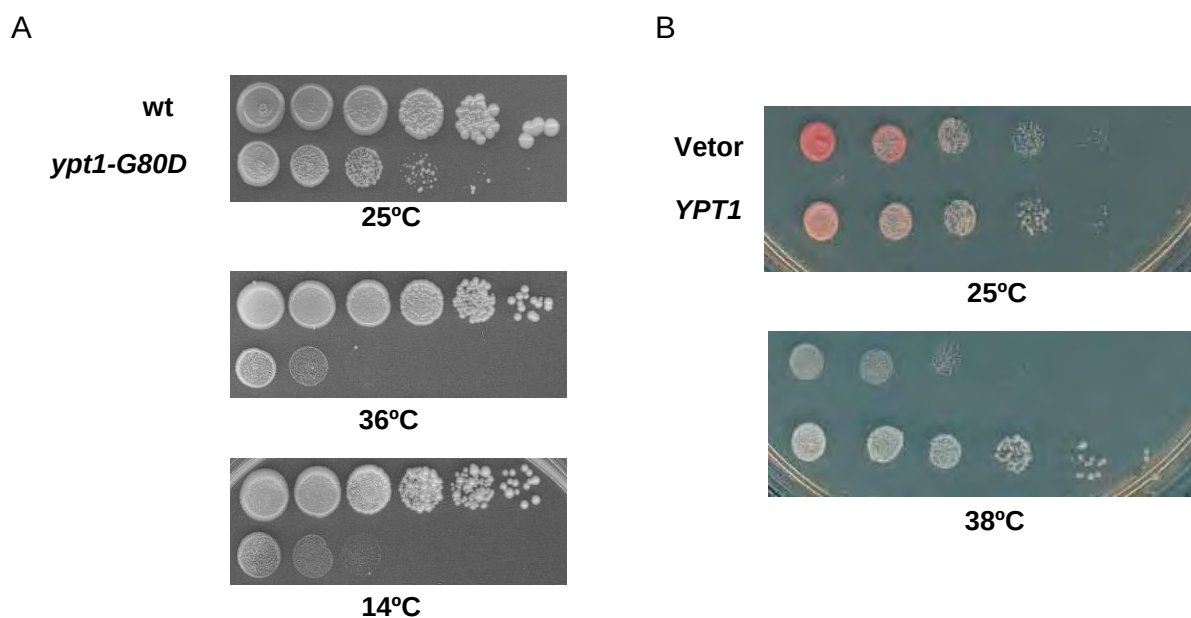


FIGURA 11 – Verificação de fenótipos condicionais e confirmação da recessividade do alelo *ypt1-G80D*. (A) As leveduras SVL422 (*ypt1-G80D*) e a levedura selvagem SVL82 (*YPT1*) foram crescidas, após diluição seriada das culturas, em meio YPD a 25°C, a 14°C e a 36°C. (B) A levedura SVL422 (*ypt1-G80D*) foi transformada com o plasmídeo pSV428 (*YPT1/URA3/CEN*) ou com o vetor vazio. Os transformantes foram cultivados, após diluição seriada das culturas, em meio sintético desprovido de uracila a 25°C e a 38°C.

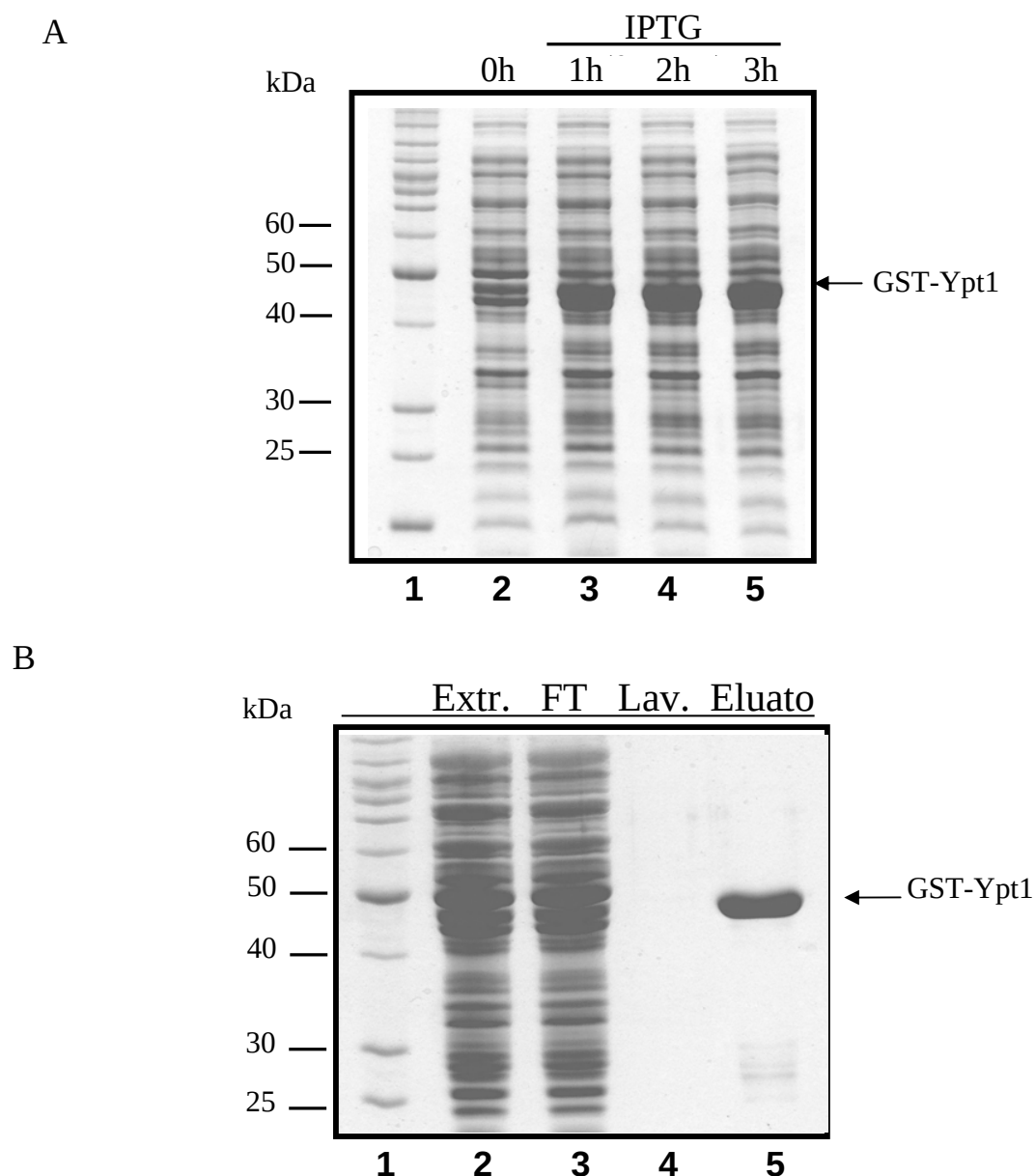
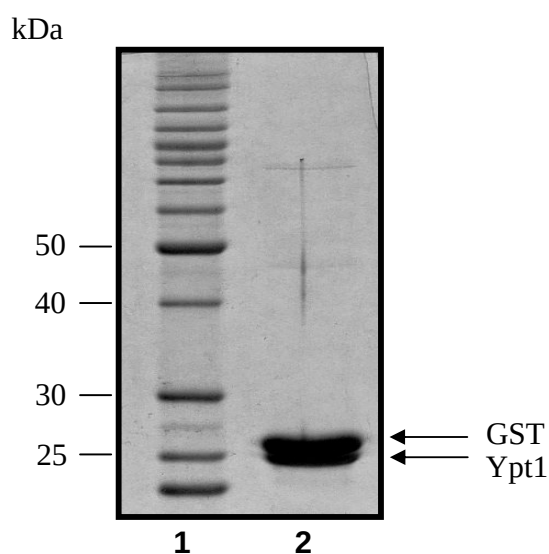


FIGURA 12 - Produção e purificação da proteína de fusão GST-Ypt1. Indução da produção da proteína GST-Ypt1 (A). As alíquotas da cultura antes (canaleta 2) e após indução com IPTG (canaletas 3 a 5) foram separadas por SDS-PAGE e coradas por Coomassie. Purificação de GST-Ypt1 (B). A canaleta 2 (Extr.) contém amostra do extrato antes da cromatografia. A canaleta 3 (FT= Flowthrough) contém amostra não ligada à coluna. A canaleta 4 (Lav.) contém amostra obtida durante a lavagem da coluna e a canaleta 5 contém amostra coletada durante a etapa de eluição. As setas indicam GST-Ypt1. A canaleta 1 dos dois painéis contém padrão de massa molecular 10kDa (Invitrogen).

A



B

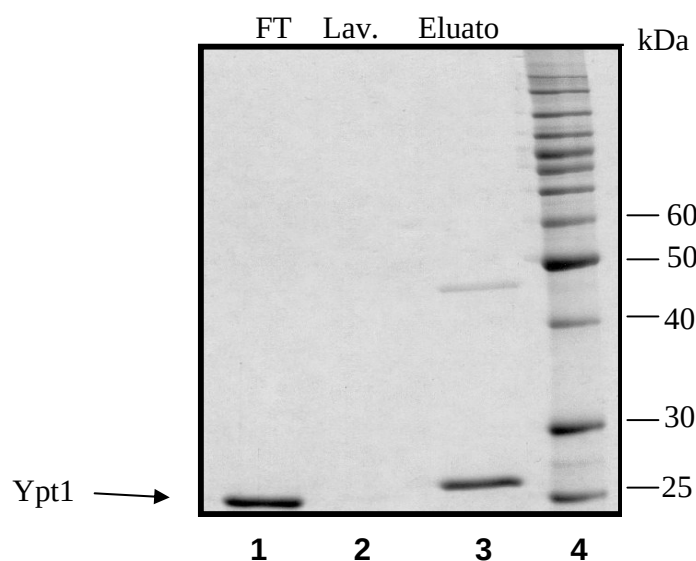


FIGURA 13 - Produção e purificação da proteína Ypt1. Digestão de GST-Ypt1 (A). A canaleta 2 contém amostra do produto da digestão da proteína de fusão GST-Ypt1 por trombina. Purificação de Ypt1 (B). A canaleta 1 (FT) contém amostra não ligada à coluna e corresponde à Ypt1 livre purificada. A canaleta 2 (Lav.) contém amostra obtida durante a lavagem da coluna e a canaleta 3 contém amostra coletada durante a etapa de eluição. As setas indicam Ypt1 ou GST. As canaletas 1 (Painel A) e 4 (Painel B) contém o padrão de massa molecular 10kDa (Invitrogen).

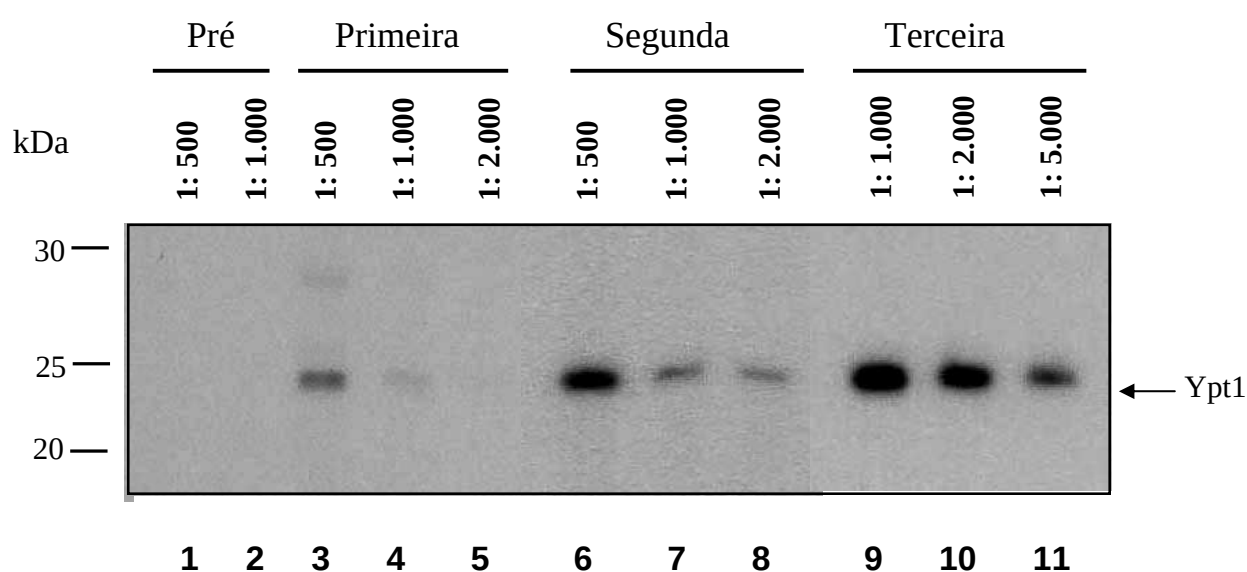


FIGURA 14 - Avaliação do anticorpo policlonal anti-Ypt1 produzido em coelho. Ensaio de western blot utilizando extrato total de levedura e os soros obtidos nas diversas sangrias após imunização com a proteína Ypt1 purificada. O soro pré-imune do coelho foi utilizado nas diluições 1:5000 e 1:1.000 (canaletas 1 e 2). O soro obtido da 1^a sangria foi testado nas diluições 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 (canaletas 3 a 5). As canaletas 6 a 8 mostram os resultados obtidos com a 2^a sangria (diluições 1:500, 1:1.000 e 1:2.000). Nas canaletas 9 a 11 estão apresentadas as diluições 1:1.000, 1:2.000 e 1:5.000 referentes à 3^a sangria. A seta indica a proteína Ypt1.

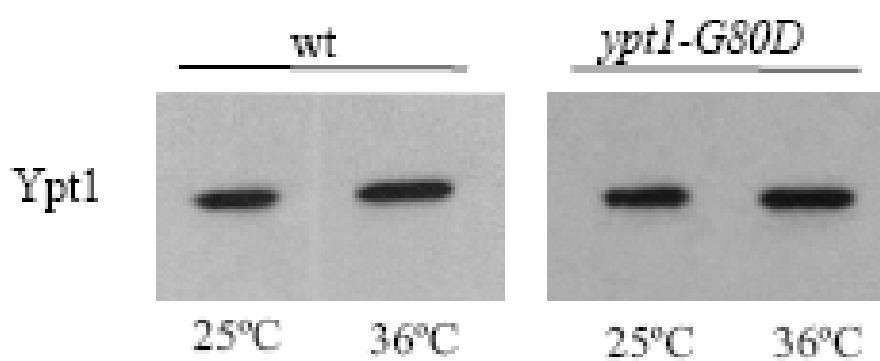


FIGURA 15 - Avaliação da estabilidade de Ypt1 no mutante *ypt1-G80D*. Ensaio de western blot do extrato total da levedura contendo a mutação *ypt1-G80D* (SVL422) e a levedura selvagem (SVL82). A proteína Ypt1 foi detectada com anticorpo anti-Ypt1. A análise da membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S revelou quantidade semelhante de proteínas aplicadas nas canaletas.

4.4 - Verificação da existência de interação física entre Ypt1 e eIF5A

O evento de letalidade sintética pode revelar proteínas que interagem fisicamente (APPLING, 1999). Dessa forma, foi preciso verificar se o evento de letalidade sintética entre *TIF51A* e *YPT1* não é resultado da perda de interação física entre as proteínas eIF5A e Ypt1. Esta possibilidade foi verificada através de ensaios de copurificação.

4.4.1 – Copurificação utilizando GST-Ypt1

A sequência codificadora do gene *YPT1* foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO194 e SVO240, que se hibridizam nas regiões flanqueadoras da região codificadora do gene. O fragmento obtido da PCR foi clonado no sítio da enzima de restrição *Bam*HI do vetor induzível por galactose pYGEX (pSV20), responsável pela expressão do gene *GST* em leveduras. A construção obtida recebeu o nome de pSV489. A funcionalidade desta construção foi determinada pela transformação do mutante condicional *ypt1-A136D* (SVL403) e avaliação da supressão do fenótipo temperatura-sensível em meio seletivo -Ura contendo galactose. O resultado obtido está apresentado na Figura 16, onde pode ser observado que a construção contendo a cópia selvagem do gene *YPT1* foi capaz de restaurar o crescimento do mutante a 36°C. Como controle foi utilizado o mesmo mutante transformado com o vetor vazio pSV20.

A seguir, a levedura SVL55 foi transformada com a construção plasmidial pSV489 e com o vetor vazio. Os transformantes obtidos foram submetidos ao teste de indução para produção da proteína de interesse. Alíquotas das culturas antes e após 3 horas de indução com galactose foram retiradas e submetidas à análise por western blot utilizando anticorpo policlonal anti-GST. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17, na qual se observa a expressão do gene da proteína de fusão GST-Ypt1. As canaletas 1 e 2 correspondem às alíquotas dos lisados obtidos antes da indução. Após as 3 horas de indução, as proteínas GST-Ypt1 (aproximadamente 48kDa) e GST (aproximadamente 27kDa) puderam ser reveladas nas canaletas 3 e 4, respectivamente. Desta forma, o período de 3 horas de indução foi suficiente para garantir a produção da proteína de fusão.

Após a confirmação da indução, extratos foram obtidos a partir de leveduras contendo a construção plasmidial pSV489 (GST-Ypt1) ou o vetor de expressão pSV20. A seguir, quantidades normalizadas destes extratos foram submetidas ao processo de purificação por afinidade à resina de glutationa-sepharose. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Figura 18. O painel inferior apresenta a membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S,

para análise das proteínas purificadas e aplicadas no gel utilizado para o ensaio de western blot. O painel superior, por sua vez, refere-se ao resultado do ensaio western blot, utilizando o soro policlonal anti-eIF5A, que além de eIF5A, reconhece também GST. As canaletas 1 e 2 contêm alíquotas dos sobrenadantes (fração não ligada) obtidos após a purificação das leveduras expressando apenas GST ou GST-Ypt1 (canaletas 1 e 2, respectivamente), nos quais é possível observar a proteína eIF5A. As canaletas 3 e 4 referem-se à copurificação com a proteína GST sozinha e GST-Ypt1, respectivamente. Como pode ser observado, a proteína eIF5A (de aproximadamente 18 kDa) não foi copurificada com a proteína de fusão GST-Ypt1 (canaleta 4). Esses resultados mostram que Ypt1 e eIF5A não interagem fisicamente.

4.4.2 - Copurificação utilizando GST-eIF5A e GST-eIF5A_{K51R}

Para testar o outro lado, lisados celulares obtidos após indução com galactose das leveduras SVL105, SVL106 e SVL110, que expressam respectivamente GST, GST-eIF5A e GST-eIF5A_{K51R}, foram utilizados para copurificação de Ypt1. A proteína eIF5A_{K51R}, alterada no resíduo K51, não sofre hipusinação e portanto não é funcional. Ao extrato celular obtido e quantificado foi adicionado resina de glutathiona-sepharose e o processo de purificação foi realizado como anteriormente. Desta forma, as proteínas GST, GST-eIF5A e GST-eIF5A_{K51R} foram purificadas e seus possíveis ligantes copurificados. A copurificação foi checada por western blot utilizando o anticorpo anti-Ypt1 produzido. O painel inferior da Figura 19 apresenta a membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S, para análise das proteínas purificadas aplicadas no gel utilizado para o western blot. O painel superior, por sua vez, apresenta o western blot da copurificação revelado com soro policlonal anti-Ypt1. As canaletas 1, 2 e 3 contêm alíquotas dos sobrenadantes (fração não ligada) obtidos após a purificação com glutathiona-sepharose, nos quais é possível observar a proteína Ypt1. As canaletas 4, 5 e 6 referem-se à copurificação com a proteína GST sozinha, GST-eIF5A e GST-eIF5A_{K51R}, respectivamente. Como pode ser observado, estas proteínas não permitiram a copurificação de Ypt1, pois nenhuma banda foi revelada em torno de 23kDa, tamanho esperado para esta proteína. Assim, estes resultados confirmam que não existe interação física entre Ypt1 e eIF5A.

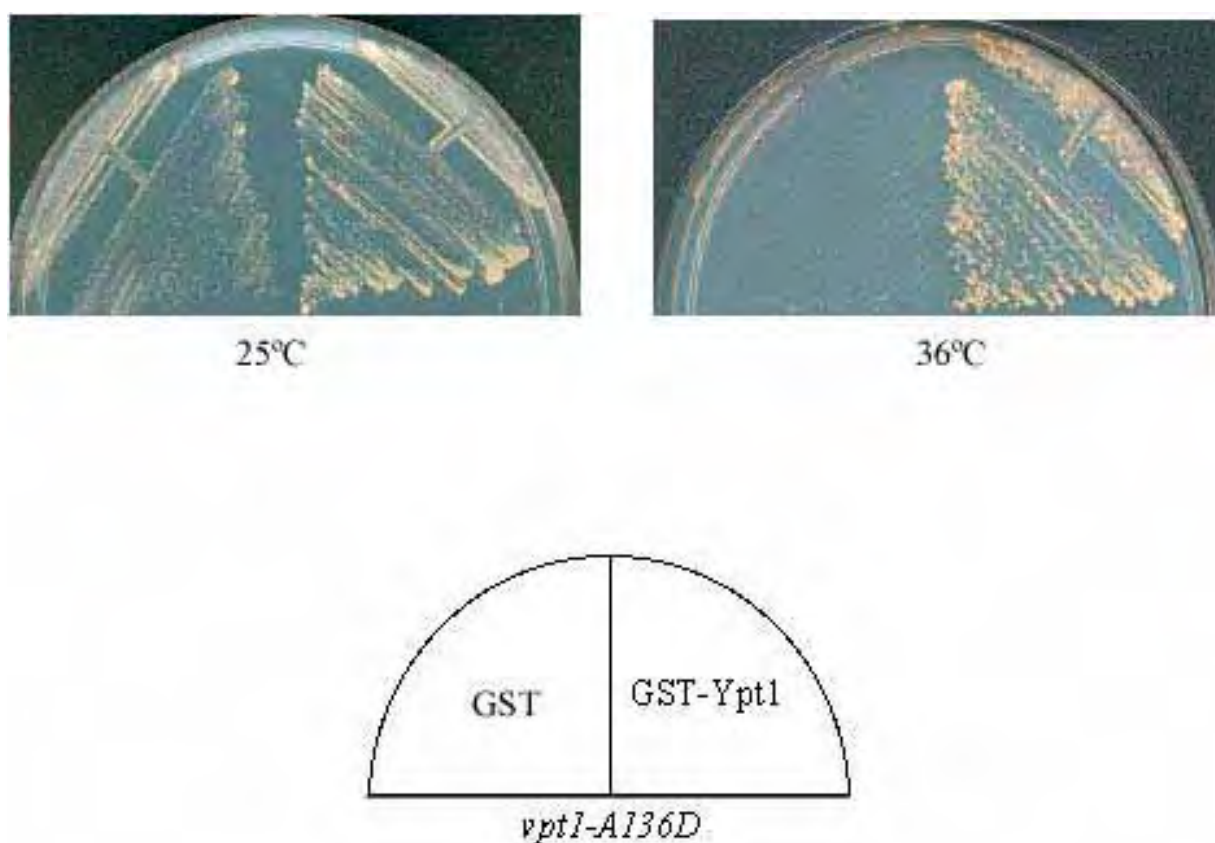


FIGURA 16 - Checagem da funcionalidade da construção contendo o gene *YPT1* em fusão com GST. A capacidade de crescimento em meio -Ura com galactose foi ensaiada utilizando o mutante *ypt1-A136D* (SVL403) transformado com a construção plasmidial contendo o gene *YPT1* em fusão com GST (pSV489). O controle do experimento foi realizado utilizando o mesmo mutante transformado com o vetor vazio (pSV20).

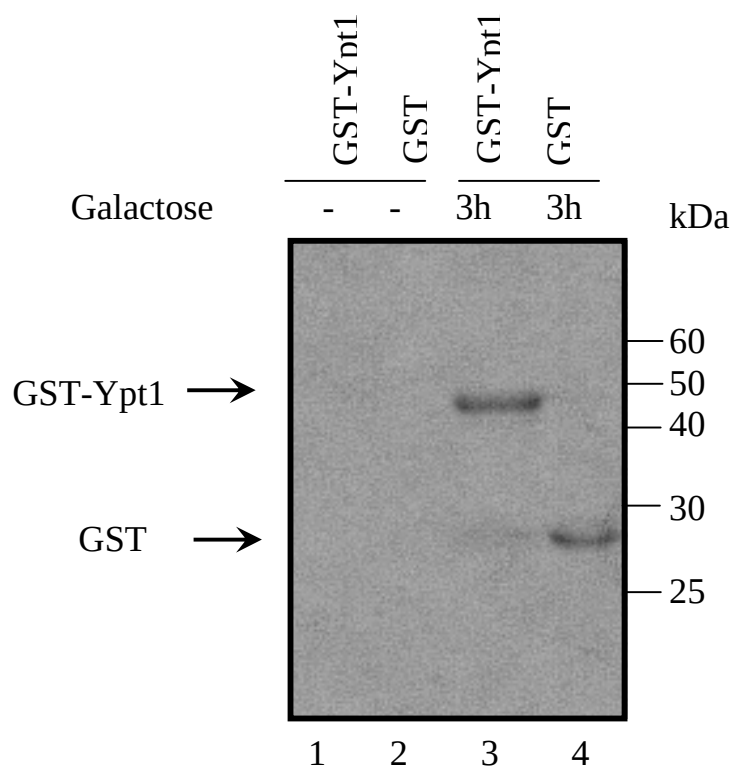


FIGURA 17 - Teste de expressão do gene da proteína de fusão GST-Ypt1 em leveduras. Ensaio de western blot de extratos totais da levedura SVL55 contendo a construção plasmidial pSV489 ou o vetor vazio, obtidos antes (canaletas 1 e 2) e após 3 horas de indução com galactose 2% (canaletas 3 e 4). As proteínas produzidas foram detectadas com anticorpo anti-GST.

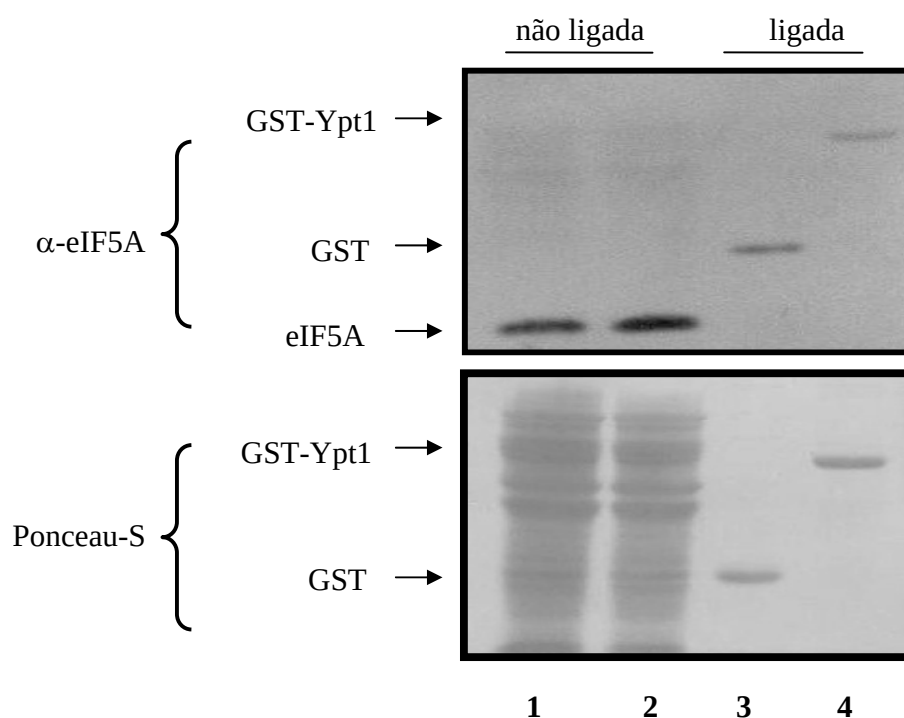


FIGURA 18 - Análise da interação física entre eIF5A e a proteína de fusão GST-Ypt1 por copurificação. Ensaio de western blot das amostras obtidas após ensaio de copurificação utilizando a levedura SVL55 produzindo GST (canaleta 1, fração não ligada e canaleta 3, fração ligada) ou GST-Ypt1 (canaleta 2, fração não ligada e canaleta 4, fração ligada). O ensaio de western blot foi revelado com anticorpo anti-eIF5A.

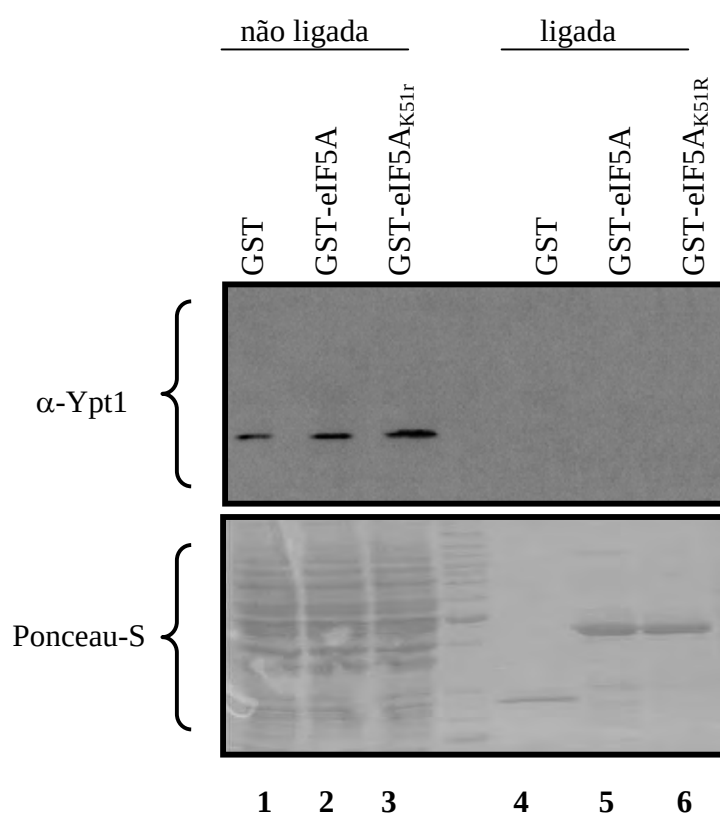


FIGURA 19 - Análise da interação física entre Ypt1 e a proteína de fusão GST-eIF5A por copurificação. Ensaio de western blot das amostras obtidas após ensaio de copurificação utilizando a levedura SVL55 produzindo GST (canaleta 1, fração não ligada e canaleta 4, fração ligada), GST-eIF5A (canaleta 2, fração não ligada e canaleta 5, fração ligada) ou GST-eIF5A_{K51R} (canaleta 3, fração não ligada e canaleta 6 fração ligada). O ensaio de western blot foi revelado com anticorpo anti-Ypt1.

4.5 - Análise do funcionamento da via secretória nos mutantes condicionais de Ypt1 eIF5A

A situação de letalidade sintética pode ser gerada também entre genes que codificam proteínas que participam do mesmo processo metabólico (APPLING, 1999). Desta forma, procurou-se verificar se o mutante de Ypt1 (*ypt1-G80D*) e os mutantes de eIF5A apresentam defeitos na via secretória. Essa análise permitiu também o aprofundamento da caracterização do mutante obtido em nosso laboratório (*ypt1-G80D*), procurando verificar se este mutante possui o mesmo padrão de bloqueio da via secretória verificado nos mutantes *ypt1-1* e *ypt1-A136D* (BACON et al., 1989; JEED et al., 1995).

A funcionalidade da via secretória em *S. cerevisiae* pode ser verificada através da monitoração de proteínas que se utilizam desta via para sua maturação e endereçamento celular. A proteína carboxipeptidase Y (CPY) é uma das proteínas utilizadas para essa finalidade.

CPY é uma serina carboxipeptidase vacuolar, codificada pelo gene *PRC1* (HAYASHI, 1976). Um esquema ilustrativo do processo de maturação dessa enzima pode ser verificado na Figura 20. Inicialmente, CPY é sintetizada na forma de procarboxipeptidase Y (proCPY) e direcionada para o vacúolo via Golgi, após sofrer modificações. ProCPY, também chamada de forma p1 (512 aminoácidos), possui 91 resíduos a mais na região amino-terminal quando comparada com a CPY madura (421 aminoácidos). Essa extensão presente na proCPY é chamada de propeptídeo, o qual é essencial para o correto enovelamento da proteína e para a manutenção na forma inativa até que esta atinja seu destino final (vacúolo). A forma p1 é encontrada no retículo endoplasmático e já possui oligossacarídeos ligados às cadeias laterais de determinados resíduos de asparagina (HASILIK e TANNER, 1978; STEVENS et al., 1982). A formação de um segundo precursor (p2) acontece no Golgi, após a adição de resíduos de manose aos oligossacarídeos adicionados no retículo endoplasmático. Com essa adição, a proteína adquire uma massa de 2kDa e passa de 67 para 69kDa (VIDA et al., 1990). A forma madura da CPY (mCPY) é produzida por remoção proteolítica do propeptídeo (91 resíduos) de 8kDa, imediatamente após a chegada da forma p2 ao vacúolo (HASILIK e TANNER, 1978; VIDA et al., 1990).

O processamento de CPY foi acompanhado no mutante *ypt1-G80D* e também nos mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2*, *tif51A-3* e *tif51A-ts1159* nas temperaturas permissiva e não permissiva, por meio de ensaios de western blot com o emprego de anticorpo anti-CPY (ROCKLAND Immunochemicals for Research). O extrato protéico obtido da levedura SVL403 foi utilizado como controle positivo. Essa levedura possui uma mutação no gene *YPT1* (*ypt1-A136D*), que

acarreta um bloqueio no funcionamento da via secretória. Como controle negativo, foi utilizado o extrato protéico obtido da levedura selvagem SVL82, a qual apresenta funcionalidade normal da via secretória. Como controle de carregamento foi utilizada a proteína eEF2, revelada com anticorpo anti-eEF2, produzido em nosso laboratório. O painel A da Figura 21 apresenta o resultado obtido para o mutante *ypt1-G80D*. Como pode ser observado, esse mutante acumula a forma p1 de CPY na temperatura não-permissiva e, dessa forma, apresenta o mesmo padrão de bloqueio da via secretória encontrado no mutante *ypt1-A136D*, utilizado como controle positivo deste ensaio. Os resultados obtidos para os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-2* estão apresentados no painel B da mesma figura. Como pode ser observado, apenas a forma madura (m) de CPY foi detectada nos mutantes de *TIF51A* utilizando esse tipo de análise, não evidenciando defeitos na via secretória. O mesmo resultado foi observado para os mutantes *tif51A-3* e *tif51A-ts1159* (dados não mostrados). Esses resultados revelam que a função de eIF5A não está relacionada diretamente com a via secretória.

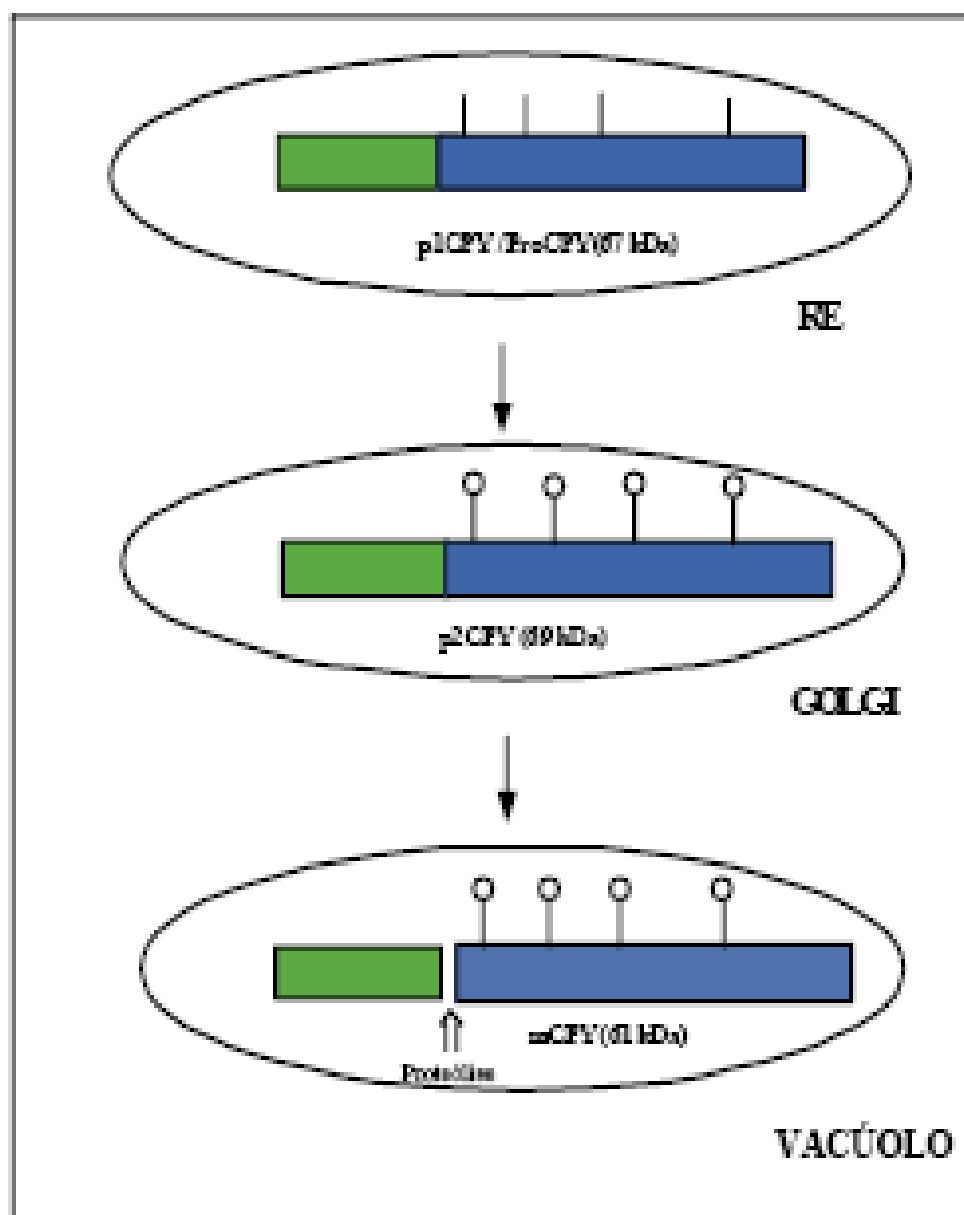


FIGURA 20 – Esquema da compartimentalização e processamento de CPY *in vivo*. Esquema apresentando as formas compartimentalizadas de CPY durante sua passagem pelo retículo endoplasmático (RE), Golgi e vacúolo. A região em verde representa o propeptídeo amino-terminal (91 aminoácidos) e a região em azul representa a fração relativa a CPY madura (421 aminoácidos). As linhas verticais, presentes a partir da forma p1, representam os quatro conjuntos de oligossacarídeos adicionados no RE e os círculos, presentes a partir da forma p2, referem-se aos resíduos de manose adicionados no Golgi (VIDA et al., 1990).

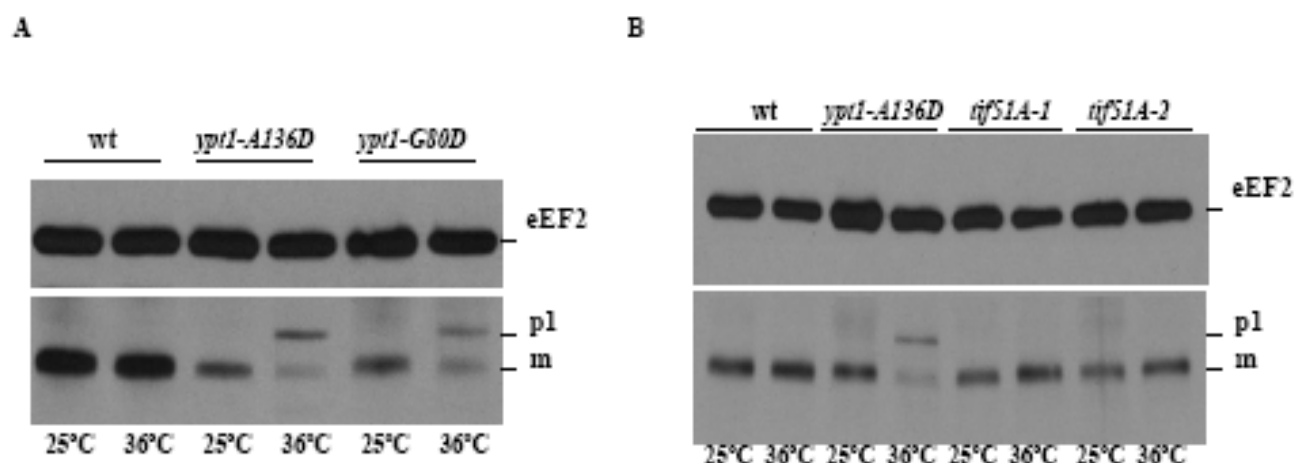


FIGURA 21 - Análise do processamento de CPY produzida constitutivamente pelos *mutantes ypt1-G80D, tif51A-1 e tif51A-2*. Ensaio de western blot do extrato total do mutante *ypt1-G80D* (SVL422) (A) e dos mutantes *tif51A-1* (SVL14) e *tif51A-2* (SVL26) (B) crescidos nas temperaturas permissiva e não permissiva. Nos dois painéis, a levedura selvagem (SVL82) e a levedura contendo a mutação *ypt1-A136D* (SVL403) foram utilizadas como controle negativo e positivo para o experimento, respectivamente. Como controle de carregamento foi utilizado o fator de elongação 2 (eEF2), revelado pelo anticorpo anti-eEF2 produzido em nosso laboratório. As diferentes formas da proteína CPY (p1=não processada e m=madura) foram detectadas com anticorpo anti-CPY.

4.6 - Avaliação da localização subcelular de eIF5A e Ypt1

Com o objetivo de fortalecer a interação funcional entre eIF5A e Ypt1, foi investigado se essas duas proteínas apresentavam a mesma localização subcelular em *S. cerevisiae*. A localização de Ypt1 já foi descrita por outros autores (SEGEV et al., 1988; JEED et al., 1995). Entretanto, no caso de eIF5A, sabe-se apenas que esta proteína localiza-se no citoplasma com uma concentração perinuclear, possivelmente no retículo endoplasmático (VALENTINI et al., 2002), uma vez que, eIF5A colocaliza com calnexina, uma proteína residente de retículo endoplasmático (SHI et al., 1996).

A localização subcelular de eIF5A e Ypt1 em levedura selvagem (SVL82) foi realizada por fracionamento celular através de ultracentrifugação diferencial que permite a obtenção de uma fração citosólica (sobrenadante) e uma fração contendo as membranas (precipitado). Neste experimento, a presença das proteínas de interesse nessas frações foi revelada por western blot. Como controles das frações de membrana e citosólica, foram utilizadas as proteínas Sec63 e hexoquinase, respectivamente. A proteína Sec63 é uma proteína residente de retículo endoplasmático e foi visualizada utilizando-se um anticorpo anti-GFP (ROCKLAND Immunochemicals for Research) e a levedura selvagem transformada com o plasmídeo pSV234, o qual expressa constitutivamente a proteína de fusão funcional GFP-Sec63 (PRINZ et al., 2000). A proteína citoplasmática hexoquinase está envolvida com metabolismo de glicose e foi evidenciada com o anticorpo anti-hexoquinase (ROCKLAND Immunochemicals for Research). Como pode ser verificado no painel A da Figura 22, Ypt1 e eIF5A encontram-se tanto na fração citoplasmática quanto na fração correspondente às membranas. Os resultados obtidos confirmam os dados que Ypt1 se encontra livre no citoplasma ou ligada a membranas através de prenilação (SEGEV et al., 1988; JEED et al., 1995). Esses resultados mostram também que eIF5A apresenta-se livre no citoplasma e ligada, de alguma forma, a membranas. Nossos dados, em conjunto com a literatura, fortalecem a provável ligação de eIF5A ao retículo endoplasmático.

4.7 – Avaliação da localização subcelular de eIF5A na presença de EDTA ou RNase A

Resultados recentes têm fortalecido o papel de eIF5A no processo de tradução e foi demonstrado que eIF5A associa-se fisicamente a ribossomos traducionalmente ativos (ZANELLI et al., 2006; JAO e CHEN, 2006). Dessa forma, a localização de eIF5A na fração de membranas poderia ser devido aos ribossomos ligados à superfície do retículo endoplasmático. Assim, a fração de membranas derivadas de levedura selvagem foi tratada com EDTA ou RNase A,

tratamentos que resultam na perda de atividade traducional dos ribossomos, procurando evidenciar se essas condições afetam a ligação de eIF5A a membranas. Como pode ser verificado no painel B da Figura 22, eIF5A deixa de aparecer no precipitado quando as membranas sofrem o tratamento com EDTA ou RNase A. Dessa forma, estes resultados sugerem que eIF5A associa-se à fração de membranas através dos ribossomos e não diretamente à membrana. Estes resultados são interessantes e estão de acordo com outros resultados do nosso laboratório que mostram eIF5A interagindo fisicamente com ribossomos traducionalmente ativos (ZANELLI et al., 2006).

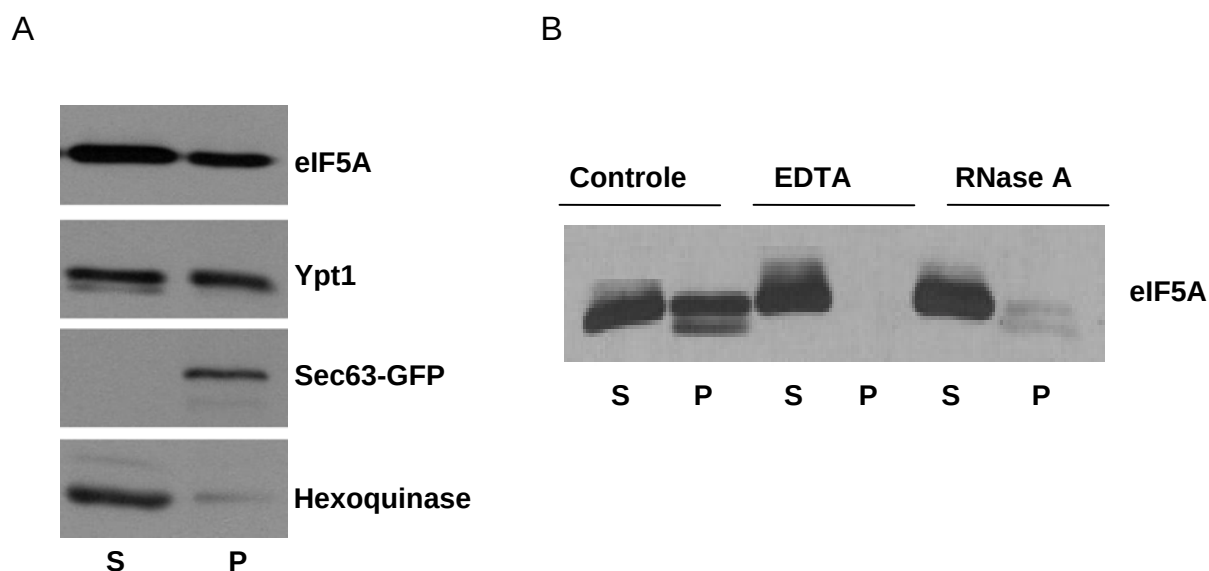


FIGURA 22 - Localização subcelular de eIF5A e Ypt1 e alteração da associação de eIF5A com membranas na presença de EDTA ou RNase A. (A) Extrato total da levedura selvagem foi submetido à ultracentrifugação diferencial, gerando uma fração citoplasmática (S) e uma fração referente às membranas (P). As proteínas indicadas foram detectadas por ensaios de western blot. (B) A fração correspondente às membranas foi tratada com EDTA ou RNase A para inibição da atividade traducional dos ribossomos associados. No controle, a fração de membranas não sofreu nenhum tratamento. A seguir, foi realizada uma nova ultracentrifugação diferencial, gerando sobrenadante (S) e precipitado (P). A proteína eIF5A foi detectada por western blot.

4.8 - Análise da sensibilidade dos mutantes de *YPT1* a inibidores de síntese protéica

Como a interação genética de letalidade sintética estabelecida entre os genes *TIF51A* e *YPT1* revela uma relação funcional entre as proteínas codificadas por esses genes, tornou-se necessário verificar tanto a relação de eIF5A com a via secretória, quanto a relação de Ypt1 com a síntese protéica. Como visto anteriormente, a participação direta de eIF5A na via secretória não foi verificada por experimentos de processamento de CPY. Para avaliar a relação de Ypt1 com a tradução foram utilizados diferentes antibióticos capazes de inibir a síntese protéica.

Dessa forma, os mutantes *ypt1-G80D* (SVL422), *ypt1-1* (SVL404), *ypt1-2* (SVL355), *ypt1-A136D* (SVL403), *ypt1-3* (SVL357), *ypt1-ts* (SVL360) e *ypt1-Q67L* (SVL579) foram crescidos em meio contendo os inibidores de tradução paromomicina, anisomicina ou cicloheximida, com o objetivo de verificar se mutações em *YPT1* causam sensibilidade à inibição da maquinaria de síntese protéica.

Anisomicina e cicloheximida são inibidores da peptidiltransferase (OEN et al., 1974; CARRASCO et al., 1973). Paromomicina está relacionada com a fidelidade traducional, ou seja, na presença de paromomicina os ribossomos cometem erros na incorporação de aminoácidos durante a síntese protéica (SANDBAKEN e CULBERTSON, 1988).

Os mutantes de *YPT1* testados não mostraram sensibilidade à anisomicina e à cicloheximida (dados não mostrados). Entretanto, mostraram sensibilidade à paromomicina. Como pode ser verificado na Figura 23, os mutantes *ypt1-G80D*, *ypt1-1*, *ypt1-2*, *ypt1-A136D* e *ypt1-ts* apresentaram sensibilidade variada. Destaca-se que o mutante *ypt1-1* apresentou um fenótipo bastante severo. Os mutantes *ypt1-3* e *ypt1-Q67L* não apresentaram sensibilidade significativa nesse meio. Como controle do experimento, foram utilizadas a levedura selvagem (SVL82) e o mutante *tif51A-3* (SVL32), o qual apresenta sensibilidade ao inibidor utilizado (ZANELLI et al., 2006). Esses resultados sugerem que determinadas alterações na tradução têm efeito pronunciado sobre alguns mutantes de *YPT1* e reforçam a relação funcional entre via secretória e síntese protéica.

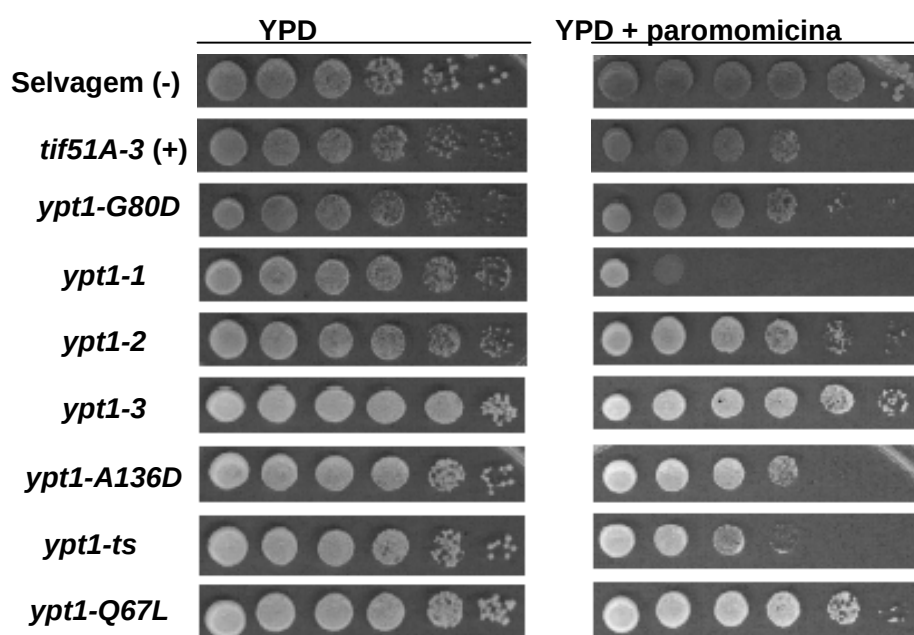


FIGURA 23 – Análise da sensibilidade dos mutantes de *YPT1* à paromomicina, um inibidor de síntese protéica. Os mutantes *ypt1-G80D* (SVL422), *ypt1-1* (SVL404), *ypt1-2* (SVL355), *ypt1-A136D* (SVL403), *ypt1-3* (SVL357), *ypt1-ts* (SVL360) e *ypt1-Q67L* (SVL579) foram crescidos, após diluição seriada das culturas, em meio de cultura contendo paromomicina. A levedura selvagem (SVL82) e o mutante *tif51A-3* (SVL32) foram utilizados como controles negativo e positivo do experimento, respectivamente.

4.9 – Verificação da existência de novas interações genéticas entre *YPT1* e *TIF51A*

Novas interações genéticas foram avaliadas entre os genes *YPT1* e *TIF51A*, procurando fortalecer a interação funcional entre Ypt1 e eIF5A.

4.9.1 – Avaliação da supressão da inviabilidade dos genes envolvidos na letalidade sintética

A habilidade de um gene em suprimir a completa deleção de um outro gene sugere que a ação do produto do gene supressor seja necessária após a ação do produto do gene deletado (SAPPERSTEIN et al., 1996). Dessa forma, foram realizados experimentos de supressão dos alelos nulos dos dois genes em estudo.

4.9.1.1 – Supressão da inviabilidade de *TIF51A*

A supressão da inviabilidade de *TIF51A* pela expressão de *YPT1* em alto número de cópias foi testada empregando-se a levedura SVL132, a qual contém o gene *TIF51A* nocauteado (*tif51A::HIS3*). A viabilidade desta levedura é mantida pela presença de um plasmídeo *URA3/CEN* possuindo a cópia selvagem de *TIF51A* (pSV138). Dessa forma, o crescimento em meio contendo 5-FOA é impossível para tal levedura. Com base nestes dados, a levedura em questão foi transformada com um plasmídeo contendo a marca *LEU2* e expressando *YPT1* em alto número de cópias (pSV450). Este plasmídeo foi obtido pela mesma estratégia de obtenção do pSV451 descrita anteriormente. Um fragmento contendo *YPT1* de 1,3kb foi retirado do pSV428 através da ação da enzima *XbaI* e subclonado no vetor pSV64 aberto com a enzima compatível *SpeI*. A construção obtida (pSV450) foi diagnosticada e teve sua funcionalidade confirmada (dados não apresentados). Para controle do experimento, a mesma levedura foi transformada com o vetor vazio (pSV64) e com o plasmídeo *LEU2* contendo o gene *TIF51A* (pSV108). Os transformantes foram crescidos em meio desprovido de leucina e passados para o meio contendo 5-FOA. Como pode ser observado na Figura 24, o transformante possuindo *YPT1* não foi capaz de crescer neste meio, indicando que este gene em alto número de cópias não consegue suprimir a deleção de *TIF51A*.

4.9.1.2 – Supressão da inviabilidade de *YPT1*

Por outro lado, para testar se *TIF51A* em alto número de cópias é capaz de suprimir a inviabilidade de *YPT1*, foi necessário inicialmente obter uma levedura contendo o gene *YPT1* nocauteado.

O nocauteamento do gene *YPT1* foi realizado por recombinação homóloga, empregando um produto amplificado por PCR contendo o gene *HIS3* flanqueado pelas regiões 5' e 3' do gene *YPT1* (45 nucleotídeos de cada região flanqueadora). Este produto de PCR foi introduzido na levedura diplóide selvagem SVL80. Diversos transformantes foram obtidos. Três candidatos tiveram o DNA genômico extraído e submetido a análise da confirmação do nocauteamento por PCR. A primeira reação de PCR confirmatória foi realizada utilizando oligonucleotídeos que hibridizam em regiões externas ao sítio de integração (SVO193 e SVO194). O Painel A da Figura 25 apresenta um esquema de fácil compreensão da estratégia da confirmação do nocauteamento por PCR. É possível notar que quando ocorre o nocauteamento, um fragmento de 1,7kb é obtido. Por outro lado, um fragmento de 1,3kb é obtido a partir do alelo selvagem. O Painel B da Figura 25 apresenta os resultados obtidos na análise dos diplóides selecionados. Como controle, foi utilizado o DNA genômico obtido do diplóide não submetido à integração (canaleta 1). Como pode ser observado, dos três diplóides selecionados para a confirmação do nocauteamento, dois foram positivos para o nocauteamento do gene *YPT1* (canaletas 2 e 4).

Para confirmar o nocauteamento, foi realizada uma segunda reação de PCR para os dois candidatos positivos na reação anterior. Nesta reação confirmatória, foram empregados os oligonucleotídeos SVO193 e SVO19, sendo que este último é capaz de hibridizar na região codificadora do gene *HIS3*. Apenas no caso de nocauteamento, um fragmento de 0,9kb é obtido (Painel A da Figura 26). Os resultados obtidos podem ser observados no Painel B da Figura 26. Os dois candidatos analisados tiveram o nocauteamento confirmado pela presença deste fragmento (canaletas 1 e 2), o qual está ausente no caso do diplóide selvagem (canaleta 3).

Um dos diplóides confirmados foi transformado com um plasmídeo *URA3/CEN* possuindo a cópia selvagem de *YPT1* (pSV428). Após isso, o diplóide foi submetido a esporulação, dissecação e análise de tétrades. A Figura 27 apresenta o crescimento de cinco tétrades em meio YPD, em meio desprovido de histidina e em meio contendo 5-FOA. Como esperado, a segregação da marca *HIS3* e do crescimento em meio contendo 5-FOA foi 2:2. As leveduras haplóides possuindo *YPT1* nocauteado foram incapazes de sobreviver na ausência do plasmídeo, confirmando a essencialidade desse gene.

DNA genômico das leveduras haplóides resultantes da tétrade 1 foi obtido e submetido a confirmação do nocauteamento por PCR, empregando os oligonucleotídeos SVO19 e SVO193. Como pode ser observado na Figura 28, as leveduras resultantes dos esporos (a) e (b) possuem o alelo *YPT1* nocauteado (*ypt1::HIS3*) (canaletas 3 e 4) e as leveduras resultantes dos esporos (c) e (d) possuem o alelo selvagem de *YPT1* (canaletas 5 e 6). Na canaleta 1 pode ser observada a

presença do alelo nocauteado (*ypt1::HIS3*) na levedura diplóide. A levedura resultante do esporo (a) foi escolhida para a análise da supressão da inviabilidade e recebeu o nome de SVL441.

A levedura SVL441 (*ypt1::HIS3*) foi transformada com um plasmídeo contendo a marca *LEU2* e expressando *TIF51A* em alto número de cópias (pSV108). Como controle do experimento, a mesma levedura foi transformada com o vetor vazio (pSV64) e com o plasmídeo contendo o gene *YPT1* (pSV450). Os transformantes foram crescidos em meio desprovido de leucina e em meio contendo 5-FOA. Como pode ser observado na Figura 29, leveduras possuindo *TIF51A* não foram capazes de crescer neste meio, indicando que este gene em alto número de cópias também não consegue suprimir a deleção de *YPT1*.

4.9.2 – Avaliação da letalidade sintética entre o mutante *tif51A-3* e outros mutantes de *YPT1*.

Uma vez que letalidade sintética foi revelada entre *tif51A-3* e *ypt1-G80D*, seria interessante verificar se essa interação genética está restrita a esses alelos ou se ocorre também entre outros alelos mutados desses genes.

Assim, a levedura contendo o alelo *tif51A-3* (SVL32 ou SVL102) foi cruzada com outros mutantes de *YPT1* descritos na literatura: *ypt1-1* (SVL404), *ypt1-2* (SVL355), *ypt1-3* (SVL357), *ypt1-A136D* (SVL403), *ypt1-ts* (SVL360) e *ypt1-Q67L* (SVL579). A Tabela 5 apresenta as mutações contidas nos diferentes mutantes de *YPT1*, bem como alguns dos fenótipos descritos até o momento. Os diplóides foram transformados com um plasmídeo contendo o gene *YPT1* e a marca *URA3* (pSV451). Após dissecação e análise de tétrades, os duplos mutantes foram selecionados e a presença da letalidade foi evidenciada em meio contendo 5-FOA. O painel A da Figura 30 mostra os resultados obtidos em meio 5-FOA dos mutantes duplos obtidos. Como pode ser observado, a situação de letalidade sintética foi revelada com todos os mutantes de *YPT1* testados, com a exceção do mutante *ypt1-3*. Esses resultados estão apresentados também na Tabela 5.

4.9.3 – Avaliação da letalidade sintética entre o mutante *ypt1-G80D* com outros mutantes de *TIF51A*.

Por outro lado, com o objetivo de verificar se o novo mutante gerado apresenta letalidade com os outros mutantes de *TIF51A*, a levedura mutante gerada (SVL422) contendo *ypt1-G80D* foi cruzada com SVL14 (*tif51A-1*), SVL26 (*tif51A-2*) e SVL248 (*tif51A-ts1159*). Como controle positivo, o mutante *ypt1-G80D* (SVL422) foi também cruzado como o mutante contendo o alelo

tif51A-3 (SVL32), utilizado no rastreamento de letalidade sintética. Os diplóides gerados foram transformados com pSV451. Após a obtenção dos duplos mutantes, a presença da letalidade pôde ser verificada em meio contendo 5-FOA. O painel B da Figura 30 apresenta os resultados obtidos da análise dos mutantes duplos obtidos. Assim, foi possível definir que o mutante *ypt1-G80D* apresenta letalidade com os outros mutantes de *TIF51A*. A Tabela 6 apresenta as mutações contidas nos diferentes mutantes de *TIF51A*, seus fenótipos e resume os resultados de letalidade sintética com *ypt1-G80D*.

4.9.4 – Avaliação da supressão dos mutantes condicionais de *YPT1* por *TIF51A* em alto número de cópias

Para estabelecer uma outra forma de interação genética entre *TIF51A* e *YPT1*, foi avaliada a capacidade desses genes em suprimir do fenótipo de termosensibilidade. Os mutantes de *YPT1* que apresentam fenótipos condicionais *ypt1-G80D* (SVL422), *ypt1-1* (SVL404), *ypt1-3* (SVL579), *ypt1-A136D* (SVL403) e *ypt1-ts* (SVL360) foram transformados com um plasmídeo expressando *TIF51A* em alto número de cópias, pSV107 (*TIF51A/URA3/2μ*). Após diluição seriada, os transformantes foram submetidos ao crescimento nas temperaturas permissiva e não permissiva definida para cada mutante, apresentada na Tabela 5. Como controle negativo e positivo do experimento, cada mutante foi transformado com o vetor vazio pSV65 (*URA3/2μ*) e com plasmídeo contendo pSV451 (*YPT1/URA3/2μ*), respectivamente. A Figura 31 mostra os resultados obtidos nesta análise. Como pode ser comprovado, a situação de supressão foi revelada com todos os mutantes condicionais de *YPT1* testados, inclusive com o mutante *ypt1-3*, o qual não foi letal sintético com *tif51A-3*. Esses resultados também estão resumidos na Tabela 5.

4.9.5 – Avaliação da supressão dos mutantes condicionais de *TIF51A* por *YPT1* em alto número de cópias

Por outro lado, com o objetivo de verificar se ocorria supressão fenotípica dos mutantes de *TIF51A* quando *YPT1* fosse expresso em alto número de cópias, os mutantes *tif51A-1* (SVL14), *tif51A-2* (SVL26), *tif51A-3* (SVL32) e *tif51A-ts1159* (SVL248) foram transformados com o plasmídeo contendo *YPT1* pSV451 (*YPT1/URA3/2μ*). Os transformantes foram selecionados e após diluição seriada foram submetidos ao crescimento nas temperaturas permissiva e não permissiva para cada mutante. Como controle negativo e positivo do experimento, cada mutante foi transformado com os plasmídeos pSV65 (*URA3/2μ*) e pSV107 (*TIF51A/URA3/2μ*), respectivamente. Como pode ser observado na Figura 32, *YPT1* não suprime

o fenótipo de termossensibilidade dos mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3*. O mesmo resultado foi obtido para o mutante *tif51A-ts1159* (dados não apresentados). Esses resultados estão resumidos na Tabela 6.

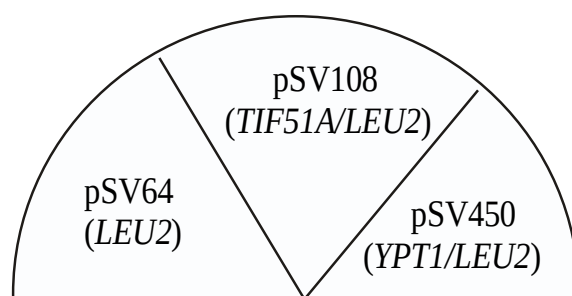
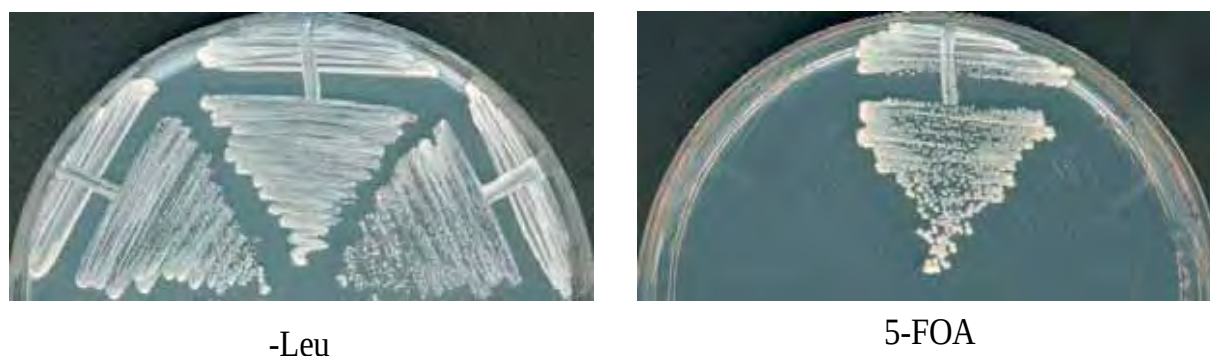


FIGURA 24 – Avaliação da supressão do alelo nocauteado de *TIF51A* (*tif51A::HIS3*) por *YPT1* em alto número de cópias. A levedura SVL132, possuindo o gene *TIF51A* nocauteado (*tif51A::HIS3*) e mantida pela presença do plasmídeo *URA3/CEN/TIF51A* (pSV138), foi transformada com um plasmídeo contendo a marca *LEU2* e expressando *YPT1* em alto número de cópias (pSV450), com o vetor vazio (pSV64) e com o plasmídeo contendo o gene *TIF51A* (pSV108). Os transformantes foram crescidos em meio desprovido de leucina e passados para o meio contendo 5-FOA.

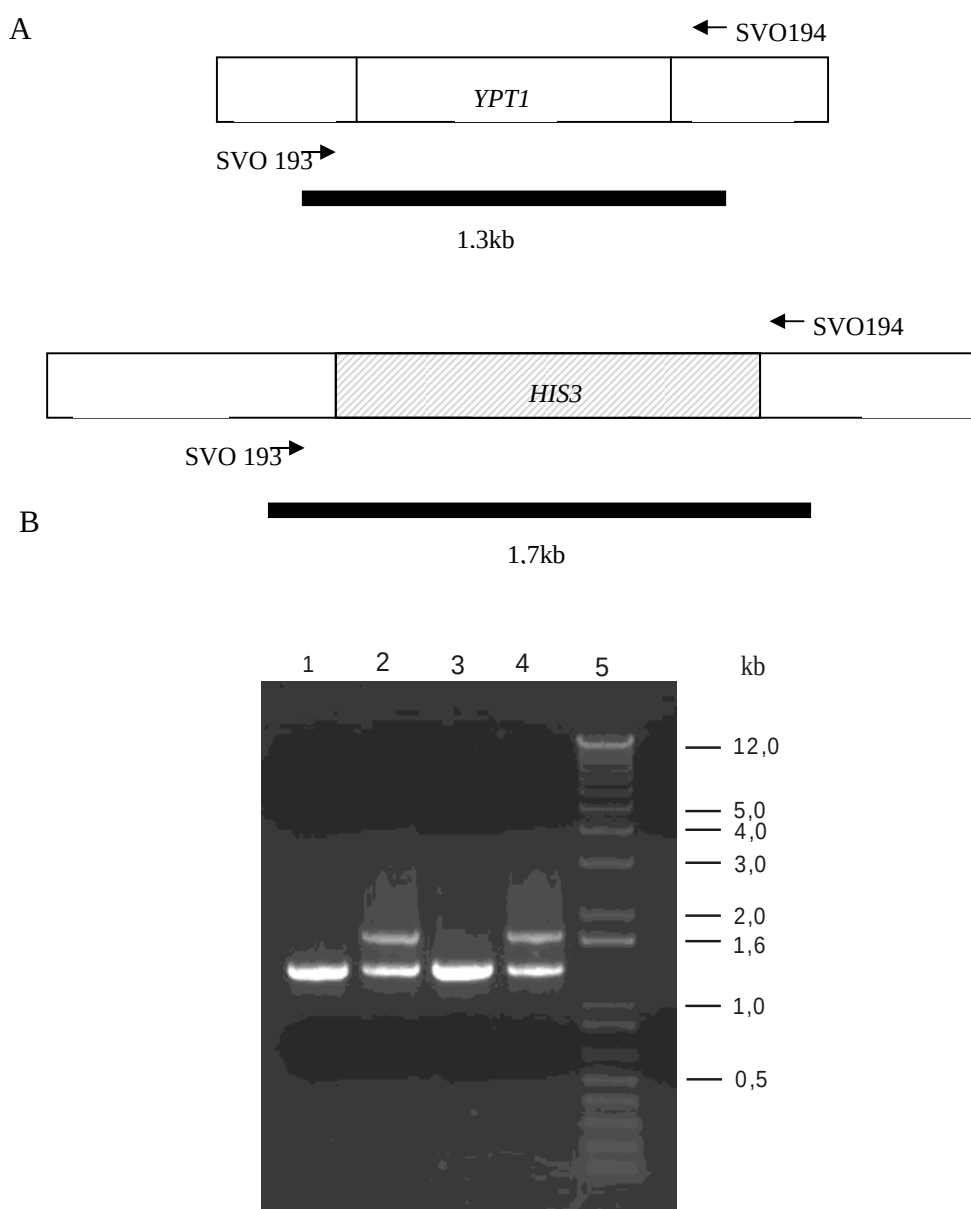
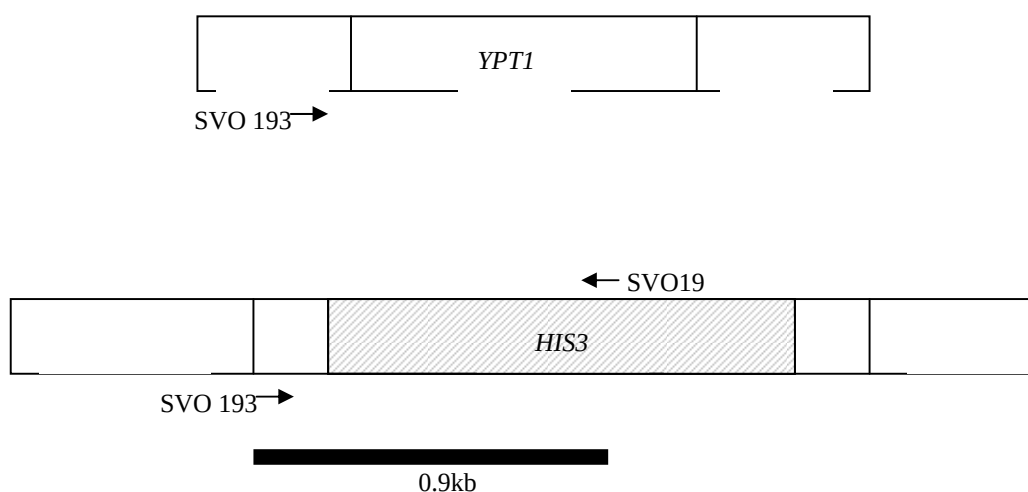


FIGURA 25 – Confirmação por PCR do nocauteamento do gene *YPT1*, utilizando primers flanqueadores de *YPT1*. (A) Esquema mostrando os fragmentos obtidos na reação de PCR empregando primers externos ao gene *HIS3*, que se hibridizam nas regiões flanqueadoras de *YPT1*. No caso de nocauteamento, dois fragmentos são obtidos (1,7kb e 1,3kb). Quando não ocorre nocauteamento, apenas o fragmento de 1,3kb é obtido. (B) DNA genômico do diplóide selvagem (canaleta 1) e de três diplóides selecionados (canaletas 2, 3 e 4) foram submetidos ao ensaio de confirmação do nocauteamento por PCR. A canaleta 5 corresponde ao padrão de tamanho molecular “1 Kb ladder plus” (Invitrogen).

A



B

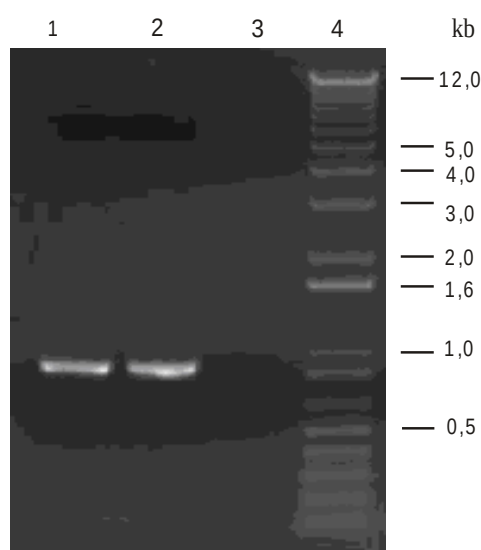


FIGURA 26 - Confirmação por PCR do nocauteamento do gene *YPT1*, utilizando primer interno de *HIS3*. (A) Esquema mostrando o fragmento obtido na reação de PCR empregando um primer interno ao gene *HIS3* (SVO19) e um primer que se hibridiza na região flangeadora de *YPT1* (SVO193). O fragmento de 0,9kb é obtido apenas quando ocorre o nocauteamento. (B) DNA genômico dos diplóides confirmados na reação anterior (canaletas 1 e 2) e do diplóide selvagem (canaleta 3) foram submetidos ao ensaio de confirmação do nocauteamento por PCR. A canaleta 4 corresponde ao padrão de tamanho molecular “1 Kb ladder plus” (Invitrogen).

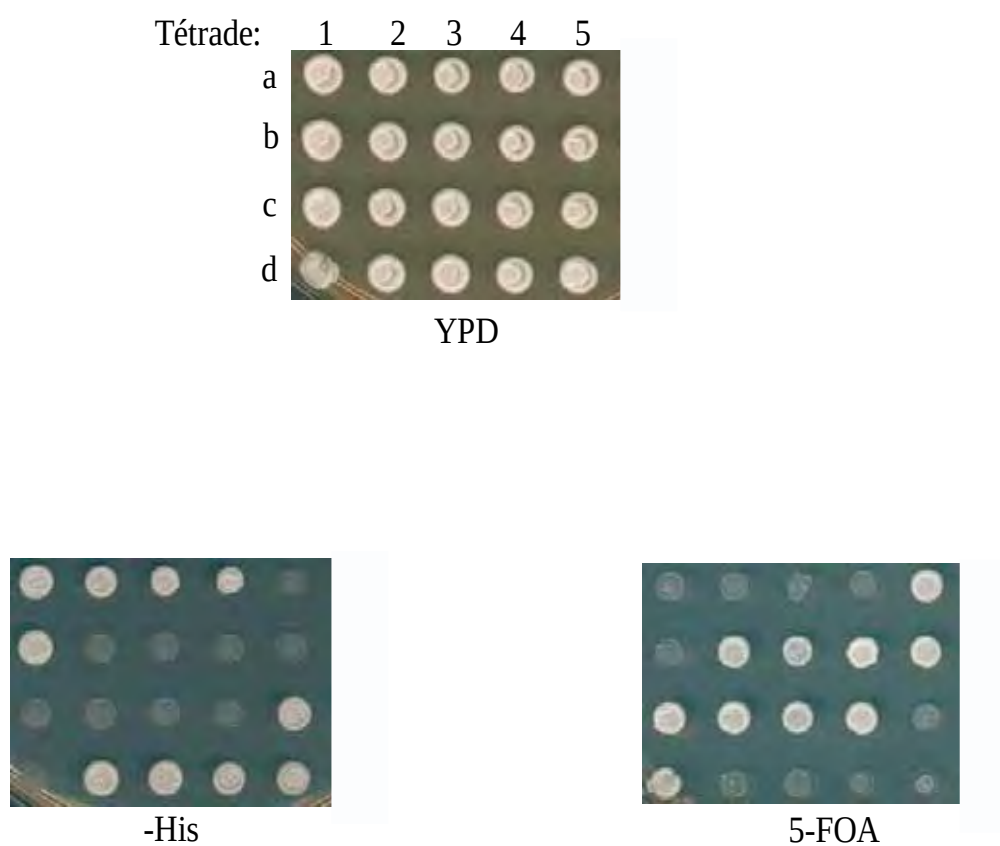


FIGURA 27 – Obtenção de uma levedura contendo o gene *YPT1* nocauteado (*ypt1::HIS3*).

Um diplóide nocauteado foi transformado com o plasmídeo pSV428 (*YPT1/URA3/CEN*) e, após a esporulação, dissecado. As colônias derivadas de cinco tétrades foram crescidas em meio YPD, em meio desprovido de histidina e em meio contendo 5-FOA.

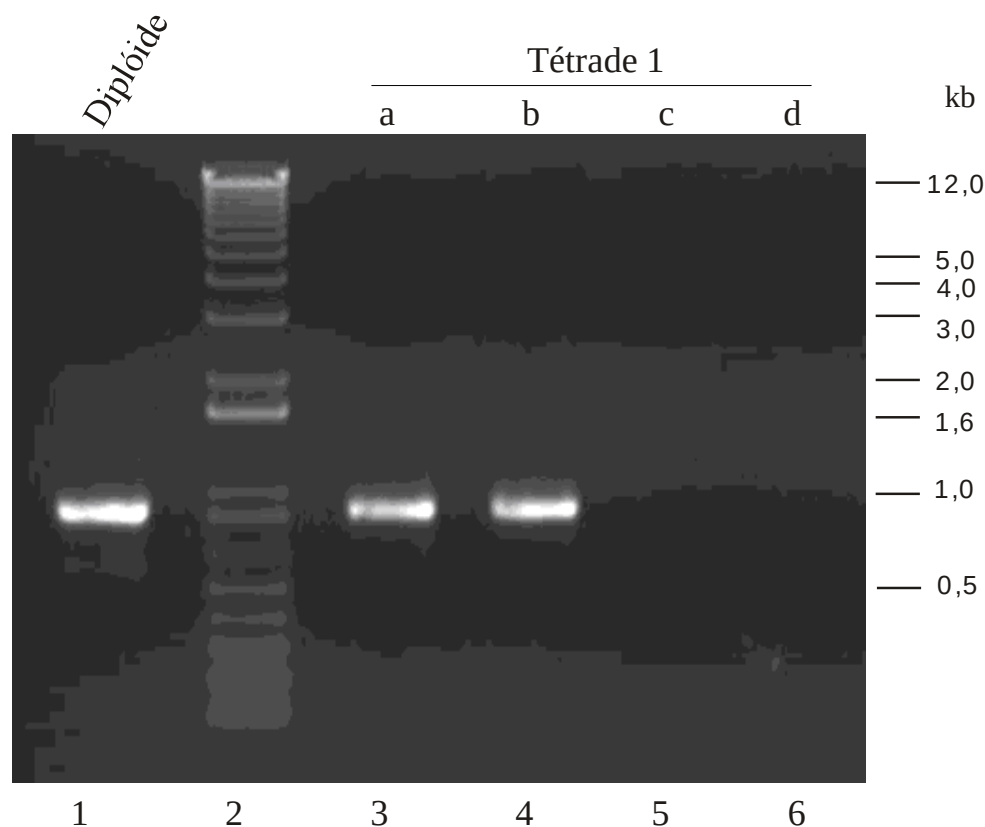


FIGURA 28 - Confirmação por PCR do nocauteamento do gene *YPT1* após esporulação do diplóide, utilizando primer interno de *HIS3*. Amostras de DNA genômico da levedura diplóide nocauteada (canaleta 1) e das leveduras resultantes da tétrade 1 obtida anteriormente (canaletas 3, 4, 5 e 6) foram submetidos ao ensaio de confirmação do nocauteamento por PCR, empregando os primers SVO19 e SVO193. A canaleta 2 corresponde ao padrão de tamanho molecular “1 Kb ladder plus” (Invitrogen).

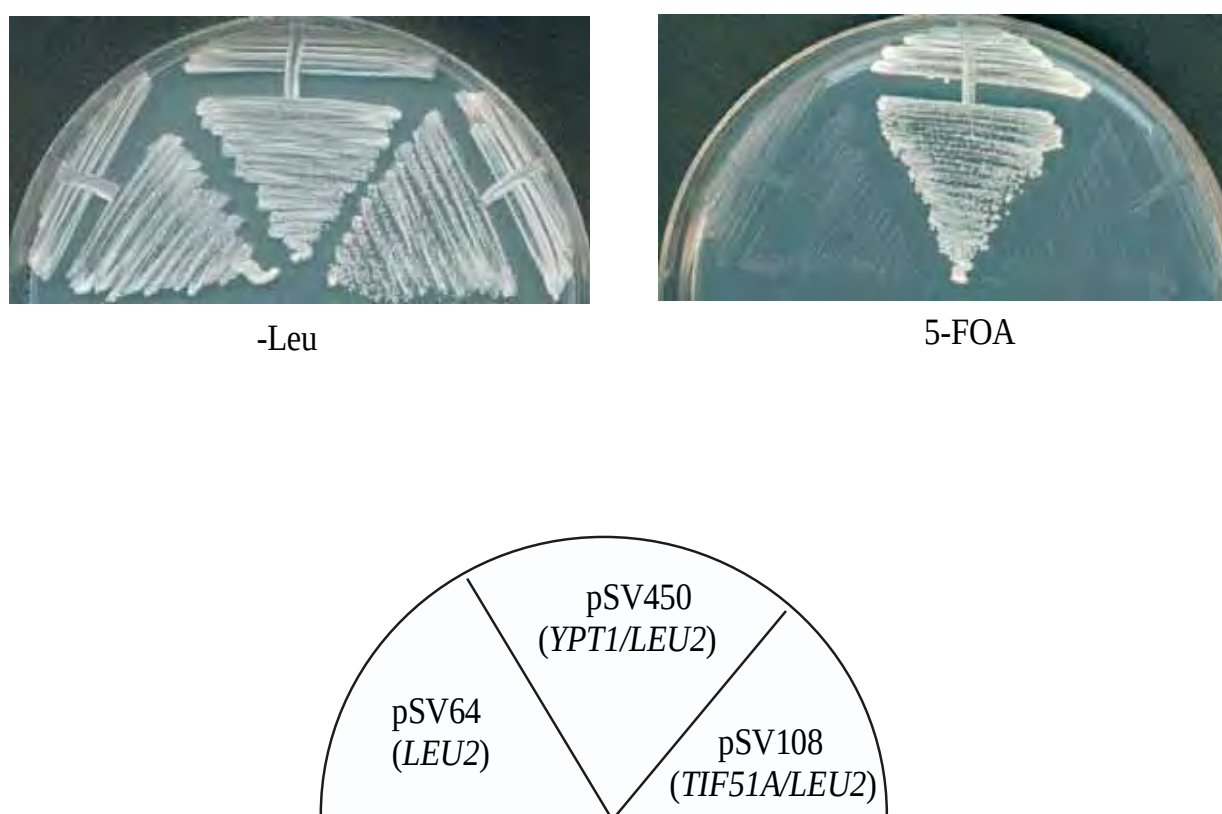


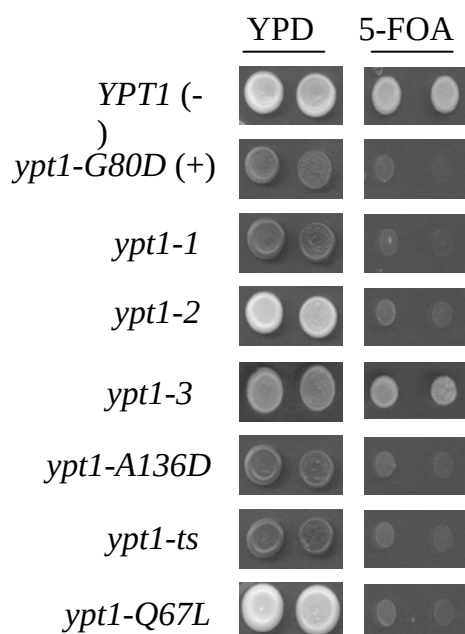
FIGURA 29 – Avaliação da supressão do alelo nocauteado de *YPT1* (*ypt1::HIS3*) por *TIF51A* em alto número de cópias. A levedura SVL441, possuindo o gene *YPT1* nocauteado (*ypt1::HIS3*) e mantida pela presença do plasmídeo *URA3/CEN/YPT1* (pSV428), foi transformada com um plasmídeo contendo a marca *LEU2* e expressando *TIF51A* em alto número de cópias (pSV108), com o vetor vazio (pSV64) e com o plasmídeo contendo o gene *YPT1* (pSV450). Os transformantes foram crescidos em meio desprovido de leucina e passados para o meio contendo 5-FOA.

TABELA 5 - Características fenotípicas e interações genéticas dos mutantes de *YPT1* utilizados neste estudo.

<u><i>Mutante</i></u>	Mutação Presente	Fenótipo Condicional	Temperatura de Morte em meio Seletivo	Letal Sintético com <i>tif51A-3</i>	Fenótipo Condicional Suprimido pela Expressão de <i>TIF51A</i> em alto n° de Cópias
<i>ypt1-G80D</i>	G80D	cs e ts	38°C	sim	sim
<i>ypt1-1</i>	T40K	cs e ts	ND	sim	ND
<i>ypt1-2</i>	G83E	-	-	sim	-
<i>Ypt1-3</i>	S95T	ts	37°C	não	sim
<i>ypt1-A136D</i>	A136D	ts	33°C	sim	sim
<i>ypt1-ts</i>	N121I, A161V	ts	36,5°C	sim	sim
<i>ypt1-Q67L</i>	Q67L	-	-	sim	-

cs, ts: sensibilidade a baixas e altas temperaturas, respectivamente; ND: não determinado

A



B

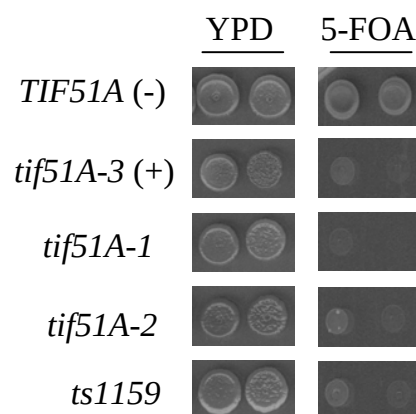


FIGURA 30 – Avaliação da letalidade sintética entre os mutantes de *YPT1* e de *TIF51A*.

Crescimento em meio YPD e em meio contendo 5-FOA dos mutantes duplos obtidos pelo cruzamento dos mutantes *ypt1-1*, *ypt1-2*, *ypt1-3*, *ypt1-A136D*, *ypt1-ts* e *ypt1-Q67L* com o mutante *tif51A-3* (A) e dos mutantes duplos provenientes do cruzamento entre o mutante *ypt1-G80D* e os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2*, *tif51A-3* e *tif51A-ts1159* (B). Os mutantes duplos foram mantidos pela presença do plasmídeo pSV451 (*YPT1/URA3*).

TABELA 6 - Características fenotípicas e interações genéticas dos mutantes de *TIF51A* utilizados neste estudo.

<u>Mutante</u>	Mutação Presente	Fenótipo Condicional	Temperatura de Morte em meio Seletivo	Letal Sintético com <i>ypt1-G80D</i>	Fenótipo Condicional Suprimido pela Expressão de <i>YPT1</i> em alto n° de Cópias
<i>tif51A-1</i>	P83S	ts	36°C	sim	não
<i>tif51A-2</i>	P83L	ts	36°C	sim	não
<i>tif51A-3</i>	C39Y, G118D	ts	35°C	sim	não
<i>ts1159</i>	S149P	ts	33°C	sim	não

ts: sensibilidade a altas temperaturas.

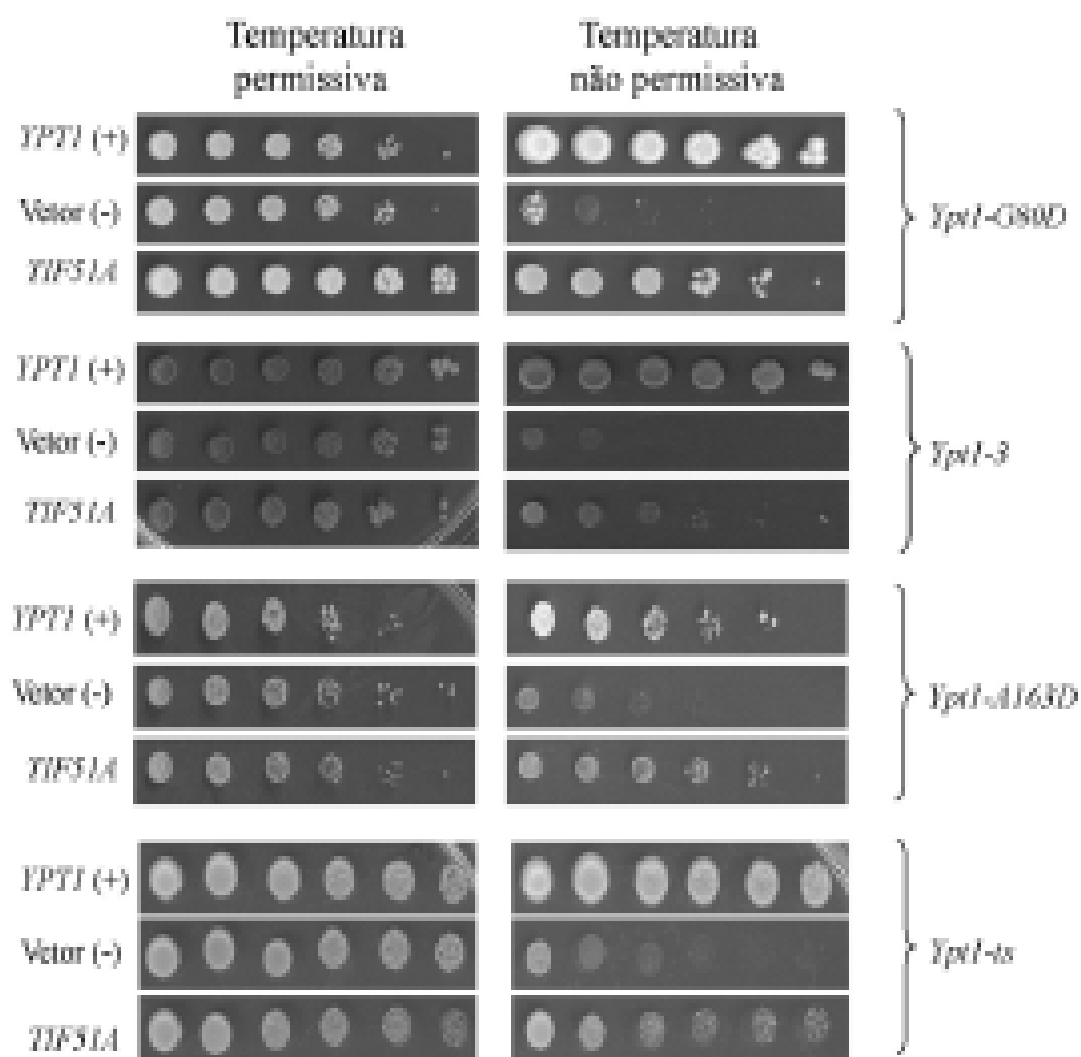


FIGURA 31 – Avaliação da supressão do fenótipo temperatura-sensível dos mutantes de *YPT1* por *TIF51A* expresso em alto número de cópias. Os mutantes *ypt1-G80D*, *ypt1-3*, *ypt1-A136D* e *ypt1-ts* contendo os plasmídeos com os genes indicados foram crescidos, após diluição seriada das culturas, nas temperaturas permissiva e não permissiva.

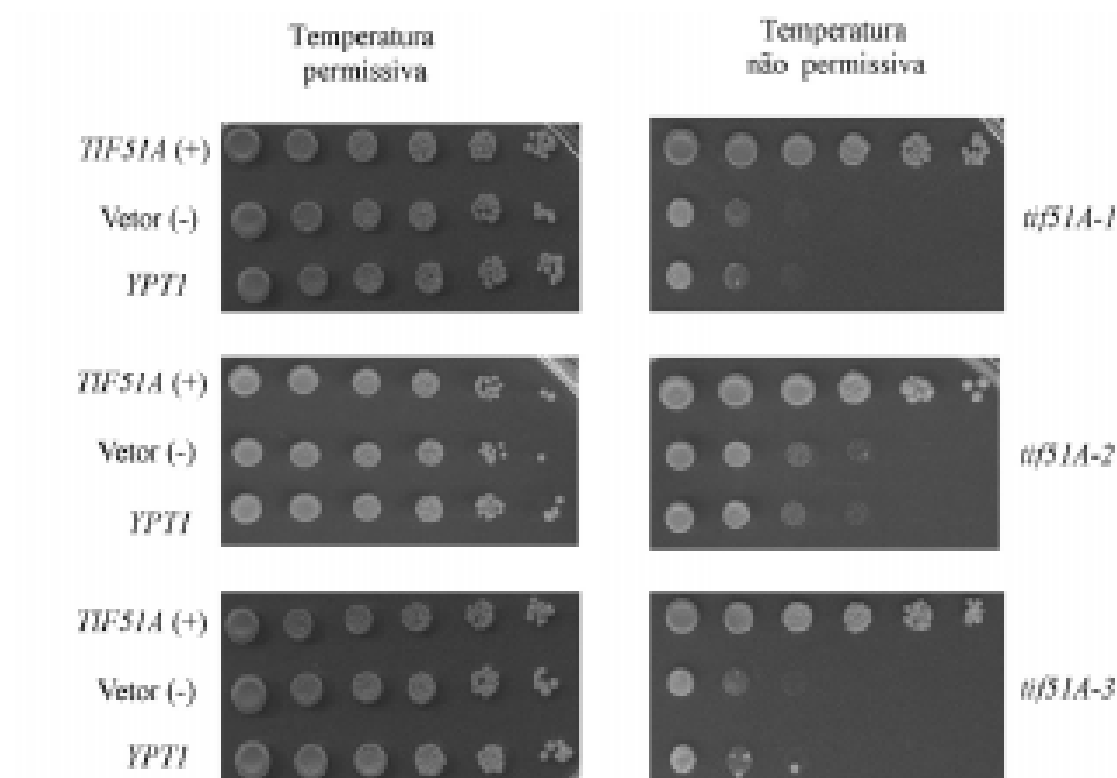


FIGURA 32 – Avaliação da supressão do fenótipo temperatura-sensível dos mutantes de *TIF51A* por *YPT1* expresso em alto número de cópias. Os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* contendo os plasmídeos com os genes indicados foram crescidos, após diluição seriada das culturas, nas temperaturas permissiva e não permissiva.

5- DISCUSSÃO

O estudo de fatores altamente conservados e essenciais para a viabilidade celular tem auxiliado na compreensão de processos biológicos que ocorrem na célula. O provável fator de início de tradução (eIF5A) é uma proteína abundante, altamente conservada em eucariotos e está presente também em arqueobactérias. Esse fator é essencial para a viabilidade celular e é a única proteína descrita que contém o resíduo de aminoácido hipusina. Apesar de eIF5A ser conhecida há quase 30 anos, o estudo da sua função biológica ainda desperta interesse em diversos pesquisadores, pois apesar de ter sido associada com vários processos celulares, o seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado até o momento. Os primeiros estudos sugeriram o envolvimento de eIF5A na síntese de proteínas. Entretanto, outros estudos associaram esse fator com proliferação celular, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de RNA mensageiro e polarização de actina. Finalmente, estudos recentes têm fortalecido o papel de eIF5A na tradução.

Os rastreamentos genéticos são de grande utilidade na determinação do mecanismo de ação do produto de um determinado gene, pois tais rastreamentos podem revelar interações que são transientes ou muito instáveis para serem detectadas *in vitro* (APPLING, 1999). O encontro de uma interação genética não implica necessariamente em uma associação física entre os dois produtos dos genes envolvidos, pois, interações indiretas podem ser responsáveis pela relação genética observada (APPLING, 1999).

Para auxiliar na busca da função de eIF5A, um fator celular importante e intrigante, foi realizado um rastreamento genético empregando a letalidade sintética (FRIGIERI, 2002; FRIGIERI et al., 2006). A utilização desse tipo de rastreamento tem-se mostrado muito útil na elucidação da função de diferentes proteínas (BENDER e PRINGLE, 1991; COSTIGAN et al., 1992; SHEN et al., 1998; COSTA e ARNDT, 2000; CARE et al., 2004).

A letalidade sintética corresponde à situação onde a combinação de duas mutações é letal em determinada condição que seria permissiva para cada mutação individualmente. Essa condição pode indicar que os dois genes envolvidos codificam proteínas que executam funções redundantes em uma via essencial, onde a mutação dos dois genes é necessária para eliminar esta via. Uma segunda possibilidade é quando dois genes codificam proteínas que interagem fisicamente, onde a mutação em um dos genes enfraquece a interação, mas não a elimina. Quando o outro gene envolvido é mutado, a interação é enfraquecida ainda mais, podendo até não mais existir. Finalmente, uma terceira possibilidade seria aquela onde os produtos dos dois genes são componentes de um mesmo processo metabólico, no qual cada proteína retém parcialmente a

função, sem necessariamente possuírem interação física. Assim, o processo metabólico pode funcionar com redução da atividade de uma etapa, mas cessa quando a atividade das duas etapas é reduzida (APPLING, 1999).

O rastreamento por letalidade sintética realizado com o mutante condicional *tif51A-3* revelou o gene essencial *YPT1* (FRIGIERI, 2002; FRIGIERI et al., 2006), o qual codifica uma GTPase envolvida com o trânsito vesicular do retículo endoplasmático para o Golgi. Revelada a interação genética entre esses genes, o próximo passo foi investigar a relação funcional entre eIF5A e Ypt1.

Antes de iniciar a análise da interação funcional, foi necessário caracterizar o alelo mutado do gene *YPT1* sinteticamente letal com *tif51A-3*. Inicialmente, foi verificado que a mutação introduzida no gene *YPT1* pelo mutágeno químico resulta na alteração do códon GGT para GAT. Essa mudança corresponde, na proteína, na troca de uma glicina para um ácido aspártico na posição 80 (*ypt1-G80D*). Segundo dados cristalográficos, a glicina nesta posição pode ser importante para a interação de Ypt1 com GDI (Rak et al., 2003), pois foi mostrado que o resíduo G80 de Ypt1 interage com o resíduo Y237 de GDI, o qual se localiza na região envolvida na associação com as proteínas Ypt/Rabs (“Rab Binding Plataform”). A troca de glicina para ácido aspártico poderia estar atrapalhando, provavelmente, a interação Ypt1:GDI. Experimentos futuros deverão ser realizados com o objetivo de verificar se a interação Ypt1:GDI deixa de existir ou está enfraquecida no mutante *ypt1-G80D*.

O alelo recessivo *ypt1-G80D* confere fenótipos de sensibilidade a altas e baixas temperaturas, semelhantes aos fenótipos observados para o mutante *ypt1-1* (SEGEV et al., 1988). Ainda, os níveis da proteína Ypt1 não se alteraram com o crescimento do mutante na temperatura não permissiva. O encontro de alelos temperatura-sensíveis que mantêm a proteína estável na temperatura não permissiva é vantajoso, pois permite revelar com maior facilidade interações diretas com outros componentes celulares quando utilizados em rastreamentos genéticos, uma vez que não existe a necessidade de compensar a perda total da proteína. Dessa forma, o mutante obtido poderá ser utilizado em rastreamentos de genes supressores, com o objetivo de se encontrar novos parceiros celulares de *YPT1* e contribuir, por exemplo, na caracterização dos eventos regulatórios da função essencial de Ypt1 na célula.

Após a caracterização do novo mutante, foram avaliadas as três possibilidades de relação funcional que podem resultar da letalidade sintética. Com a análise de bancos de dados, a primeira possibilidade de os dois genes envolvidos codificarem proteínas com funções redundantes foi descartada, uma vez que eIF5A não apresenta domínios envolvidos na associação

com GTP. A seguir, a segunda possibilidade foi investigada procurando verificar se eIF5A e Ypt1 interagem fisicamente. Essa possibilidade também foi descartada, pois essas proteínas não mostraram interação através de experimentos de copurificação. Esse resultado é justificado, pois a localização de Ypt1 e seu mecanismo de ação já estão bem estabelecidos; Ypt1 se liga à membrana do retículo endoplasmático por prenilação e age no transporte de proteínas que já sofreram as modificações necessárias no retículo endoplasmático e que estão sendo direcionadas para o Golgi (SEGEV et al., 1988; JEED et al., 1995). No caso de eIF5A, embora a função ainda não esteja completamente elucidada, estudos recentes fortalecem o papel de eIF5A na tradução e sua interação com os ribossomos (ZANELLI et al., 2006). Dessa forma, eIF5A estaria agindo antes da proteína ser translocada para o retículo endoplasmático, ou seja, numa etapa anterior à ação de Ypt1, o que não justificaria a necessidade de interação física com Ypt1.

Na terceira possibilidade de relação funcional, a situação de letalidade sintética poderia estar revelando genes que codificam proteínas envolvidas no mesmo processo metabólico. Assim, procurou-se evidenciar a presença de defeitos na via secretória e na síntese protéica nos mutantes de eIF5A e Ypt1, respectivamente. Essas análises poderiam fortalecer a idéia de que síntese protéica e secreção são processos metabólicos altamente relacionados (DELOCHE et al., 2004).

Como esperado, defeito no funcionamento da via secretória foi verificado no mutante *ypt1-G80D*, o qual revelou o mesmo padrão de bloqueio verificado nos mutantes *ypt1-1* e *ypt1-A136D* (BACON et al., 1989; JEED et al., 1995). No entanto, os mutantes de *TIF51A* testados não mostraram alteração desta via. Com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que eIF5A não esteja atuando diretamente na via secretória.

A seguir, foi avaliado o padrão da localização subcelular de Ypt1 e de eIF5A. Essa análise foi realizada para confirmar a localização de eIF5A e compará-la com a localização de Ypt1. Experimentos de localização em células de mamíferos, revelaram duas frações de eIF5A no citoplasma, uma solúvel e outra ligada a membranas internas (SHI et al., 1996). Neste mesmo estudo, foi mostrado colocalização de eIF5A com calnexina, proteína residente do retículo endoplasmático rugoso (SHI et al., 1996). Como dito anteriormente, em leveduras, eIF5A localiza-se no citoplasma, com uma concentração perinuclear, possivelmente ligada ao retículo endoplasmático (VALENTINI et al., 2002). No caso de Ypt1, foi mostrada a sua localização na membrana do retículo endoplasmático e cis-Golgi, tanto em mamíferos como em levedura (SEGEV et al., 1988; JEED et al., 1995). Em concordância com a literatura, foi verificado que Ypt1 e eIF5A encontram-se tanto na fração citoplasmática quanto na fração correspondente às

membranas. Um dado extremamente interessante é que foi verificado que a associação de eIF5A com membrana é dependente da atividade dos ribossomos. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos recentemente pelo laboratório, que sugerem que eIF5A interaja diretamente com monossomos ativamente engajados na tradução e tenha uma função no controle traducional (ZANELLI et al., 2006).

Outros dados relacionam eIF5A com a via secretória. Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a parada de crescimento do mutante temperatura-sensível *tif51A-1* é suprimida pela expressão em alto número de cópias dos genes *PKC1*, *WSC1*, *WSC2* e *WSC3* (VALENTINI et al., 2002; ZANELLI e VALENTINI, 2005), os quais, estão relacionados ao correto funcionamento da via secretória (GUSTIN et al., 1998). Ainda, *TIF51A* foi clonado como supressor do mutante *sec2-78* (ORTIZ et al., 2002). Sec2 é uma GEF essencial para a ação da GTPase Sec4, a qual é necessária para o direcionamento polarizado de vesículas para os sítios de exocitose, sendo assim, essencial para o crescimento polarizado. Finalmente, os genes *MSB3* e *MSB4*, que codificam GAPs de Sec4 (GAO et al., 2003), foram capazes de suprimir o mutante *tif51A-1* (ZANELLI, C.F., dados não publicados). Em conjunto, esses dados fortalecem o envolvimento de eIF5A com via secretória.

A relação entre outros fatores de tradução e secreção também foi revelada por outros estudos. O gene *SUI2*, o qual codifica a subunidade α do fator de início de tradução 2 (eIF2), é letal sintético com *SEC7*, codificador de um componente da via secretória (DAVIERWALA et al., 2005). Ainda, foram reveladas interações genéticas entre o fator de início de tradução eIF4B (Tif3) e proteínas envolvidas em diferentes etapas do tráfego vesicular (DELOCHE et al., 2004). Esse estudo mostrou que mutações na via secretória direcionam a uma rápida e específica atenuação do início de tradução. Interessantemente, a resposta de atenuação da tradução não necessita de componentes importantes da via de integridade celular, tal como Wsc1 e Pkc1. Por outro lado, esse mecanismo estaria relacionado com a proteína quinase de eIF2 α , Gcn2, e com uma proteína que liga eIF4E, Eap1, ambos inibidores das funções desses fatores de início de tradução. Ainda, foi mostrado que esse efeito ocorre antes da inibição transcricional dos componentes ribossomais. Esse estudo sugere que a atenuação da tradução é a primeira resposta para preservação de energia pela célula e a prevenção de acúmulo de proteínas não localizadas adequadamente devido à inativação do transporte vesicular.

Outro dado interessante que fortalece a relação entre via secretória e tradução é que alguns mutantes de *YPT1* apresentam sensibilidade a um inibidor de tradução (paromomicina). Porém, esse resultado não ocorre quando são empregados outros inibidores de síntese protéica

(anisomicina e cicloheximida). Esses resultados podem estar apontando uma sensibilidade específica dos mutantes de *YPT1* à paromomicina ou que as concentrações de anisomicina e cicloheximida utilizadas são suficientes para evidenciar sensibilidade nos mutantes de *TIF51A*, mas não nos mutantes de *YPT1*. Experimentos adicionais para avaliação da relação de Ypt1 e tradução estão sendo planejados e serão necessários para compreender a sensibilidade a esses antibióticos.

Na última parte do presente estudo, novas interações genéticas foram estudadas entre *YPT1* e *TIF51A*, procurando fortalecer a interação funcional entre Ypt1 e eIF5A. A interação genética revelada inicialmente entre *tif51A-3* e *ypt1-G80D* foi fortalecida pela letalidade sintética com outros mutantes de *YPT1* e *TIF51A*. O fato de o mutante *ypt1-3* não revelar letalidade sintética com *tif51A-3* não invalida a interação genética. Isto é verdade, pois procurando avaliar a interação genética por letalidade sintética entre mutantes de via secretória que agem após o Golgi e os mutantes *ypt1-1*, *ypt1-2*, *ypt1-3* e *ypt1-ts*, foi mostrado que nem todos os mutantes de *YPT1* revelaram letalidade (FINGER e NOVICK, 2000). Uma interação genética bastante interessante revelada nesse estudo foi a de que *TIF51A* em alto número de cópias suprime o fenótipo condicional dos mutantes de *YPT1*, sendo que o mesmo não acontece quando o gene *YPT1* é introduzido em alto número de cópias nos mutantes de eIF5A. Uma possível explicação para esses resultados será apresentada adiante.

Vários autores têm proposto um papel para eIF5A na proliferação celular (revisado em PARK et al., 1997; FRIGIERI et al., 2006; ZANELLI e VALENTINI, 2007). Foi verificado em mamíferos que a inibição de qualquer etapa da hipusinação resulta no bloqueio da proliferação celular (CARAGLIA et al., 2001). Em leveduras, a depleção de eIF5A provoca um aumento de células paradas na fase G1 do ciclo celular em leveduras (KANG e HERSHEY, 1994). Ainda, defeito na polimerização de actina, a qual é essencial para a transição G1/S, foi verificado em mutantes condicionais de *TIF51A*, o qual é suprimido pelo gene *GIC1* em alto número de cópias que suprime também o fenótipo de sensibilidade à temperatura, sendo que este último fenótipo também é suprimido por *BNI1* (ZANELLI e VALENTINI, 2005). Bni1 e Gic1 trabalham juntas para o estabelecimento de polarização em leveduras. Bni1 é uma formina, a qual promove a nucleação e o crescimento dos cabos de actina. A ação desta proteína ocorre após e de maneira dependente de Gic1, um efetor de Cdc42 (JAQUENOUD e PETER, 2000, IRAZOQUI e LEW, 2004). A ação de eIF5A na progressão do ciclo celular em leveduras foi confirmado por outros pesquisadores (CHARTTERJEE et al., 2006). Como a rápida depleção de eIF5A leva a uma diminuição de apenas 30% na síntese protéica total (KANG e HERSHEY, 1994), este fator

poderia estar envolvido na tradução de mRNA específicos, provavelmente, mRNAs que codificam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (KANG e HERSHEY, 1994; PARK et al., 1997; ZANELLI e VALENTINI, 2005).

Com base nestes dados e nos resultados obtidos durante o presente estudo, foi possível esquematizar um modelo explicativo da interação genética e funcional entre eIF5A e Ypt1 (Figuras 33 a 35), visando a proposição de novos experimentos dirigidos por hipótese que auxiliem na caracterização funcional de eIF5A e na compreensão da letalidade sintética entre eIF5A e Ypt1. Neste modelo é sugerido que eIF5A 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.

O painel A da Figura 33 mostra o esquema de uma levedura selvagem, com seu mecanismo de tradução e a via secretória (secreção polarizada) funcionando normalmente. O painel B da mesma Figura mostra a situação de letalidade entre eIF5A e Ypt1, onde a tradução e a via secretória estão comprometidas. Nesta situação, a levedura não está produzindo suficientemente as proteínas necessárias para o brotamento, e também não está conseguindo levar as proteínas produzidas ao local adequado, neste caso, o local onde está ocorrendo a formação do broto.

O painel A da Figura 34 mostra a levedura possuindo somente a mutação *ypt1-G80D*. É possível observar no esquema que a via secretória está comprometida neste mutante. O painel B da mesma Figura procura explicar porque a viabilidade celular é prolongada na temperatura não permissiva quando *TIF51A* é expresso em alto número de cópias. É sugerido aqui que nesta situação ocorra um aumento da síntese protéica. Assim, a diminuição do tráfego vesicular é compensada pela quantidade de proteína transportada. A mesma compensação não ocorre quando *YPT1* é expresso em alto número de cópias no mutante condicional *tif51A-3* (Figura 35), uma vez que não adiantaria intensificar a via secretória (painel B) se não há proteína suficiente para ser transportada (painel A). Neste caso, a levedura não recupera a capacidade de crescimento na temperatura não permissiva.

Novos experimentos deverão ser realizados para comprovar o modelo proposto e também para confirmar se a mutação *ypt1-G80D* resulta em resposta de alteração na síntese protéica. Esses resultados serão necessários para concluir o manuscrito em fase final de redação (FRIGIERI M.C., JOÃO LUIZ M.V.S., APPONI L.H., ZANELLI C.F. e VALENTINI S.R. Synthetic lethality with Ypt1 reveals connection of eIF5A with secretory pathway). A

continuidade do estudo da relação funcional entre eIF5A e Ypt1 será muito importante para fortalecer a conexão entre síntese protéica e secreção na célula.

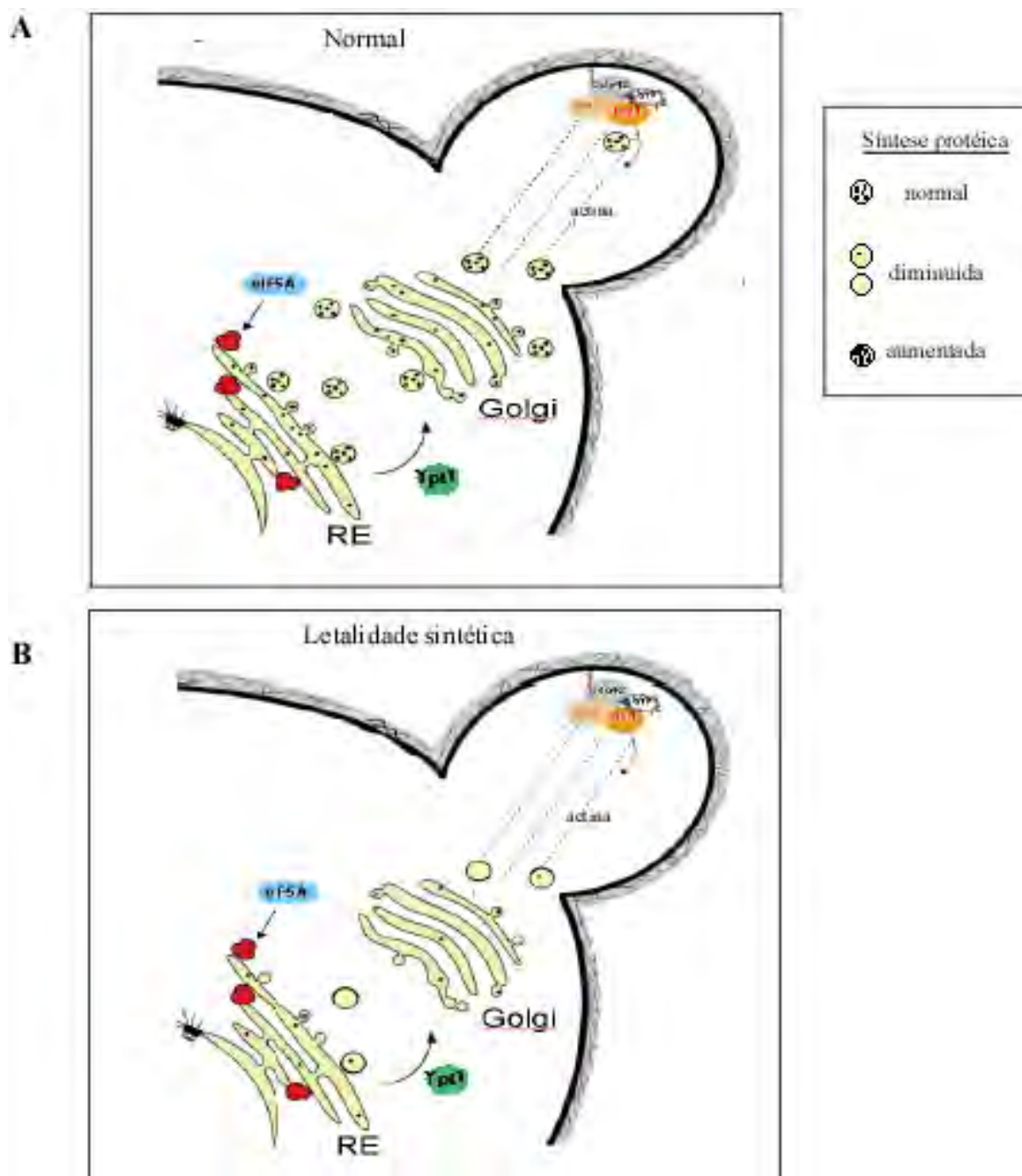


FIGURA 33 – Modelo esquemático da situação de letalidade sintética entre eIF5A e Ypt1.

(A) Modelo de uma levedura selvagem, com seu mecanismo de tradução e a via secretória funcionando normalmente. (B) Modelo de uma levedura na situação de letalidade sintética, possuindo tradução (*tif51A-3*) e via secretória (*ypt1-G80D*) comprometidas. O grau de funcionamento da via secretória e o nível de síntese protéica estão indicados pelo número de vesículas e pela intensidade de pontos dentro de cada vesícula, respectivamente.

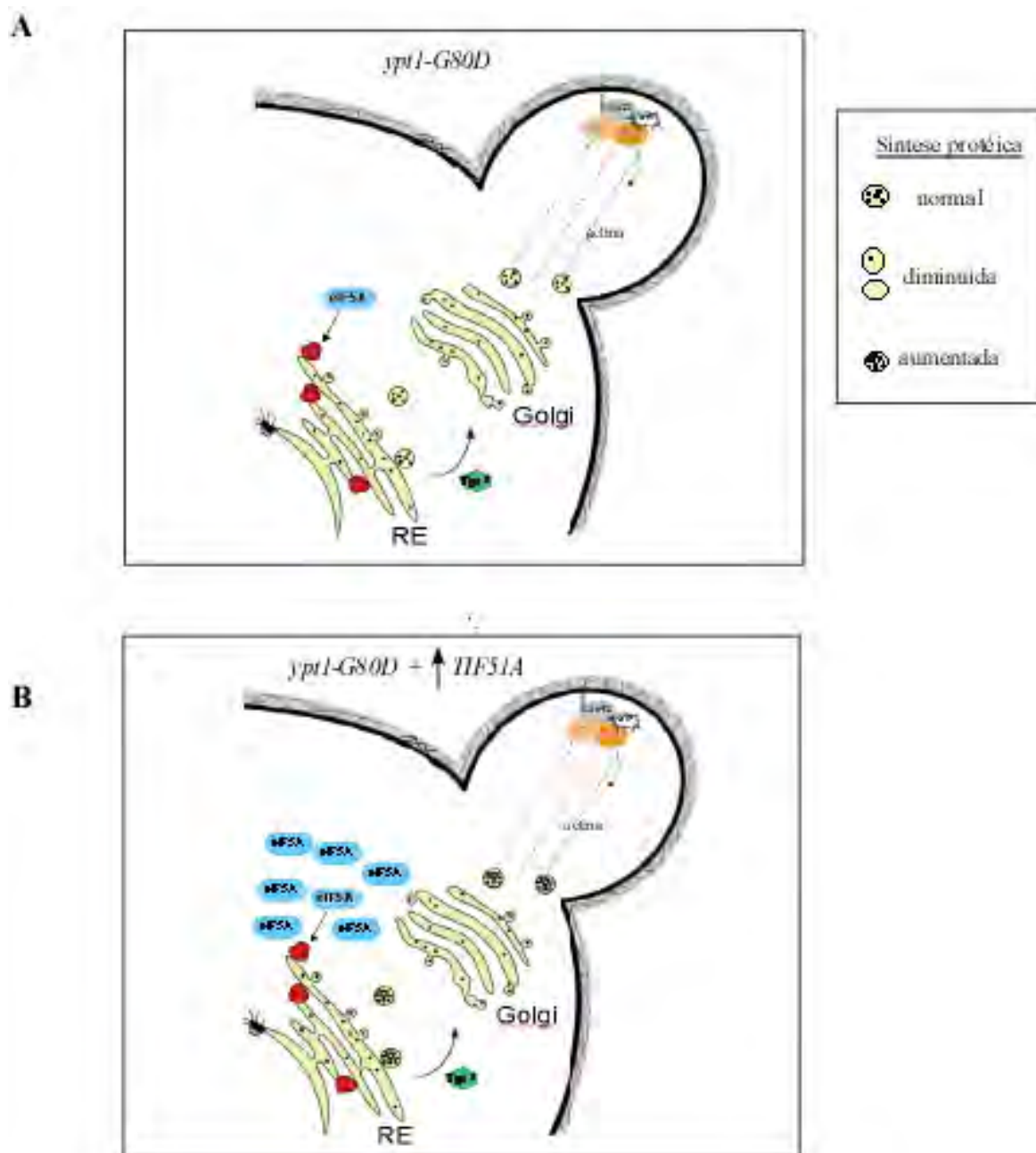


FIGURA 34 – Modelo esquemático da situação de aumento do número de cópias do gene *TIF51A* no mutante *ypt1-G80D*. (A) Modelo de uma levedura contendo apenas alteração na via secretória devido à mutação *ypt1-G80D*. (B) Modelo do mutante *ypt1-G80D* na situação de supressão do fenótipo condicional por *TIF51A* em alto número de cópias. O grau de funcionamento da via secretória e o nível de síntese protéica estão indicados pelo número de vesículas e pela intensidade de pontos dentro de cada vesícula, respectivamente.

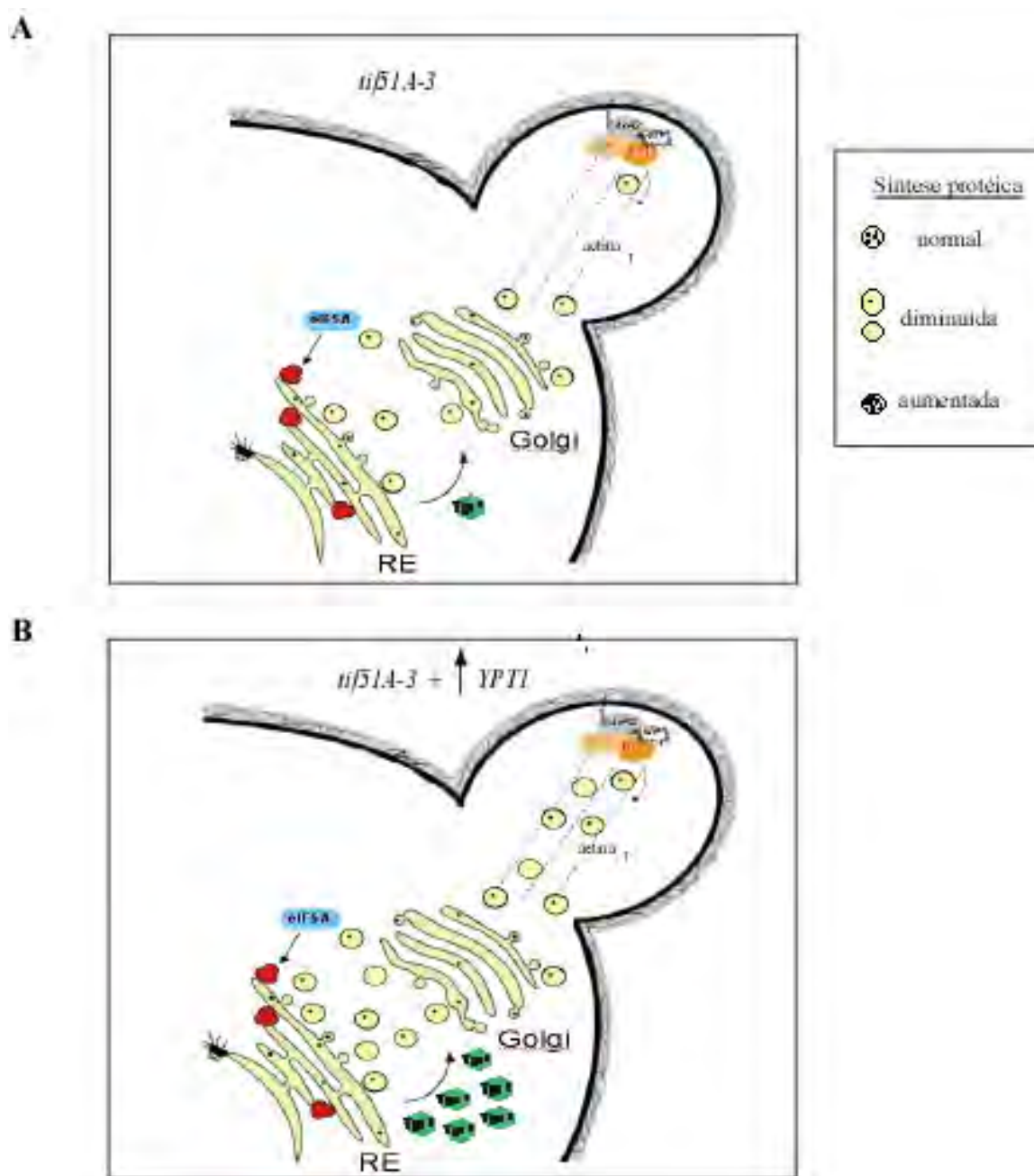


FIGURA 35 –Modelo esquemático da situação de aumento do número de cópias do gene *YPT1* no mutante *tif51A-3*. (A) Modelo de uma levedura contendo apenas diminuição da tradução devido a mutação *tif51A-3*. (B) Modelo do mutante *tif51A-3* na situação de não supressão do fenótipo condicional por *YPT1* em alto número de cópias. O grau de funcionamento da via secretória e o nível de síntese protéica estão indicados pelo número de vesículas e pela intensidade de pontos dentro de cada vesícula, respectivamente.

6 – CONCLUSÕES

- O mutante de eIF5A *tif51A-3* é sinteticamente letal com o alelo mutado do gene *YPT1*;
- O novo mutante gerado do gene *YPT1* possui alteração do códon GGT para GAT, que provoca a mudança de uma glicina para um ácido aspártico na proteína (*ypt1-G80D*);
- O mutante *ypt1-G80D* apresenta fenótipo de sensibilidade de crescimento em altas e baixas temperaturas;
- Os níveis da proteína Ypt1 não se alteram no mutante *ypt1-G80D* na temperatura não permissiva;
- As proteínas Ypt1 e eIF5A não interagem fisicamente por experimentos de copurificação;
- O mutante *ypt1-G80D* apresenta bloqueio da via secretória na temperatura não permissiva;
- Os mutantes de eIF5A não apresentam defeitos na via secretória e eIF5A não está portanto envolvida diretamente com secreção;
- eIF5A localiza-se tanto na fração citoplasmática quanto na fração correspondente às membranas;
- A interação de eIF5A com as membranas é dependente da atividade de ribossomos;
- Alguns mutantes de *YPT1* são sensíveis à paromomicina, um inibidor de síntese protéica;
- *YPT1* em alto número de cópias não é capaz de suprimir a inviabilidade do nocaute de *TIF51A*, assim como, *TIF51A* não é capaz de suprimir a inviabilidade do nocaute de *YPT1*;
- O mutante *tif51A-3* apresenta letalidade sintética com outros mutantes de *YPT1*, com exceção do mutante *ypt1-3*;
- O mutante *ypt1-G80D* é sinteticamente letal com outros mutantes de *TIF51A*;
- *TIF51A* em alto número de cópias suprime o defeito de crescimento na temperatura não permissiva dos mutantes condicionais de *YPT1*;
- *YPT1* não suprime em alto número de cópias o defeito de crescimento na temperatura não permissiva dos mutantes condicionais de *TIF51A*.

7 - REFERÊNCIAS

ALORY, C.; BALCH, W. E. Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease. **Traffic**, v. 2, p. 532-543, 2001.

APPLING, D. R. Genetic approaches to the study of protein-protein interactions. **Methods**, v. 19, p. 338-349, 1999.

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: Wiley, 2004.

BACON, R. A.; SALMINEN, A.; RUOHOLA, H.; NOVICK, P.; FERRO-NOVICK, S. The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. **J. Cell Biol.**, v. 109, p. 1015-1022, 1989.

BAUDIN, A.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; DENOUEL, A.; LAGROUTE, F.; CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 3329-3330, 1993.

BENDER, A.; PRINGLE, J. R. Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11, p. 1295-1305, 1991.

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

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

CARAGLIA, M.; MARRA, M.; GIUBERTI, G.; D'ALESSANDRO, A. M.; BUDILLON, A.; DEL PRETE, S.; LENTINI, A.; BENINATI, S.; ABBRUZZESE, A. The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. **Amino Acids**, v. 20, n. 2, p. 91-104, 2001.

CARE, A.; VOUSDEN, K. A.; BINLEY, K. M.; RADCLIFFE, P.; TREVETHICK, J.; MANAZZU, I.; SUDBERY, P. E. A synthetic lethal screen identifies a role for the cortical actin patch/endocytosis complex in the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 166, p. 707-719, 2004.

CHATTERJEE, I.; GROSS, S. R.; KINZY, T. G.; CHEN, Y. K. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. **Mol. Gen. Genomics**, v. 275, p. 264–276, 2006.

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

CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R. S.; DANTE, M.; SHERO, J. H.; HIETER, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, p. 119-122, 1992.

CLAGUE, M. J. Molecular aspects of the endocytic pathway. **Biochem. J.**, v. 336, p. 271-278, 1998.

COOPER, G. M. **A célula**. 2. ed. Porto Alegre: Artemed, 2001. 402 p.

COSTA, P. J.; ARNDT, K. M. Synthetic lethal interactions suggest a role for the *Saccharomyces cerevisiae* Rtf1 protein in transcription elongation. **Genetics**, v. 156, p. 535-547, 2000.

COSTIGAN, C.; GEHRUNG, S.; SNYDER, M. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, p. 1162-1178, 1992.

DAVIERWALA, A. P.; HAYNES, J.; LI, Z.; BROST, R. L.; ROBINSON, M. D.; YU, L.; MNAIMNEH, S.; DING, H.; ZHU, H.; CHEN, Y.; CHENG, X.; BROWN, G. W.; BOONE, C.; ANDREWS, B. J.; HUGHES, T. R. The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes. **Yeast**, v. 21, p. 463-471, 2004.

DU, L. L.; NOVICK, P. Yeast rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, p. 1215-1226, 2001.

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

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, p. 6229-6234, 1999.

FERRO-NOVICK, S.; KAISER, C. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p. 477-482, 1998.

FINGER, P. F.; NOVICK, P. Synthetic interactions of the Post-Golgi sec mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 156, p. 943-951, 2000.

FRIGIERI, M. C. **Clonagem do gene YPT1 como sinteticamente letal com TIF51A, gene codificador de eIF5A em Saccharomyces cerevisiae**. 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

FRIGIERI, M. C.; CANO, V. P. S.; APPONI, L. H.; DIAS, C. A. O.; GREGIO, A. P. B.; JOÃO-LUIZ, M. V. S.; SILVEIRA, W. S.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. eIF5A: uma proteína essencial para a viabilidade celular cuja função permanece obscura. **Rev. Ciên. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n. 3, p. 189-195, 2006.

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.

GALLWITZ, D.; DONATH, C.; SANDER, C. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product. **Nature**, v. 306, p. 704-707, 1983.

GAO, X. D.; ALBERT, S.; TCHEPEREGINE, S. E.; BURD, C. G.; GALLWITZ, D.; BI, E. The GAP activity of Msb3 and Msb4 for the Rab GTPase Sec4 is required for efficient exocytosis and actin organization. **J. Cell Biol.**, v. 162, n. 4, p. 635-646, 2003.

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

GUTHIE, C.; FINK, G. R. **Guide to yeast genetics**. New York: Academic press, 1991. 194 p.

HAYASHI, R. Carboxypeptidase Y. **Methods Enzymol.**, v. 450, p. 568-587, 1976.

HASILIK, A.; TANNER, W. Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into the enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 85, p. 599-608, 1978.

- 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, p. 693-707, 1997.
- IRAZOQUI, J. E.; LEW, D. J. Polarity establishment in yeast. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 2169-2171, 2004.
- JAQUENOUD, M.; PETER, M. Gic2 may link activated Cdc42p to components involved in actin polarization, including Bni1p and Bud6p (Aip3p). **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 6244-6258, 2000.
- 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, p. 590-600, 2002.
- JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusinedependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J. Cell Biochem.**, v. 97, p. 583-598, 2006.
- JEDD, G.; RICHARDSON, C.; LITT, R.; SEGEV, N. The Ypt1p GTPase is essential for the first two steps of the yeast secretory pathway. **J. Cell Biol.**, v. 131, p. 583-590, 1995.
- JONES, S.; RICHARDSON, C. J.; LITT, R.; SEGEV, N. Identification of regulators for Ypt1 GTPase nucleotide cycling. **Mol. Biol. Cell.**, v. 9, p. 2819-2837, 1998.
- KANG, H. A.; SCHWELBERGER, J. W.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 14750-14756, 1993.
- 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, p. 3934-3940, 1994.
- 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, p. 360-364, 1993.
- LAFOURCADE, C.; GALAN, J. M.; GLOOR, Y.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; PETER, M. The GTPase-activating enzyme Gyp1 is required for recycling of internalized membrane

material by inactivation of the Rab/Ypt GTPase Ypt1p. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 9, p. 3815-3826, 2004.

MARTINEZ, O.; GOUD, B. Rab proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1404, p. 101-112, 1998.

OEN, H.; PELLEGRINI, M.; CANTOR, C. R. Peptidyl transferase inhibitors alter the covalent reaction of BrAcphe-tRNA with the *E. coli* ribosome. **FEBS Letters**, v. 45, p. 218-222, 1974.

ORTIZ, D.; MEDKOVA, M.; WALCH-SOLIMENA, C.; NOVICK, P. Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in Yeast. **J. Cell Biol.**, v. 157, n. 6, p. 1005-1015, 2002.

PARK, M. H.; WOLFFI, 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, p. 95-104, 1993a.

PARK, M. H.; WOLFFI, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation?. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, p. 475-479, 1993b.

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

PRINZ, W. A.; GRZYB, L.; VEENHUIS, M.; KAHANA, J. A.; SILVER, P. A.; RAPOPORT, T. A. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 150, n. 3, p. 461-474, 2000.

PEREIRA-LEAL, J. B.; HUME, A. N.; SEABRA, M. C. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. **FEBS Letters**, v. 498, p. 197-200, 2001.

RAK, A.; PYLYPENKO, O.; DUREK, T.; WATZKE, A.; KUSHNIR, S.; BRUNSVELD, L.; WALDMANN, H.; GOODY, R. S.; ALEXANDROV, K. Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. **Science**, v. 302, p. 646-650, 2003.

ROSORIOUS, O.; KRATZER, F.; HEGER, P.; DABAUVALLE, M. C.; HAUBER, J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. **J. Cell. Sci.**, v. 112, 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 transactivation. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 1309-1320, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: CSH Press, 1989. v. 3.

SANDBAKEN, M. G.; CULBERTSON, M. R. Mutations in elongation factor EF1-A affect the frequency of frameshifting and amino acid misincorporation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 120, p. 923-934, 1988.

SAPPERSTEIN, S. K.; LUPASHIN, V. V.; SCHMITT, H. D.; WATERS, M. G. Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Uso1p. **J. Cell Biol.**, v. 132, p. 755-767, 1996.

SEACHRIST, J. L.; FERGUSON, S. S. G. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. **Life Sciences**, v. 74, p. 225-235, 2003.

SEGEV, N.; BOTSTEIN, D. The ras-like yeast *YPT1* gene is itself essential for growth, sporulation, and starvation response. **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 2367-2377, 1987.

SEGEV, N.; MULHHOLLAND, J.; BOTSTEIN, D. The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. **Cell**, v. 52, p. 915-924, 1988.

SEGEV, N. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 500-511, 2001.

SHEN, E. C.; HENRY, M. F.; WEISS, V. H.; VALENTINI, S. R.; SILVER, P. A.; LEE, M. S. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. **Genes Dev.**, v. 12, p. 679-691, 1998.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; AHERN, J.; DAVIS, L. J.; STERN, A. M.; WAXMAN, L. Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1310, p. 119-126, 1996.

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, p. 143-149, 1997.

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, p. 19-27, 1989.

STEVENS, T.; ESMON, B.; SCHEKMAN, R. Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. **Cell**, v. 30, p. 439-448, 1982.

THOMPSON, G. M.; CANO, V. S. P.; VALENTINI, S. R. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. **FEBS Lett.**, v. 555, p. 464-468, 2003.

VALENTINI, S. R.; CASOLARI, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; SILVER, P. A.; McBRIDE, A. 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, p. 393-405, 2002.

VIDA, T. A.; GRAHAM, T. R.; EMR, S. D. In vitro reconstitution of Intercompartmental protein transport to the yeast vacuole. **J. Cell Biol.**, v. 111, p. 2871-2884, 1990.

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, p. 1571-1581, 2005.

ZANELLI, C. F.; MARAGNO, A. L. C.; GREGIO, A. P. B.; 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, p. 1358-1366, 2006.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Is there a role for eIF5A in translation? **Amino Acids**, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g62h106175158681>>. Acesso em: 01 ago 2007.

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