

TATIANA FARIA WATANABE

Estudo do papel da proteína eIF5A na elongação da tradução em *S. cerevisiae*: análise da relação funcional com o tRNA de alanina e sua participação na síntese proteica geral da célula

Tese apresentada ao Instituto de Química – UNESP, Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

**Araraquara – SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

W324e Watanabe, Tatiana Faria
Estudo do papel da proteína eIF5A na elongação da tradução em *S. cerevisiae*: análise da relação funcional com o trna de alanina e sua participação na síntese proteica geral da célula / Tatiana Faria Watanabe – Araraquara : [s.n], 2015
110 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Sandro Roberto Valentini

1. Proteínas - Síntese. 2. Ribossomos. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Ácido ribonucleico. 5. Proteínas. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

TATIANA FARIA WATANABE

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Araraquara, 31 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara.



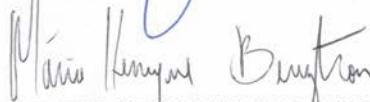
Profª. Drª. MARIA CÉLIA BERTOLINI
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Prof. Dr. OTAVIO HENRIQUE THIEMANN
Instituto de Física / USP / São Carlos.



Prof. Dr. RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO
Instituto de Física / USP / São Carlos.



Prof. Dr. MARIO HENRIQUE BENGTSON
Instituto de Biologia / UNICAMP / Campinas.

Dedico este trabalho a minha família, primeiramente meus pais Aparecida e Shiqueru que sempre me incentivaram e apoiaram incondicionalmente. Aos meus irmãos Jorge e Junior que foram desde sempre minhas inspirações. Ao meu marido Marco Túlio por sempre estar ao meu lado, me amando e tornando meus dias mais leves. Aos meus filhos Caio e Igor que são meus maiores tesouros e minha fonte inesgotável de energia e amor.

Agradecimentos

A minha mãe Aparecida por me ensinar tudo de mais valioso que sei e ao meu pai Shígueru por me dar apoio e acreditar na minha capacidade desde sempre.

Ao meu irmão Jorge pelo carinho, conselhos e amor. E a minha cunhada e amiga Ângela por fazer parte da família e cuidar do meu irmão.

Ao meu irmão Junior por estar sempre por perto para comemorar as conquistas e chorar nas derrotas, mas principalmente por nunca me deixar desistir.

Ao meu companheiro de aventuras, meu amor da vida inteira, que sempre fez das minhas escolhas nossas prioridades, me apoiando em todas as decisões que tomei e por me proporcionar a melhor e mais linda família.

Aos meus filhos, Caio e Igor, por irem comigo ao laboratório desde muito pequenos e me dar forças mesmo quando eu acreditava não as ter.

Às minhas amigas Val, Míriam, Sol e Marta que mesmo de longe estiveram presentes e compreenderam minhas ausências.

Ao professor Sandro que me inspirou desde as primeiras aulas de biomol e abriu as portas do seu laboratório ensinando sua paixão pela ciência.

Ao professor Cleslei por me orientar e com muita paciência me guiar nas decisões ao longo desta jornada, por todas as noites corrigindo relatórios e discutindo resultados.

Às minhas AMIGAS Daniella e Tatiana por todos os momentos que dividimos, pela ajuda, carinho, conselhos e por todas as ocasiões que pudemos compartilhar, vocês são especiais. Aos esposos Son e Xandão que por tabela acabaram complementando nossa amizade maravilhosa.

Aos amigos que fiz nesta caminhada Haroldo, Panta, Laranja, Su, Amanda, Carol, Flávia, Angélica e Carol.

Aos membros do laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos por me ensinarem todos os dias regras fundamentais de convivência e respeito ao próximo. Também pelos churrascos eternos e happy hours desfrutados, bem como todas as despedidas que pudemos comemorar.

Aos meus ICs queridos Caroli, Pri, Matheus e Júlia por me ensinarem como é bom ensinar, vocês são inesquecíveis.

Ao professor Jonathan Dinman que me mostrou uma forma diferente de encarar a carreira acadêmica, por abrir as portas do seu laboratório e acreditar em mim, me cobrando da mesma forma que cobrava seus alunos.

Aos membros do laboratório do prof. Dinmam Alicia, Sharmishtha, Suna, Vivek, Carol, Joe, Ryan e Arturas por tornarem o período que passei longe da minha família mais divertido e amigável.

A Juliana e Brett por nos ajudarem de todas as formas possíveis durante o sanduíche.

A todos os funcionários da faculdade de ciências farmacêuticas da UNESP pela convivência diária e pelos sorrisos todos os dias, especialmente Tiana, Olívia, Margarete, Sr. Sílvio, Sr. Mário, Bispo, Lazareto, Valéria, Néia e Marisa.

Às funcionárias da seção de pós graduação principalmente a Wennia por sua ajuda e amizade.

A equipe da biblioteca do Instituto de Química por toda a ajuda com as referências e ficha catalográfica, principalmente a Valéria e Isabel.

A todos do departamento de Ciências Biológicas pela convivência. Um agradecimento especial a professora Mara por sua amizade, professor Aristeu pelo carinho e professora Alexandra pelos sorrisos e conversas divertidas.

A todos os professores que passaram pelo meu caminho nesta caminhada e contribuíram em minha formação profissional e pessoal.

Ao CNPq, CAPES e PADC- FCFAr pelo apoio financeiro dos projetos.

A FAPESP pelo apoio financeiro tanto para os projetos quanto pela bolsa de doutorado direto (2010/31359-0) e BEPE para realização do doutorado sanduíche (2012/23396-4).

*“Mais do que máquinas precisamos de humanidade.
Mais do que inteligência precisamos de afeição e doçura.
Sem essas virtudes a vida será de violência e tudo estará perdido.”*
Charles Chaplin

“Viver é um rasgar-se e remendar-se.”
Guimarães Rosa

RESUMO

eIF5A é uma proteína altamente conservada entre arqueas e eucariotos e apresenta uma modificação pós-traducional única e essencial para sua função, chamada de hipusinação. eIF5A foi inicialmente identificado como um fator de início de tradução (eukaryotic translation Initiation Factor 5A) porém foi demonstrado que eIF5A atua na elongação da tradução. Recentemente foi demonstrado que eIF5A seja mais importante na tradução específica de proteínas contendo resíduos consecutivos de prolina. No intuito de aprofundar o conhecimento da participação de eIF5A no processo de tradução, o presente trabalho de doutorado estudou a relação funcional entre eIF5A e o tRNA de alanina (tRNA^{Ala}), revelada como uma interação genética em *Saccharomyces cerevisiae*, assim como avaliou a relação de eIF5A com eventos da síntese proteica como *Programmed Ribosomal Frameshifting* (PRF), *misincorporation* e *readthrough*, utilizando repórteres de duas luciferases. Primeiramente, foi analisada a especificidade alélica da supressão em alto número de cópias ocasionada por tRNA^{Ala} e a capacidade de tRNAs para outros aminoácidos suprimirem o fenótipo de crescimento de mutantes de eIF5A, e os resultados mostraram que esta supressão não se dá de maneira alelo específica e curiosamente, dentre os outros tRNAs testados, apenas o tRNA^{iMet} é capaz de suprimir o fenótipo de crescimento do mutante *tif51A^{K56A}* de eIF5A. A supressão observada por estes tRNAs não reflete na melhora do defeito no perfil polissomal, para ambos os casos. Foi testada também a interação física direta entre eIF5A e o tRNA^{Ala}, utilizando o sistema de triplo-híbrido, no entanto, nenhuma interação foi detectada, sugerindo que a interação observada entre eIF5A e o tRNA em complexo com 80S seja dependente do ribossomo. Os experimentos de *Programmed Ribosomal Frameshifting* (PRF) revelaram um aumento na taxa de PRF para os sinais dos vírus L-A e HIV-1 nas linhagens mutantes para eIF5A, demonstrando que a função de eIF5A interfere com eventos de recodificação de mRNAs. Além disso, os mesmos mutantes apresentaram aumento em *misincorporation* para códons *near-cognates*, bem como aumento significativo no fenômeno de *readthrough* para o códon UGA. Estes resultados se assemelham a resultados obtidos para outros fatores gerais de tradução e, portanto, sugerem um papel biológico relevante de eIF5A na tradução geral e não somente na tradução específica de proteínas na célula.

ABSTRACT

eIF5A is highly conserved between archaea and eukaryotes and has a unique and essential postranslational modification, called hypusination. eIF5A was initially described as a translation initiation factor (eukaryotic Initiation Factor 5A) but it was shown that eIF5A engaged in translation elongation. Recently findings demonstrated that eIF5A is most important for specific translation of proteins containing consecutive proline residues. In order to deepen the knowledge of function of eIF5A during the translation process, this research studied the functional correlation between eIF5A and the alanine tRNA (tRNA^{Ala}), revealed as a genetic interaction in *Saccharomyces cerevisiae*, and also evaluated the effect of eIF5A in events of protein synthesis as Programmed Ribosomal frameshifting (PRF), misincorporation and readthrough using dual luciferase reporters. First, the allele specificity of the high copy suppression caused by tRNA^{Ala} and the ability of tRNAs for other amino acids to suppress the growth of eIF5A mutants were analyzed, and the results showed that this deletion does not occur in an allele specific manner and interestingly, among other tRNAs tested, only tRNA^{iMet} is able to suppress the growth phenotype of the eIF5A mutant *tif51A^{K56A}*. The suppression induced by these tRNAs does not reflect in improvement of the mutant defect in polysomal profile, for both cases. It was also tested direct physical interaction between eIF5A and tRNA^{Ala} using three-hybrid system, however, no interaction was detected, suggesting that the interaction observed between eIF5A and tRNA in the 80S complex is dependent on the ribosome. The Programmed Ribosomal frameshifting (PRF) experiments showed an increase in PRF numbers for the signals of the virus LA and HIV-1 in eIF5A mutant strains, demonstrating that eIF5A function interferes with mRNA recoding events. Furthermore, the same mutants showed an increase in misincorporation at near-cognate codons, as well as significant increase in the phenomenon of readthrough at the UGA codon. These results are similar to results obtained for other general translation factors and thus suggest a relevant biological role for eIF5A in general translation and not only in the translation of a specific set of proteins in the cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem do ribossomo bacteriano por microscopia eletrônica de transmissão	3
Figura 2.	Estrutura cristalográfica do ribossomo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
Figura 3.	Estrutura geral de um tRNA.	6
Figura 4.	Posição dos tRNAs no ribossomo de bactéria (70S).	7
Figura 5.	Visão global da tradução em eucariotos.....	9
Figura 6.	Representação esquemática do mecanismo de escaneamento do ribossomo e início da tradução em eucariotos.....	11
Figura 7.	Estrutura do complexo tRNA com aminoacil-tRNA sintetase.....	13
Figura 8.	Esquema de elongação da tradução de eucariotos.....	17
Figura 9.	Comparação estrutural entre eRF1 e um tRNA.....	18
Figura 10.	Esquema de término da tradução e reciclagem do ribossomo em eucariotos.	20
Figura 11.	Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de eIF5A.	22
Figura 12.	Modificação pós-traducional de eIF5A: hipusinação.	23
Figura 13.	Modificação pós-traducional de EF-P em <i>E. coli</i>	27
Figura 14.	Semelhança estrutural entre eIF5A e EF-P.	28
Figura 15.	Localização de eIF5A no ribossomo.....	29
Figura 16.	Ensaio de sensibilidade a temperatura dos mutantes <i>tif51A-1</i> , <i>tif51A^{K56A}</i> e <i>tif51A^{Q22H/L93F}</i> para o tRNA ^{Ala} em alto número de cópias.	51
Figura 17.	Alinhamento das sequências dos genes de tRNA para fenilalanina que possuem o anticódon GAA.....	52
Figura 18.	Ensaio de sensibilidade a temperatura dos mutantes <i>tif51A^{K56A}</i> e <i>tif51A^{Q22H/L93F}</i> contendo os diferentes tRNAs indicados em alto número de cópias.	54
Figura 19.	Mutagênese sítio-dirigida para substituição dos anticódons dos tRNAs de alanina e fenilalanina.....	56

Figura 20.	Efeito dos tRNAs com anticódons substituídos nas linhagens selvagem e mutantes de eIF5A.....	58
Figura 21.	Efeito dos supressores em alto número de cópias tRNA ^{Ala} e eEF2 no perfil polissomal do mutante <i>tif51A^{K56A}</i>	61
Figura 22.	Efeito do tRNA ^{Met} no perfil polissomal do mutante <i>tif51A^{K56A}</i>	62
Figura 23.	Esquema ilustrado do sistema de triplo-híbrido de RNA utilizado neste trabalho.....	64
Figura 24.	Avaliação da interação física entre eIF5A e o tRNA ^{Ala} pelo sistema de triplo-híbrido.	66
Figura 25.	Esquema dos mecanismos de <i>Programmed Ribosomal Frameshifting</i>	69
Figura 26.	Esquema dos repórteres de duas luciferases utilizados neste trabalho.	70
Figura 27.	Mutantes de eIF5A (<i>tif51A-1</i> e <i>tif51A-3</i>) apresentam aumento na taxa de PRF - 1	71
Figura 28.	Efeitos do PRF -1 na propagação viral.	72
Figura 29.	Esquema representativo do pareamento códon-anticódon da interação <i>near-cognate</i> entre tRNA e mRNA.	73
Figura 30.	Ensaio de luminescência para <i>misincorporation</i> nos mutantes <i>tif51A-1</i> e <i>tif51A-3</i> de eIF5A.....	74
Figura 31.	Ensaio de luminescência utilizando dois diferentes mutantes de eIF5A (A1 e A3).	76
Figura 32.	Mecanismo de reconhecimento de códon de parada e terminação da tradução em eucariotos.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Clones isolados no rastreamento de supressores em alto número de cópias utilizando o alelo mutante <i>tif51A^{Q22H/L93F}</i> que já haviam sido isolados em rastreamentos anteriores utilizando o mutante <i>tif51A-1</i>	31
Tabela 2.	Tabela contendo potenciais supressores isolados no rastreamento de supressores em alto número de cópias utilizando o alelo mutante <i>tif51A^{Q22H/L93F}</i>	32
Tabela 3.	Linhagens utilizadas neste trabalho.	36
Tabela 4.	Plasmídeos utilizados neste estudo.	37
Tabela 5.	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	angstron
°C	graus Celcius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
BSA	soroalbumina bovina
CCA	cisteína-cisteína-gilicina
cm	centímetro
C-terminal	carboxi-terminal
DC	<i>decoding center</i> (sítio de decodificação)
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O. _{254nm}	densidade ótica a 254 nm
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF	fator de início da tradução de eucarioto
eEF	fator de elongação da tradução de eucarioto
eRF	fator de término da tradução de eucarioto
g	grama
GGQ	glicina-glicina-glutamina
GTP	trifosfato de guanosina
GDP	difosfato de guanosina
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani

M	molar
m7G	7-metilguanosina
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ms	milisegundo
NAD	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
ORF	<i>open reading frame</i> (janela aberta de leitura)
PABP	<i>poli-A binding protein</i> (proteína ligadora de calda de poli adenina)
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
PEG	polietilenoglicol
PTC	<i>peptidil transferase center</i> (sítio peptidiltransferase)
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
tRNA ^{Ala}	RNA transportador de alanina
tRNA ^{Gly}	RNA transportador de glicina
tRNA ^{Leu}	RNA transportador de leucina
tRNA ^{Met}	RNA transportador de metionina
tRNA ^{Phe}	RNA transportador de fenilalanina
tRNA ^{Pro}	RNA transportador de prolina

tRNA _i ^{Met}	RNA transportador de metionina iniciadora
RNase	ribonuclease
SC	meio sintético completo para levedura
TAE	tris-acetato EDTA
TE	tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
UTR	<i>untranslated region</i> (região não traduzida do mRNA)
UV	ultravioleta
V	volt
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> (base nitrogenada para levedura)
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i> (meio complexo para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)
xg	aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Tradução em eucariotos.....	2
1.1.1.	Início da tradução	10
1.1.2.	Elongação da tradução	12
1.1.3.	Término e reciclagem	17
1.2.	O fator de tradução eIF5A	21
2	OBJETIVOS	33
2.1.	Objetivo geral	34
2.2.	Objetivos específicos	34
2.2.1.	Avaliar a especificidade alélica da supressão em alto número de cópias do tRNA de alanina em diferentes alelos mutantes da proteína eIF5A.....	34
2.2.2.	Analisar o efeito da troca de anticódon do tRNA de alanina na supressão do mutante <i>tif51A^{Q22H/L93F}</i>	34
2.2.3.	Analisar o perfil polissomal dos mutantes da proteína eIF5A na presença do tRNA de alanina.	34
2.2.4.	Testar a possibilidade de interação física entre eIF5A e o tRNA de alanina.....	34
2.2.5.	Análises de <i>Programmed Ribosomal Frameshift</i> (PRF), <i>misincorporation</i> e <i>readthrough</i> de mutantes de eIF5A.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1.	Material.....	36
3.2.	Métodos.....	42
3.2.1.	Clonagem gênica	42

3.2.1.1. Obtenção do DNA molde	42
3.2.1.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	42
3.2.2. Mutagênese sítio-dirigida	43
3.2.3. Sequenciamento de DNA	44
3.2.4. Teste de sensibilidade a temperatura.....	45
3.2.5. Perfil polissomal de levedura	46
3.2.5.1. Preparação do gradiente de sacarose	46
3.2.5.2. Preparação do extrato celular total e centrifugação dos gradientes.....	46
3.2.5.3. Fracionamento dos gradientes	46
3.2.6. Ensaio de β -galactosidase	47
3.2.7. Ensaio de luminescência.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Especificidade alélica da supressão em alto número de cópias do tRNA ^{Ala}	50
4.2. Avaliação da supressão de mutantes de eIF5A por tRNAs para outros aminoácidos.....	51
4.3. Efeito da troca do anticódon na supressão do tRNA ^{Ala}	55
4.4. Análise do perfil polissomal de <i>tif51A</i> ^{K56A} na presença de tRNA ^{Ala} e tRNA ^{Met} em alto número de cópias.....	59
4.5. Análise de interação física entre eIF5A e o tRNA ^{Ala} por triplo-híbrido.....	63
4.6. Análise dos eventos de tradução <i>Programmed Ribosomal Frameshifting</i> (PRF), <i>misincorporation</i> e <i>readthrough</i> utilizando repórteres de duas luciferases.....	66
5 CONCLUSÕES.....	78
6 PERSPECTIVAS.....	80
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO 1	95

1.1. Tradução em eucariotos

A tradução é um dos mecanismos altamente conservados ao longo da evolução e corresponde a etapa final da expressão gênica, onde uma sequência polipeptídica é sintetizada a partir de um mRNA transcrito da informação contida no DNA. A tradução é mediada por um dos maiores complexos presentes em todos os domínios da vida, formado de proteína e RNA, o ribossomo. O ribossomo traduz as informações contidas em um mRNA em cadeias polipeptídicas com muita rapidez e acurácia. Apesar de estarem presentes em todos os domínios da vida, os ribossomos possuem diferenças consideráveis tanto na montagem quanto na estrutura, quando comparamos procariotos e eucariotos. Tais diferenças propiciam a utilização de fármacos eficientes e com ação relativamente específica. Estes complexos foram e são de extrema importância não somente pela questão clínica, como para a caracterização funcional de fatores que atuam de alguma forma na tradução (SOHMEN et al., 2009). A estrutura do ribossomo foi descrita pela primeira vez como microssomos, estruturas que renderam um prêmio Nobel em 1974 a George Palade, que conseguiu as primeiras imagens por microscopia eletrônica de transmissão, levando ao primeiro modelo 3D dos ribossomos (Figura 1).

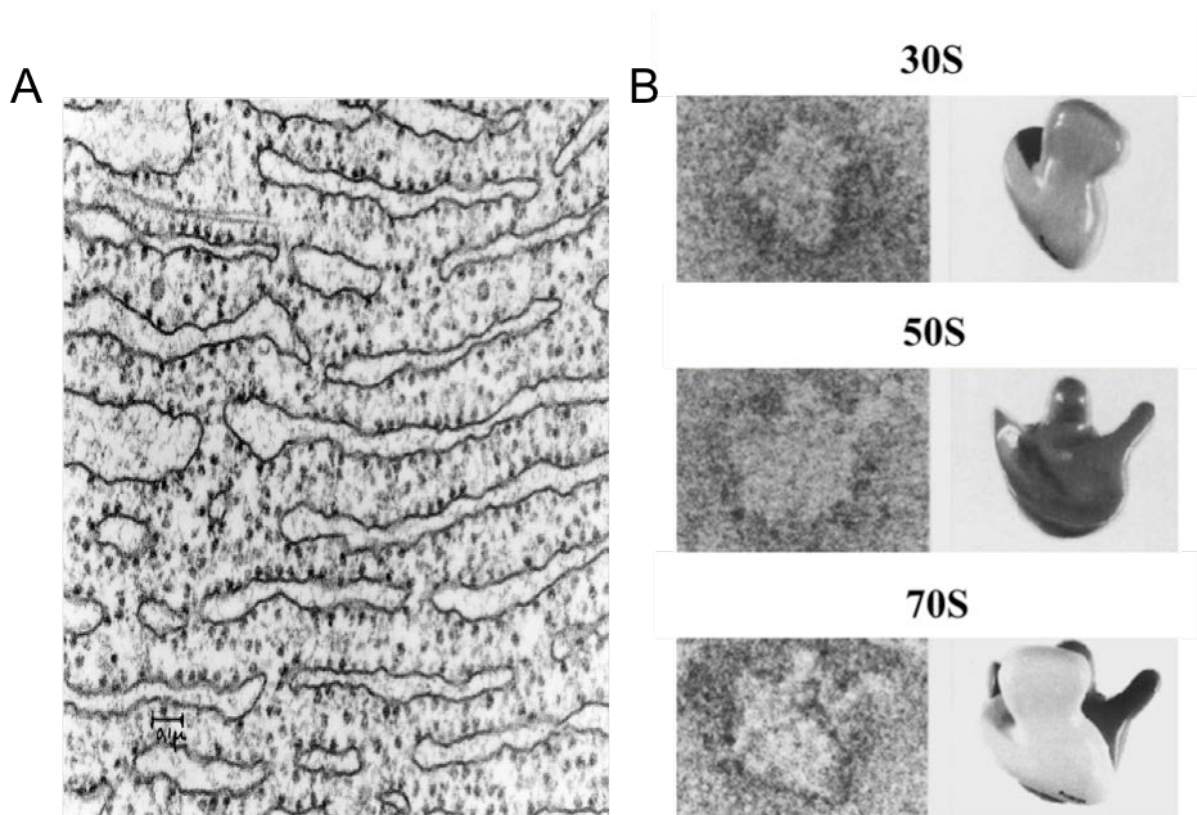


Figura 1. Imagens do ribossomo bacteriano. A Imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos microssomos descritos por George Palade (PALADE E SIEKEVITZ, 1956). B Imagens de microscopia eletrônica do ribossomo revelando a forma das subunidades. Tais imagens foram utilizadas como base para a primeira modelagem do ribossomo em 3D (WITTMANN, 1983).

Estudos estruturais dos ribossomos levaram a elucidação da estrutura em nível atômico dos ribossomos de bactérias, revelando em detalhes esta complexa macromolécula e seus sítios funcionais (BAN et al., 2000; CARTER et al., 2000; SCHLUENZEN et al., 2000). Em seguida a estrutura cristalográfica, resolvida por raios-X, foi demonstrada para ribossomos de *Saccharomyces cerevisiae* (BEN-SHEM et al., 2010; BEN-SHEM et al., 2011) e mais recentemente foram elucidadas as estruturas para os ribossomos de humano, *D. melanogaster* (ANGER et al., 2013) e a subunidade menor do ribossomo de coelhos, por crioletromicrografia (LOMAKIN E STEITZ, 2013).

O ribossomo é constituído de duas subunidades definidas pelo seu coeficiente de sedimentação S: a subunidade menor (30S em procariotos e 40S em eucariotos) e a subunidade maior (50S em procariotos e 60S em eucariotos). As duas subunidades

ribossomais interagem entre si, para a formação do complexo ribossomal traducionalmente ativo. A estrutura do ribossomo e seus componentes são extremamente conservadas em todos os domínios da vida. Porém os ribossomos de eucariotos são mais complexos e maiores, contendo um RNA adicional, e segmentos de expansão nos outros RNAs ribossomais conservados, assim como proteínas adicionais, e também extensões em algumas cadeias polipeptídicas. Na Figura 2, podemos observar a estrutura do ribossomo de *S. cerevisiae* obtida por cristalografia.

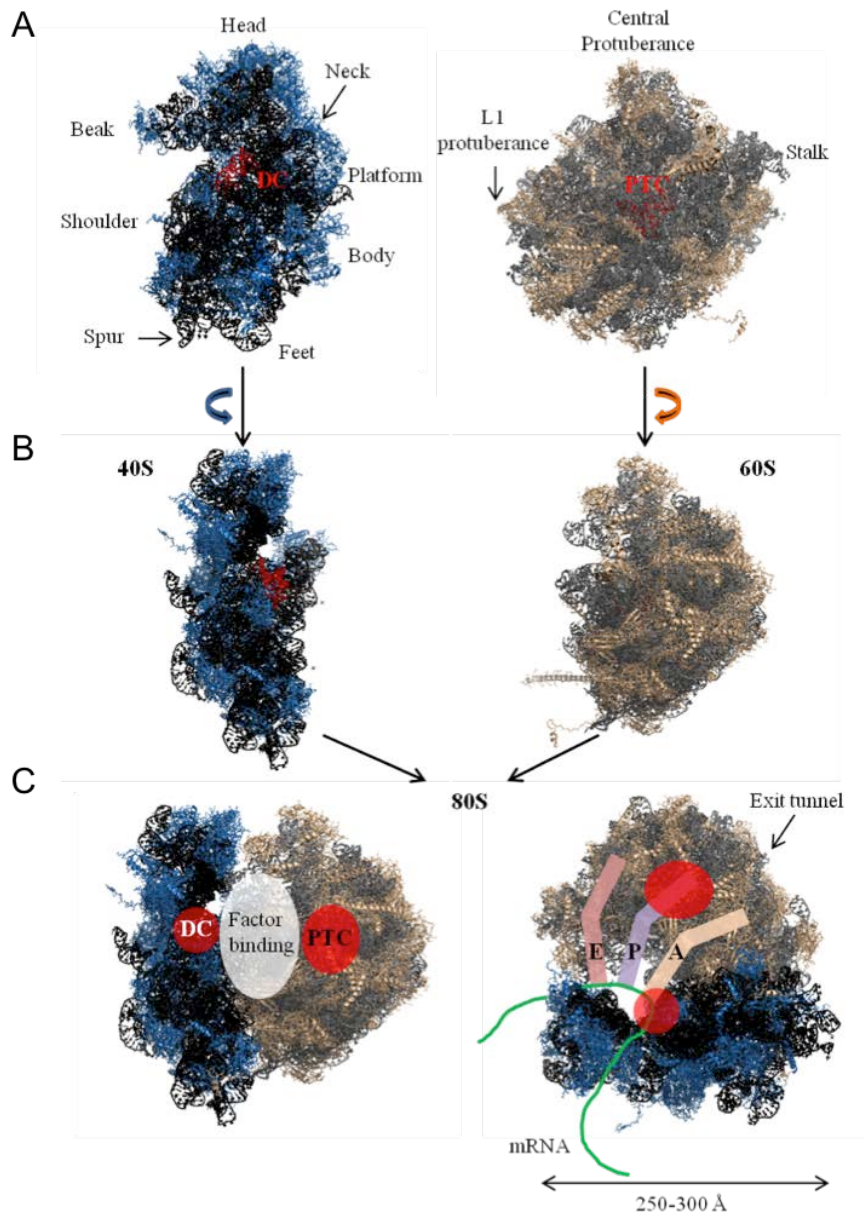


Figura 2. Estrutura cristalográfica do ribossomo de *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Visão frontal indicando as estruturas na superfície da subunidade menor e maior, esquerda e direita, respectivamente; (B) visão lateral das subunidades do ribossomo onde estão representados o rRNA em preto e as proteínas em azul (40S) e o rRNA em cinza e as proteínas em dourado (60S); (C) Visão funcional, destacando os sítios DC (centro de decodificação), *factor binding* (onde ocorre a ligação dos fatores de tradução durante a elongação e término) e o PTC (centro da peptidiltransferase), bem como os sítios A (aminoacil), P (peptidil) e E (*exit* ou de saída), onde os tRNAs são acomodados durante a tradução (DELANO, 2002).

A interação entre as subunidades ribossomais é de extrema importância para guiar os tRNAs no ribossomo. Os tRNAs são as moléculas de RNA que mais sofrem modificações, oitenta das noventa e cinco modificações descritas para RNAs são observadas em tRNAs (JACKMAN E ALFONZO, 2013). A estrutura secundária e terciária de um tRNA é mostrada na Figura 3. Devido a complementariedade de bases, a estrutura secundária dos tRNAs forma uma estrutura característica, formando três braços ou *loops*, e podendo ter um braço adicional para alguns tRNAs específicos. Os braços são denominados aceptor, T, D e do anticódon. Na extremidade 3' dos tRNAs é adicionada, pós-transcricionalmente, uma sequência de três bases (CCA), onde ocorre a ligação dos aminoácidos específicos (Figura 3).

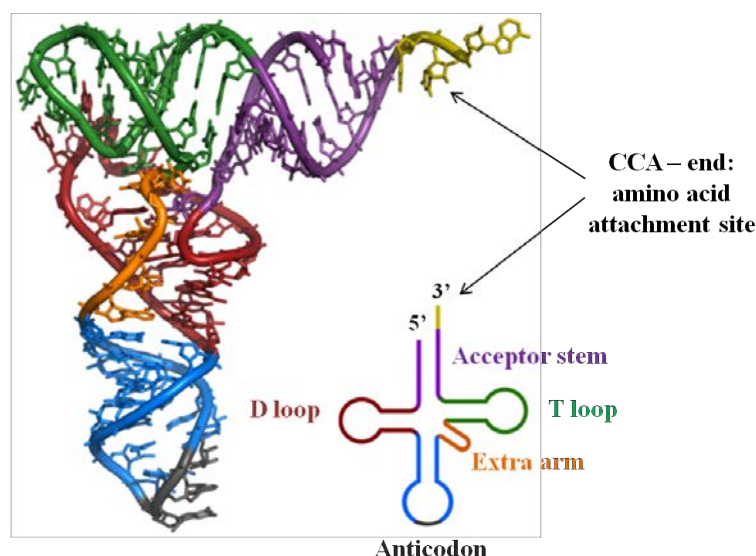


Figura 3. Estrutura geral de um tRNA. Os braços são formados por regiões onde não ocorre pareamento de bases. Os braços que compõem a estrutura dos tRNAs são aceptor (roxo), T (verde), D (vermelho), do anticódon (azul) e o braço extra (laranja). A região do anticódon (em cinza) interage com o códon do mRNA, que está posicionado no *decoding center*, localizado na subunidade menor do ribossomo, e o braço aceptor é covalentemente ligado ao aminoácido que interage com o *peptidyl transferase center* (PTC) na subunidade maior (GRIFFITHS-JONES et al., 2005).

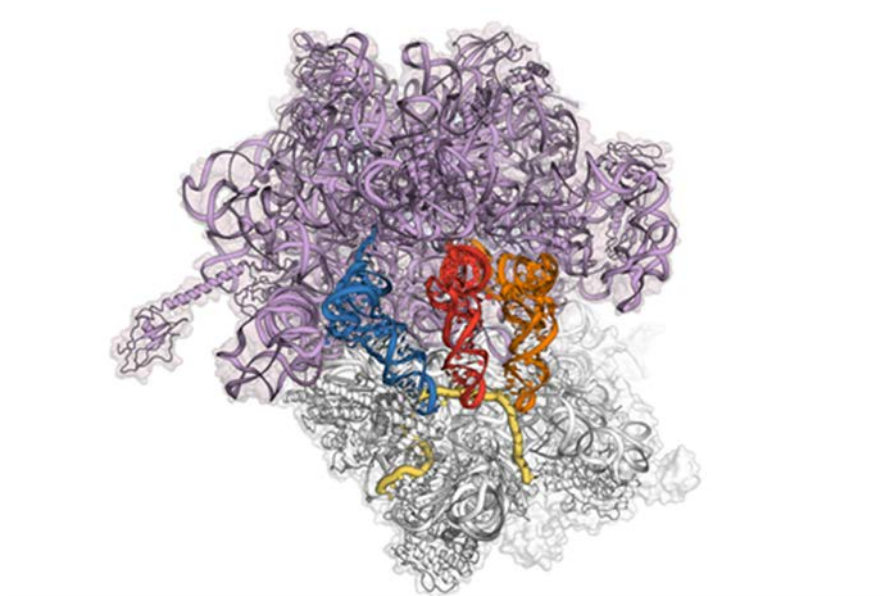


Figura 4. Posição dos tRNAs no ribossomo de bactéria (70S). Ribossomo contendo tRNAs nos sítios A, P e E em laranja, vermelho e azul, respectivamente, e o mRNA em amarelo. Em cinza está representada a subunidade menor (30S) e em roxo a subunidade maior (50S) (YUSUPOV et al., 2001).

Uma vez que o ribossomo encontra-se montado, após um longo processo de maturação das subunidades, a síntese proteica pode ser iniciada. O processo de tradução é extremamente rápido, sendo que a inserção de um aminoácido na cadeia polipeptídica nascente, durante a elongação, ocorre em aproximadamente 60 ms em bactéria (ZAHER E GREEN, 2009). Este processo, apesar de rápido, é muito acurado, somente um erro é incorporado para cada $10^3 - 10^4$ códons lidos (LOFTFIELD E VANDERJAGT, 1972; IBBA E SOLL, 1999). Muitos ribossomos podem traduzir um mesmo mRNA ao mesmo tempo, resultando em estruturas chamadas de polissomos. O mecanismo de polimerização dos aminoácidos pode ser dividido em 3 fases: início, elongação e terminação, sendo que tais etapas são realizadas com auxílio de múltiplos fatores de tradução essenciais. Existe ainda uma quarta etapa, que é chamada de reciclagem do ribossomo, mas esta etapa ainda não é muito bem descrita. O início da tradução é caracterizado pela formação do complexo 80S traducionalmente ativo, onde a regulação é feita de maneira fina através de complexos mecanismos mediados pelos fatores de início. A elongação se inicia a partir da formação da primeira ligação peptídica e trata-se da mais longa etapa, onde os aminoácidos são

continuamente adicionados a cadeia polipeptídica nascente de acordo com os códons contidos no mRNA e o deslocamento do ribossomo sobre este molde. Quando o códon de parada é posicionado no sítio A, ocorre o término. Neste momento, fatores de terminação permitem que o polipeptídeo nascente seja liberado. As subunidades do ribossomo (40 e 60S) podem então ser recicladas e iniciar outro ciclo de tradução no mesmo mensageiro ou iniciar a tradução de outro mensageiro. O esquema geral do processo de tradução em eucariotos está mostrado na Figura 5.

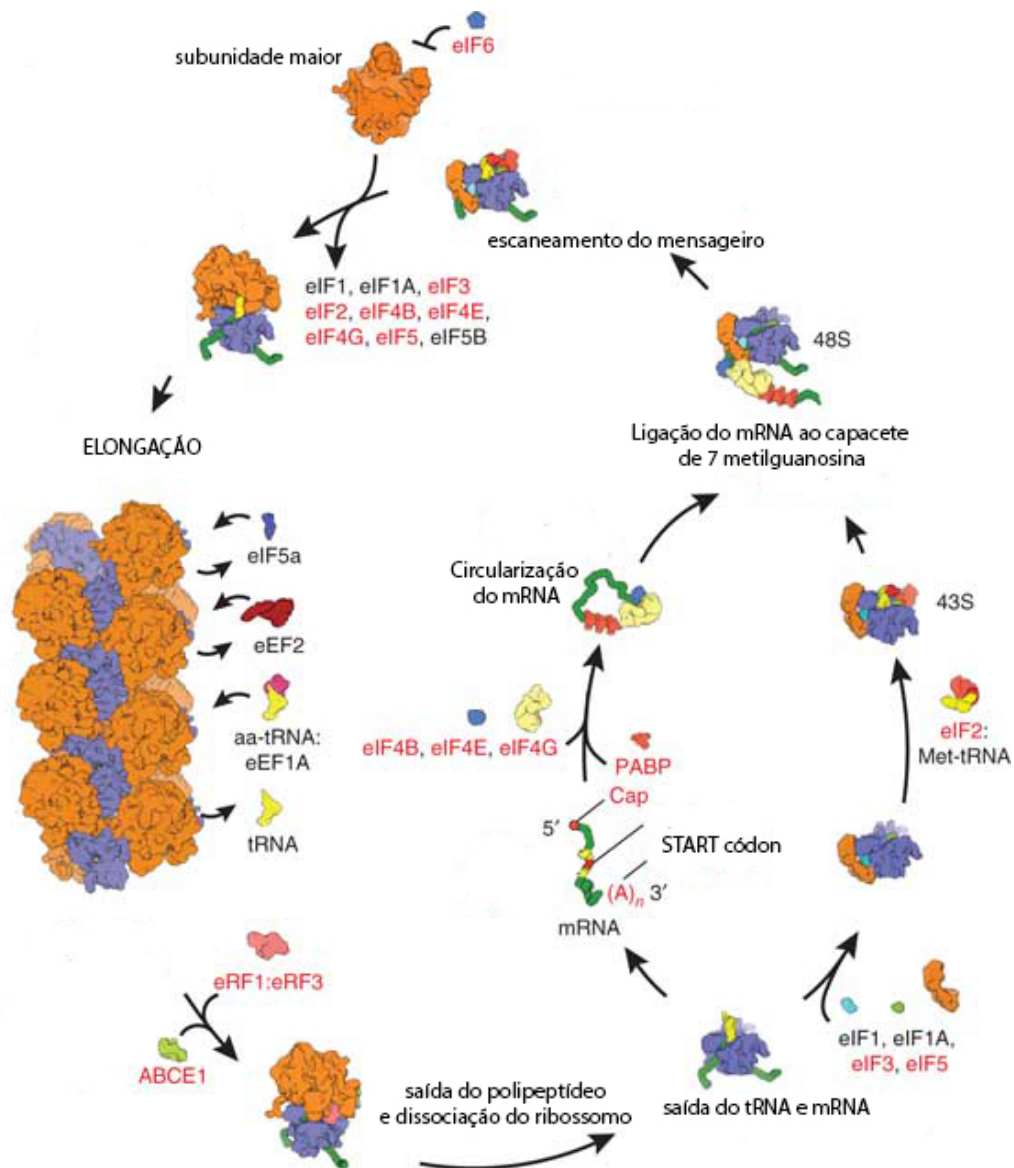


Figura 5. Visão global da tradução em eucariotos. Esquema ilustrativo contendo as quatro etapas da tradução em eucariotos (início, alongação, terminação e reciclagem do ribossomo), bem como os fatores envolvidos nesse processo (MELNIKOV et al., 2012 com modificações).

1.1.1. Início da tradução

A etapa de início da tradução é limitante, sendo que este é o principal ponto de regulação deste processo (SONENBERG E HINNEBUSCH, 2009). Em eucariotos este processo envolve uma série de fatores de início (eIFs) e está esquematizado na Figura 6. A subunidade menor se liga a eIF1A e eIF3, o que previne a associação das subunidades maior e menor do ribossomo (RABL et al., 2011). A metionina iniciadora ligada ao tRNA_i^{Met} é entregue à subunidade menor ligada a eIF2-GTP, formando o complexo ternário. Além de prevenir a associação das subunidades, eIF1A e eIF3 estimulam a ligação do complexo ternário à subunidade menor, formando o complexo de pré-iniciação 43S (ASANO et al., 2000). O mRNA interage na extremidade 3', através da cauda poli-A, com a proteína PABP (poly-A binding protein) e, na extremidade 5', com eIF4E, através do capacete de 7-metilguanosina (m7G). PABP e eIF4E interagem por meio de eIF4G, o que leva à circularização do mensageiro (GINGRAS, RAUGHT E SONENBERG, 1999). Neste momento o mRNA está traducionalmente competente para interagir com o complexo de pré-iniciação. eIF4G facilita a ligação do 43S através da interação com eIF3, resultando no complexo de pré-iniciação 48S. Ocorre então a hidrólise de ATP por eIF4A e se inicia então o escaneamento do mRNA base a base, no sentido 3', até que o primeiro AUG é posicionado no sítio P. Este pareamento leva a quebra de GTP por eIF2, estimulada pela ação conjunta de eIF5 e do 40S (WILSON et al., 2000; PESTOVA et al., 2001; PESTOVA E KOLUPAEVA, 2002; LOMAKIN et al., 2003; UNBEHAUN et al., 2007). Os fatores de início citados acima perdem a afinidade pelo complexo, e a subunidade maior se associa ao complexo 40S, com o tRNA_i^{Met} ocupando o sítio P do ribossomo.

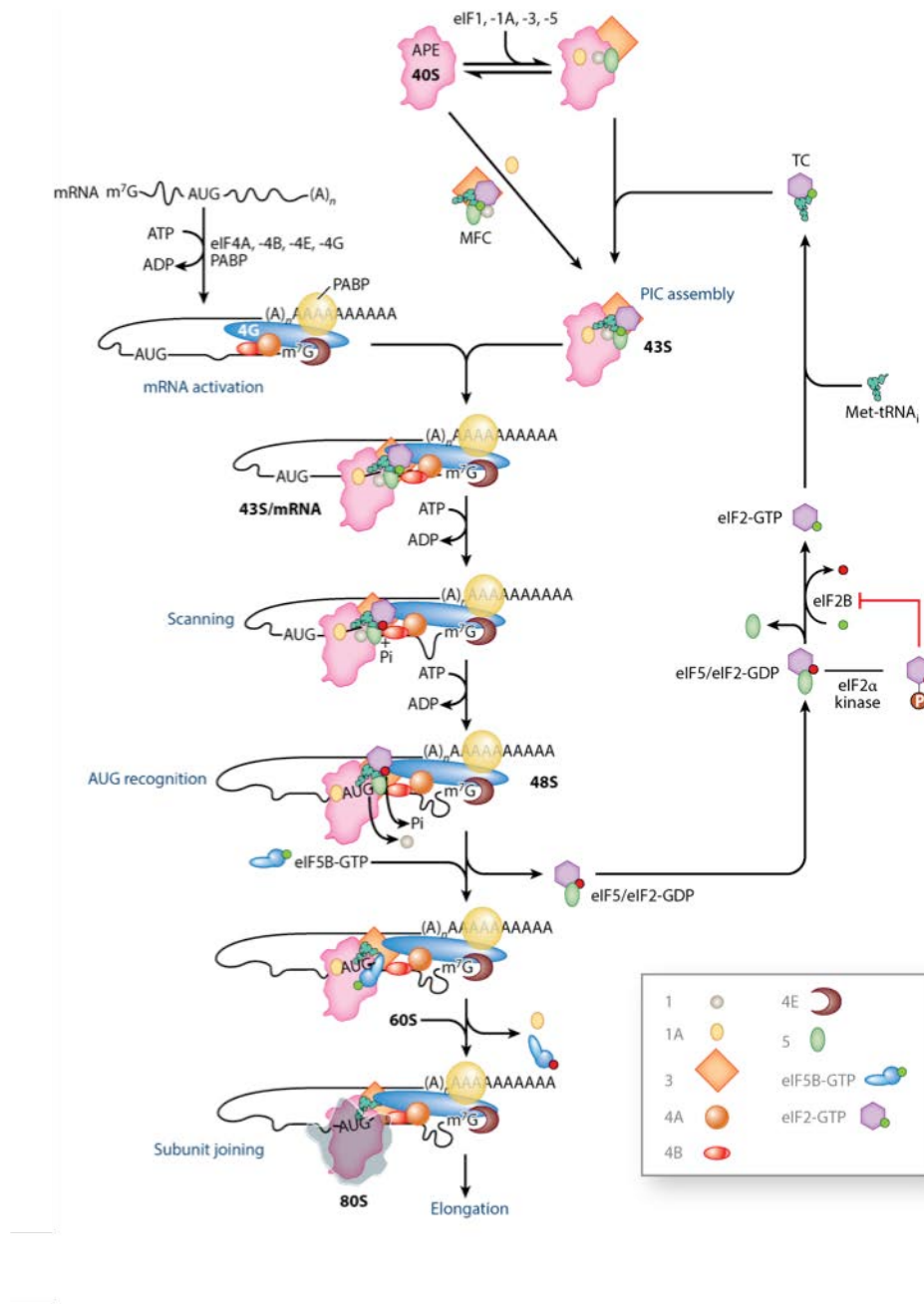


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de escaneamento do ribossomo e início da tradução em eucariotos. Durante a fase de iniciação, o capete de m⁷G do mRNA associa-se ao complexo eIF4F (eIF4G, eIF4E, eIF4A), mediado por eIF4E. O complexo de pré-iniciação 43S, composto pelo ribossomo 40S, complexo ternário (eIF2-GTP-tRNA_i^{Met}), eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3 é recrutado pelas interações entre eIF4G e eIF3, formando o complexo de pré-iniciação 48S. Ocorre, então, o escaneamento do mRNA até o encontro do primeiro AUG. A subunidade 60S é recrutada para este complexo e fatores de iniciação são liberados (HINNEBUSCH, 2014).

1.1.2. Elongação da tradução

Uma vez estabelecido no mRNA durante o início da tradução, o ribossomo está pronto para estender a cadeia polipeptídica, deslizando no mensageiro códon a códon com o auxílio dos tRNAs e fatores de elongação para entregar o aminoácido correto em cada códon posicionado no sítio A. A elongação é a etapa em que a maior parte da síntese proteica ocorre e apresenta a maior velocidade do processo.

O primeiro passo da elongação é a entrega do tRNA aminoacilado (aa-tRNA) ao sítio A do ribossomo. No entanto, antes disso acontecer, os tRNAs precisam ser carregados com os aminoácidos correspondentes, ligados covalentemente por enzimas aminoácido-específicas chamadas aminoacil-tRNA sintetases. Apesar da interação códon-anticódon dirigir a elongação da tradução, o reconhecimento e correto carregamento dos tRNAs pelas aminoacil-tRNA sintetases tem importância comparável no processo de elongação. O carregamento errôneo dos tRNAs pode levar a incorporação de aminoácidos incorretos e a produção de proteínas defeituosas. A correta aminoacilação depende da seleção de dois substratos apropriados pela respectiva aminoacil-tRNA sintetase: o tRNA e o aminoácido. Enquanto os tRNAs são maiores, quando comparadas aos tRNAs, e podem ser facilmente diferenciados entre si, os aminoácidos precisam ser distinguidos somente por suas cadeias laterais. A reação de aminoacilação acontece em duas etapas e ocorre em dois sítios chamados de sítio de ativação e sítio de edição, respectivamente (ERIANI et al., 1995). O aminoácido é primeiramente ativado por uma adenilação impulsionada por ATP e é, então, transferido para a extremidade CCA do tRNA cognato. Através de exclusão estérica dos aminoácidos, conferida pelo tamanho de suas cadeias laterais, e o reconhecimento de propriedades específicas de cada aminoácido, geralmente faz com que o sítio de ativação seja relativamente específico para que somente o aminoácido correto seja ativado e transferido. Porém, aminoácidos que possuem propriedades similares e são menores do que os cognatos podem ocasionar a incorreta ativação e incorporação em uma alta frequência, que poderia causar efeitos deletérios à célula. Para resolver esse problema, algumas aminoacil-tRNA sintetases possuem um segundo sítio ativo responsável pela checagem desses tRNAs, chamado de sítio de edição, onde os tRNAs incorretamente carregados são hidrolisados (FERSHT E KAETHNER, 1976; NUREKI et al., 1998; DOCK-BREGEON et al., 2004; LING, REYNOLDS E IBBA, 2009). A presença de dois sítios catalíticos com diferentes

atividades fortalecem a fidelidade da tradução desde o ponto de síntese dos tRNAs aminoacilados. Na Figura 7 está representada a estrutura de uma aminoacil-tRNA sintetase complexada com seu tRNA cognato, com destaque para os dois sítios ativos da enzima.



Figura 7. Estrutura do complexo tRNA com aminoacil-tRNA sintetase. A estrutura do tRNA (rosa) permite que a sintetase (azul) se ligue tanto ao braço aceptor quanto ao *loop* do anticódon para realizar a ativação e carregamento no sítio de ativação (amarelo). O carregamento do aminoácido é então verificado através do sítio de edição (verde) (BERG, TYMOCZKO E STRYER, 2002).

Os tRNAs corretamente carregados são entregues ao ribossomo através do complexo ternário de elongação, constituído pelo tRNA aminoacilado, eEF1A e GTP. A diferença entre a interação de um tRNA cognato e um tRNA *near-cognate* termina na acomodação ou rejeição do tRNA (RODNINA et al, 2001; VALLE et al, 2002; RODNINA et al, 2005). Primeiro, a ligação inicial do complexo ternário resulta na interação com o sítio A, no qual o anticódon do tRNA é posicionado no centro de decodificação (*decoding center*). Os tRNAs cognatos e *near-cognates* ligados ao complexo ternário são estabilizados através da interação códon-anticódon, que ocorre através da formação de um eficiente pareamento de bases formando

ligações Watson-Crick. Os tRNAs *non-cognates* ligados ao complexo ternário são rapidamente rejeitados no primeiro estágio desta seleção. Quando a seleção do tRNA correto ocorre, um rearranjo no rRNA ocorre, levando a formação de uma estrutura chamada de *mini-helix* formada pela interação códon-anticódon (OGLE et al., 2001; SCHMEING E RAMAKRISHNAN, 2009). Esta estabilização induz mudanças conformacionais no ribossomo que leva a atividade GTPase de eEF1A (PAPE, WINTERMEYER E RODNINA, 1998; RODNINA E WINTERMEYER, 2009; SCHUETTE et al., 2009). tRNAs *non-cognates* não são capazes de estimular os rearranjos necessários no rRNA, e consequentemente falham em estimular a hidrólise de GTP por eEF1A. A mudança conformacional da forma de eEF1A ligada a GDP resulta na perda da interação tanto com o tRNA quanto com o ribossomo. Após o desligamento de eEF1A o aminoacil tRNA passa pelo processo de acomodação no sítio A na porção maior do ribossomo.

A eficiência do passo inicial de seleção não é suficiente para distinguir entre os complexos ternários ligados a tRNAs cognato e *near-cognate*, porque as diferenças entre os valores das taxas de rejeição e acomodação não são distantes o suficiente (GROMADSKI E RODNINA, 2004; GROMADSKI, DAVITER E RODNINA, 2006; MITTELSTAET, KONEVEGA E RODNINA, 2011). Portanto, a diferenciação dos tRNAs *near-cognates* ocorre apenas após a hidrólise de GTP durante a fase de seleção, em um processo conhecido como *proofreading* do tRNA no sítio A do ribossomo. Essa etapa é bem menos conhecida do que a etapa de seleção durante a decodificação. Estudos recentes sugerem que o reconhecimento da geometria canônica da interação códon-anticódon no centro de decodificação induz a estabilização do *loop* do anticódon inteiro pelo rRNA das subunidades menor e maior do ribossomo mediada por íons magnésio (DEMESHKINA et al., 2012). Isso leva a fixação do braço do anticódon através de rearranjos que ocorrem no rRNA 25S e em proteínas ribossomais. A ligação do tRNA cognato no ribossomo estimula o posicionamento da extremidade aceptora no centro de peptidiltransferase. Estudos cinéticos indicam que os aminoacil-tRNAs cognatos são acomodados e formam as ligações peptídicas mais rapidamente (PAPE, WINTERMEYER E RODNINA, 1999; GROMADSKI E RODNINA, 2004). O mecanismo de checagem (*proofreading*) do sítio A do ribossomo é similar em outras macromoléculas como as aminoacil-tRNAs sintetases, discutidas acima, e DNA polimerases. Os passos de seleção e checagem permitem que a ligação dos tRNAs cognatos ao ribossomo seja mais estável, bem como mais rápida na

reação de hidrólise de GTP e acomodação no sítio A do que nos tRNAs *near-cognates* e *non-cognates*.

O centro catalítico ribossomal é composto inteiramente por rRNA, sendo que as proteínas que o estruturam estão a 13 Å de distância (BEN-SHEM et al., 2011). A atividade peptidiltransferase é mediada somente pela subunidade maior do ribossomo (60S), e sozinha pode sintetizar ligações peptídicas tão rápido quanto no ribossomo inteiro (80S). Após a acomodação do tRNA aminoacilado no sítio A, a extremidade CCA no 3' do aminoacil tRNA é estabilizada pelo rRNA 25S e posicionada diretamente no centro de peptidiltransferase, resultando em uma reação quase instantânea. Aminoácidos reagem rápido com ésteres naturalmente para formar ligações peptídicas ($10^{-4}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ na temperatura ambiente), e o ribossomo é capaz de acelerar essa reação de 10^6 a 10^7 vezes (SIEVERS et al., 2004). Estudos recentes sugerem que a ligação dos substratos corretos induzem mudanças conformacionais no PTC que resultam em uma orientação adequada para a catálise. Estas mudanças conformacionais ocorrem devido ao posicionamento do substrato por resíduos conservados no sítio ativo, posicionando de forma que a via de transferência de prótons seja estabilizada (RODNINA, BERINGER E WINTERMEYER, 2007). Como resultado, o cerne catalítico foi conservado estruturalmente e quanto ao mecanismo de ação ao longo da evolução, desde os organismos mais primitivos até os mais complexos, e é um dos elementos mais conservados em todos os seres vivos (WOESE, 2001; KRUPKIN et al., 2011).

Após a formação da ligação peptídica, o sítio A precisa ser esvaziado para permitir a ligação de um novo complexo ternário aa-tRNA+eEF1A+GTP. Para que isso aconteça, é necessário que o peptidil-tRNA seja transferido para o sítio P ao mesmo tempo que o tRNA desacilado que ocupa o sítio P passe para o sítio E e possa ser liberado do ribossomo. Esse processo recebe o nome de translocação e resulta em um reposicionamento dos ligantes nos sítios A, P e E do ribossomo. Imediatamente após a transferência do peptídeo nascente para o tRNA do sítio A, o posicionamento clássico dos tRNAs nos sítios P/P e A/A (essa nomenclatura se refere às posições do tRNA na subunidade maior/posição do tRNA na subunidade menor) adota uma conformação híbrida P/E e A/P (SPAHN et al., 2001; AGIRREZABALA et al., 2008; FISCHER et al., 2010). Este estado híbrido não ocorre antes da desacilação do tRNA no sítio P, possivelmente pelo ancoramento que existe do polipeptídeo nascente no túnel de saída (VALLE et al., 2003). O movimento do tRNA do sítio P para o

estado híbrido envolve uma grande mudança em todo corpo da molécula, enquanto o estado híbrido do tRNA do sítio P somente tem a extremidade CCA posicionada no sítio P. No momento da formação do estado híbrido, eEF2 se liga ao ribossomo e sua interação com ambas subunidades ribossomais levam à transição do estado híbrido para o estado clássico, com gasto de GTP (SPAHN et al., 2004; FRANK et al., 2007). Isso é acompanhado pelo movimento do ribossomo na direção 3' do mRNA em um códon, permitindo que o tRNA do sítio P na subunidade menor seja posicionado no sítio E da mesma subunidade, bem como o tRNA no sítio A seja posicionado no sítio P da subunidade menor (NOLLER et al., 2002).

A transição entre o estado clássico e híbrido é acompanhada por uma extensa mudança conformacional do ribossomo, sendo que o estado clássico é chamado de estado não rotacionado do ribossomo e o estado híbrido de rotacionado, existindo conformações intermediárias entre estes dois extremos (FISCHER et al., 2010). Evidências sugerem que a ligação do complexo ternário eEF1A+aa-tRNA+GTP se liga quando o ribossomo está no estado não rotacionado e quando se encontra no estado rotacionado eEF2 pode se ligar (SPIEGEL, ERMOLENKO E NOLLER, 2007; UEMURA et al., 2010; CHEN et al., 2013). Na Figura 8, podemos observar os estágios que ocorrem na etapa de elongação, bem como os fatores que se ligam ao ribossomo em cada estágio da elongação.

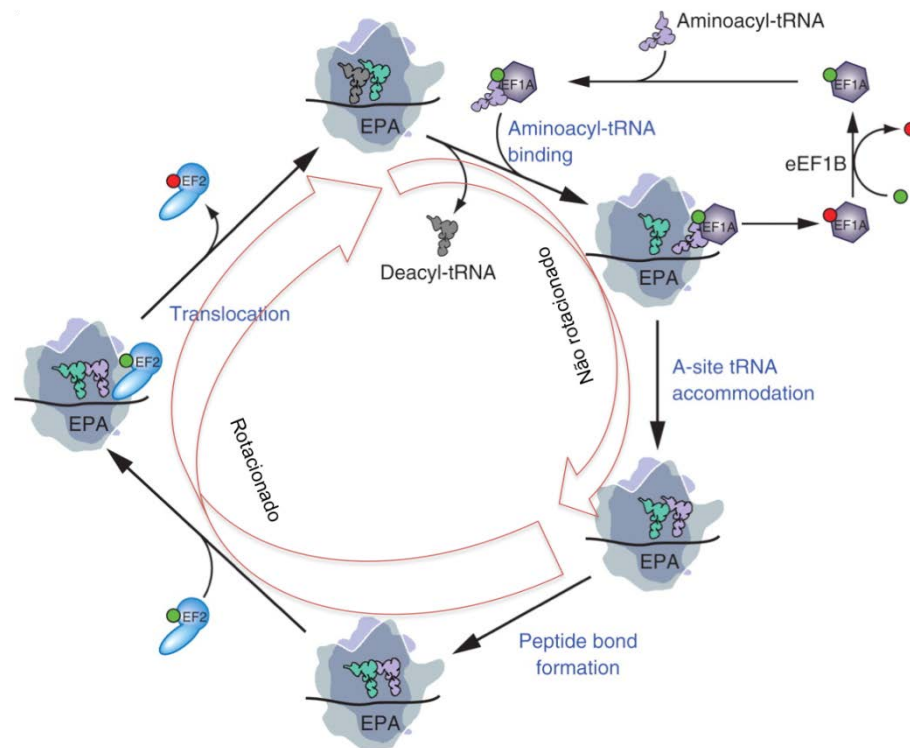


Figura 8. Esquema de elongação da tradução de eucariotos. Durante a elongação da tradução ocorre o posicionamento do tRNA aminoacilado no sítio A, trazido por eEF1A. Após a acomodação do tRNA aminoacilado no sítio A, ocorre a catálise pela subunidade 60S, no PTC (Peptidyl Transferase Center). Neste momento, ocorre a ligação de eEF2, que propicia a translocação do ribossomo, com gasto de GTP. As setas curvas representam os estados rotacionado e não rotacionado do ribossomo durante a elongação (modificado de DEVER E GREEN, 2012).

1.1.3. Término e reciclagem

Existem três códons de parada ou término da tradução, também chamados de códons *nonsense*: UGA, UAG e UAA; os quais marcam o final do produto proteico na maioria dos organismos. Porém em alguns organismos os stop códons UGA e UAG codificam para o vigésimo primeiro e vigésimo segundo aminoácidos, selenocisteína e pirrolisina respectivamente. Não existem tRNAs cognatos para os três códons de parada em levedura. Ao invés disso, fatores proteicos chamados de fatores de terminação ou *release factors* (RFs) se ligam ao ribossomo no sítio A e interagem com o códon de parada, levando a uma reação de hidrólise no PTC, o que resulta na liberação do polipeptídeo nascente ligado ao tRNA do sítio P. Eucariotos possuem apenas um fator de terminação de classe I (eRF1), que é capaz de reconhecer os três stop códons. eRF1 se associa com outro fator de terminação,

de classe II (eRF3), e se liga ao ribossomo como outro complexo ternário, resultando na hidrólise de GTP por eRF3 e ativação de eRF1 (ZHOURAVLEVA et al, 1995; SONG et al, 2000). Pelo fato de eRF1 interagir com os mesmos elementos ribossomais do aminoacil tRNA no sítio A, este fator de terminação funciona como um mimetizador de tRNA (NAKAMURA E ITO, 2011). Na Figura 9, podemos observar essa mimetização estrutural que permite o término da tradução. O complexo formado entre eRF1-eRF3 assemelha-se estruturalmente a um tRNA ligado a eEF1A, sendo que a extremidade CCA do tRNA é substituída por GGQ em eRF1, permitindo que o término da tradução ocorra (CHAVATTE et al, 2002).

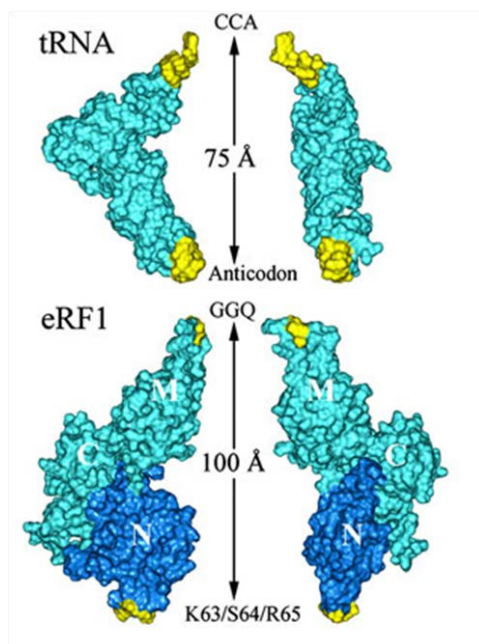


Figura 9. Comparação estrutural entre eRF1 e um tRNA. A similaridade das estruturas é mostrada tanto na visão lateral (esquerda) quanto na visão frontal (direita). O domínio amino-terminal de eRF1 mimetiza o braço do anticódon do tRNA, o domínio central é equivalente ao braço aceptor e o domínio carboxi-terminal é responsável pela interação com eRF3 (modificada de CHAVATTE et al., 2002).

A liberação da cadeia polipeptídica nascente deixa o ribossomo 80S ligado ao mRNA, ao tRNA desacilado no sítio P e eRF1 no sítio A e todos esses elementos precisam ser desligados e liberados do mRNA para permitir outros ciclos de tradução. Neste ponto, existem algumas diferenças entre procariotos e eucariotos, já que procariotos possuem um fator de liberação (RRF), que é capaz de desestabilizar a interação das ligações formadas

entre as subunidades ribossomais (GAO et al., 2005; DUNKLE et al., 2011), neste momento EF-G (homólogo de eEF2 em procariotos) ligado a GTP promove a separação das duas subunidades do ribossomo, e esta dissociação é estabilizada pela ligação de IF3 à subunidade menor do ribossomo, levando a liberação do mRNA, tRNA e o fator de terminação (RF1 ou RF2) (HIROKAWA et al., 2005; PESKE, RODNINA E WINTERMEYER, 2005; ZAVIALOV, HAURYLIUK E EHRENBURG, 2005). Em eucariotos, não existe nenhum fator com ação semelhante a RRF (FREISTROFFER et al., 1997; DEVER E GREEN, 2012). E o mecanismo de liberação dos fatores associados ao término da tradução em eucariotos ainda não está completamente elucidado. Estudos recentes descrevem que a participação de uma ATPase chamada de ABCE1 (eucariotos superiores) e Rli1 (leveduras) pode promover a separação das subunidades ribossomais em combinação com eRF1 (BECKER et al., 2012). ABCE1/Rli1 é também requerida na reciclagem de ribossomos parados em vias de recuperação de mRNAs, como as vias de *No-go decay* (NGD) e *Non-stop decay* (NSD). As proteínas Dom34 e sua parceira com atividade GTPase Hsb1 são parálogas do complexo eRF1-eRF3 e possuem similaridade na forma de se ligarem ao sítio A de ribossomos parados. A ligação de ABCE1/Rli1 leva a desassociação das subunidades ribossomais e reciclagem (SHOEMAKER, EYLER E GREEN, 2010; BECKER et al., 2012). Após a separação das duas subunidades, pode ocorrer a ligação de eIF3 ao 40S, impedindo a re-associação com 60S. O mecanismo geral do término da tradução em eucariotos está representado na Figura 10, indicando os fatores envolvidos neste processo.

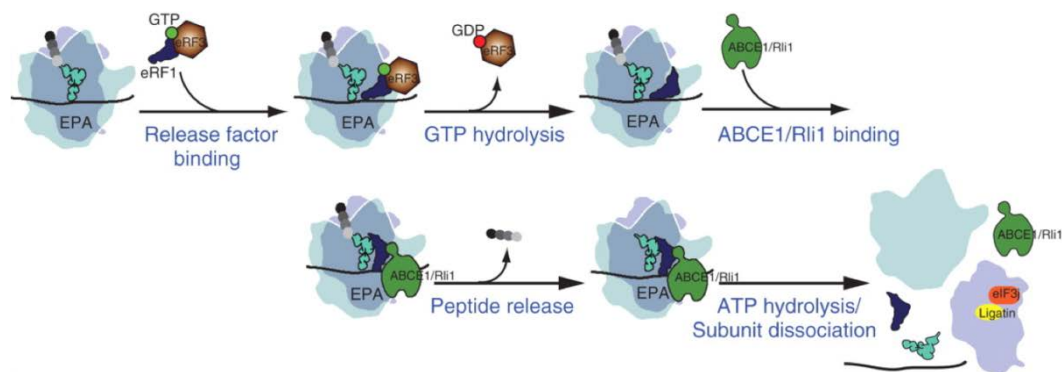


Figura 10. Esquema de término da tradução e reciclagem do ribossomo em eucariotos. O término da tradução ocorre quando um códon de terminação é posicionado no sítio A do ribossomo. Neste momento o complexo de término eRF1+eRF3+GTP liga-se ao ribossomo, interagindo no sítio A. Ocorre quebra de GTP e liberação de eRF3, permitindo que eRF1 interaja com ABCE1/Rli1. Após a ligação de ABCE1/Rli1, ocorre a liberação do polipeptídeo recém-traduzido e dissociação das subunidades. Em seguida, a ligação de eRF3 impede a re-associação das subunidades ribossomais (DEVER E GREEN, 2012).

1.2. O fator de tradução eIF5A

Tendo em vista a conservação do processo de tradução ao longo dos domínios da vida, não surpreende a conservação dos fatores que atuam na tradução. Dentre os vários fatores que atuam no processo de tradução, existe a proteína eIF5A, inicialmente descrita como um fator de início da tradução (**e**ucaryotic **I**nitiation **F**actor **5A**), mas não possui seu papel tão bem esclarecido no processo de síntese proteica, como a maior parte dos fatores contextualizados anteriormente nesta introdução. Além de conservado evolutivamente, eIF5A é essencial em todos os organismos testados (BENNE E HERSHEY, 1978). eIF5A é uma proteína de aproximadamente 17 kDa (variando de acordo com a espécie), e presente tanto em eucariotos quanto em arqueas, mas não em bactérias (PARK, WOLFF E FOLK, 1993b; PARK, LEE E JOE, 1997; KLIER et al., 1993). As proteínas eIF5A de *S. cerevisiae* e de mamíferos compartilham 63% de identidade (SCHNIER et al., 1991; CHEN E LIU, 1997), sendo que a proteína de humano é capaz de substituir a proteína de levedura, o que comprova a conservação funcional deste fator (SCHNIER et al., 1991). Em levedura, existem dois genes homólogos que codificam para eIF5A: *TIF51A*, que é expresso em condições de aerobiose; e *TIF51B*, expresso somente em condições de anaerobiose.

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional específica e exclusiva chamada de hipusinação, que ocorre em um resíduo de lisina na posição 51 em levedura (CHEN E LIU, 1997; PARK, LEE E JOE, 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês *hypusine*: *hydroxyputrescine-lysine*) ocorre através da transferência de um grupamento aminobutil da molécula de espermidina para o amino grupo livre da lisina alvo, pela desoxi-hipusina sintase (Dys1 em levedura). Em seguida, a hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura) gera eIF5A madura e ativa (PARK et al., 2010) (Figura 12). Foi demonstrada que a hipusinação é irreversível, de modo que eIF5A modificada permanece assim até que seja degradada (PARK, WOLFF E FOLK, 1993a). A conservação observada nas regiões flangeadoras do resíduo em que ocorre a hipusinação demonstra a importância desta modificação (MAGDOLEN et al., 1994; CHEN E LIU, 1997). Na Figura 11, temos o alinhamento múltiplo do gene que codifica para eIF5A em diferentes organismos, destacando esta conservação.

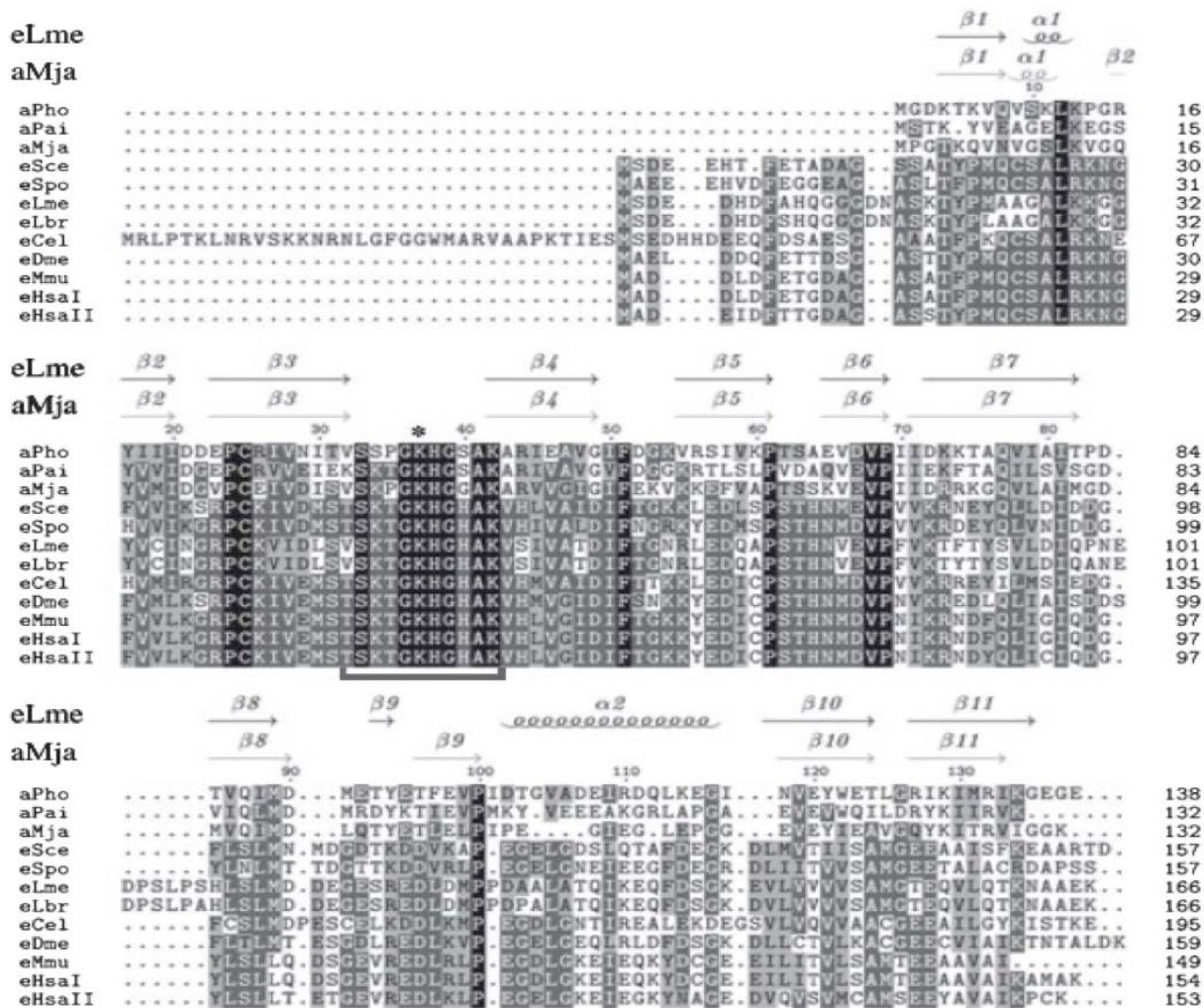


Figura 11. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos de eIF5A. As seqüências de aPho (*Pyrococcus horikoshii*), aPai (*Pyrobaculum aerophilum*), aMja (*Methanococcus jannaschii*), eSce (*Saccharomyces S. cerevisiae*), eSpo (*Schizosaccharomyces pombe*), eLme (*Leishmania mexicana*), eLbr (*Leishmania braziliensis*), eCel (*Caenorhabditis elegans*), eDme (*Drosophila melanogaster*), eMmu (*Mus musculus*), eHsaI (*Homo sapiens* eIF5A-1) e eHsaII (*Homo sapiens* eIF5A-2) foram comparadas através do programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). As estruturas secundárias de eIF5A de eLme e aMja estão indicadas abaixo do alinhamento com setas para estruturas β e curvas para α -hélices. Os resíduos de aminoácidos completamente conservados em todos os organismos estão destacados em preto e aqueles que são parcialmente conservados estão marcados em cinza. A maior intensidade do cinza da marcação está associada a maior conservação do resíduo entre os organismos. A marcação horizontal, abaixo da seqüência, indica os resíduos que fazem parte da região onde está localizada a hipusina e o asterisco indica a lisina modificado para hipusina (DIAS et al., 2008).

A funcionalidade de eIF5A é dependente da hipusinação pois foi observado que quando a lisina alvo é substituída por arginina, no mutante K51R, a célula é inviável (SCHNIER et al., 1991). Na Figura 12, podemos observar o processo de hipusinação tanto em arqueas quanto em eucariotos, mostrando que o passo de hidroxilação não ocorre em arqueas, já que estes organismos não apresentam a segunda enzima modificadora da via. Em levedura, apesar de presente, a enzima responsável pelo segundo passo da via não é essencial para a viabilidade celular (THOMPSON, CANO E VALENTINI, 2003), diferentemente do que ocorre em eucariotos superiores, onde foi demonstrada a essencialidade deste gene (HANAUSKE-ABEL et al., 1994).

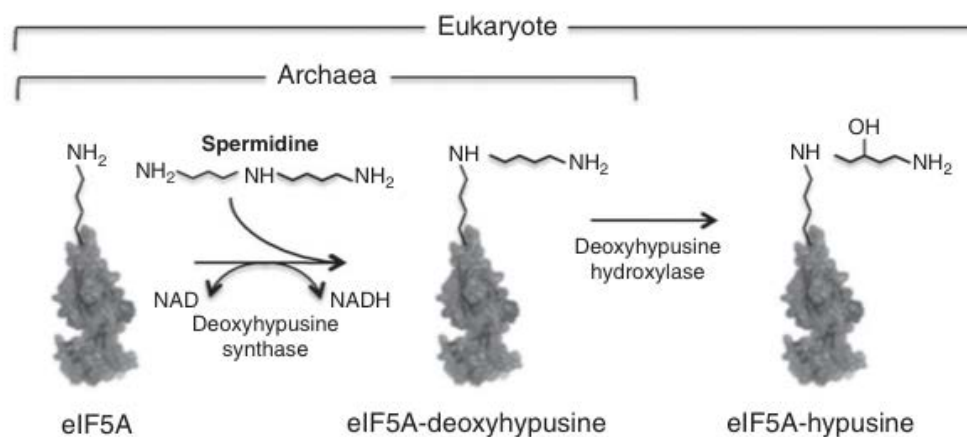


Figura 12. Modificação pós-traducional de eIF5A: hipusinação. O grupo aminobutil da espermidina é transferido para o amino grupo do resíduo específico de lisina (51 em eIF5A de levedura) pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1). Em seguida, o intermediário de eIF5A é hidroxilado, pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1), formando assim eIF5A hipusinado (modificada de ROSSI et al., 2014).

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de três espécies de arqueas (KIM et al., 1998; PEAT et al., 1998; YAO et al., 2003), de dois protozoários (1XTD e 1X60), de *S. cerevisiae* (3ER0) e de humano (3CPF) foram determinadas e revelaram várias características comuns. Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como

Translation Protein SH3-like motif, o qual também está presente em algumas proteínas ribossomais. O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (*Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold*), o qual está presente em proteínas de diferentes funções celulares que se ligam a RNA ou DNA fita simples (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; (GOUGH et al., 2001). No entanto, não está demonstrado ainda para eIF5A quais as funções específicas desses domínios na interação com ligantes.

eIF5A foi isolado de ribossomos obtidos de lavado de lisado de reticulócitos de coelho, um modelo experimental para identificação de fatores de início de tradução, e demonstrou um efeito estimulatório na síntese *in vitro* de metionil-puromicina (BENNE E HERSHEY, 1978). O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de tRNA^{Met}, à puromicina, através de catálise ribossomal. Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, assim, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, que também foram testados (BENNE E HERSHEY, 1978). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de iniciação de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

Após o dado de que a ausência de eIF5A causa apenas uma redução de 30% na síntese proteica total, este fator foi correlacionado com outros processos, celulares na tentativa de se entender o papel desta proteína essencial e única. Durante este período eIF5A foi correlacionada com transporte núcleo citoplasmático da proteína REV de HIV-1 (RUHL et al., 1993; BEVEC et al., 1996; BEVEC e HAUBER, 1997; LIU et al., 1997; HOFMANN et al., 2001), porem outros estudos não confirmaram tais atribuições para eIF5A nesta função (HENDERSON e PERCIPALLE, 1997; SHI et al., 1997; LIPOWSKY et al., 2000; VALENTINI et al., 2002).

Dentre os estudos focados na função de eIF5A neste processo está a análise da localização subcellular de REV, utilizando diferentes linhagens de células de mamíferos, que revelou que eIF5A, produzida transientemente, está localizada no núcleo e que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática coincidente com o retículo plasmático (SHI et al., 1996). Ainda, foi demonstrado que na presença de inibidores

da transcrição a localização de Rev é alterada completamente, em contraste com a de eIF5A que permanece inalterada. Entretanto, na presença de inibidores da tradução a localização subcelular de eIF5A é alterada ao contrário do que ocorre com Rev. Sugerindo que eIF5A não sofre translocação nucleocitoplasmática como ocorre com Rev (Shi *et al.*, 1997).

Em levedura foi demonstrado que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática com concentração perinuclear que não é alterada em leveduras contendo um alelo temperatura-sensível de *XPO1*, gene que codifica para CRM1/exportina1, na temperatura não permissiva (VALENTINI *et al.*, 2002). Assim como acontece em mamíferos, o bloqueio da ação de exportina1 em leveduras leva a um acúmulo de Rev no núcleo. Desta forma, esses dados associam eIF5A com o retículo endoplasmático e compromete o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas contendo NES através do receptor CRM1/exportina1, como no caso da proteína Rev de HIV-1 (VALENTINI *et al.*, 2002).

Também foi sugerido que eIF5A poderia estar envolvido no decaimento de RNA mensageiros, pois foi demonstrado que o mutante condicional do gene *TIF51A*, *ts1159*, acumula mRNAs sem o capacete 7-metil-guanosina na temperatura restritiva de crescimento (Zuk e Jacobson, 1998). Assim como o mutante *ts1159*, os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* descritos por nosso laboratório (VALENTINI *et al.*, 2002) também acumulam mRNAs 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).

eIF5A foi também envolvido com a progressão no ciclo celular em diferentes organismos. Em levedura, verificou-se que a depleção de eIF5A leva a um aumento de células na fase G1 (KANG E HERSHEY, 1994). O envolvimento de eIF5A na proliferação celular também foi sugerido pela observação de que a inibição das duas enzimas envolvidas na etapa de hipusinação resulta no bloqueio da proliferação celular em cultura de diferentes linhagens de células de mamíferos (HANAUKEABEL *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996; CARAGLIA *et al.*, 2001). Baseado nessas observações, foi levantada a hipótese de que eIF5A atuasse como um fator de tradução seletivo para um subgrupo específico de mRNAs que codificam para proteínas envolvidas com progressão do ciclo celular (KANG E HERSHEY, 1994; PARK, LEE E JOE, 1997). Adicionalmente, outras evidências também correlacionam eIF5A com progressão do

ciclo celular. Por exemplo, experimentos utilizando linfócitos T ativados demonstraram indução da expressão de eIF5A nesse processo (BEVEC et al., 1994). Além disso, em *D. melanogaster*, foi demonstrada a perda de controle no ciclo celular no início do desenvolvimento deste inseto em consequência da alteração dos níveis de eIF5A (LEE et al., 2001). Em estudos em nosso laboratório, utilizando-se mutantes condicionais de eIF5A em *S. cerevisiae*, foram isolados, em um rastreamento de alto número de cópias, fatores envolvidos com a correta morfologia celular durante a transição G1/S e estes mutantes condicionais apresentam defeito na polarização de citoesqueleto de actina, a qual é essencial para a transição G1/S nesse organismo (ZANELLI E VALENTINI, 2005).

O estudo de eIF5A na tradução somente se intensificou novamente após as publicações de nosso e outro grupo de pesquisa com a demonstração de interação física direta de eIF5A com ribossomos traducionalmente ativos (JAO E CHEN, 2006; ZANELLI et al., 2006). Através de ensaios de co-purificação, foram identificadas por espectrometria de massas proteínas ribossomais (P0, S5 e L11) e um fator de alongação da tradução (eEF2), como ligantes de eIF5A in vivo (ZANELLI et al., 2006). Logo em seguida foi demonstrado que mutantes de eIF5A apresentam defeito na síntese proteica (DIAS et al., 2008) bem como defeitos de perfil polissomal característicos de fatores de alongação, ou seja, aumento das frações polissomais em relação ao pico de 80S, quando comparado com a linhagem selvagem. Defeito também observado para o mutante, dominante negativo, de eEF2 (eEF2-H699K) (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que mutantes condicionais de eIF5A apresentam um atraso no tempo de trânsito ribossomal (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009). Outro dado relevante foi a observação de que mutantes condicionais de eIF5A não são capazes de formar *P-bodies* (Processing bodies – corpúsculos citoplasmáticos contendo enzimas e RNAs que podem ser degradados ou voltar ao citoplasma e serem traduzidos) na temperatura restritiva, fenótipo também observado quando a célula é tratada com um inibidor da síntese proteica, cicloheximida, que sabidamente atua na etapa de alongação (GREGIO et al., 2009). Estes dados sugerem a participação de eIF5A na alongação na tradução e não no início, como previamente descrito. Foi demonstrado ainda, que eIF5A interage geneticamente com eEF2 em alto número de cópias, levando a melhora dos fenótipos observados para um mutante de eIF5A como:

melhora do crescimento na temperatura restritiva, melhora no defeito de perfil polissomal, bem como melhora no defeito de síntese proteica (DIAS et al., 2012).

eIF5A é uma proteína conservada ao longo da evolução, porém bactérias não possuem eIF5A, estes organismos, por sua vez, possuem um homólogo estrutural chamado de fator de alongação da tradução EF-P (HANAWA-SUETSUGU et al., 2004). Tal como eIF5A, EF-P é capaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina, tem sua função diminuída na presença de inibidores da atividade peptidiltransferase (GANOZA, KIEL E AOKI, 2002), bem como é capaz de estimular a formação de ligações peptídicas de aminoácidos de cadeia lateral curta (GLICK E GANOZA, 1975).

Foi demonstrado ainda que EF-P pode sofrer diferentes modificações pós-traducionais, dependendo da espécie de bactéria, semelhantes à hipusinação de eIF5A, que podem ser a lisilação de uma lisina ou a ramnosilação de uma arginina (ROSSI et al., 2014; LASSAK et al., 2015). Em *Escherichia coli*, as modificações pós-traducionais de EF-P são mediadas por três enzimas, como apresentado na Figura 13.

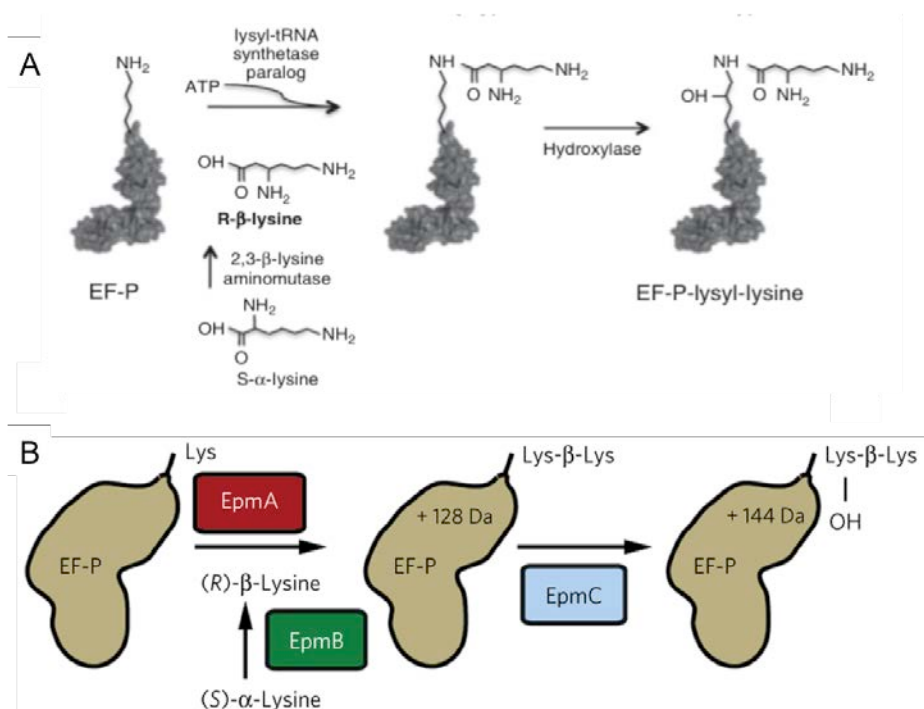


Figura 13. Modificações pós-traducionais de EF-P em *E. coli*: A lisilação; B ramnosilação. Inicialmente, a enzima YjeK converte uma S- α -lisina a R- β -lisina para que esta seja transferida para EF-P pela ação de YjeA (paróloga de uma lisil-tRNA sintetase) em uma

lisina específica (K34 em *E. coli*), com gasto de ATP. YfcM realiza, então, a hidroxilação do resíduo de lisil-lisina (modificado de ROSSI et al., 2014); **B** Inicialmente, a enzima EpmB converte uma S- α -lisina a R- β -lisina para que esta seja transferida para EF-P pela ação de EpmA em uma arginina específica (R32 em *E. coli*), com gasto de ATP. EpmC realiza, então, a hidroxilação do resíduo de lisil-lisina (modificado de LASSAK et al., 2015).

EF-P possui 3 domínios, sendo que os domínios II e III são considerados como duplicados por sua semelhança estrutural. Recentemente foi demonstrado, por cristalografia, que EF-P se liga ao ribossomo entre os sítios P e E, e atua no correto posicionamento do tRNA^{fMet} (tRNA iniciador carregado com formil-metionina) (BLAHA, STANLEY E STEITZ, 2009). Como apresentado na Figura 14, podemos observar a semelhança estrutural entre eIF5A e EF-P.

EF-P atua cooperativamente com o ribossomo na tradução de proteínas que possuem sequências PP, PPP, PPG, as quais causam diminuição da velocidade da tradução, e são consideradas *stalling motifs*, (DOERFEL et al., 2013; UDE et al., 2013). Sabe-se ainda que essa diminuição da velocidade da tradução decorre não somente da sequência traduzida no momento da parada do ribossomo, como também do contexto em que esta sequência está, ou seja, os aminoácidos que estão antes e depois da sequência de *stalling* (PEIL et al., 2013).

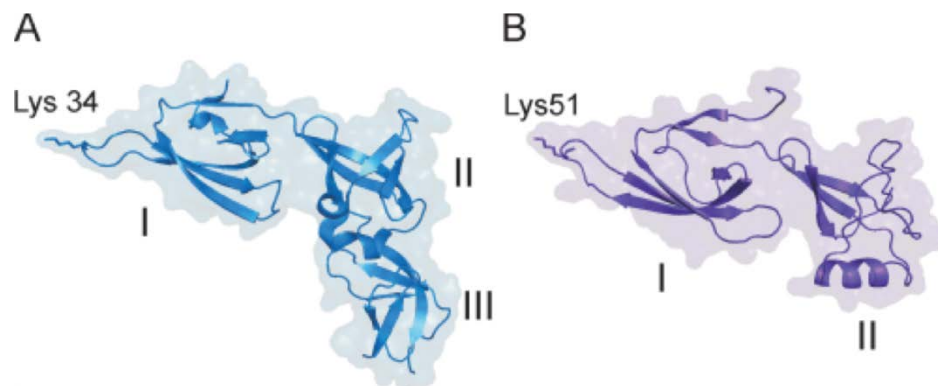


Figura 14. Semelhança estrutural entre eIF5A e EF-P. (A) Estrutura de EF-P de *E. coli* (PDB 3A5Z) indicando os domínios I, II e III. Em destaque, está a lisina 34, em que ocorre a modificação pós-traducional lisilação. **(B)** Estrutura de eIF5A de *S. cerevisiae* (3ER0), indicando os domínios amino e carboxi-terminal, bem como a lisina alvo da hipusinação (K51) (modificado de DOERFEL E RODNINA, 2013).

Estudos recentes mostraram que além da semelhança estrutural, eIF5A e EF-P apresentam também semelhança funcional, já que foi demonstrado que eIF5A também se liga ao ribossomo e que os pontos de ligação são muito semelhantes aos pontos em que EF-P se liga. Através do mapeamento de clivagem de radical hidroxila, a região em que eIF5A se liga ao ribossomo foi descrita, revelando seu posicionamento entre os sítios P e E do ribossomo e que a região que contém a hipusina está próxima da extremidade CCA do tRNA^{Met} posicionado no sítio P, como está esquematizado na Figura 15. Tanto regiões do rRNA (25S) próximas ao PTC, quanto o tRNA^{Met} foram mapeadas como pontos de interação, mostrando que eIF5A interage com o tRNA posicionado no sítio P (GUTIERREZ et al., 2013).

Além disso, o mesmo estudo mostra a atuação de eIF5A atuando no alívio da parada do ribossomo em sequências contendo duas ou mais prolina, mostrando que este fator é importante para que o ribossomo traduza de forma eficiente sequências que causam a diminuição da velocidade da tradução (GUTIERREZ et al., 2013), como foi observado em bactéria (DOERFEL et al., 2013; UDE et al., 2013).

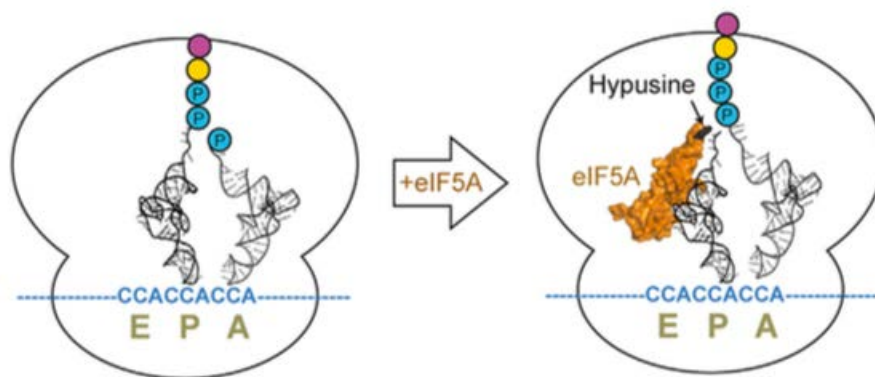


Figura 15. Localização de eIF5A no ribossomo. A localização de eIF5A na subunidade maior do ribossomo permite que o resíduo de hipusina seja posicionado próximo ao PTC, de alguma forma favorecendo a formação de ligação peptídica para sequências ricas em prolina (GUTIERREZ et al., 2013).

O trabalho descrito no parágrafo anterior utilizou mutantes condicionais de *S. cerevisiae* e exemplifica o quanto este organismo modelo é importante até hoje no estudo e caracterização funcional de proteínas. No que diz respeito ao que se conhece atualmente dos mecanismos envolvidos na tradução, muito se deve à utilização deste modelo. E por

isto, decidimos neste estudo utilizar mutantes condicionais de eIF5A em *S. cerevisiae* para buscar a melhor compreensão de seu papel no processo de tradução.

Durante minha iniciação científica, foi realizado um rastreamento genético em busca de supressores em alto número de cópias, porém diferentemente dos rastreamentos realizados anteriormente com o mutante *tif51A-1* de eIF5A, que é um mutante que leva à degradação da proteína eIF5A na temperatura restritiva de crescimento, neste caso foi utilizado um mutante que possui a proteína estável na temperatura restritiva, o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}*. Ou seja, apesar de apresentar o fenótipo de sensibilidade a temperatura, o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* não apresenta degradação da proteína eIF5A, como ocorre com o mutante *tif51A-1* (DIAS et al., 2008). Uma vez que mutantes condicionais que não levam à degradação da proteína mutada podem ter seu defeito ocasionado por perdas de interações físicas na temperatura restritiva de crescimento, esperávamos, com o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* ter a possibilidade de identificar fatores que interagem fisicamente com eIF5A através do rastreamento de supressor em alto número de cópias (FORSBURG, 2001). A supressão observada, quando um gene é superexpresso, leva a um aumento no tempo de sobrevivência do mutante na temperatura restritiva de crescimento ou pode levar a um aumento na temperatura de morte do mutante. Após o rastreamento com o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}*, foi possível o isolamento de 24 clones, os quais estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Destes, 13 apresentaram o gene selvagem, *TIF51A*, que codifica para eIF5A, mostrando que a cobertura do rastreamento foi satisfatória, e 5 genes já haviam sido encontrados anteriormente como supressores do mutante *tif51A-1*: *WSC1*, *WSC2*, *WSC3*, *ROM1* e *PKC1*. Além desses genes já descritos como supressores do mutante de eIF5A, dois clones apresentaram novos candidatos a supressor em alto número de cópias: o clone #245, que contém 3 diferentes genes (*YPL034W*, *SRL4* e *SVL3*); e o clone #279, que possui dois genes (*KEX2* e *YTP1*). Estes genes precisam ainda ser subclonados individualmente para determinação do responsável pela supressão em cada clone. Apesar disso, nenhum dos genes do clone #245 possui função conhecida e o pouco que se sabe sobre cada um deles não parece contribuir muito para o entendimento da função de eIF5A: *YPL034W*, gene não essencial, proteína hipotética; *SRL4* (*Suppressor of Rad53 null Lethality or Suppressor of Rad53 and Lcd1*), proteína de função desconhecida, envolvida na regulação da produção de dNTP, o mutante deste gene suprime a letalidade sintética entre mutantes de *lcd1* e *rad53*

(PERKINS et al., 1999; LAHAV et al., 2007; CHOI et al., 2008); *SVL3* (*Styryl dye Vacuolar Localization*), é uma proteína de função desconhecida, o fenótipo do mutante sugere potencial função vacuolar, Svl3-GFP realocaliza da periferia celular, citoplasma, broto e *bud neck* para apenas citoplasma em condições de estresse de replicação de DNA (ZHENG et al., 1998; HUH et al., 2003; BYRNE E WOLFE, 2005; TKACH et al., 2012). Da mesma maneira, os genes contidos no clone #279 não chamaram muita atenção quanto à contribuição para o entendimento da função de eIF5A: *KEX2* (*Killer EXpression defective*), serina protease envolvida na ativação de pró-proteínas dentro do Golgi (FULLER, BRAKE E THORNER, 1989); e *YTP1* (*Yeast putative Transmembrane Protein*), provável proteína integral de membrana do tipo III de função desconhecida, tem regiões de similaridade com proteínas mitocondriais de transporte de elétrons (WEST et al., 1996). Informações e referências extraídas do SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) em 09/03/2015.

Curiosamente, 4 diferentes clones (#86, #87, #240, #243) apresentaram o gene que codifica para um dos tRNAs de alanina (tRNA^{Ala}) em *S. cerevisiae* e, tendo em vista o envolvimento de eIF5A com o processo de tradução, foi proposta neste projeto de doutorado a busca da relação funcional entre eIF5A e tRNA^{Ala}, no intuito de contribuir para o entendimento desta relação de eIF5A com a síntese proteica celular.

Tabela 1. Clones isolados no rastreamento de supressores em alto número de cópias utilizando o alelo mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* que já haviam sido isolados em rastreamentos anteriores utilizando o mutante *tif51A-1*.

CLONE	GENE
#89, #154, #263, #62, #232, #260, #512, #549, #539, #559, #572, #540, #541	<i>TIF51A</i>
#191	<i>WSC1</i>
#124	<i>WSC2</i>
#298	<i>WSC3</i>

#242	<i>ROM1</i>
#293	<i>PKC1</i>

Tabela 2. Tabela contendo potenciais supressores isolados no rastreamento de supressores em alto número de cópias utilizando o alelo mutante *tif51A^{Q22H/L93F}*.

CLONE	GENE
#86, #87, #240, #243	<i>tRNA^{Ala}</i> (tA(AGC)P)
#245	<i>YPL034W, SRL4, SVL3</i>
#279	<i>KEX2, YTP1</i>

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a relação funcional de eIF5A com o tRNA de alanina, isolado como supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A^{Q22H/L93F}*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a especificidade alélica da supressão em alto número de cópias do tRNA de alanina em diferentes alelos mutantes da proteína eIF5A.

2.2.2. Analisar o efeito da troca de anticódon do tRNA de alanina na supressão do mutante *tif51A^{Q22H/L93F}*.

2.2.3. Analisar o perfil polissomal dos mutantes da proteína eIF5A na presença do tRNA de alanina.

2.2.4. Testar a possibilidade de interação física entre eIF5A e o tRNA de alanina.

2.2.5. Análises de *Programmed Ribosomal Frameshift* (PRF), *misincorporation* e *readthrough* de mutantes de eIF5A.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Tabela 3. Linhagens utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Origem
SVL14	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 ade2 tif51A-1</i>	Coleção do Laboratório
SVL32	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 ade2 tif51A-3</i>	Coleção do Laboratório
SVL82	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 ade2</i>	Coleção do Laboratório
VZL821	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pSV708]</i>	Coleção do Laboratório
L40-coat (VZL836)	<i>MAT_a his3 leu2-3,112 ura3-52 trp1Δ1 his3Δ200 ade2 LYS2::(lexAop)-HIS3 ura3::(lexAop)-lacZ</i>	SenGupta, 1996
VZL838	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pSV501]</i>	Coleção do Laboratório
VZL987	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pSV1040]</i>	Coleção do Laboratório
VZL1009	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pVZ1040] [pVZ65]</i>	Coleção do Laboratório
VZL1010	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pVZ1040] [pVZ262]</i>	Coleção do Laboratório
VZL1038	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pVZ501] [pVZ65]</i>	Coleção do Laboratório

Tabela 4. Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Características	Origem
pSV59	pRS304 (<i>TRP1</i> , <i>CEN</i>)	Coleção do Laboratório
pSV65	pRS426 (<i>URA3</i> , 2μ)	Coleção do Laboratório
pSV107	<i>TIF51A</i> clonado em pRS426	Coleção do Laboratório
pSV262	<i>EFT2</i> clonado em pRS426	Coleção do Laboratório
pSV285	<i>TIF51A</i> clonado em pACT	Coleção do Laboratório
pSV501	<i>TIF51A</i> clonado em pRS304	Coleção do Laboratório
pSV551	<i>tif51A-1</i> clonado em pRS304	Coleção do Laboratório
pSV708	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} clonado em pRS304	Coleção do Laboratório
pVZ965	pACT-2 (<i>LEU2</i> , 2μ)	Coleção do Laboratório
pVZ966	IRP1 clonado em pACT-2	Bernstein et al. 2002
pVZ967	IRE clonado em pIIIA/MS2-1	Bernstein et al. 2002
pVZ970	pIIIA/MS2-1 (<i>URA3</i> , 2μ)	Bernstein et al. 2002
pSV1040	<i>tif51A</i> ^{K56A} clonado em pRS426	Coleção do Laboratório
pVZ1231	<i>tA(AGC)P</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1232	<i>tG(GCC)B</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1233	<i>tL(CAA)N</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1272	<i>tM(CAU)M</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1273	<i>tP(AGC)D</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1274	<i>tF(GAA)F</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1275	<i>tA(AGC)P</i> clonado em pIIIA/MS2-1	Este estudo
pVZ1318	tRNA-Ala→Phe clonado em pRS426	Este estudo

pVZ1325	tRNA-Phe→Ala clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1331	<i>tA(GAA)P</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1339	<i>tF(AGC)F</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1342	<i>tM(CAU)E</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1353	<i>tK(CUU)D1</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1617	<i>tA(TGC)G</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1618	<i>tG(UCC)G</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1629	<i>tL(GAG)G</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1620	<i>tP(AGG)C</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1621	<i>tQ(CUG)M</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1622	<i>tR(CCT)J</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1623	<i>tS(CGA)C</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1624	<i>tS(UGA)I</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1625	<i>tT(CGU)K</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1626	<i>tV(UAC)B</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1627	<i>tT(UGU)G1</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1628	<i>tV(CAC)D</i> clonado em pRS426	Este estudo
pVZ1629	<i>tK(UUU)D</i> clonado em pRS426	Este estudo
pJD375	pYDL-control	Dinman's Lab collection
pJD376	pYDL-LA	Dinman's Lab collection
pJD377	pYDL-Ty1	Dinman's Lab collection
pJD378	pYDL-HIV	Dinman's Lab collection

pJD431	pYDL- UAA	Dinman's Lab collection
pJD432	pYDL- UAG	Dinman's Lab collection
pJD433	pYDL- UAG	Dinman's Lab collection
pJD642	pYDL- TCT ₂₁₈	Dinman's Lab collection
pJD643	pYDL- AGC ₂₁₈	Dinman's Lab collection
pJD644	pYDL- AGT ₂₁₈	Dinman's Lab collection

Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.

Oligo	Gene	Sequência
VZO778	<i>tG(GCC)B</i> F	TCCCCGCGGGCGCAAGTGGTTTAG
VZO780	<i>tL(CAA)N</i> F	TCCCCGCGGGGTTGTTTGGCCG
VZO784	<i>tM(CAU)M</i> F	TCCCCGCGGAGCGCCGTGGCGC
VZO788	Ala→Phe F	GTAGCGCGCTCCCTTGAAATGGGAGAG
VZO789	Ala→Phe R	GGAGACCTCTCCCATTTCAAGGGAGCG
VZO790	Phe→Ala F	GGAGAGCGCCAGACTAGCGAAAAAAC
VZO791	Phe→Ala R	GACCGAAGTTTTTTTCGCAAGTCTGGCG
VZO831	<i>tG(GCC)B</i> F	CCCAAGCTTTGCGCAAGCCCGG
VZO833	<i>tL(CAA)N</i> R	CCCAAGCTTTTGTTTGCTAAGAG
VZO835	<i>tM(CAU)M</i> R	CCCAAGCTTTAGCGCCGCTCGG
VZO967	<i>tRNAi^{Met} (72bp)</i>	TCCCCGCGGAGCGCCGTGGCGC
VZO968	<i>tRNAi^{Met} (72bp)</i>	CCCAAGCTTTAGCGCCGCTCGG
VZO973	<i>tA(AGC)P</i> F	CCCAAGCTTCACGTAAAACACAT
VZO974	<i>tA(AGC)P</i> R	TCCCCGCGGCTAAAACGCCTTTC

VZO977	<i>tF(GAA)F F</i>	TCCCCGCGGGCGGACTTAGCTC
VZO978	<i>tF(GAA)F R</i>	CCCAAGCTTTGCGAACTCTGTGG
VZO979	<i>tP(AGC)D F</i>	TCCCCGCGGGGGCGTGTGGTC
VZO980	<i>tP(AGC)D R</i>	CCCAAGCTTGGGGCGAGCCGGG
VZO778	<i>tG(GCC)B F</i>	TCCCCGCGGGCGCAAGTGGTTTAG
VZO780	<i>tL(CAA)N F</i>	TCCCCGCGGGGTTGTTTGGCCG
VZO784	<i>tM(CAU)M F</i>	TCCCCGCGGAGCGCCGTGGCGC
VZO788	<i>Ala-Phe</i>	GTAGCGCGCTCCCTTGAAATGGGAGAG
VZO789	<i>Ala-Phe</i>	GGAGACCTCTCCCATTTCAAGGGAGCG
VZO790	<i>Ala-Phe</i>	GGAGAGCGCCAGACTAGCGAAAAAAC
VZO1970	<i>tA(TGC)G_F</i>	CGGGATCCCGATTACTCTTTTAAGTAATTGCG
VZO1971	<i>tA(TGC)G_R</i>	CGGGATCCCTTGCACTATTCTATAGTCAC
VZO1974	<i>tG(UCC)G_F</i>	CGGGATCCGTGACATGAATACTAATCGATGG
VZO1975	<i>tG(UCC)G_R</i>	CGGGATCCCCGTAAATTTGTAAAAAAGGG
VZO1976	<i>tK(UUU)G2_F</i>	CGGGATCCCATTAATCCTAATACAGTATCAATCC
VZO1977	<i>tK(UUU)G2_R</i>	CGGGATCCATCAATATTTTTTTGAATCTACGC
VZO1980	<i>tL(GAG)G_F</i>	CGGGATCCCCTGTATGGTCTGCGTGGATTGCC
VZO1981	<i>tL(GAG)G_R</i>	CGGGATCCCAATGGAATGTCCTTCCTTTTAG
VZO1982	<i>tP(AGG)C_F</i>	CGGGATCCGCAGGGTTACTTTTGACTTAAAC
VZO1983	<i>tP(AGG)C_R</i>	CGGGATCCCCGAAATAACGAGTAAATGTTC
VZO1986	<i>tQ(CUG)M_F</i>	CGGGATCCCCTCACTCACAATTCTTTCTTTAG
VZO1987	<i>tQ(CUG)M_R</i>	CGGGATCCGAGTAACTTCTTCGATATCTCTGG

VZ01990	<i>tR(CCT)J_F</i>	CGGGATCCGCCTTATTTAAAAATGGAATCCC
VZ01991	<i>tR(CCT)J_R</i>	CGGGATCCCACATTTAACTGCACTAGATACC
VZ01992	<i>tS(CGA)C_F</i>	CGGGATCCCCACAAAAGACATGAAAATTAG
VZ01993	<i>tS(CGA)C_R</i>	CGGGATCCGTGTTTACATTGATGATGAGTCC
VZ01994	<i>tS(GCU)F_F</i>	CGGGATCCGTAGATTTCCTATGTTGCCGAAAAC
VZ01995	<i>tS(GCU)F_R</i>	CGGGATCCGGAGAGGTATATTTTGATGGTTCC
VZ01996	<i>tS(UGA)I_F</i>	CGGGATCCCATTAATAATTCCTGTCCCTTTAG
VZ01997	<i>tS(UGA)I_R</i>	CGGGATCCAATAACATCGCGCAGATTATTC
VZ01998	<i>tT(CGU)K_F</i>	CGGGATCCCGCTGCTAACTTTTTGAATAACC
VZ01999	<i>tT(CGU)K_R</i>	CGGGATCCGGAAAACAATAAATTGTATAGTGGC
VZ02000	<i>tT(UAC)B_F</i>	CGGGATCCGCACATAATATAGAAATACTTCG
VZ02001	<i>tT(UAC)B_R</i>	CGGGATCCCTGAGATCTATCTCTAATGATGC
VZ02002	<i>tT(UGU)G1_F</i>	CGGGATCCGTACCCTTATTTGTATATATGTTG
VZ02003	<i>tT(UGU)G1_R</i>	CGGGATCCCCAAATTACAATTGAAATTTTTCAAC
VZ02004	<i>tV(CAC)D_F</i>	CGGGATCCGTAGGAAGCAATATTGAAAGGAAG
VZ02005	<i>tV(CAC)D_R</i>	CGGGATCCCTTACCCCTCATGAAGAGGTAACC

3.2. Métodos

A manutenção, o cultivo das linhagens de levedura e de *E. coli*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e os protocolos das técnicas utilizados neste trabalho seguiram procedimentos padrão descritos anteriormente (GUTHRIE E FINK, 1991; AMBERG et al., 2005; AUSUBEL et al., 2005).

3.2.1. Clonagem gênica

3.2.1.1. Obtenção do DNA molde

O inóculo da linhagem selvagem de *S. cerevisiae* de interesse foi preparado em meio complexo (YPD) e cultivado por uma noite sob agitação a 30°C. No dia seguinte, o precipitado de células foi coletado, por centrifugação a 15.000 *xg* por 1 min, e lavado com 1 mL de água Milli-Q. Em seguida, foi adicionado 1 g de pérolas de vidro e 1 mL do tampão de lise de levedura (Triton x-100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM) e suspensão de células foi submetida à agitação em aparelho Fastprep (três ciclos de 20 s, na velocidade 4.0, com intervalos de 1 min em gelo). O lisado obtido foi tratado com PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico) para remoção da fase orgânica. À fase aquosa, foi adicionado 1 mL de isopropanol para precipitação do DNA, após centrifugação, foram realizadas lavagens consecutivas com etanol 70% e o precipitado ressuspendido em água Milli-Q após a secagem.

3.2.1.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Para obtenção de inserto, oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados previamente conforme descrito na Tabela 5 e as reações de PCR foram realizadas nas condições descritas abaixo:

25 ciclos	Etapas	Temperatura/Tempo
	Desnaturação/Hot Start	95°C – 1'
	Desnaturação	95°C – 50"
	Anelamento	TM do primer * - 50"
	Extensão	68°C – 1'/Kb
	Extensão final	68°C – 10'

* Tan utilizada 5°C abaixo do TM do primer.

3.2.2. Mutagênese sítio-dirigida

Os oligonucleotídeos para introduzir as modificações de bases nitrogenadas foram desenhados seguindo recomendações descritas no kit “Quick Change Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene). O vetor contendo o gene a ser mutagenizado foi purificado através de preparação de DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). O DNA plasmidial purificado foi quantificado por D.O._{260nm} e a reação de PCR para a mutação sítio-dirigida por PCR foi preparada conforme descrito na tabela abaixo:

Reagentes	Reação	Controle negativo
Molde (DNA plasmidial)	45 ng	45 ng
Tampão Rxn 10X	2,5 µL	2,5 µL
DNTPmix	0,5 µL	0,5 µL
Oligo 1 (0,3 µg/µL)	0,3 µL	0,3 µL
Oligo 2 (0,3 µg/µL)	0,3 µL	0,3 µL
DNA polimerase TURBO	0,5 µL	-
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	25 µL	25 µL

Etapas	Temperatura/Tempo
Desnaturação/Hot Start	95°C – 1'
Desnaturação	95°C – 50"
Anelamento	TM do primer * - 50"
Extensão	68°C – 1'/Kb
Extensão final	68°C – 10'

* Tan utilizada 5°C abaixo do TM do primer.

Metade do volume do produto das reações de PCR, descritas acima, foi digerida com a enzima *DpnI*, adicionando 1 µL da enzima (20 U), 2,5 µL do tampão apropriado e 9 µL de água Milli-Q. As digestões foram incubadas por 12-16 h a 37°C. Em seguida, todo o volume das reações de digestão foi transformado em *E. coli* ultracompetente e plaqueado em meio LB contendo o antibiótico para seleção do plasmídeo utilizado e, posteriormente, incubado por 12-16 h a 37°C. O crescimento foi analisado quanto ao número de colônias nas placas da reação de mutagênese em comparação com o controle negativo. Quando o crescimento de colônias na placa da reação era maior ou igual a 5 vezes o controle negativo, 5-10 colônias foram cultivadas em LB líquido contendo o mesmo antibiótico. Em seguida, a cultura foi incubada por 12-16 h a 37°C sob agitação. O DNA plasmidial foi isolado das culturas utilizando o kit “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN). A confirmação das mutações foi feita por sequenciamento do gene de interesse a partir dos plamídeos purificados.

3.2.3. Sequenciamento de DNA

Após preparação e quantificação do DNA plasmidial por kit, foi preparada a reação de PCR para sequenciamento de bases nitrogenadas, utilizando reagentes da Applied Biosystems. Pipetou-se 400 ng do DNA molde, 1 µL do oligonucleotídeo que flanqueia o gene de interesse (3,2 µM), 1 µL de BigDye diluído 8x, 3,5 µL do tampão de sequenciamento 5x, completando para 20 µL final com água Milli-Q. As condições da reação são mostradas na tabela abaixo:

25 ciclos	Etapas	Temperatura/Tempo
	Desnaturação/Hot Start	96°C – 1'
	Desnaturação	96°C – 10"
	Anelamento	TM do primer – 5"
	Extensão	60°C – 4'
	Extensão final	60°C – 5'

* T_{an} utilizada 5°C abaixo do T_M do primer

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit “Big Dye X-Terminator®” (Applied Biosystems). Pipetou-se, então, 45 µL do tampão SAM® e 10 µL da resina de precipitação de DNA sobre 10 µL da reação de PCR. A reação foi mantida sob agitação por 30 min à temperatura ambiente e centrifugada por 2 min a 1.000 *xg*. As amostras purificadas foram sequenciadas no equipamento 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.2.4. Teste de sensibilidade a temperatura

As linhagens de interesse foram crescidas em 5 mL de meio apropriado (YPD ou SC) até atingir concentração celular correspondente a $D.O_{600nm} = 0,6$ a $0,8$. Um volume adequado de cultura foi centrifugado a 600 *xg* por 7 min e ressuspendido em glicerol 50% para concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Um volume de 200 µL de cada amostra foi aplicado no primeiro poço de uma microplaca e os outros poços (5 colunas) foram preenchidos com 180 µL de glicerol 50%. Em seguida, foram realizadas cinco diluições seriadas (1:10). Com ajuda de um micropipetador multicanal, 4 µL das amostras, e suas respectivas diluições, foram aplicados nos meios de cultura apropriados. As placas foram então incubadas nas temperaturas de interesse.

3.2.5. Perfil polissomal de levedura

3.2.5.1. Preparação do gradiente de sacarose

Os gradientes foram preparados adicionando-se, em tubo de polialômero (14X89 mm/12,5 mL - Beckman) 5,5 mL de uma solução de sacarose 7% e 5,5 mL de uma solução de sacarose 47% em tampão adequado (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM). Em seguida, os gradientes contínuos foram preparados no equipamento Gradient Master (Biocomp).

3.2.5.2. Preparação do extrato celular total e centrifugação dos gradientes

As linhagens de interesse foram incubadas em 200 mL de meio de cultura adequado até a D.O._{600nm}=0,8 a 25°C, em seguida as culturas foram diluídas em meio rico para D.O._{600nm}=0,2, mantendo-as sob agitação por mais 3 h a 25°C. Em seguida foram transferidas para um banho com agitação a 38°C por 4 h. Após esse período de incubação, as células foram tratadas com formaldeído, (5,4 mL/200 mL de cultura), durante 1 h em banho de gelo e a neutralização do formaldeído foi feita com glicina 2,5 M (10 mL/200 mL de cultura). Em seguida, as culturas foram centrifugadas em garrafas previamente geladas a 3.500 *xg* por 5 min a 4°C. Lavadas com 15 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM) e, então, transferidas para tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 3.500 *xg*, por 5 min a 4°C. Para realizar a lise, o precipitado de células foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lise adicionado de inibidores de protease (aprotinina, antipaina, leupeptina, pepstatina e quimostatina, todos em uma concentração de 5 mg/mL), e transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 1 g de pérolas de vidro. A lise foi realizada em aparelho Fastprep (três ciclos de 20 s, na velocidade 4.0, com intervalos de 1 min em gelo). O lisado obtido foi transferido para um novo tubo e, em seguida, centrifugado a 14.000 *xg* por 20 min a 4°C, para clarificação. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e a D.O._{260nm} da amostra foi determinada.

3.2.5.3. Fracionamento dos gradientes

Um volume de lisado equivalente a 20 D.O._{260nm} foi pipetado sobre o gradiente de sacarose e centrifugado a 39.000 rpm por 3 h a 4°C em rotor SW-41.Ti, utilizando ultracentrífuga Beckman. Para o fracionamento dos gradientes de sacarose contendo o

extrato de levedura separado por densidade, foi utilizado o sistema da Bio-Rad, utilizando-se um fluxo contínuo de 1 mL/min de solução de sacarose 60%, sendo que a D.O._{254nm} foi continuamente registrada por um leitor UV conectado ao sistema. Para obter a relação entre polissomo e monossomo, a área sob a fração polissomal foi delimitada e quantificada, bem como a área sob o pico de 80S. Dividiu-se, então a área do polissomo pela área do monossomo e foi obtida a relação entre as frações. Os dados de quantificação foram gerados com o auxílio do software NIH Image J.

3.2.6. Ensaio de β -galactosidase

Cultivaram-se as linhagens de interesse a 25°C em 5 mL e a diluição seriada foi feita de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.4. Foram aplicados 3 μ L da suspensão de células sobre uma membrana de nitrocelulose (Amersham – GE Healthcare) sobre meio sólido YPD, e incubou-se durante uma noite a 25°C. Retirou-se a membrana da placa e a mesma foi colocada sobre um papel alumínio flutuando em nitrogênio líquido com as células voltadas para cima. Após 30 s, a membrana foi submergida no nitrogênio líquido por 5 s e retirada para descongelar em temperatura ambiente. Colocou-se um papel de filtro (Whatman) umedecido com 1,5 mL de Tampão Z (Na_2HPO_4 60 mM; NaH_2PO_4 40 mM; KCl 10 mM; MgSO_4 1 mM pH 7,0) adicionado de X-gal (0,5 mg/mL) em uma placa de petri de 100 mm. A membrana foi colocada, com as células voltadas para cima, sobre este papel de filtro e incubada a 30°C em câmara úmida até o desenvolvimento de coloração azul no controle positivo.

3.2.7. Ensaio de luminescência

As linhagens de interesse foram cultivadas a 25°C em 5 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000 $\times g$ por 10 min e remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS 1X adicionado de PMSF. O precipitado de células foi ressuspensionado em 200-500 μ L de PBS 1X adicionado de PMSF e 1 g de beads de vidro geladas. As linhagens foram lisadas em vórtex por 5 min e centrifugadas em centrífuga refrigerada por 5 min na velocidade máxima. Pipetou-se 30 μ L do lisado em

cada poço de uma microplaca de 96 poços. Os substratos para as luciferases foram preparados seguindo a recomendação do fabricante. A leitura da placa foi feita em luminômetro GloMax®-Multi com sistema de injeção automática sendo que as leituras para a luciferase de Renilla foram feitas a 480 nm e as leituras para a luciferase de vagalume foram feitas a 560 nm. A análise dos dados foi feita utilizando a razão calculada entre os valores de luminescência obtidos para a atividade da segunda luciferase (vagalume) pela atividade obtida para a primeira luciferase (*Renilla*). As razões foram, então, normalizadas pelo controle da linhagem selvagem. Para as análises estatísticas, foram utilizadas 4 leituras para cada uma das três replicatas biológicas feitas em ensaios independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Especificidade alélica da supressão em alto número de cópias do tRNA^{Ala}

Recentemente foi demonstrado que o fator de alongação da tradução (eEF2) é capaz de suprimir os defeitos de crescimento e de síntese proteica do *tif51A*^{K56A} de eIF5A (DIAS et al., 2012). Sabe-se ainda que essa supressão é alelo específica, já que no alelo mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}, que também produz eIF5A estável na temperatura restritiva de crescimento, apresenta um fenótipo oposto, ou seja, na presença de eEF2 em alto número de cópias, a linhagem mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} é ainda mais doente (dados não publicados). Com o intuito de testar a possibilidade de especificidade alélica na supressão por tRNA^{Ala}, foram utilizados diferentes mutantes de eIF5A e tais linhagens foram testadas quanto a capacidade de supressão pelo tRNA^{Ala} em alto número de cópias. Para isso, foram utilizados três mutantes de eIF5A sensíveis a temperatura. O *tif51A-1*, que apresenta a perda da proteína eIF5A na temperatura não permissiva de crescimento e os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}, que não apresentam perda da proteína na temperatura não permissiva (DIAS et al., 2008).

Na Figura 16 podemos observar o ensaio de sensibilidade a temperatura dos mutantes *tif51A-1*, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} na presença do tRNA^{Ala} em alto número de cópias, condição em que não foi observada alelo especificidade na supressão pelo tRNA, já que todos os alelos testados apresentaram supressão. Dessa forma, conclui-se que o mecanismo de supressão dos mutantes de eIF5A pelo tRNA^{Ala} em alto número de cópias é diferente daquele ocasionado por eEF2, o que também sugere que a supressão por tRNA^{Ala} ocorra de maneira mais indireta que eEF2. Ou seja, genes que ativam vias alternativas ou fatores *downstream* ao fator mutado em uma determinada via tendem a suprimir qualquer alelo mutante de um determinado gene, inclusive mutantes que levam à perda da proteína na temperatura não permissiva, enquanto supressores que interagem fisicamente no mesmo complexo que o fator mutante tendem a ter interações genéticas que são alelo específicas e não suprimem alelos que levam à perda da proteína mutada (FORSBURG, 2001).

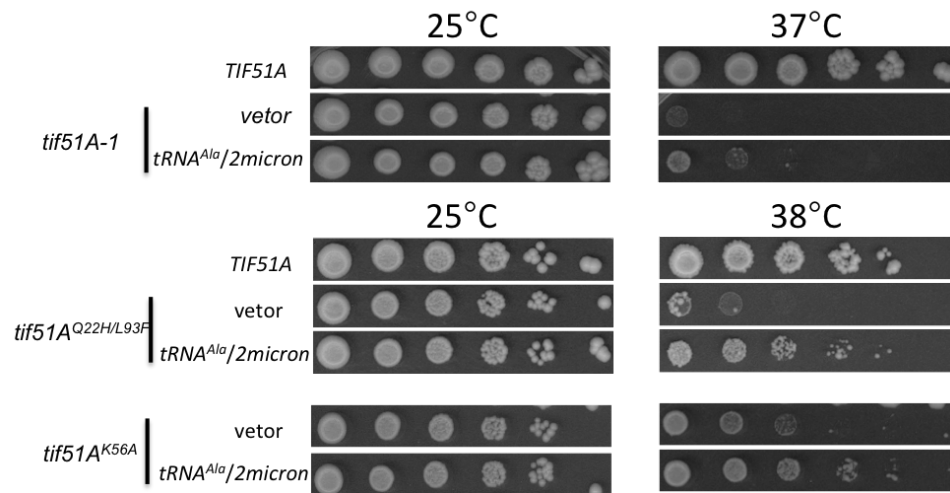


Figura 16. Ensaio de sensibilidade a temperatura dos mutantes *tif51A-1*, *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}* para o tRNA^{Ala} em alto número de cópias. A coluna da esquerda e direita correspondem ao crescimento nas temperaturas permissiva e restritiva, respectivamente.

4.2. Avaliação da supressão de mutantes de eIF5A por tRNAs para outros aminoácidos

No intuito de se testar se tRNAs para outros aminoácidos também são capazes de suprimir o fenótipo de mutantes de eIF5A, e também contribuir para a análise do papel de eIF5A na formação de ligação peptídica de aminoácidos com diferentes tamanhos de cadeia lateral, decidiu-se neste período clonar e analisar os genes de tRNAs para fenilalanina, glicina, leucina, lisina, metionina e prolina. No entanto, estudos mostram que, em *S. cerevisiae*, genes que codificam para os diferentes tRNAs possuem mais de um anticódon e mais de um gene para um mesmo anticódon (PERCUDANI, PAVESI E OTTONELLO, 1997). Para o tRNA de alanina, por exemplo, existem 15 genes distribuídos no genoma, divididos em dois grupos: 11 genes possuem o anticódon AGC e 4 genes possuem o anticódon TGC. Levando-se esses dados em consideração para decidir quais genes de tRNA seriam utilizados em nosso estudo, foi realizada uma análise de frequência gênica. Todos os genes de tRNA para cada um dos aminoácidos citados acima foram alinhados e se optou por aquele de maior frequência no genoma, considerando-se a identidade entre as sequências. No nome sistemático dos genes que codificam para cada tRNA, podemos identificar o aminoácido que ele transporta (código de uma letra), entre parênteses está indicado o anticódon que possui,

e a última letra no final do nome de cada gene distingue-o dos demais tRNAs que possuem o mesmo anticódon e podem ou não estar em um mesmo cromossomo, neste caso existe ainda um número após a letra. Por exemplo, o tRNA de fenilalanina escolhido para realização da clonagem possui o nome sistemático tF(GAA)F. Na Figura 17, é mostrado um exemplo dessa análise. Podemos observar no alinhamento múltiplo dos genes para os tRNAs fenilalanina, que 6 dos 10 tRNAs^{Phe} que possuem anticódon GAA apresentam sequência completamente idêntica e um deles foi escolhido para clonagem em vetor de alto número de cópias (pRS426). Estes ensaios fizeram parte do projeto de Iniciação Científica do aluno Matheus Nanny Le Sueur Vieira (FAPESP-2012/03164-1).



Figura 17. Alinhamento das sequências dos genes de tRNA para fenilalanina que possuem o anticódon GAA. O anticódon está destacado pela caixa vermelha. O alinhamento foi feito utilizando-se o ClustalW2. O tRNA selecionado para a clonagem foi o tF(GAA)F, presente no cromossomo 6.

Para garantir que a região promotora dos genes estivesse contida no fragmento amplificado por PCR, posicionaram-se os oligonucleotídeos iniciadores 250 pares de bases antes do início da região codificadora dos tRNAs escolhidos. Os fragmentos obtidos por PCR foram então ligados ao vetor pRS426 e as clonagens foram confirmadas por sequenciamento. Foi incluída na análise a clonagem do gene do tRNA de metionina iniciador

(tRNA^{iMet}), devido ao fato de ter sido descrita a estrutura de EF-P em complexo com o ribossomo (70S) e o tRNA^{iMet} (BLAHA, STANLEY E STEITZ, 2009).

Após análise de todos os tRNAs descritos acima e sua clonagem, foi realizado o ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura dos mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}* e é possível observar uma supressão reprodutível em todas as replicatas apenas para o tRNA^{Ala} em ambos mutantes. Curiosamente, o tRNA^{iMet} também foi capaz de suprimir o mutante *tif51A^{K56A}* (Figura 18). Apesar de a maioria dos outros tRNAs testados também mostrarem alguma melhora do crescimento em comparação com o vetor vazio, a supressão é muito fraca e, provavelmente por isso, também não é robusta, havendo variação entre as replicatas. Devido ao fato do mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* possuir um fenótipo mais severo podemos observar o crescimento de revertentes mais acentuado do que no mutante *tif51A^{K56A}* o que prejudica a análise da supressão, como pode ser observado na figura 18.

Foi demonstrado recentemente que eIF5A se liga ao ribossomo próximo ao sítio E, e atua aliviando a pausa do ribossomo em sequências contendo pelo menos três prolinas consecutivas. Além disso, a ausência de eIF5A na célula prejudica a tradução de proteínas que contêm prolinas consecutivas (GUTIERREZ et al., 2013). Vale ressaltar que apesar de eIF5A e seu homólogo em bactérias EF-P estarem envolvidos na tradução de proteínas que possuem prolinas consecutivas (DOERFEL et al., 2013; GUTIERREZ et al., 2013; UDE et al., 2013), o aumento na quantidade do tRNA^{Pro} não é capaz de melhorar de maneira significativa o fenótipo do mutante *tif51A^{K56A}* de eIF5A.

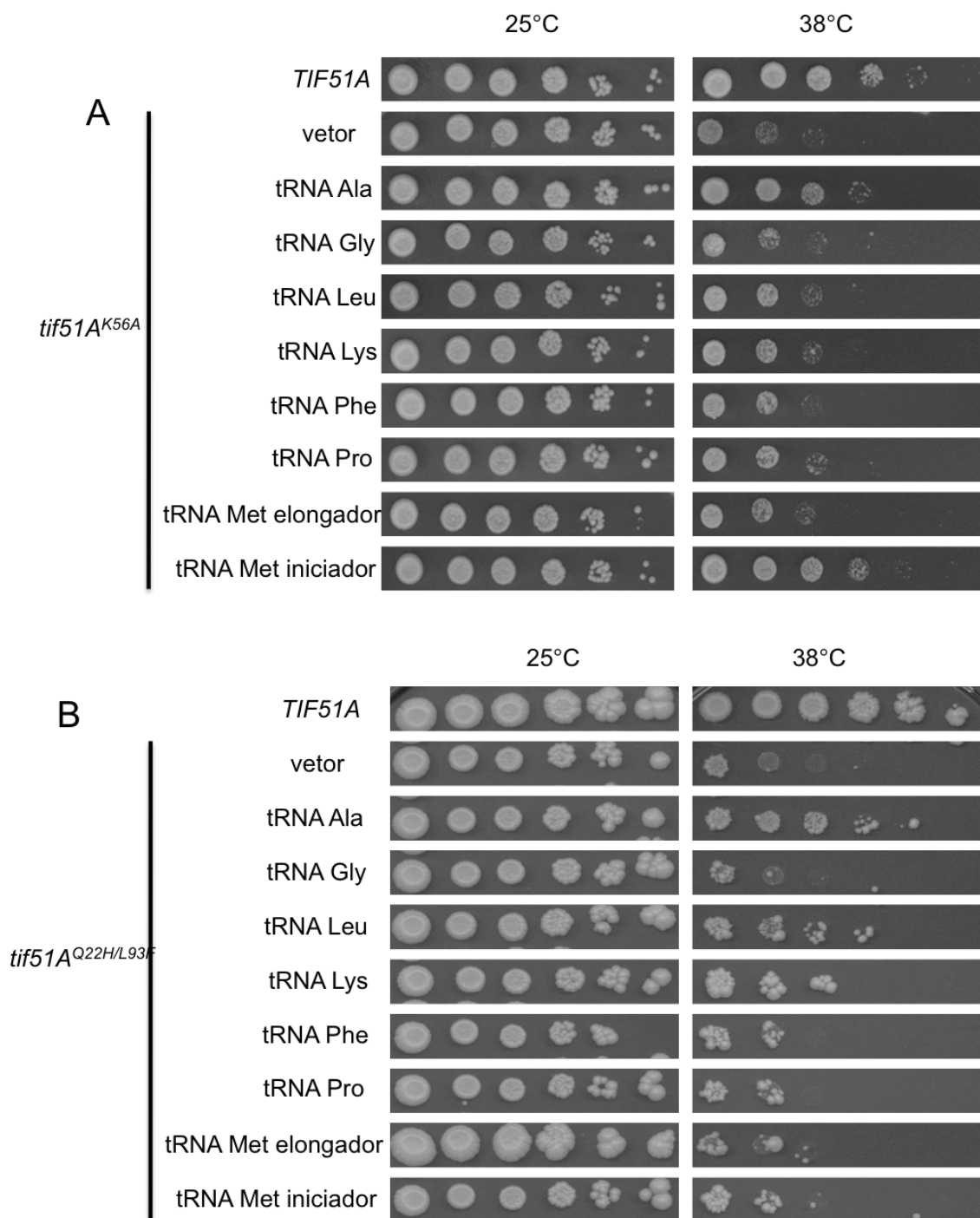


Figura 18. Ensaio de sensibilidade a temperatura dos mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}* contendo os diferentes tRNAs indicados em alto número de cópias. A coluna da esquerda e direita correspondem ao crescimento a 25°C (condição permissiva) e a 37°C/38°C, respectivamente (condição restritiva).

4.3. Efeito da troca do anticódon na supressão do tRNA^{Ala}

Tendo em vista a similaridade estrutural entre eIF5A de arqueas e EF-P (HANAWA-SUETSUGU et al., 2004), e o fato de a potencial função de EF-P estar correlacionada ao favorecimento de formação de ligação peptídica para aminoácidos de cadeia lateral curta (GLICK, CHLADEK E GANOZA, 1979), a supressão observada pelo tRNA de alanina (tRNA^{Ala}) poderia ocorrer devido à compensação de um possível papel para eIF5A na formação de ligação peptídica para aminoácidos de cadeia lateral curta. Com o intuito de analisar essa hipótese, foi proposto realizar a troca do anticódon do tRNA de alanina (AGC) para o anticódon de fenilalanina (GAA), e também substituir no tRNA de fenilalanina seu anticódon original (GAA) pelo anticódon para alanina (AGC), e analisar sua capacidade de supressão. Foram utilizados como ponto de partida para a substituição dos códons os clones obtidos para o ensaio de supressão em alto número de cópias, apresentados no item 4.2. Assim, os plasmídeos contendo os tRNAs para alanina (tA(AGC)P) e fenilalanina (tF(GAA)F) tiveram seus anticódons substituídos. A Figura 19 mostra o alinhamento entre as sequências dos tRNA de alanina (tA(AGC)P) e de fenilalanina (tF(GAA)F), depositadas no banco de dados SGD (yeastgenome.org), comparadas com as dos insertos dos novos plasmídeos gerados pVZ1275 (tRNA-Ala→Phe) e pVZ1325 (tRNA-Phe→Ala), respectivamente. Foi utilizada para essa análise a ferramenta ClustalW2.



Figura 19. Mutagênese sítio-dirigida para substituição dos anticódons dos tRNAs de alanina e fenilalanina. (A) Alinhamento entre o gene selvagem de tRNA de alanina utilizado neste estudo (tA(AGC)P) e o inserto do plasmídeo recombinante gerado após mutação sítio-dirigida para trocar o anticódon de alanina (AGC) para o anticódon de fenilalanina (GAA). **(B)** Alinhamento entre o gene selvagem de tRNA de fenilalanina utilizado neste estudo (tF(GAA)F) e o inserto do plasmídeo recombinante gerado após mutação sítio-dirigida para trocar o anticódon de fenilalanina (GAA) para o anticódon de alanina (AGC). Os asteriscos indicam identidade completa entre as bases e os pontos representam o local onde ocorreu a troca (não identidade entre as bases).

Os plasmídeos contendo os insertos mutagenizados foram transformados em linhagens mutantes de eIF5A e o fenótipo destas linhagens foi analisado. Na tentativa de inserir os plasmídeos em alto número de cópias nas linhagens de interesse, foi observado que o plasmídeo contendo o gene para o tRNA-Phe→Ala apresentou toxicidade para as linhagens testadas, já que não foi possível recuperar nenhuma colônia após repetidas transformações (Figura 20, painel A). Apesar de *S. cerevisiae* apresentar 10 genes para o tRNA de fenilalanina localizados em diferentes *loci* do genoma, a inserção de um tRNA contendo o anticódon modificado em alto número de cópias gera um defeito severo no crescimento da linhagem selvagem, que já pode ser observado na recuperação de colônias.

Por outro lado, quando o plasmídeo em alto número de cópias contendo o tRNA-Ala→Phe é inserido nas linhagens selvagem e mutantes, não observamos nenhum problema na recuperação de colônias após a transformação (Figura 20, painel B). Após o isolamento

de alguns destes transformantes, foram realizados ensaios de sensibilidade a temperatura e não foi observado nenhum efeito aditivo ao fenótipo das linhagens mutantes quando o tRNA-Ala→Phe é inserido nas mesmas (dados não mostrados).

Na tentativa de diminuir a toxicidade ocasionada pelo tRNA-Phe→Ala, foi realizada a subclonagem deste inserto para um vetor centromérico (baixo número de cópias). Como controle, o mesmo procedimento foi realizado para o tRNA-Ala→Phe. Após a transformação das linhagens mutantes de eIF5A, obteve-se uma grande quantidade de clones, como pode ser observado na Figura 20. Os transformantes recuperados foram submetidos ao teste de sensibilidade a temperatura e também não foi observada nenhuma alteração no fenótipo de crescimento (dados não mostrados).

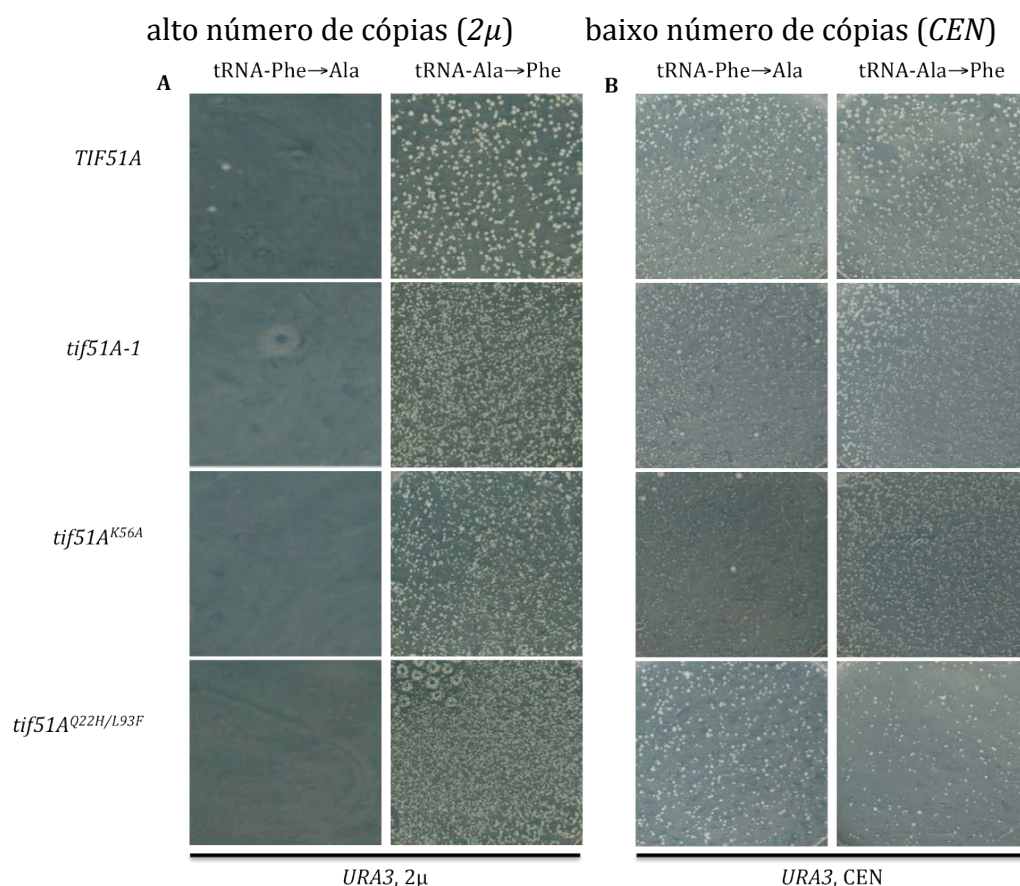


Figura 20. Efeito dos tRNAs com anticódons substituídos nas linhagens selvagem e mutantes de *eIF5A*. Placas obtidas após transformação das linhagens indicadas com os plasmídeos contendo o tRNA de fenilalanina com anticódon de alanina (tRNA-Phe→Ala) ou tRNA de alanina com o anticódon de fenilalanina (tRNA-Ala→Phe). No painel **(A)** os plasmídeos utilizados são de alto número de cópias (origem de replicação 2μ) e no painel **(B)** os plasmídeos utilizados são de baixo número de cópias (origem de replicação *CEN*).

Após a análise desses resultados, foi possível concluir que o efeito da superexpressão de um tRNA-Phe→Ala é tóxico para as linhagens de *S. cerevisiae* testadas, porém este efeito não é observado quando o tRNA-Ala→Phe é superexpresso nas mesmas linhagens, mostrando que apesar de existir mais de um gene que codifica para um mesmo tRNA na célula esse efeito compensatório não ocorre em qualquer situação. Além disso, a adição dos tRNAs modificados (tRNA-Phe→Ala, tRNA-Ala→Phe) em vetor de baixo número de cópias não causa nenhum efeito no fenótipo de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* testadas, isso leva a crer que nesta situação observa-se um efeito compensatório da presença de outros genes que codificam para os tRNAs de fenilalanina e alanina permitindo o crescimento normal da célula. Uma vez que não foi observado nenhum comportamento

diferencial entre linhagens selvagem e mutantes de eIF5A, esta análise não contribuiu para estudo do mecanismo de supressão do tRNA^{Ala} em mutantes de eIF5A.

4.4. Análise do perfil polissomal de *tif51A*^{K56A} na presença de tRNA^{Ala} e tRNA^{iMet} em alto número de cópias

Ensaio de perfil polissomal são muito importantes para caracterização de defeitos nas etapas de início e alongação da tradução, sendo que em mutantes de início da tradução observamos diminuição da fração polissomal e aumento de monossomos, enquanto mutantes de alongação apresentam aumento de polissomos e diminuição da fração de monossomo (ASANO et al., 2000; ANAND et al., 2003). Estudos prévios mostraram que o perfil polissomal de mutantes de eIF5A é bastante diferente do perfil de mutantes de início de tradução e se assemelham com os perfis polissomais do mutante de alongação dominante negativo eEF2^{H699K} (ZANELLI et al., 2006; GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009). Outro estudo mostrou que a adição de eEF2 em alto número de cópias é capaz de melhorar o defeito observado no perfil polissomal do mutante *tif51A*^{K56A} (DIAS et al., 2012). Tendo em vista a utilidade dos ensaios de perfil polissomal na caracterização de defeitos na tradução, foi proposto analisar o perfil polissomal de mutantes estáveis de eIF5A na presença do tRNA^{Ala} em alto número de cópias.

Análises de perfil polissomal de diferentes mutantes de eIF5A em nosso laboratório sempre revelaram defeitos típicos de alongação da tradução (ZANELLI et al., 2006; GREGIO et al., 2009; DIAS et al., 2012). Entre os mutantes analisados, estão os mutantes *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}. No entanto, no caso específico da linhagem VZL821 (*tif51A*^{Q22H/L93F}), apesar de se observar o defeito no perfil polissomal desta linhagem em temperaturas restritivas mais altas, não foi observada uma grande diferença de perfil polissomal para esta linhagem na temperatura de 38°C, na qual é melhor observada a supressão fenotípica de VZL821 (*tif51A*^{Q22H/L93F}) pelo tRNA^{Ala}/2μ (dados não mostrados).

Por outro lado, a 38°C foi possível observar tanto um bom nível de supressão da linhagem VZL987 (*tif51A*^{K56A}) por tRNA^{Ala}/2μ, quanto também defeito no perfil polissomal desta linhagem (Figura 21). Através da quantificação relativa dos picos na Figura 21, pode-se observar que a linhagem mutante *tif51A*^{K56A} apresenta aumento da relação

polissomos/monossomo (80S) quando comparado ao selvagem (*TIF51A*). Este dado está de acordo com o que já foi visto em nosso laboratório com relação a mutantes de eIF5A apresentarem defeito de elongação da tradução (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009).

Com relação ao mutante *tif51A^{K56A}* contendo o *tRNA^{Ala}/2μ*, não é observada uma diferença significativa com o perfil do mutante *tif51A^{K56A}* sem o tRNA: um P/M de $2,3 \pm 0,3$ para *tif51A^{K56A}* + *tRNA^{Ala}* comparado à $2,2 \pm 0,2$ na condição de *tif51A^{K56A}* sozinho. Novamente, se compararmos o efeito de eEF2 sobre o perfil polissomal deste mutante, observamos praticamente os mesmos valores de P/M para *tif51A^{K56A}* + eEF2 e linhagem selvagem. O experimento utilizando eEF2 como supressor do defeito do mutante *tif51A^{K56A}* foi utilizado como controle positivo de supressão e os resultados estão de acordo com os dados previamente publicados (DIAS et al., 2012).

Com isso, os resultados sugerem que o mecanismo de supressão por *tRNA^{Ala}* é diferente daquele ocasionado por eEF2. Além disso, os resultados obtidos sugerem que o mecanismo da supressão pelo *tRNA^{Ala}* não afeta a tradução de maneira global, visto que o efeito não pode ser observado no perfil polissomal na presença do tRNA em alto número de cópias.

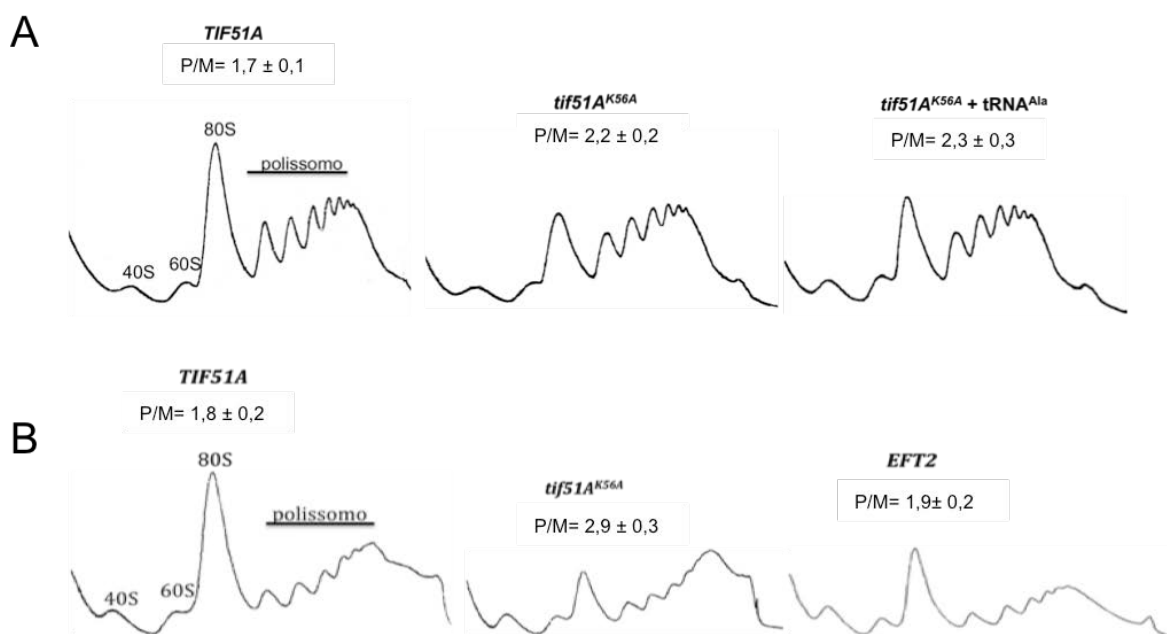


Figura 21. Efeito dos supressores em alto número de cópias tRNA^{Ala} e eEF2 no perfil polissomal do mutante *tif51A*^{K56A}. Perfis polissomais das linhagens indicadas após tratamento com formaldeído. Os traçados representam a leitura de absorvância a 254 nm dos gradientes de sacarose (7% - 47%) de cada extrato celular fracionado após centrifugação. P/M é a relação entre os valores obtidos da área dos picos de polissomos dividida pela área de monossomo (80S). Efeito da superexpressão do tRNA^{Ala} e eEF2 no perfil polissomal do mutante *tif51A*^{K56A}, **A** e **B**, respectivamente.

Tendo em vista a supressão no defeito de crescimento do mutante *tif51A*^{K56A} observada quando o tRNA^{Met} está alto número de cópias na célula, foi também avaliado o efeito deste supressor no perfil polissomal do mutante. Como pode ser observado na Figura 22, tal supressão do fenótipo de crescimento não interfere no defeito observado no perfil polissomal para o mutante *tif51A*^{K56A}, ou seja, como ocorre com o tRNA^{Ala}, a supressão no fenótipo de crescimento não está correlacionada com uma diferença detectável pelo experimento de perfil polissomal, na síntese proteica total. Sugerindo, mais uma vez, um mecanismo de supressão diferente da que ocorre quando eEF2 é superexpresso no mutante *tif51A*^{K56A}.

Inicialmente se acreditava que a supressão por tRNA^{Met}/2μ poderia ocorrer devido a uma maior disponibilidade de complexo ternário e, com isso, aumento no início da tradução, que seria uma melhora geral da tradução e que possivelmente levaria à melhora de crescimento de outros mutantes de eIF5A também. Porém somente o mutante *tif51A*^{K56A}

apresenta supressão do fenótipo de crescimento por $\text{tRNA}_{\text{Met}}/2\mu$ (Figura 22). Não é descartada a possibilidade de eIF5A ou EF-P atuarem durante a formação da primeira ligação peptídica, no entanto, os perfis polissomais de mutantes desses fatores levam a defeitos de perfil polissomal típicos de elongação da tradução (ASANO et al., 2000; ANAND et al., 2003; GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009) .

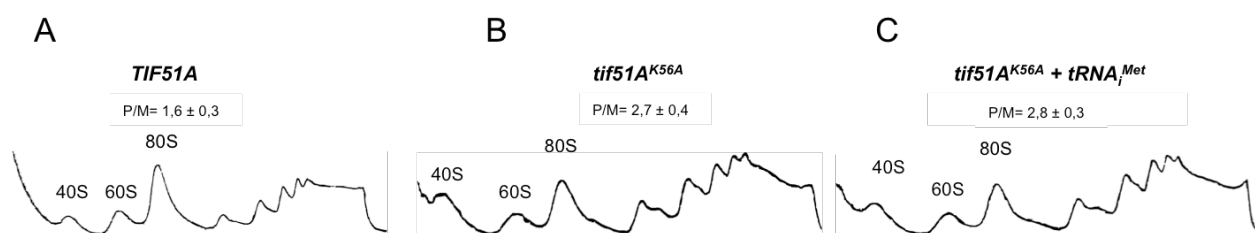


Figura 22. Efeito do tRNA_{Met} no perfil polissomal do mutante *tif51A^{K56A}*. Perfis polissomais das linhagens indicadas após tratamento com formaldeído. Os traçados representam a leitura de absorbância a 254 nm dos gradientes de sacarose (7% - 47%) de cada extrato celular fracionado após centrifugação.

4.5. Análise de interação física entre eIF5A e o tRNA^{Ala} por triplo-híbrido

O sistema de triplo-híbrido de RNA em levedura é derivado do sistema de duplo-híbrido e possibilita a avaliação de interações físicas entre RNA e proteína. Esse sistema se baseia na característica modular dos domínios de ligação ao DNA (BD) e de ativação da transcrição (AD) dos fatores de transcrição. Portanto, mesmo que os domínios que constituem estes fatores sejam produzidos separadamente na célula, quando reaproximados são capazes de ativar a transcrição novamente. Essa reaproximação pode ser gerada pela interação física entre duas proteínas fusionadas diretamente com BD e AD (duplo-híbrido) ou entre um RNA ligado ao BD e uma proteína ligada ao AD (triplo-híbrido de RNA). Desta forma, se os híbridos interagirem, a reaproximação de BD com AD possibilita a ativação de transcrição pelo fator reconstituído e este evento pode ser detectado através de genes repórteres (SENGUPTA et al., 1996).

A linhagem L40-coat (VZL836) possui, integrado em seu genoma, a região codificadora para o primeiro híbrido que constitui o sistema (BD-MS2BP). Este gene de fusão codifica para a proteína *lexA*, que tem o domínio de ligação ao DNA (BD) fusionado à proteína que se liga ao RNA MS2 (*MS2 binding protein* - MS2BP). O segundo híbrido é constituído do RNA estrutural MS2, fusionado ao RNA de interesse, que, em nosso caso, é o tRNA de alanina. O terceiro híbrido é constituído do domínio de ativação da transcrição de Gal4 (AD) fusionado à proteína de interesse, que neste trabalho é eIF5A. Tanto o segundo híbrido, de RNA (tA(AGC)P em pIIIA/MS2-1), quanto o terceiro híbrido, de proteína (*TIF51A* em pACT-2), são inseridos na linhagem contendo o primeiro híbrido (BD-MS2BP), na forma de plasmídeos. Na Figura 23, está representado o fundamento deste ensaio. Se ocorrer interação entre o RNA teste (tRNA^{Ala}) e a proteína teste (eIF5A), a proteína *lexA* (BD) e o domínio de ativação da transcrição Gal4 (AD) são aproximados, e ocorre a ativação da transcrição dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ*, tornando a linhagem L40-coat prototrófica para histidina e positiva no ensaio de β -galactosidase.

O controle positivo do sistema é baseado na interação conhecida entre o RNA IRE (*Iron Response Element*) e a proteína IRP1 (*Iron Regulatory Protein*), sistema caracterizado de resposta a íons ferro. O IRE é um RNA estruturado que está presente na região não

traduzida de mRNAs que codificam para proteínas envolvidas na utilização de ferro e se liga especificamente a IRP1 (SENGUPTA et al., 1996).

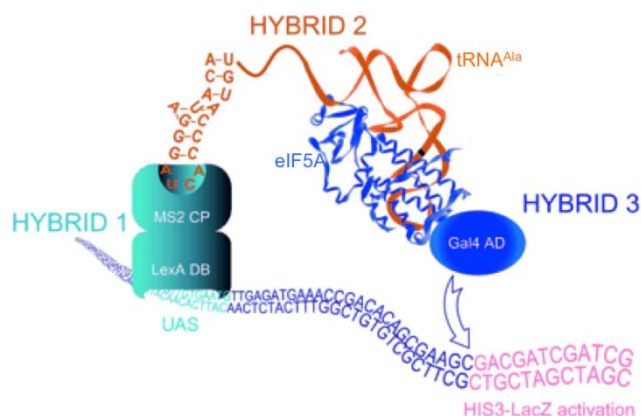


Figura 23. Esquema ilustrado do sistema de triplo-híbrido de RNA utilizado neste trabalho. O híbrido 1 (lexA-MS2BP) está representado em verde; o híbrido 2 (RNA MS2-tRNA^{Ala}), em laranja; e o terceiro híbrido (eIF5A-Gal4-AD), em azul (modificado de ZHENG et al., 2004).

Para o teste de interação física entre eIF5A e o tRNA^{Ala}, o gene do tRNA^{Ala} (tA(AGC)P) foi clonado no vetor pIIIA/MS2-1, o qual irá gerar o híbrido 2 (RNA MS2-tRNA^{Ala}), e a construção pACT-TIF51A (pVZ285), que codifica o híbrido 3 (eIF5A-Gal4-AD). O gene do tRNA^{Ala} (tA(AGC)P) foi clonado no vetor pIIIA/MS2-1 utilizando-se a enzima de restrição *Sma*I e, após a clonagem, realizou-se o sequenciamento dos clones obtidos para selecionar um clone corretamente inserido com relação à direção desejada (dados não mostrados).

Após a obtenção da linhagem contendo concomitantemente o híbrido de RNA (MS2-tRNA^{Ala}) e o híbrido proteico (eIF5A-Gal4-AD), três diferentes transformantes foram ensaiados quanto à capacidade de ativar os genes repórteres do sistema. Como mostrado na Figura 24, não ocorreu ativação de nenhum dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*), demonstrando que o tRNA^{Ala} e eIF5A não interagem fisicamente pelo sistema de triplo-híbrido em levedura.

É importante ressaltar que dados de localização no ribossomo tanto de EF-P (EF-P+70S+fMet-tRNA_f^{Met} por cristalografia à resolução de 3,5 angstroms), quanto de eIF5A (eIF5A+80S+Met-tRNA_f^{Met} por clivagem de rRNA e tRNA à resolução estimada de ~10 Å),

mostram pontos de interação entre esses fatores e o tRNA iniciador no sítio P (BLAHA, STANLEY E STEITZ, 2009; GUTIERREZ et al., 2013). Portanto, havia a expectativa de se observar uma interação física entre eIF5A e o tRNA^{Ala}. Além disso, outro trabalho de nosso laboratório testou a interação física direta entre eIF5A e Met-tRNA^{iMet} *in vitro* utilizando *band shift* e nenhum resultado positivo foi obtido (Danuza Rossi, dados não publicados de seu Pós-Doutorado). Tendo em vista este resultado do experimento de *band shift*, e o fato de eIF5A estimular a síntese de di e tripeptídeos de prolina em um sistema *in vitro*, ou seja, em um sistema contendo Pro-tRNA^{Pro} no sítio P (GUTIERREZ et al., 2013), é pouco provável que eIF5A se ligue apenas a tRNAs específicos. Por outro lado, é bastante possível que a interação eIF5A-tRNA apenas possa ser observada no ribossomo por uma questão de posicionamento destes fatores ou mesmo por não ser estável o suficiente para ser detectada fora do ribossomo.

Recentemente, a descoberta de interações genéticas entre eIF5A e os fatores de *Ribosomal Quality Control* Rqc2 e Ltn1 (Paulo Boldrin, dados não publicados de seu Doutorado Direto) podem talvez ajudar a explicar a relação entre eIF5A e o tRNA^{Ala}. Sabe-se que quando o ribossomo está preso ao mRNA em uma sequência que causa forte *stalling*, como 12 lisinas ou argininas consecutivas, ocorre direcionamento destes peptídeos nascentes para degradação no proteassomo, bem como a reciclagem do ribossomo, mediados pelo complexo de *Ribosomal Quality Control* (RQC) (LYKKE-ANDERSEN E BENNETT, 2014). Ainda, verificou-se que Rqc2 é capaz de adicionar uma cauda contendo alanina e treonina ao peptídeo nascente ainda associado à subunidade 60S do ribossomo, sem a necessidade de molde (mRNA) ou da subunidade 40S (SHEN et al., 2015). Uma vez que é sugerido que eIF5A seja um facilitador da formação de ligação peptídica em determinadas situações, como no caso de prolinas consecutivas, é possível que eIF5A auxilie Rqc2 durante a extensão da cauda de alanina e treonina e que o tRNA^{Ala} em alto número de cópias seja um supressor desta função de eIF5A. Infelizmente, o tRNA para treonina não fez parte das análises deste trabalho. Mais experimentos serão necessários para investigar estas relações funcionais, os quais farão parte do Doutorado Direto do Paulo Boldrin.

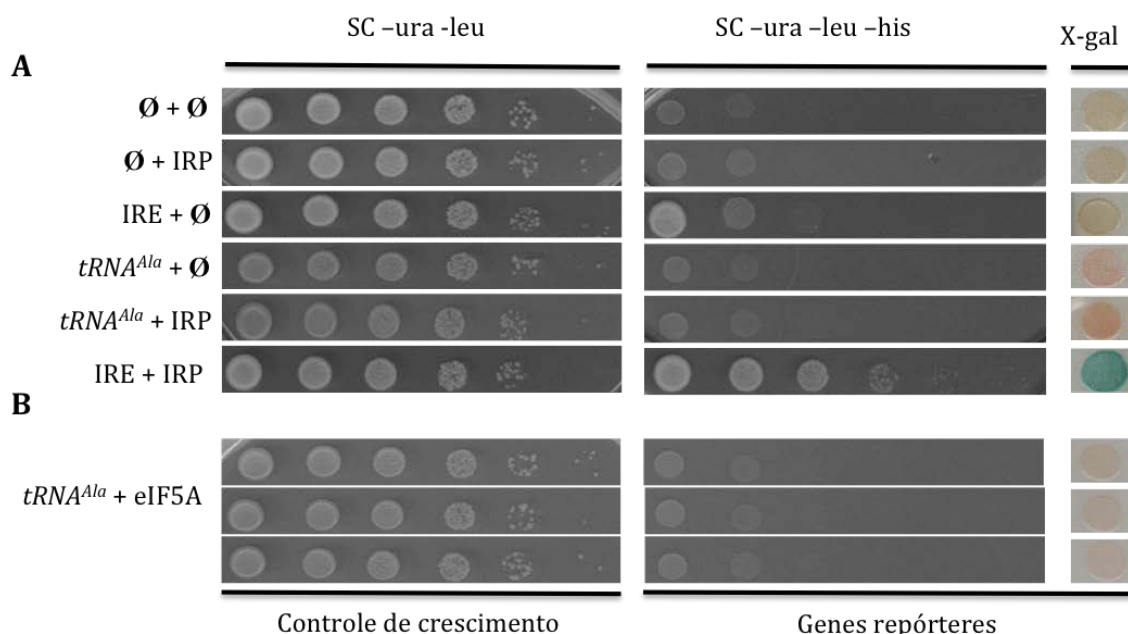


Figura 24. Avaliação da interação física entre eIF5A e o tRNA^{Ala} pelo sistema de triplo-híbrido. (A) A linhagem L40-coat transformada com os plasmídeos pIIIA/MS2-1 contendo o que está indicado à esquerda, mais pACT contendo o que está indicado à direita, na descrição de cada linha, foi cultivada em meio SC-leu,-ura, SC-leu,-ura,-his e ensaiadas para β-galactosidase em membrana de nitrocelulose. A linhagem contendo IRE + IRP1 (+) foi utilizada como controle positivo e todas as outras deste painel são controles negativos de interação neste sistema. **(B)** Ensaio de interação entre eIF5A e o tRNA^{Ala}, 3 clones diferentes foram testados.

4.6. Análise dos eventos de tradução *Programmed Ribosomal Frameshifting* (PRF), *misincorporation* e *readthrough* utilizando repórteres de duas luciferases

Considerando-se todos os resultados obtidos até este ponto e dificuldades de se correlacionar funcionalmente eIF5A e o tRNA^{Ala}, concomitante com a publicação da função de EF-P na tradução específica de sequências *stalling* de ribossomo ricas em prolinas (DOERFEL et al., 2013; UDE et al., 2013), decidimos também abordar neste projeto a participação de eIF5A na tradução específica *versus* tradução geral. Assim, com a possibilidade de realização do estágio no exterior (BEPE deste Doutorado Direto, 2012/23396-4), iniciamos uma colaboração com o Dr. Jonathan Dinman, do Depto. de Biologia Celular e Genética Molecular da Universidade de Maryland, EUA. O Dr. Dinman estuda estrutura e função do ribossomo de eucariotos, assim como controle da expressão

gênica em nível traducional e desenvolveu vários repórteres para avaliar eventos da tradução utilizando duas luciferases (HARGER E DINMAN, 2003; PLANT et al., 2007).

Uma vez que este tipo de repórter já havia sido utilizado na demonstração da função de eIF5A no alívio de *stalling* ribossomal causado por sequências de prolinas consecutivas (GUTIERREZ et al., 2013), e vários trabalhos propuseram uma grande complexidade dos tipos de sequências ricas em prolinas que estão relacionadas funcionalmente a EF-P em bactéria (DOERFEL et al., 2013; HERSCH et al., 2013; UDE et al., 2013; WOOLSTENHULME et al., 2013), uma parte de nossa proposta era analisar diferentes tipos de sequências ricas em prolina utilizando repórteres de duas luciferases. Para abordar esta parte do projeto BEPE, foram construídos repórteres contendo repetições de resíduos do mesmo aminoácido que foram descritas por GUTIERREZ et al. 2013 como causadoras ou não de *stalling* ribossomal entre os genes das duas luciferases (*spacer sequence* na Figura 26). Após os ensaios destes repórteres, utilizando mutantes de eIF5A, não foi possível reproduzir os dados publicados por GUTIERREZ et al. 2013, em que foi mostrada a participação específica de eIF5A na tradução de proteínas que contêm sequências ricas de prolinas. Além disso, repórteres utilizando sequências de prolinas semelhantes, porém com outras proteínas de fusão, gerados em outro projeto de nosso laboratório, também não reproduziram os dados de GUTIERREZ et al. 2013 (Paulo Boldrin, dados não publicados de seu Doutorado Direto). Estes resultados nos causaram grande surpresa e, em nossa busca das razões pelas quais não temos reproduzido os resultados de GUTIERREZ et al. 2013, verificamos que a linhagem mutante para eIF5A utilizada naquele trabalho também possuía um nocaute no gene *GCN2*, que atua inibindo o início da tradução em diversas situações de estresse celular (MURGUIA E SERRANO, 2012). Não sabemos ainda se o nocaute em *GCN2* pode interferir com esta função de eIF5A e esta análise está sendo conduzida em nosso laboratório. No entanto, estão descritas interações genéticas sintéticas negativas (*synthetic sick phenotype*) entre mutantes de eIF5A e nocautes de *GCN1* e *GCN20* (COSTANZO et al., 2010), os quais codificam ativadores diretos de *Gcn2* (GARCIA-BARRIO et al., 2000).

Tendo em vista que o laboratório do Dr. Dinman é referência no estudo de eventos de recodificação (*Programmed Ribosomal Frameshifting*) e defeitos na tradução (*readthrough* e *misincorporation*), também testamos a participação de eIF5A nestes eventos

traducionais, os quais são afetados por diferentes fatores essenciais para a tradução geral da célula (PLANT et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2010).

O *Programmed Ribosomal Frameshifting* (PRF) é um mecanismo alternativo de decodificação do mRNA que produz alterações na janela de leitura do ribossomo. Em diferentes tipos de sinais de PRF, essas alterações podem ocorrer tanto no sentido 3' (PRF +1), como no sentido 5' (PRF -1) (FARABAUGH, 1996). Existem atualmente duas categorias de PRF descritas, baseando-se na direção em que a recodificação ocorre. Conforme mostrado na Figura 25, quando o ribossomo muda a fase de leitura avançando uma base na direção 5' do mRNA, ocorre o fenômeno de PRF -1 e quando o ribossomo avança uma base na direção 3' do mRNA, ocorre o fenômeno de PRF +1. Para que esse fenômeno aconteça, é necessário que o mRNA possua sequências estimulatórias que permitem a mudança na fase de leitura. Para PRF -1, esse sinal estimulatório é composto de uma sequência de até 12 nucleotídeos específicos de escorregamento (*slipery site*), um códon de parada na fase de leitura 0, ou seja, a fase determinada pelo códon de iniciação e uma estrutura secundária no mRNA que funciona como uma barreira para o ribossomo naquele ponto. Com a diminuição na velocidade da tradução neste ponto e os sítios A e P do ribossomo ocupados, a sequência estimulatória de escorregamento permite que o ribossomo mude a fase de leitura neste ponto, avançando uma base na direção 5' do mRNA e mudando a partir deste ponto a fase de leitura. Nos mecanismos para PRF +1 ocorre maior variação. Sabe-se que geralmente existe um códon raro logo após a sequência de escorregamento, e esse códon raro permite também que ocorra uma diminuição na velocidade da tradução e o ribossomo é então capaz de avançar uma base na direção 3' do mRNA. Em *S. cerevisiae*, existem alguns sinais de PRF +1 descritos atualmente, destes 5 são em retrotransposons, sequências móveis no genoma que formam partículas virais no citoplasma e retornam ao núcleo para se integrar ao genoma. Outro gene que possui um sinal de PRF +1 é o da antizima (*OAZ1*). A tradução completa da antizima ocorre somente após um evento de PRF +1, pois quando não ocorre mudança na fase de leitura, uma proteína menor e afuncional é traduzida. A antizima participa do metabolismo de poliaminas na célula, inibindo a enzima ornitina descarboxilase, etapa limitante na produção de poliaminas. A regulação da taxa de PRF +1 nesta enzima é determinada pela ligação de poliaminas diretamente ao peptídeo nascente da antizima. Por regular negativamente a concentração de poliaminas na célula, a interação

de poliaminas com o peptídeo nascente estimula a ocorrência de PRF +1 e a enzima ativa é então produzida (KURIAN et al., 2011). Apesar de inicialmente descritos em genomas virais, hoje se sabe que aproximadamente 10% dos mRNAs de eucariotos possuem sequências com potenciais sinais de PRF -1 e, recentemente, foram caracterizados genes que possuem sua expressão controlada por mecanismos de PRF, como, por exemplo, alguns genes envolvidos com a manutenção de telômeros em levedura (*EST1*, *EST2*, *STN1* e *CDC13*) (DINMAN, 2012a; ADVANI, BELEW E DINMAN, 2013).

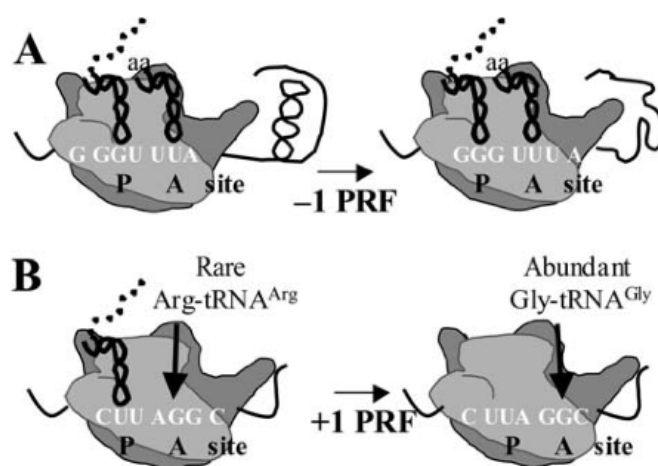


Figura 25. Esquema dos mecanismos de *Programmed Ribosomal Frameshifting*. (A) Representação do que ocorre durante a tradução do RNA do vírus L-A de levedura. O ribossomo pára quando encontra uma estrutura secundária no mRNA no *slipery site*. Com os sítios A e P ocupados, ocorre a mudança de fase de leitura no momento em que os tRNAs deslizam uma base na direção 5', induzindo o PRF -1. **(B)** Mecanismo de PRF +1 do retrotransposon TY-1 de levedura. Neste caso, o ribossomo pára quando encontra um códon raro de arginina. Neste momento, ocorre o deslizamento do tRNA do sítio P na direção 3', o que leva à formação de um códon frequente para glicina no sítio A (VALENTE E KINZY, 2003).

Com o intuito de analisar os efeitos na tradução causados por defeitos da proteína eIF5A nos fenômenos PRF -1 e PRF +1, foram realizados experimentos utilizando repórteres de luminescência. Além de se analisar PRF, esse tipo de repórter também é muito útil para se analisar a incorporação errônea de determinados aminoácidos durante a tradução (*misincorporation*) e também analisar defeitos da terminação da tradução (*readthrough*). O esquema dos repórteres utilizados neste trabalho está representado na Figura 26 (HARGER E DINMAN, 2003; PLANT et al., 2007).

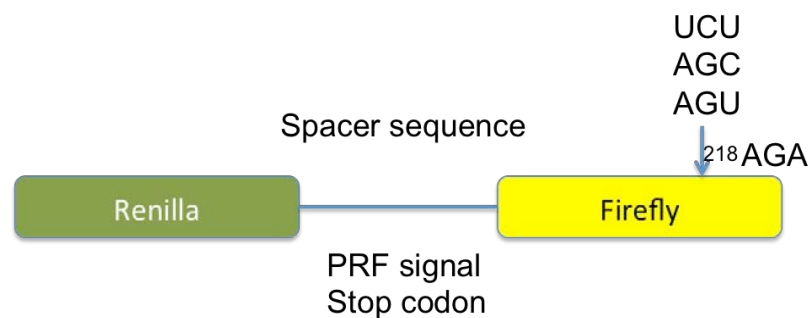


Figura 26. Esquema dos repórteres de duas luciferases utilizados neste trabalho. Os genes que codificam para as proteínas luciferase de *Renilla* e vagalume possuem uma sequência espaçadora (*spacer sequence*), onde estão os sinais de PRF (repórteres de PRF) ou um dos três códons de terminação (repórteres de *readthrough*). No mesmo sistema, a substituição do códon AGA, na proteína selvagem, por códons *near-cognate* (AGC, ACU) ou *non-cognate* (UCU) nos repórteres de *misincorporation* (adaptada de HARGER E DINMAN, 2003; PLANT et al., 2007).

O grupo de repórteres de PRF (-1 ou +1) possui um sinal de PRF na sequência espaçadora (Figura 26). Neste caso, a tradução da segunda luciferase, a de vagalume, somente ocorre se houver PRF, levando à formação de uma proteína de fusão (mesmo polipeptídeo) entre as duas luciferases. Caso não ocorra o PRF, um códon de parada é alcançado e apenas a luciferase de *Renilla* é traduzida. Assim, a capacidade da célula em realizar PRF é medida através da relação entre a atividade das duas luciferases, que apesar de estarem em uma mesma cadeia polipeptídica, possuem substratos e domínios distintos, o que possibilita medir a atividade de cada uma delas independentemente.

Na Figura 27, podemos observar que mutantes de eIF5A apresentam aumento na taxa de PRF -1, tanto para o sinal contido no vírus LA-1, quanto para o sinal do vírus HIV-1. Para que ocorra PRF -1, é necessário que ocorra o escorregamento dos tRNAs posicionados nos sítos A e P do ribossomo (DINMAN, 2012b). Para que isso aconteça, a velocidade da tradução precisa diminuir significativamente. A estrutura secundária formada pelo mRNA logo após o sítio de escorregamento gera uma barreira física que impede a passagem do ribossomo neste ponto. No caso destes vírus, o mecanismo de PRF existe para que a quantidade correta das proteínas Gag e Pol sejam produzidas, ou seja, nos dois vírus supracitados temos os dois genes que codificam para proteínas estrutural e enzimática com uma região de sobreposição. Para que a replicação do vírus seja eficiente, a taxa de PRF -1 deve ser mantida, como ilustrado na Figura 28. Um estudo recente mostrou que mutantes

condicionais do fator de término da tradução de eucariotos (eRF1) apresenta o mesmo efeito na taxa de PRF -1 de HIV-1. eRF1 foi isolado em um rastreamento de nocautes que inibem a replicação do vírus HIV-1, e no mesmo estudo, foi demonstrado que esse efeito não está relacionado com o aumento do tempo que o ribossomo fica parado no sítio de escorregamento nem com o códon de parada presente após o sítio de escorregamento. Foi proposto, então, que eRF1 possa formar algum complexo ainda não identificado com outros fatores de tradução para regular a ocorrência de PRF -1 (KOBAYASHI et al., 2010). Ainda, um estudo recente mostrou que eIF5A apresenta um efeito estimulatório, independente de Rev, na expressão gênica de HIV-1, bem como na tradução de mRNAs deste vírus (LIU et al., 2011).

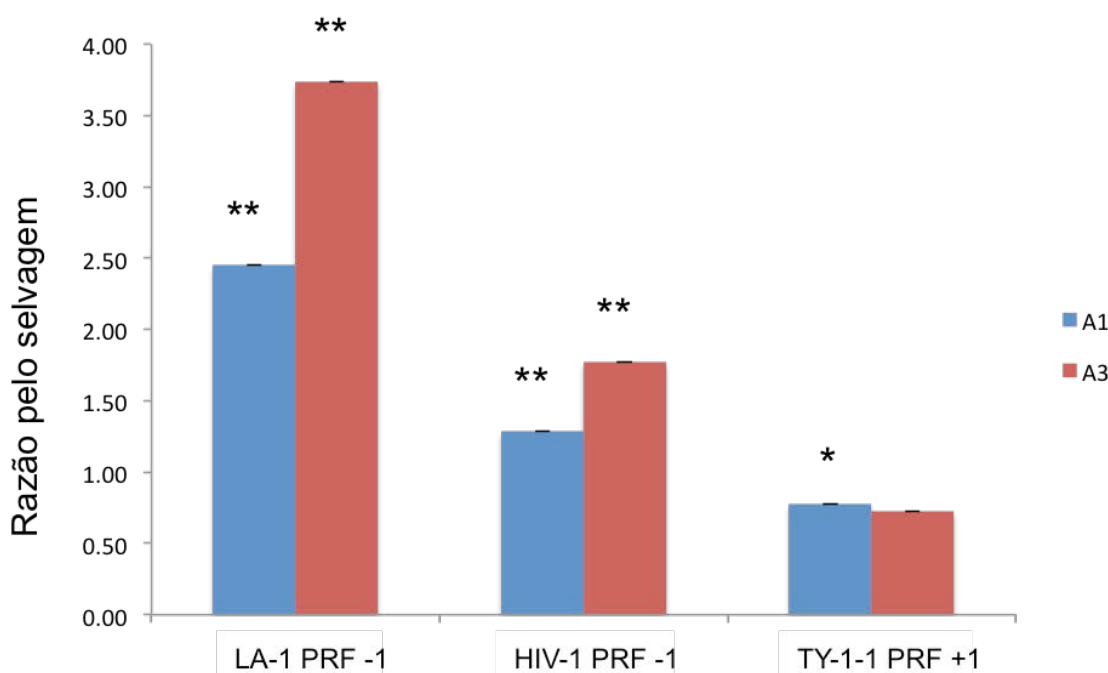


Figura 27. Mutantes de eIF5A (*tif51A-1* e *tif51A-3*) apresentam aumento na taxa de PRF -1. Plasmídeos repórteres contendo as sequências codificadoras para as luciferases de *Renilla* e vagalume, separadas por sinais de PRF -1 do vírus L-A, PRF +1 do retrotransposon TY-1, PRF -1 do vírus HIV ou controle sem nenhum sinal de PRF foram introduzidos na linhagem selvagem e nos mutantes de eIF5A *tif51A-1* (A1) e *tif51A-3* (A3). A eficiência de PRF foi calculada através da razão entre os valores obtidos para as atividades de luciferase de vagalume/*Renilla* pela mesma razão do controle. Foi aplicado o teste estatístico *t student* para validação dos dados e os asteriscos indicam os resultados com * $p > 0,05$ e ** $p > 0,01$.

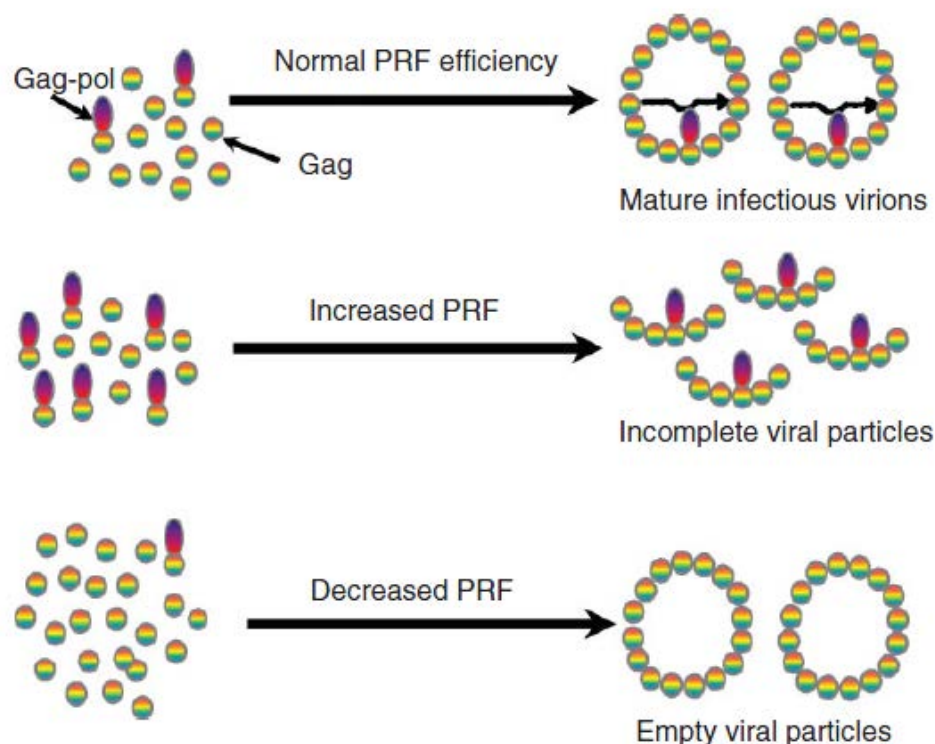


Figura 28. Efeitos do PRF -1 na propagação viral. A relação correta na síntese das proteínas estrutural e enzimática é mantida pelo sinal de PRF -1 contido no genoma viral que direciona os ribossomos em uma fase de leitura alternativa em uma taxa determinada que permite a produção da proteína Gag-pol. Quando não ocorre PRF somente Gag é produzida. Aumento ou diminuição nas taxas de PRF -1 resultam em inibição da replicação viral (DINMAN, 2012b).

Ainda no intuito de analisar eventos na tradução que possam ser alterados pela ausência da função de eIF5A na célula, foi avaliada a fidelidade durante a tradução (*misincorporation*). A síntese de proteínas na célula é um processo extremamente controlado e acurado, porém a incorporação de erros durante a tradução ocorre em uma taxa de 10^{-4} por códon (DINMAN, 2012a), e alterações nesta taxa podem levar a efeitos deletérios para a célula. Existem dois tipos de interações que podem ocorrer de acordo com o pareamento entre códon e anti-códon no momento da incorporação dos aminoácidos: pode ocorrer a entrada de um aminoácido trazido por um tRNA que possui um anticódon chamado de *near-cognate* ou um *non-cognate*. A diferença entre essas categorias de interação se dá pela capacidade do códon e anticódon formarem uma estrutura chamada de mini-hélice, que pode ser formada de maneira transitória nos códons chamados de *near-*

cognates e, para outras interações em que essa estrutura não pode ser formada, é dado o nome de *non-cognate*. Na Figura 29 está representado o pareamento das bases entre o anticódon de 2 diferentes tRNAs de arginina e o códon, no mRNA, representando as interações *near-cognate* entre códon e anticódon (PLANT et al., 2007).

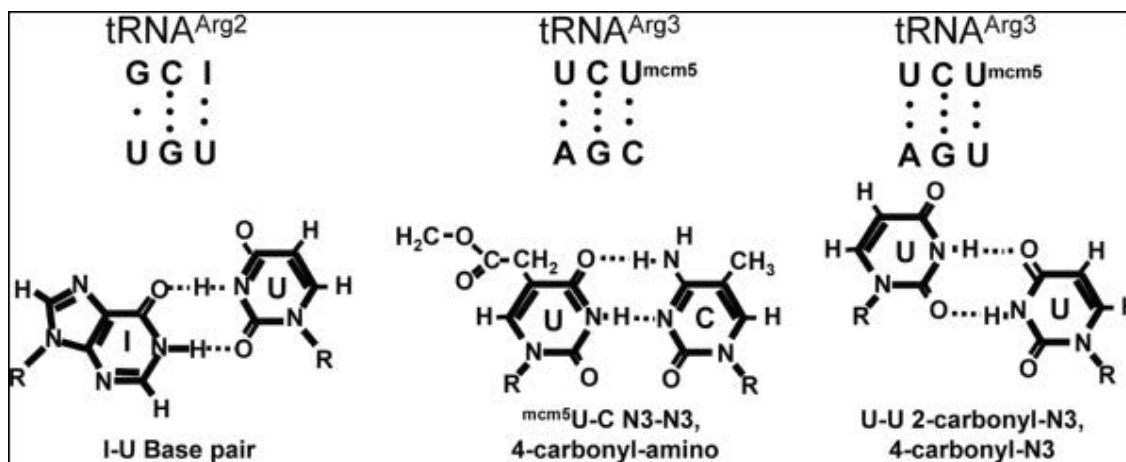


Figura 29. Esquema representativo do pareamento códon-anticódon da interação *near-cognate* entre tRNA e mRNA. Na parte superior da figura, está mostrado o pareamento das bases nitrogenadas entre o anticódon do tRNA^{Arg2} e o códon UGU (esquerda), e entre o anticódon do tRNA^{Arg3} e os códons AGC e AGU (centro e direita, respectivamente). Na parte inferior da figura, está mostrado o pareamento entre as bases nitrogenadas I:U, U:C e U:U (PLANT et al., 2007).

Desta forma, uma possível perda de fidelidade na tradução em linhagens mutantes para a proteína eIF5A foi testada utilizando os repórteres de *misincorporation* descritos na Figura 26. O grupo de repórteres de *misincorporation* possui uma substituição no códon AGA da posição 218 da luciferase de vagalume (*firefly* na Figura 26), que codifica para uma arginina na proteína selvagem, por um códon *near-cognate* (AGC ou AGU) ou códon *non-cognate* (UCU), que codificam para o aminoácido serina. A arginina 218 da luciferase de vagalume é necessária para a atividade desta enzima, com isso é possível aumento da atividade somente quando ocorre perda da fidelidade da tradução e uma arginina é adicionada no lugar da serina.

Podemos observar na Figura 30 que na depleção de eIF5A ocorre perda na fidelidade da tradução somente para códons *near-cognate*. Este efeito observado para os mutantes de eIF5A testados é similar ao que ocorre quando tratamos a célula com o aminoglicosídeo paromomicina (SALAS-MARCO E BEDWELL, 2005). Isso se dá pelo fato de que esse antibiótico

se liga ao sítio de decodificação na subunidade menor do ribossomo, gerando um aumento na frequência de *misincorporation* (OGLE E RAMAKRISHNAN, 2005). Tal efeito pode ser observado também em mutantes para o fator de alongação 1A (eEF1A), que apresentam perda de fidelidade na tradução apenas para códons *near-cognate*, sem apresentar significativa mudança para incorporação de *non-cognate*. Esse efeito observado em mutantes de eEF1A ocorre de maneira alelo específica, sendo que 6 diferentes alelos mostram aumento de *misincorporation* de *near-cognate* e 2 apresentam um fenótipo de hiperfidelidade, ou seja, os mutantes apresentam diminuição de *misincorporation* de *near cognate* quando comparados à linhagem selvagem (PLANT et al., 2007). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que mutantes de eEF1B γ (*tef3 Δ* , *tef4 Δ*) apresentam aumento em *misincorporation* de códons *near-cognate* e diminuição de *misincorporation* de códons *non-cognate*. O efeito no aumento de *misincorporation* nestes mutantes se deve a um evento indireto na ação de eEF1A, uma vez que eEF1B γ faz parte do complexo eEF1B (eEF1B α +eEF1B β +eEF1B γ), trocador de GDP por GTP de eEF1A (JEPPESEN et al., 2003).

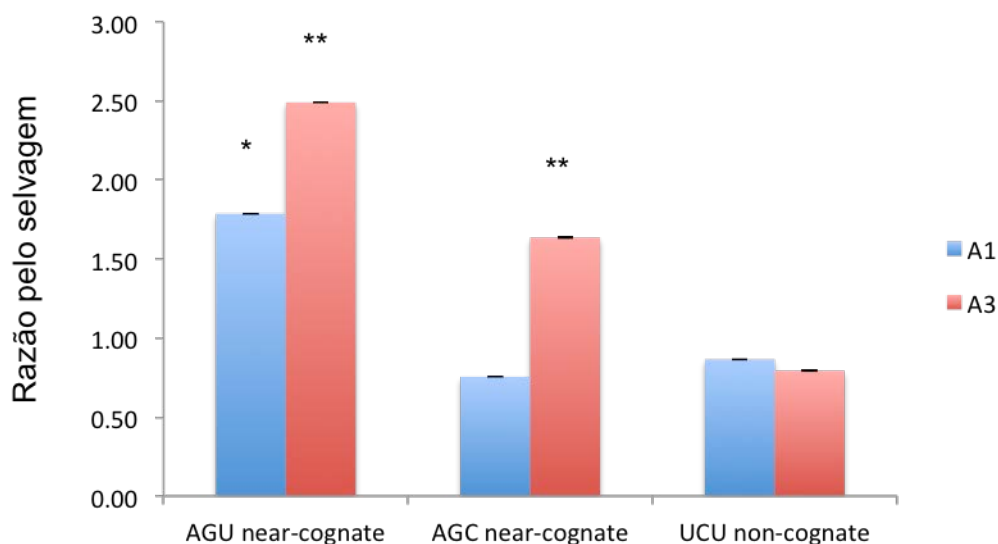


Figura 30. Ensaio de luminescência para *misincorporation* nos mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* de eIF5A. Foram utilizados três diferentes repórteres contendo códons para o aminoácido serina *near-cognate* (AGC ou AGU) ou *non-cognate* (UCU) na posição referente ao resíduo de aminoácido 218 do segundo gene da construção da Figura 30, que codifica para a luciferase de vagalume. O gene selvagem da luciferase de vagalume apresenta o códon para arginina (AGA). Os resultados foram avaliados como significativamente distintos ou não dos valores obtidos para a linhagem selvagem. Foi aplicado o teste estatístico t

student para validação dos dados e os asteriscos indicam os resultados com * $p > 0,05$ e ** $p > 0,01$.

Ainda utilizando repórteres de luminescência para avaliar a tradução, foi realizado o ensaio para analisar a participação de eIF5A na etapa de terminação da tradução. Como descrito na Figura 26, o grupo de repórteres de *readthrough* possui um códon de terminação (UAA, UAG ou UGA) entre os dois genes de luciferases e são utilizados para avaliar a terminação da tradução nas linhagens de interesse. Curiosamente, os mutantes de eIF5A apresentaram aumento de *readthrough*, ou seja, perda do reconhecimento de códon de parada, somente para o códon de parada UGA, como pode ser visto na Figura 31. De maneira bastante interessante, novamente, o mesmo efeito já foi observado em linhagens mutantes do fator de terminação da tradução de eucariotos (eRF1). Foi mostrado que eRF1 é capaz de liberar o peptídeo nascente eficientemente quando se liga aos códons de terminação UAA e UAG, porém para o códon de parada UGA, a presença de eRF3 é fundamental, bem como a hidrólise de GTP. Foi proposto ainda um mecanismo diferente para a terminação da tradução dependente do códon de parada (Figura 32). No mecanismo proposto, para que ocorra liberação do peptídeo nascente, eRF1 precisa sofrer uma modificação conformacional com gasto de GTP, para que a extremidade GGQ possa ser posicionada no centro da peptidiltransferase do ribossomo e realizar a liberação da cadeia polipeptídica (FAN-MINOGUE et al., 2008). Por fim, foi também proposto que eIF5A poderia estimular a terminação da tradução, pois em um ensaio *in vitro* a presença de eIF5A mostrou efeito estimulatório na liberação de dipeptídeos e tripeptídeos do ribossomo (SAINI et al., 2009).

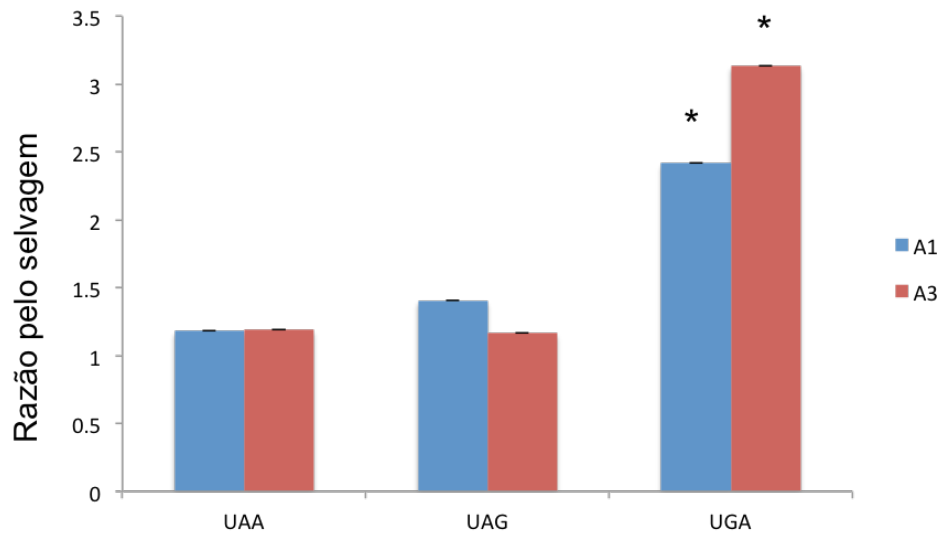


Figura 31. Ensaio de luminescência utilizando dois diferentes mutantes de eIF5A (A1 e A3). Foram utilizados três diferentes repórteres contendo um dos stop códon, indicados no eixo Y, entre os genes que codificam para as duas luciferases. Os resultados foram avaliados como significativamente distintos ou não dos valores obtidos para a linhagem selvagem. Foi aplicado o teste estatístico t para validação dos dados e os asteriscos indicam os resultados com * $p > 0,05$.

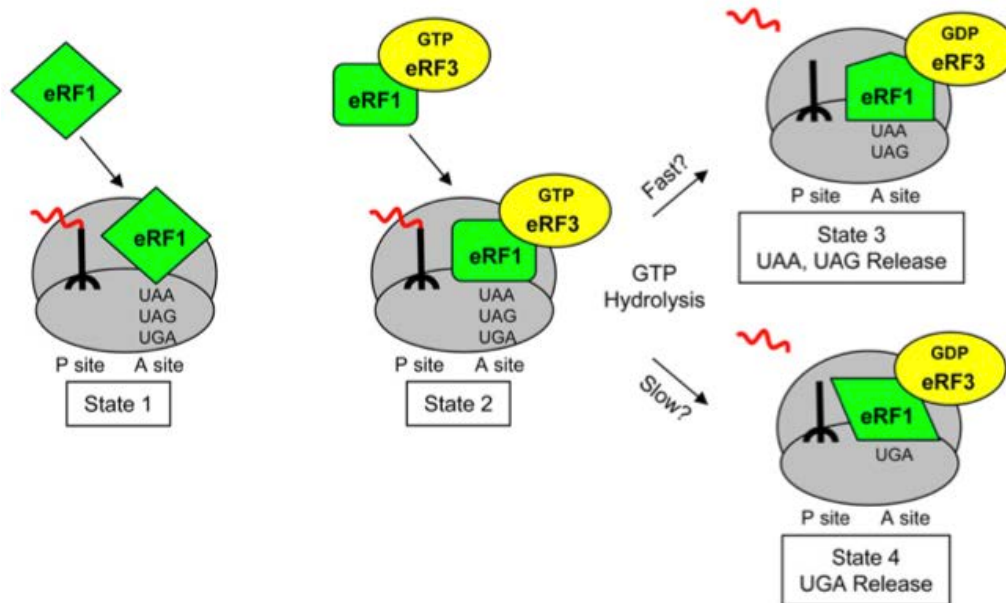


Figura 32. Mecanismo de reconhecimento de códon de parada e terminação da tradução em eucariotos. Modelo apresentando diferentes estados conformacionais induzidos por eRF1 e mostrando que o reconhecimento de UGA é mais lento e a liberação por eRF1 somente ocorre após a hidrólise da molécula de GTP associada a eRF3 (FAN-MINOGUE et al., 2008).

Apesar de os ensaios aqui utilizados não esclarecerem os mecanismos pelos quais são afetadas as funções do ribossomo, todos os resultados obtidos com os repórteres de duas luciferases sugerem uma atuação mais geral de eIF5A na tradução e não apenas de maneira específica, como foi sugerido por diferentes estudos (ROSSI et al., 2014). Esta conclusão não exclui a possibilidade de que eIF5A tenha um papel principal na tradução de sequências ricas em prolinas, como descrito mais recentemente (GUTIERREZ et al., 2013), no entanto, sugere que este não seja o único impacto da função de eIF5A na tradução e está de acordo com outros resultados da literatura, como a estimulação da síntese proteica observada tanto pelo ensaio de metionil puromicina (BENNE E HERSHEY, 1978), como pelo ensaio de liberação de dipeptídeos e tripeptídeos (SAINI et al., 2009). O efeito de eIF5A na tradução de sequências ricas em prolinas (GUTIERREZ et al., 2013) pode ser explicado pela maior necessidade da atividade de eIF5A no ribossomo quando essas sequências de parada precisam ser traduzidas, e por isso seu efeito em proteínas contendo tais sequências seja mais facilmente correlacionado com sua função estimulatória durante a formação de ligação peptídica na elongação.

O mesmo efeito estimulatório observado na taxa de PRF -1, para as linhagens na ausência de eIF5A, foi observado quando a atividade peptidiltransferase do ribossomo é inibida (DINMAN et al., 1997). Neste estudo foi demonstrado que linhagens selvagens tratadas com os inibidores da síntese proteica anisomicina e sparsomicina, que interferem diretamente na capacidade do ribossomo em catalisar ligações peptídicas, apresentam aumento nas taxas de PRF -1.

Ainda, estudos recentes mostram que existe um controle traducional específico para condições de estresse que leva a um aumento do *readthrough* de alguns genes e isso tem como resultado o encaminhamento de enzimas glicolíticas para o peroxissomo. Foi demonstrado que esse evento é observado para mRNAs que contém o stop códon UGA seguido de CUA, somente essa sequência de nucleotídeos causa um aumento considerável na taxa de *readthrough* nestes mRNAs. Quando o códon de parada é tocado para UAA ou UAG o mesmo efeito não é observado, mostrando a importância deste códon de parada na regulação de alguns genes (SAMANFAR et al., 2014).

CONCLUSÕES

1. A supressão pelo tRNA de alanina não é alelo-específica pois em diferentes alelos mutantes para eIF5A podemos observar melhora no fenótipo de sensibilidade à temperatura, quando realizado o teste de crescimento em temperaturas restritivas;
2. A presença do tRNA^{Met} em alto número de cópias é capaz de suprimir o fenótipo de sensibilidade a temperatura apenas do mutante *tif51A^{K56A}*. Diferentemente do que ocorre quando o tRNA^{Ala} é superexpresso, para o tRNA^{Met} não foi observada supressão do fenótipo de sensibilidade à temperatura de outros alelos mutantes testados;
3. A troca do anticódon do tRNA para fenilalanina para o anticódon de alanina é tóxica para a célula e o contrário não causa alteração no crescimento celular;
4. A presença do tRNA^{Ala} em alto número de cópias não causa melhora no defeito de elongação de tradução observado no perfil polissomal do mutante de eIF5A. Tanto a presença do tRNA^{Ala} quanto do tRNA^{Met} em alto número de cópias não são capazes de melhorar o defeito observado no perfil polissomal do mutante *tif51A^{K56A}*;
5. tRNA^{Ala} não interage fisicamente com eIF5A através do sistema de triplo-híbrido de RNA em levedura;
6. Os dados obtidos utilizando repórteres de duas luciferases sugerem que eIF5A atua na elongação e terminação da tradução geral de proteínas. Foi demonstrado, através de dados obtidos através de ensaios utilizando repórteres de duas luciferases, que mutantes de eIF5A apresentam defeitos em mecanismos gerais da tradução como PRF, fidelidade de tradução e reconhecimento do códon de parada UGA, que são independentes de sequências contendo poliprolinas.

PERSPECTIVAS

1. Explorar a supressão observada pelo tRNA^{Met} no mutantes *tif51A^{K56A}*;
2. Realizar a clonagem do tRNA^{Thr} para realização do ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura dos mutantes de *TIF51A*;
3. Explorar a possibilidade de eIF5A atuar na via de adição da cauda alanina-treonina pela maquinaria de controle da qualidade ribossomal (*RQC*);
4. Explorar o possível papel de eIF5A na tradução, atuando como um fator de aceleração;
5. Avaliar a participação de eIF5A no término da tradução de genes que possuem UGA como códon de terminação.

REFERÊNCIAS

ADVANI, V. M.; BELEW, A. T.; DINMAN, J. D. Yeast telomere maintenance is globally controlled by programmed ribosomal frameshifting and the nonsense-mediated mRNA decay pathway. **Translation**, v. 1, n. 1, 2013. doi:10.4161/trla.24418.

AGIRREZABALA, X. et al. Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome. **Mol. Cell**, v. 32, p. 190-197, 2008.

AMBERG, D. C.; BURKE, D. J.; STRATHERN, J. N. **Methods in yeast genetics**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.

ANAND, M. et al. Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 9, p. 6985-6991, 2003.

ANGER, A. M. et al. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. **Nature**, v. 497, p. 80-85, 2013.

ASANO, K. et al. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. **Genes Dev.**, v. 14, n. 19, p. 2534-2546, 2000.

AUSUBEL, F. M. (Ed.). **Current protocols in molecular biology**. New York: Wiley, 2005. 5 v.

BAN, N. et al. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 905-920, 2000.

BECKER, T. et al. Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. **Nature**, v. 482, p. 501-506, 2012.

BEN-SHEM, A. et al. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. **Science**, v. 330, n. 6008, p. 1203-1209, 2010.

BEN-SHEM, A. et al. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. **Science**, v. 334, n. 6062, p. 1524-1529, 2011.

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

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2002.

BEVEC, D. et al. Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 23, p. 10829-10833, 1994.

BEVEC, D. et al. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. **Science**, v. 271, p. 1858-1860, 1996.

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

BLAHA, G.; STANLEY, R. E.; STEITZ, T. A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 966-970, 2009.

BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. The yeast gene order browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. **Genome Res.**, v. 15, p. 1456-1461, 2005.

CARAGLIA, M. et al. 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.

CARTER, A. P. et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 340-348, 2000.

CHAVATTE, L. et al. The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome. **EMBO J.**, v. 21, n. 19, p. 5302-5311, 2002.

CHEN, J. et al. Coordinated conformational and compositional dynamics drive ribosome translocation. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 20, p. 718-727, 2013.

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

CHEN, Z. P. et al. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 1996.

CHOI, D. H. et al. The mutation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* SRL4 gene rescues the lethality of rad53 and lcd1 mutations by modulating dNTP levels. **J. Microbiol.**, v. 46, p. 75-80, 2008.

COSTANZO, M. et al. The genetic landscape of a cell. **Science**, v. 327, p. 425-431, 2010.

DELANO, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 14-20, 2002.

DEMESHKINA, N. et al. A new understanding of the decoding principle on the ribosome. **Nature**, v. 484, p. 256-259, 2012.

DEVER, T. E.; GREEN, R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 4, n. 7, p. a013706/1- a013706/16, 2012.

DIAS, C. A. et al. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **Febs J.**, v. 275, n. 8, p. 1874-1888, 2008.

DIAS, C. A. et al. eIF5A interacts functionally with eEF2. **Amino Acids**, v. 42, n. 2/3, p. 697-702, 2012.

DINMAN, J. D. Control of gene expression by translational recoding. **Adv. Protein Chem. Struct. Biol.**, v. 86, p. 129-149, 2012a.

DINMAN, J. D. Mechanisms and implications of programmed translational frameshifting. **Wiley Interdiscip. Rev.: RNA**, v. 3, n. 5, p. 661-673, 2012b.

DINMAN, J. D. et al. Peptidyl-transferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies: development of model systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 13, p. 6606-6611, 1997.

DOCK-BREGEON, A. C. et al. Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. **Mol. Cell**, v. 16, p. 375-386, 2004.

DOERFEL, L. K.; RODNINA, M. V. Elongation factor P: function and effects on bacterial fitness. **Biopolymers**, v. 99, n. 11, p. 837-845, 2013.

DOERFEL, L. K. et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 85-88, 2013.

DUNKLE, J. A. et al. Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. **Science**, v. 332, p. 981-984, 2011.

ERIANI, G. et al. The class II aminoacyl-tRNA synthetases and their active site: evolutionary conservation of an ATP binding site. **J. Mol. Evol.**, v. 40, n. 5, p. 499-508, 1995.

FAN-MINOGUE, H. et al. Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. **Mol. Cell**, v. 30, n. 5, p. 599-609, 2008.

FARABAUGH, P. J. Programmed translational frameshifting. **Annu. Rev. Genet.**, v. 30, p. 507-528, 1996.

FERSHT, A. R.; KAETHNER, M. M. Enzyme hyperspecificity. Rejection of threonine by the valyl-tRNA synthetase by misacylation and hydrolytic editing. **Biochemistry**, v. 15, n. 15, p. 3342-3346, 1976.

FISCHER, N. et al. Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. **Nature**, v. 466, p. 329-333, 2010.

- FORSBURG, S. L. The art and design of genetic screens: yeast. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, p. 659-668, 2001.
- FRANK, J. et al. The process of mRNA-tRNA translocation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 50, p. 19671-19678, 2007.
- FREISTROFFER, D. V. et al. Release factor RF3 in E.coli accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. **EMBO J.**, v. 16, n. 13, p. 4126-4133, 1997.
- FULLER, R. S.; BRAKE, A.; THORNER, J. Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 86, n. 5, p. 1434-1438, 1989.
- GANOZA, M. C.; KIEL, M. C.; AOKI, H. Evolutionary conservation of reactions in translation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 460-485, 2002.
- GAO, N. et al. Mechanism for the disassembly of the posttermination complex inferred from cryo-EM studies. **Mol. Cell**, v. 18, p. 663-674, 2005.
- GARCIA-BARRIO, M. et al. Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2 alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. **EMBO J.**, v. 19, n. 8, p. 1887-1899, 2000.
- GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 913-963, 1999.
- GLICK, B. R.; GANOZA, M. C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 72, n. 11, p. 4257-4260, 1975.
- GLICK, B. R.; CHLADEK, S.; GANOZA, M. C. Peptide bond formation stimulated by protein synthesis factor EF-P depends on the aminoacyl moiety of the acceptor. **Eur. J. Biochem.**, v. 97, n. 1, p. 23-28, 1979.
- GOUGH, J. et al. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **J. Mol. Biol.**, v. 313, n. 4, p. 903-919, 2001.
- GREGIO, A. P. et al. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 380, n. 4, p. 785-790, 2009.
- GRIFFITHS-JONES, S. et al. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. D121-D124, 2005.

- GROMADSKI, K. B.; RODNINA, M. V. Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome. **Mol. Cell**, v. 13, p. 191-200, 2004.
- GROMADSKI, K. B.; DAVITER, T.; RODNINA, M. V. A uniform response to mismatches in codon-anticodon complexes ensures ribosomal fidelity. **Mol. Cell**, v. 21, p. 369-377, 2006.
- GUTHRIE, C.; FINK, G. R. (Ed.). **Guide to yeast genetics and molecular biology**. San Diego: Academic Press., 1991. (Methods in enzymology, v. 194).
- GUTIERREZ, E. et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Mol. Cell**, v. 51, n. 1, p. 35-45, 2013.
- HANAUSKE-ABEL, H. M. et al. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1221, n. 2, p. 115-124, 1994.
- HANAWA-SUETSUGU, K. et al. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 26, p. 9595-9600, 2004.
- HARGER, J. W.; DINMAN, J. D. An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **RNA**, v. 9, n. 8, p. 1019-1024, 2003.
- HENDERSON, B. R.; PERCIPALLE P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. **J. Mol. Biol.**, v. 274, n. 5, p. 693-707, 1997.
- HERSCH, S. J. et al. Divergent protein motifs direct elongation factor P-mediated translational regulation in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. **MBio.**, v. 4, n. 2, 2013. doi:10.1128/mBio.00180-13.
- HINNEBUSCH, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 83, p. 779-812, 2014.
- HIROKAWA, G. et al. The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. **RNA**, v. 11, p. 1317-1328, 2005.
- HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Passive immunization against oral AIDS virus transmission: an approach to prevent mother-to-infant HIV-1 transmission? **J. Med. Primatol.**, v. 30, n. 4, p. 190-196, 2001.
- HUH, W. K. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, p. 686-691, 2003.
- IBBA, M.; SOLL, D. Quality control mechanisms during translation. **Science**, v. 286, p. 1893-1897, 1999.

JACKMAN, J. E.; ALFONZO, J. D. Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. **Wiley Interdiscip. Rev.: RNA**, v. 4, n. 1, p. 35-48, 2013.

JAO, D. L. E.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J. Cell. Biochem.**, v. 97, n. 3, p. 583-598, 2006.

JEPPESEN, M. G. et al. The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 47190-47198, 2003.

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

KIM, K. K. et al. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 18, p. 10419-10424, 1998.

KLIER, H. et al. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **Febs Lett.**, v. 334, n. 3, p. 360-364, 1993.

KOBAYASHI, Y. et al. Identification of a cellular factor that modulates HIV-1 programmed ribosomal frameshifting. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 19776-19784, 2010.

KRUPKIN, M. et al. A vestige of a prebiotic bonding machine is functioning within the contemporary ribosome. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.: Ser. B., Biol. Sci.**, v. 366, p. 2972-2978, 2011.

KURIAN, L. et al. Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. **Nature**, v. 477, p. 490-494, 2011.

LAHAV, R. et al. Role of transcription factor Kar4 in regulating downstream events in the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. **Mol. Cell Biol.**, v. 27, p. 818-829, 2007.

LASSAK, J. et al. Arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation elongation factor P. **Nat. Chem. Biol.**, 2015. doi: 10.1038/nchembio.1751. In press.

LEE, L. A. et al. A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. **Genetics**, v. 158, n. 4, p. 1545-1556, 2001.

LING, J.; REYNOLDS, N.; IBBA, M. Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 63, p. 61-78, 2009.

- LIPOWISKY, G. et al. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. **EMBO J.**, v. 19, n. 16, p. 4362-4371, 2000.
- LIU, H. et al. Incorporation of functional human immunodeficiency virus type 1 integrase into virions independent of the Gag-Pol precursor protein. **J. Virol.**, v. 71, n. 10, p. 7704-7710, 1997.
- LIU, J. et al. Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 6, n. 2, p. 308-321, 2011.
- LOFTFIELD, R. B.; VANDERJAGT, D. The frequency of errors in protein biosynthesis. **Biochem. J.**, v. 128, n. 5, p. 1353-1356, 1972.
- LOMAKIN, I. B.; STEITZ, T. A. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. **Nature**, v. 500, p. 307-311, 2013.
- LOMAKIN, I. B. et al. Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. **Genes Dev.**, v. 17, p. 2786-2797, 2003.
- LYKKE-ANDERSEN, J.; BENNETT, E. J. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. **J. Cell Biol.**, v. 204, p. 467-476, 2014.
- MAGDOLEN, V. et al. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Mol. Gen. Genet.**, v. 244, n. 6, p. 646-652, 1994.
- MELNIKOV, S. et al. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 19, p. 560-567, 2012.
- MITTELSTAET, J.; KONEVEGA, A. L.; RODNINA, M. V. Distortion of tRNA upon near-cognate codon recognition on the ribosome. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 8158-8164, 2011.
- MURGUIA, J. R.; SERRANO, R. New functions of protein kinase Gcn2 in yeast and mammals. **IUBMB Life**, v. 64, n. 12, p. 971-974, 2012.
- NAKAMURA, Y.; ITO, K. tRNA mimicry in translation termination and beyond. **Wiley Interdiscip. Rev.: RNA**, v. 2, n. 5, p. 647-668, 2011.
- NOLLER, H. F. et al. Translocation of tRNA during protein synthesis. **FEBS Lett.**, v. 514, p. 11-16, 2002.
- NUREKI, O. et al. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. **Science**, v. 280, n. 5363, p. 578-582, 1998.
- OGLE, J. M.; RAMAKRISHNAN, V. Structural insights into translational fidelity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 129-177, 2005.

OGLE, J. M. et al. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. **Science**, v. 292, p. 897-902, 2001.

PAPE, T.; WINTERMEYER, W.; RODNINA, M. V. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. **EMBO J.**, v. 17, n. 24, p. 7490-7497, 1998.

PAPE, T.; WINTERMEYER, W.; RODNINA, M. Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. **EMBO J.**, v. 18, n. 13, p. 3800-3807, 1999.

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

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

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, n. 12, p. 475-479, 1993b.

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491-500, 2010.

PEAT, T. S. et al. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1207-1214, 1998.

PEIL, L. et al. Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 110, n. 38, p. 15265-15270, 2013.

PERCUDANI, R.; PAVESI, A.; OTTONELLO, S. Transfer RNA gene redundancy and translational selection in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Mol. Biol.**, v. 268, p. 322-330, 1997.

PERKINS, E. L. et al. Yeast and human genes that affect the *Escherichia coli* SOS response. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 5, p. 2204-2209, 1999.

PESKE, F.; RODNINA, M. V.; WINTERMEYER, W. Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. **Mol. Cell**, v. 18, p. 403-412, 2005.

PESTOVA, T. V.; KOLUPAEVA, V. G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. **Genes Dev.**, v. 16, n. 22, p. 2906-2922, 2002.

PESTOVA, T. V. et al. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 13, p. 7029-7036, 2001.

- PLANT, E. P. et al. Differentiating between near- and non-cognate codons in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 2, n. 6, 2007. doi:10.1371/journal.pone.0000517.
- RABL, J. et al. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. **Science**, v. 331, p. 730-736, 2011.
- RODNINA, M. V.; WINTERMEYER, W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, n. 3, p. 435-443, 2009.
- RODNINA, M. V.; BERINGER, M.; WINTERMEYER, W. How ribosomes make peptide bonds. **Trends Biochem. Sci.**, v. 32, p. 20-26, 2007.
- RODNINA, M. V. et al. Mechanism of tRNA translocation on the ribosome. **Mol. Biol. (Mosk)**, v. 35, n. 4, p. 655-665, 2001.
- RODNINA, M. V. et al. Recognition and selection of tRNA in translation. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 938-942, 2005.
- ROSSI, D. et al. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdiscip. Rev.: RNA**, v. 5, n. 2, p. 209-222, 2014.
- RUHL, M. et al. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 6, p. 1309-1320.
- SAINI, P. et al. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 118-121, 2009.
- SALAS-MARCO, J.; BEDWELL, D. M. Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. **J. Mol. Biol.**, v. 348, n. 4, p. 801-815, 2005.
- SAMANFAR, B. et al. A global investigation of gene deletion strains that affect premature stop codon bypass in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biosyst.**, v. 10, n. 4, p. 916-924, 2014.
- SCHLUENZEN, F. et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. **Cell**, v. 102, p. 615-623, 2000.
- SCHMEING, T. M.; RAMAKRISHNAN, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. **Nature**, v. 461, p. 1234-1242, 2009.

SCHNIER, J. et al. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 11, n. 6, p. 3105-3114, 1991.

SCHUETTE, J. C. et al. GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. **EMBO J.**, v. 28, p. 755-765, 2009.

SENGUPTA, D. J. et al. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 16, p. 8496-8501, 1996.

SHEN, P. S. et al. Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. **Science**, v. 347, p. 75-78, 2015.

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

SHOEMAKER, C. J.; EYLER, D. E.; GREEN, R. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 369-372, 2010.

SIEVERS, A. et al. The ribosome as an entropy trap. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, p. 7897-7901, 2004.

SOHMEN, D. et al. SnapShot: antibiotic inhibition of protein synthesis I. **Cell.**, v. 138, n. 6, 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.08.001.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 731-745, 2009.

SONG, H. et al. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1-mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. **Cell**, v. 100, p. 311-321, 2000.

SPAHN, C. M. et al. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. **Cell**, v. 107, p. 373-386, 2001.

SPAHN, C. M. et al. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. **EMBO J.**, v. 23, p. 1008-1019, 2004.

SPIEGEL, P. C.; ERMOLENKO, D. N.; NOLLER, H. F. Elongation factor G stabilizes the hybrid-state conformation of the 70S ribosome. **RNA**, v. 13, p. 1473-1482, 2007.

THOMPSON, G. M.; CANO, V. S.; VALENTINI, S. R. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. **FEBS Lett.**, v. 555, n. 3, p. 464-468, 2003.

TKACH, J. M. et al. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nat. Cell. Biol.**, v. 14, p. 966-976, 2012.

UDE, S. et al. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 82-85, 2013.

UEMURA, S. et al. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. **Nature**, v. 464, p. 1012-1017, 2010.

UNBEHAUN, A. et al. Position of eukaryotic initiation factor eIF5B on the 80S ribosome mapped by directed hydroxyl radical probing. **EMBO J.**, v. 26, p. 3109-3123, 2007.

VALENTE, L.; KINZY, T. G. Yeast as a sensor of factors affecting the accuracy of protein synthesis. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, n. 10, p. 2115-2130, 2003.

VALLE, M. et al. Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. **EMBO J.**, v. 21, n. 13, p. 3557-3567, 2002.

VALLE, M. et al. Locking and unlocking of ribosomal motions. **Cell**, v. 114, p. 123-134, 2003.

WEST, R. W. Jr. et al. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* YTP1 gene encoding a deduced novel type-III integral membrane protein with domains of sequence similarity to mitochondrial electron-transport enzymes. **Gene**, v. 169, p. 119-124, 1996.

WILSON, J. E. et al. Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. **Cell**, v. 102, p. 511-520, 2000.

WITTMANN, H. G. Architecture of prokaryotic ribosomes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 35-65, 1983.

WOESE, C. R. Translation: in retrospect and prospect. **RNA**, v. 7, n. 8, p. 1055-1067, 2001.

WOOLSTENHULME, C. J. et al. Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 110, n. 10, p. E878-E887, 2013.

YAO, M. et al. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). **J. Biochem.**, v. 133, n. 1, p. 75-81, 2003.

YUSUPOV, M. M. et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. **Science**, v. 292, p. 883-896, 2001.

ZAHER, H. S.; GREEN, R. Quality control by the ribosome following peptide bond formation. **Nature**, v. 457, p. 161-166, 2009.

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

ZANELLI, C. F. et al. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 348, n. 4, p. 135813-135866, 2006.

ZAVIALOV, A. V.; HAURYLIUK, V. V.; EHRENBURG, M. Splitting of the posttermination ribosome into subunits by the concerted action of RRF and EF-G. **Mol. Cell**, v. 18, p. 675-686, 2005.

ZHENG, B. et al. Isolation of yeast mutants defective for localization of vacuolar vital dyes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 20, p. 11721-11726, 1998.

ZHENG, Y. G. et al. Two distinct domains of the beta subunit of *Aquifex aeolicus* leucyl-tRNA synthetase are involved in tRNA binding as revealed by a three-hybrid selection. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 3294-3303, 2004.

ZHOURLAVLEVA, G. et al. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. **Embo J.**, v. 14, n. 16, p. 4065-4072, 1995.

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

