



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Análise da supressão do fenótipo de
sensibilidade à temperatura do mutante
tif51A^{K56A} em *Saccharomyces cerevisiae***

Matheus Nanny Le Sueur Vieira

Araraquara

2013



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Análise da supressão do fenótipo de
sensibilidade à temperatura do mutante
tif51A^{K56A} em *Saccharomyces cerevisiae***

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

Nome: Matheus Nanny Le Sueur Vieira

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientadora: Tatiana Faria Watanabe

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Carlota Cristina Le Sueur Vieira (*in memorium*), que desde pequeno me ensinou os valores de um farmacêutico como profissional e como ser humano e à minha madrinha Maria Emilia Barros Vieira, que se fez mãe quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me guiado nos 5 anos de universidade com saúde e sabedoria para realizar minhas escolhas. Agradeço aos meus verdadeiros amigos, os quais compartilhei momentos inesquecíveis e que foram de grande importância para meu crescimento pessoal.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir sempre em frente, independente das dificuldades que eu encontraria.

Aos meus companheiros de laboratório, que souberam incentivar minha curiosidade pelo aprendizado. Aos meus professores, agradeço pela paciência, e pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço especialmente aos Profs. Cleslei F. Zanelli e Sandro R. Valentini, que me ensinaram o quão importante é o desenvolvimento de um senso crítico para o crescimento profissional.

Agradeço de coração à minha co-orientadora Tatiana F. Watanabe. Aprendi como receber críticas, como ser mais produtivo e principalmente como ser responsável. Aprendi que uma amizade vai além da admiração, inclui respeito e consideração. Aprendi que uma amiga pode ser sua mãe nas horas em que você precisa de uma bronca e pode ser sua irmã quando for à uma festa. Aprendi o verdadeiro significado da palavra “amiga”.

Por fim, agradeço à minha amada companheira, Stephanie Favalli Cardoso, meu maior tesouro que levo da faculdade e que seja para o resto da minha vida.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	4
RESUMO.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Processo de tradução em eucariotos	12
1.2 eIF5A na tradução.....	16
1.3 Alelo <i>tif51A</i> ^{K56A}	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
2.2.1 Clonagem de diferentes genes que codificam diferentes tRNA´s (metionina iniciador e lisina)	24
2.2.2 Realização dos ensaios de supressão em alto número de cópias de fenótipo de sensibilidade à temperatura do mutante estável de <i>TIF51A</i> (<i>tif51A</i> ^{K56A}) com os genes codificadores para os tRNAs de fenilalanina, prolina, leucina, glicina, lisina, metionina e metionina iniciador.	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Subclonagem.....	27

	5
3.1.1 Obtenção dos insertos	27
3.1.2 Ligação.....	27
3.1.3 Transformação de bactéria	27
3.1.4 Diagnóstico de Restrição	28
3.2 Sequenciamento de DNA	28
3.3 Teste de sensibilidade à temperatura	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Clonagem dos genes que codificam para tRNA de lisina e metionina iniciador.	30
4.2 Ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante <i>tif51A^{K56A}</i>	33
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

O fator de início da tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína essencial para a viabilidade celular, altamente conservada em arqueas e eucariotos e apresenta uma modificação pós-traducional única em que um resíduo específico de lisina é modificado para o aminoácido hipusina. O processo de hipusinação é essencial para a função de eIF5A e conseqüentemente para viabilidade celular. eIF5A foi descrita inicialmente como um fator de início da tradução pois estimula a síntese de metionil-puromicina *in vitro*, porém, dados de nosso e de outro laboratório mostraram um papel para eIF5A na etapa de alongação da tradução. eIF5A é um homólogo estrutural do fator de alongação da tradução P (EF-P) de bactérias. EF-P também estimula a síntese de metionil-puromicina, sendo essencial para viabilidade celular em algumas espécies de bactérias. Dados recentes mostram que EF-P, bem como eIF5A participam na etapa de alongação da tradução facilitando a tradução de sequências de parada, “stalling motifs”. Foi isolado, em nosso laboratório, o gene que codifica para o tRNA de alanina como supressor do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A^{K56A}*, sugerindo uma possível correlação funcional entre estes genes. Para compreender o mecanismo de supressão e estudar a relação com outros tRNAs este estudo foi proposto e realizado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de início da tradução.	13
Figura 2. Esquema do mecanismo de alongação e terminação da tradução.	15
Figura 3. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A em <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 4. Comparação entre EF-P e eIF5A de diferentes organismos.	21
Figura 5. Caracterização do mutante <i>tif51A</i> ^{K56A} que produz a proteína estável na temperatura não permissiva.	23
Figura 6. Clonagem dos genes para os tRNAs de metionina iniciador e lisina.	32
Figura 7. Ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante <i>tif51A</i> ^{K56A} frente aos diferentes genes para os tRNAs indicados.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
mM	milimolar
C-terminal	carboxi-terminal
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
kb	quilobase
KCM	solução contendo cloreto de potássio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar

mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
N-terminal	amino-terminal
pb	pares de bases
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)
PCR	reação de polimerase em cadeia
PDB	banco de dados de proteínas
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	tris-acetato EDTA
TE	tris-EDTA

tRNA	RNA transportador
Tris	tris-hidroximetilaminometano
UV	ultravioleta
V	volt
YNB	base nitrogenada para levedura
YPD	meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose
x g	aceleração gravitacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.....	26
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	26
Tabela 3. Condições da reação de PCR para sequenciamento.	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processo de tradução em eucariotos

O processo de tradução é iniciado pela estabilização do mRNA maduro, contendo capacete de 7-metil-guanosina e cauda poli(A), por ligação de um complexo eIF4F (eIF4A, eIF4B e eIF4G) ao capacete e ao longo do mRNA, e com a ligação da proteína PABP (poliA binding protein) na cauda de poli(A). Simultaneamente ocorre a ligação do complexo ternário (eIF2 - Met - tRNA^{Met} - GTP) na subunidade menor do ribossomo (40S) com auxílio de um complexo multi fatorial composto por eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5 formando assim o complexo de pré-iniciação (43S). A ligação do complexo de pré-iniciação ao complexo eIF4F com PABP é dependente de eIF3, formando o complexo de pré-iniciação 48S, capaz de realizar o escaneamento do mRNA até o encontro do primeiro AUG (start códon). Assim que o start códon estiver posicionado no sítio P (peptidil) do 40S, com gasto de energia, desligam-se os fatores de início de tradução e a subunidade ribossomal 60S é recrutada (Figura 1). Neste momento, após o pareamento do Met-tRNA^{Met} no sítio P o ribossomo está pronto para iniciar a elongação da tradução.

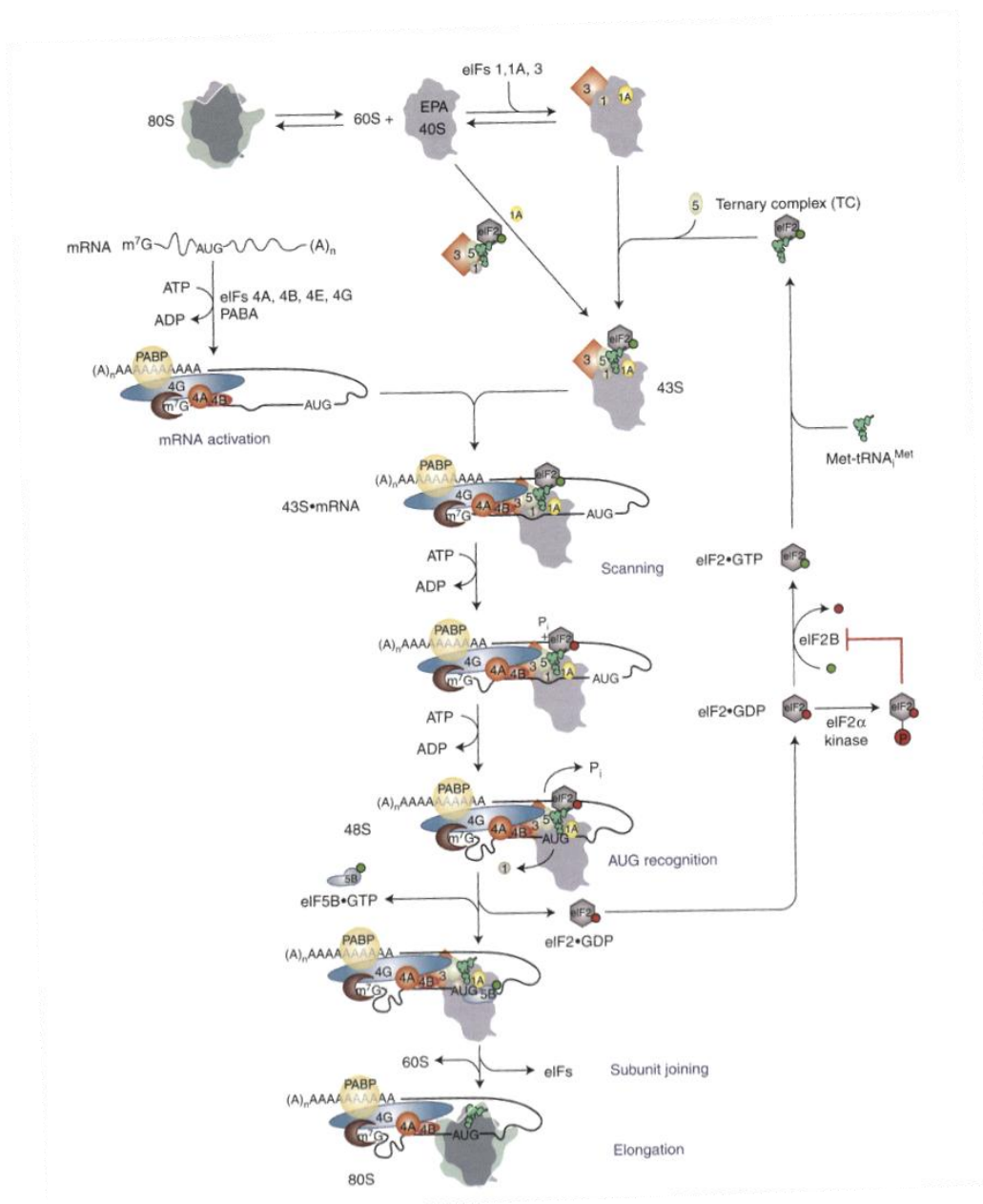


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de início da tradução. Estabilização do mRNA maduro pelo complexo eIF4F. Formação do complexo de pré-iniciação 43S, composto pelo ribossomo 40S, complexo ternário (eIF2-GTP-tRNA^{Met}), eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3. Formação do complexo de pré-iniciação 48S por interações entre eIF4G e eIF3. Recrutamento da subunidade 60S e desligamento dos eIFs. Figura adaptada. (SONENBERG *et al.*, 2007)

A etapa de alongação da tradução é extremamente conservada entre procariotos e eucariotos, e os modelos que se têm hoje foram derivados de estudos realizados principalmente em bactéria (RODNINA e WINTERMEYER, 2009). O fator de alongação em eucarioto 1A (EF-Tu em bactéria) liga-se a um tRNA aminoacilado correspondente ao segundo códon do mRNA e o posiciona no sítio A (aminoacil). Após a acomodação do tRNA, o aminoácido ligado ao tRNA posicionado no sítio A é justaposto à porção peptidil do tRNA do sítio P e a formação da ligação peptídica ocorre no sítio catalítico ribossomal (PTC – peptidyl transferase center) localizado na subunidade 60S. A formação da nova ligação peptídica transfere a cadeia polipeptídica ao tRNA do sítio A desacilando o tRNA do sítio P. A mudança de cargas e conformação dos demais sítios e ação de eEF2 causam a translocação do ribossomo (Figura 2A). Este mecanismo é repetido inúmeras vezes até o encontro de um códon de terminação.

A etapa de término da tradução dá-se pelo posicionamento do códon de terminação (stop códon) no sítio A, em seguida um complexo ternário formado por fatores de terminação da tradução eRF1, eRF3 e GTP se liga ao ribossomo. O reconhecimento do stop códon é feito por eRF1, em seguida eRF3 estimula a liberação do peptídeo por eRF1 de maneira dependente de GTP, (STANSFIELD *et al.*, 1995; ZHOURAVLEVA *et al.*, 1995; ALKALAEVA *et al.*, 2006) e por fim as subunidades ribossomais são recicladas (KAPP e LORSCH, 2004) (Figura 2B).

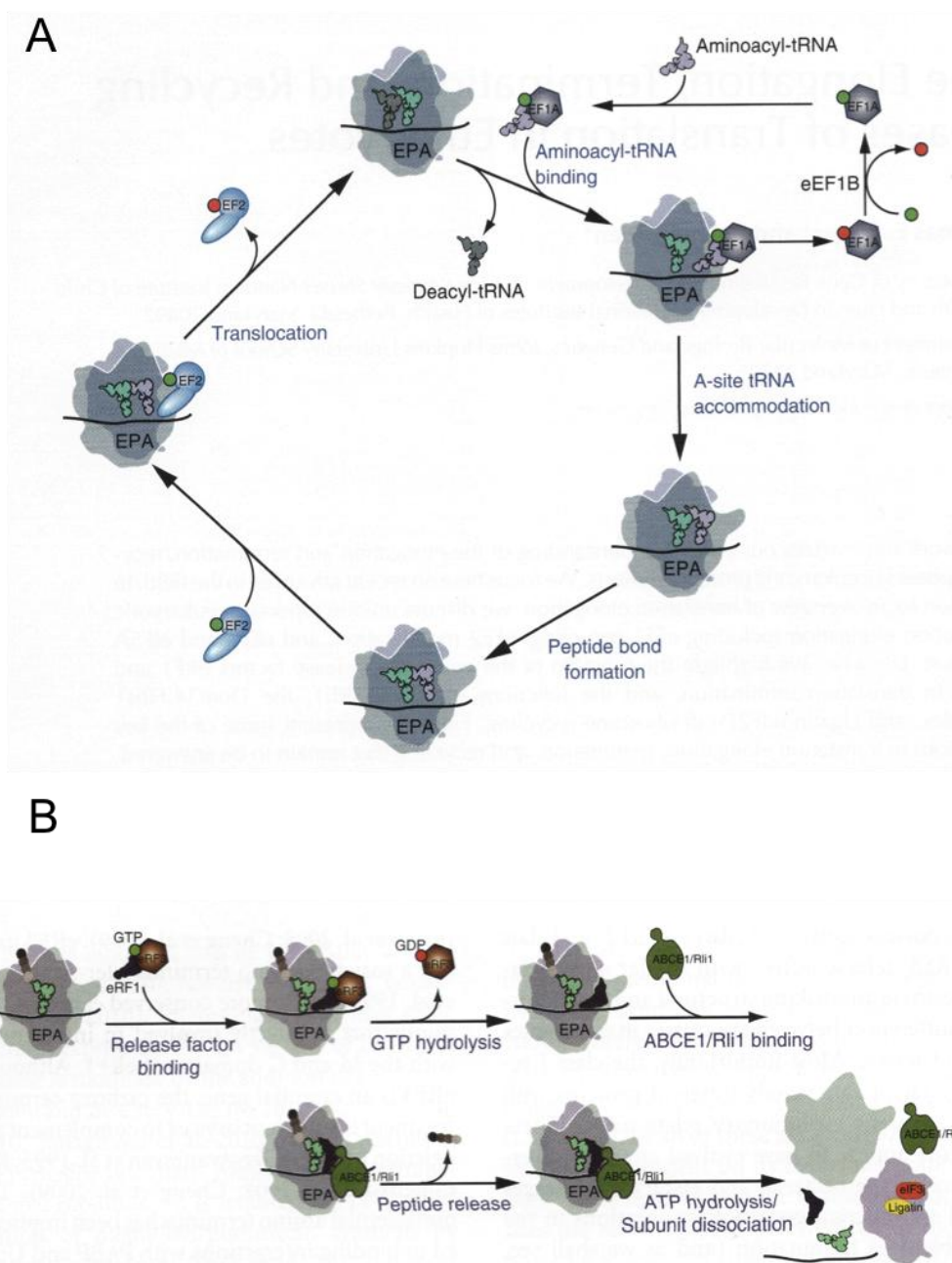


Figura 2. Esquema do mecanismo de alongação e terminação da tradução. (A) A alongação da tradução. **(B)** Término da tradução e liberação das subunidades 40S e 60S. Figura adaptada. (SONENBERG *et al.*, 2007)

1.2 eIF5A na tradução

O fator de início de tradução 5A de eucariotos (eIF5A – eukaryotic translation initiation factor 5A) é uma proteína essencial para a viabilidade celular e altamente conservada, presente em arqueas e eucariotos (BENNE e HERSHEY, 1978; KLIER *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1997) de aproximadamente 17 kDa e é codificado por dois genes homólogos *TIF51A (HYP2)* e *TIF51B (ANB1)*, gerando proteínas com 90% de identidade.

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional específica e exclusiva chamada de hipusinação (CHEN e LIU, 1997; PARK *et al.*, 1997). A formação do aminoácido hipusina ocorre através da transferência de um grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica (K51 em levedura), catalizada pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *Saccharomyces cerevisiae*), logo que a proteína é sintetizada. Em seguida, a hidroxilação deste grupo pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*) termina a maturação de eIF5A (PARK *et al.*, 2010) Figura 3). A substituição do resíduo de lisina específico de eIF5A, em *S. cerevisiae*, por arginina (K51R) leva à produção de eIF5A não hipusinado, o que resulta em inviabilidade celular (SCHNIER *et al.*, 1991). Adicionalmente, o gene codificador da enzima desoxihipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* e também é altamente conservado em arqueas e eucariotos (SCHNIER *et al.*, 1991). De modo interessante, apesar do gene codificador de desoxihipusina hidroxilase ser essencial em eucariotos superiores, este gene não é essencial em *S. cerevisiae*, sugerindo que a hidroxilação do resíduo de hipusina não afeta a função de eIF5A em levedura (PARK *et al.*, 2009).

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 ao dobramento presente em proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples ("Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold"), e desempenham diferentes funções celulares (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>) (GOUGH *et al.*, 2001) (Figura 4). eIF5A foi inicialmente descoberta e caracterizada como fator de início de tradução baseado na sua capacidade de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (BENNE e HERSHEY, 1978).

Estudos posteriores mostraram a associação de eIF5A com ribossomos ativamente engajados na tradução, o que fortalece o envolvimento desta proteína na síntese protéica (JAO e CHEN, 2006; ZANELLI *et al.*, 2006). Defeitos observados em mutantes sensíveis a temperatura sugerem um papel para eIF5A na elongação da tradução por apresentarem defeitos claros na síntese de proteínas (DIAS *et al.*, 2008) e um aumento nas frações polissomais em relação às frações de 80S (GREGIO *et al.*, 2009; SAINI *et al.*, 2009), semelhante ao que ocorre para um mutante dominante negativo de eEF2. Adicionalmente, mutantes de eIF5A não apresentaram formação de P-bodies (agregados de mRNA e proteínas, onde também ocorre a degradação do mRNA) na temperatura não permissiva, característica semelhante à observada para células tratadas com ciclo-heximida, um inibidor da elongação da tradução (GREGIO *et al.*, 2009). Estes dados sugerem um papel para eIF5A na etapa de elongação da tradução.

Apesar de não estar presente em bactérias, eIF5A possui um homólogo estrutural nestes organismos, o fator de alongação da tradução P (EF-P) sendo que a estrutura de eIF5A de arqueas é superponível aos dois primeiros domínios de EF-P (HANAWA-SUETSUGU *et al.*, 2004) como demonstrado na Figura 5. EF-P possui uma estrutura semelhante à estrutura global de um RNA transportador e produz um efeito estimulatório na formação de ligações peptídicas sendo considerado, portanto, um fator de alongação da tradução (GLICK e GANOZA, 1975). Estudos mostram que EF-P está relacionado com crescimento celular, virulência, motilidade e na sensibilidade celular frente à baixa osmolaridade, detergentes e antibióticos (ZOU *et al.*). Em *Escherichia coli*, EF-P sofre uma modificação pós-traducional por ação de três enzimas, Yjek, YjeA e YcfM, resultando na lisinação (transferência de um radical R-β-Lys para o grupamento amino) e hidroxilação em um resíduo específico de lisina na posição 34 (BAILLY e DE CRECY-LAGARD, ; NAVARRE *et al.*, ; YANAGISAWA *et al.*).

Assim, como eIF5A, EF-P é capaz de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* (GANOZA *et al.*, 2002). Dados recentes sugerem que EF-P esteja envolvido no correto posicionamento do tRNA^{Met} iniciador, atuando na formação da primeira ligação peptídica (BLAHA *et al.*, 2009). Além disso, foi mostrado que EF-P não só afeta a formação da primeira ligação peptídica, como também da ligação de outros tRNAs, como tRNA^{Pro} e tRNA^{Gly} e, conseqüentemente, garante a correta geração de seqüências peptídicas ricas em prolina e prolina-glicina, as quais formam seqüências de parada da tradução, “stalling motifs”, durante a alongação (DOERFEL *et al.*, 2013; UDE *et al.*, 2013).

No intuito de estudar a participação de eIF5A na etapa de alongação da tradução, estudos recentes demonstraram que eIF5A também promove a tradução

de sequências de prolina consecutivas (GUTIERREZ *et al.*, 2013) , como observado inicialmente para seu homólogo estrutural e funcional EF-P (DOERFEL *et al.*, 2013; UDE *et al.*, 2013). Experimentos *in vitro* mostraram que na ausência de eIF5A ocorre uma parada na tradução de sequências de prolina consecutivas quando o segundo ou terceiro códon de prolina está no sítio P. Acredita-se ainda que eIF5A posiciona-se no sítio E fazendo com que a alça de hipusinação fique adjacente ao peptidil-tRNA, no PCT do ribossomo, ajudando na formação da ligação peptídica da cadeia polipeptídica com o aminoácido ligado ao tRNA do sítio A (GUTIERREZ *et al.*, 2013). Contudo, ainda são necessários novos estudos deste fator para definição do mecanismo de ação e confirmação do local exato de interação com o ribossomo. Por fim, as evidências do envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular, via secretória e formação da ligação peptídica de sequências específicas reforçam um possível papel de eIF5A na tradução especializada de subgrupos de mRNAs, que deve ser melhor investigado.

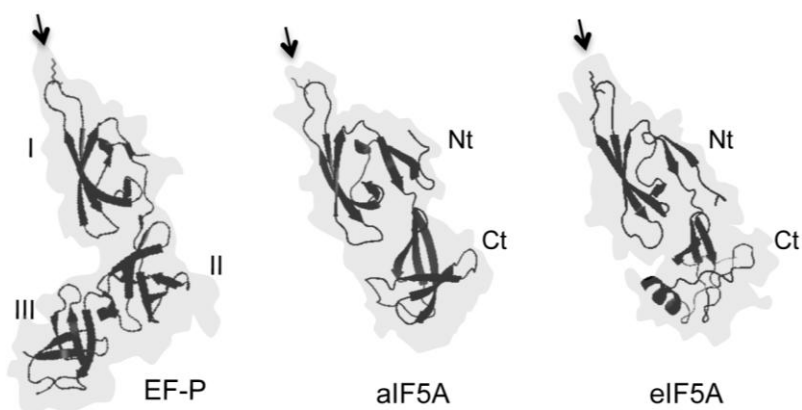


Figura 4. Comparação entre EF-P e eIF5A de diferentes organismos. Estruturas de EF-P (PDB 3A5Z), aIF5A (PDB 2EIF) e eIF5A (PDB 3ER0). As setas indicam o resíduo de lisina sujeito à modificação pós-traducional. Domínios I, II e III de EF-P e porção N-terminal e C-terminal de aIF5A e eIF5A também estão indicados. Figura adaptada de Rossi *et al.*, 2013.

1.3 Alelo *tif51A*^{K56A}

Estudos funcionais e estruturais de eIF5A, realizados em nosso laboratório, levaram à obtenção de 40 mutantes dessa proteína. Embora a maioria dos mutantes de eIF5A apresentem fenótipo de sensibilidade a temperatura devido a degradação da proteína eIF5A modificada na temperatura não permissiva, o alelo mutante *tif51A*^{K56A}, apresentou fenótipo de sensibilidade a temperatura mesmo na presença da proteína eIF5A, que aparece estável na temperatura não permissiva (DIAS *et al.*, 2008) (Figura 5). Uma provável razão para o fenótipo condicional de sensibilidade a temperatura desse mutante é a perda de interações físicas na temperatura restritiva. Dessa forma, o aumento da expressão dos possíveis parceiros físicos de eIF5A nesses mutantes poderia restabelecer as interações físicas perdidas entre fatores celulares e permitir a melhora do crescimento na temperatura restritiva. Assim, a procura de supressores, em alto número de cópias, do fenótipo de sensibilidade a temperatura desses mutantes poderia revelar fatores celulares que interagem fisicamente com eIF5A, o que auxiliaria no estudo de sua função e de seu mecanismo de ação na célula.

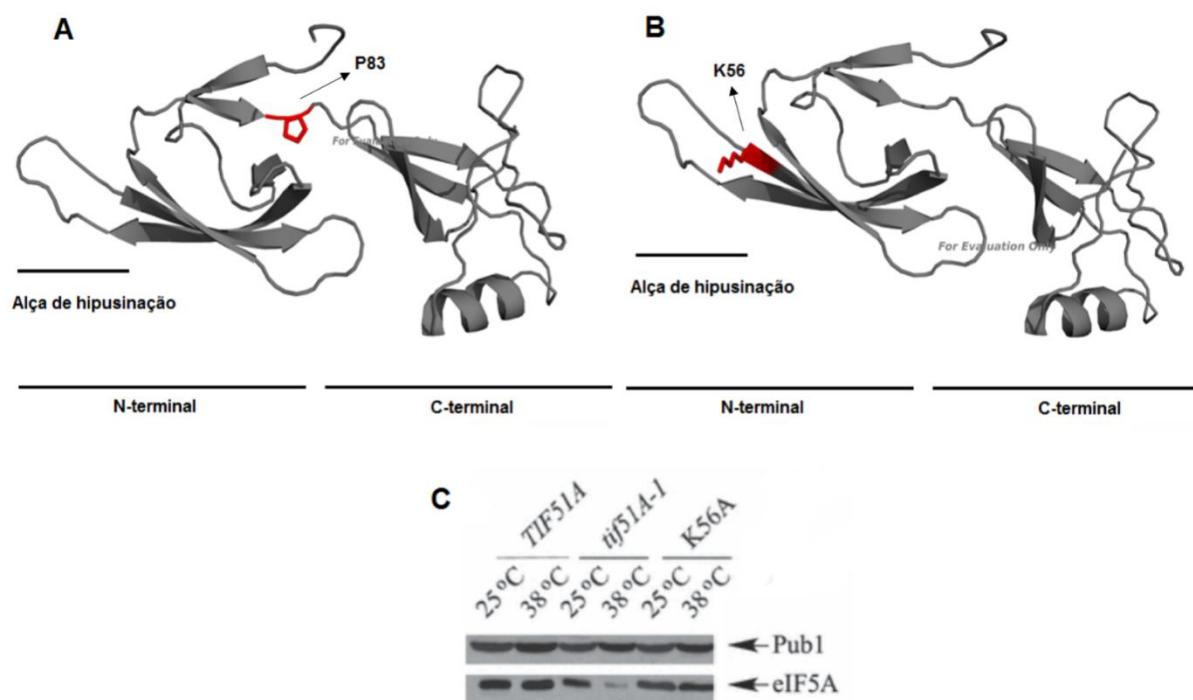


Figura 5. Caracterização do mutante *tif51A*^{K56A} que produz a proteína estável na temperatura não permissiva. (A) Localização do resíduo substituído de eIF5A do mutante *tif51A-1* (P83S). Mutante de eIF5A que apresenta fenótipo de sensibilidade a temperatura devido a degradação da proteína eIF5A modificada na temperatura não permissiva. **(B)** Localização do resíduo substituído de eIF5A do mutante *tif51A*^{K56A}. Os domínios N-terminal e C-terminal, bem como a alça de hipusinação, estão indicados por barras horizontais no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB 3ER0). **(C)** Análise dos níveis das proteínas eIF5A selvagem e mutadas por western blot, nas temperaturas permissiva e não permissiva. (Figura adaptada de (DIAS *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Análise da supressão do fenótipo de sensibilidade à temperatura do mutante *tif51A*^{K56A} em *Saccharomyces cerevisiae*.

Um gene para o tRNA de alanina (tRNA^{Ala}) foi isolado em nosso laboratório como supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura de um mutante de eIF5A em *Saccharomyces cerevisiae* (Cleslei F. Zanelli e Tatiana F. Watanabe, dados não publicados). Tendo em vista a interação genética encontrada para eIF5A e o tRNA^{Ala} e o envolvimento direto de eIF5A com o processo de tradução, mais especificamente na etapa de (GREGIO *et al.*, 2009; SAINI *et al.*, 2009), acredita-se que o estudo do mecanismo pelo qual ocorre a supressão promovida pelo tRNA^{Ala} contribuirá para o entendimento do papel desta proteína durante a síntese proteica.

Para tanto, o principal objetivo deste trabalho foi testar se o fenótipo de supressão do mutante *tif51A*^{K56A} ocorre de maneira específica pelo gene que codifica para o tRNA^{Ala}, ou se a supressão é vista sempre que qualquer um dos tRNAs são superexpressos nesta linhagem, provando um papel geral de eIF5A na tradução.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Clonagem de diferentes genes que codificam diferentes tRNA's (metionina iniciador e lisina)

2.2.2 Realização dos ensaios de supressão em alto número de cópias de fenótipo de sensibilidade à temperatura do mutante estável de *TIF51A* (*tif51A*^{K56A})

com os genes codificadores para os tRNAs de fenilalanina, prolina, leucina, glicina, lisina, metionina e metionina iniciador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

Linhagem	Genótipo	Origem
VZL82	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 ade2</i>	Coleção do Laboratório
VZL987	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [pSV1040]</i>	Coleção do Laboratório

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Origem
pSV65	pRS426 (<i>URA3</i> , 2 μ)	Coleção do Laboratório
pSV107	<i>TIF51A</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ 1171	<i>tM(CAU)E</i> , clonado em pUC 19	Coleção do Laboratório
pVZ1231	<i>tA(AGC)P</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ1232	<i>tG(GCC)B</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ1233	<i>tL(CAA)N</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ1272	<i>tM(CAU)M</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ1273	<i>tP(AGC)D</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ1274	<i>tF(GAA)F</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Coleção do Laboratório
pVZ 1342	<i>tM(CAU)E</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo
pVZ 1352	<i>tK(CUU)D1</i> , clonado em pBSK	Epoch Life Science
pVZ 1353	<i>tK(CUU)D1</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo

A manutenção, o cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e de *E. coli*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e os protocolos das técnicas utilizados neste período do trabalho seguiram procedimentos padrão descritos anteriormente (Guthrie and Fink, 1991; Amberg *et al.*, 2005).

3.1 Subclonagem

3.1.1 Obtenção dos insertos

Foram submetidos os vetores pVZ 1171 e pVZ 1352 à digestão com enzimas de restrição adequadas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs) e em seguida foram analisados os produtos da digestão por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados os fragmentos correspondentes aos genes codificadores do tRNA_{Lys} (190 bp) e do tRNA^{Met} (500 bp) utilizando o Kit “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN).

3.1.2 Ligação

O vetor de interesse (pSV 65) foi digerido com as enzimas compatíveis e foi purificado o produto da digestão após eletroforese em gel de agarose 0,8 %, utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN). Por fim, foi preparada a reação de ligação utilizando 20 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs), seguindo recomendação do fabricante e incubada a reação de ligação a 16°C por 12 a 16 horas.

3.1.3 Transformação de bactéria

Misturou-se 20 µL de reação de ligação em um microtubo de 1,5 mL contendo 80 µL de tampão de transformação (8 µL de KCM, 12 µL de PEG 10 % e 60 µL de água). Adicionou-se a mistura em um novo microtubo de 1,5 mL contendo 100 µL

de células de *E. coli* ultracompetentes recém descongeladas. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e, então, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido à reação e esta foi incubada por 50 minutos a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em 200 µL de meio LB líquido e plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico requerido para seleção dos transformantes. Incubaram-se as placas a 37°C por 12 a 16 horas.

3.1.4 Diagnóstico de Restrição

Foram selecionadas algumas colônias, inoculadas em meio LB líquido contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37°C por 12 a 16 horas, sob agitação. Em seguida foi realizada a preparação plasmidial das culturas utilizando o kit “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN) e os plasmídeos foram digeridos utilizando as mesmas enzimas de restrição e condições da etapa de clonagem. Verificaram-se os fragmentos liberados após a digestão em gel de agarose 0,8% e foram comparados com o padrão de peso molecular. Por fim, todos os genes clonados foram sequenciados.

3.2 Sequenciamento de DNA

Após preparação e quantificação do DNA plasmidial por kit, foi preparada a reação de PCR para sequenciamento das bases nitrogenadas, utilizando equipamentos e 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 Big Dye 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:

Tabela 3. Condições da reação de PCR para sequenciamento.

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

* 5°C abaixo do TM do primer

Purificou-se o produto da PCR utilizando o kit Big Dye X-Terminator[®] (Applied Biosystems). Pipetou-se 45 µL do tampão SAM[®] e 10 µL da resina de precipitação de DNA sobre 10 µL da reação de PCR. Vortexou-se por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se por 2 minutos a 1000 x g. Durante todo o procedimento, protegeram-se as amostras da luz. Aplicaram-se as amostras purificadas no aparelho 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.3 Teste de sensibilidade à temperatura

Inocularam-se as linhagens de interesse em 5,0 mL de meio apropriado (SC) até atingir concentração celular correspondente a $DO_{600} = 0,6$ a $0,8$. Centrifugou-se um volume adequado de cultura a 600 x g por 7 minutos e ressuspendeu-se em meio de cultura apropriado para concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Foram aplicados 200 µL de cada amostra no primeiro poço da microplaca e preenchidos os outros poços da mesma linha com 180 µL de meio de cultura apropriado. Em seguida,

prepararam-se cinco diluições seriadas (1:10) homogeneizando-se em cada etapa. Com ajuda de um micropipetador multicanal, foram aplicados 4,0 μ L das amostras e suas respectivas diluições nos meios de cultura apropriados e incubadas as placas à 38°C e 25°C por 3 dias. Em seguida, as placas que estavam inoculadas à 38°C foram transferidas para estufa a 25°C por 1-2 dias, a fim de melhorar a visualização da supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem dos genes que codificam para tRNA de lisina e metionina iniciador.

Após diversas tentativas de clonagem do gene *tK(CUU)D1* (tRNA^{Lys}) por PCR, entretanto sem sucesso, foi decidido comprar o gene sintético idêntico ao gene codificador para este tRNA. A análise de supressão por tRNA^{iMet} foi incluída neste projeto, devido ao fato de eIF5A ter sido inicialmente identificado como fator de início de tradução, importante para a formação da primeira ligação peptídica. O ensaio genético com o gene que codifica este tRNA, em comparação com os outros tRNAs, poderia revelar alguma relação mais direta e específica entre eIF5A e o início da tradução. Além disso, recentemente foi mostrada a estrutura de EF-P, o homólogo estrutural e funcional de eIF5A, no complexo ribossomal 70S apontando para uma interação física direta com o tRNA^{iMet} em uma região conservada entre os demais tRNAs (BLAHA *et al.*, 2009).

Os genes codificadores para tRNA de lisina e metionina iniciador foram subclonados a partir dos plasmídeos pVZ1352 (pBSK contendo *tK(CUU)D1* - tRNA^{Lys}) e pVZ1171 (pUC19 contendo *tM(CAU)E* - tRNA^{iMet}), respectivamente, para o vetor de expressão em alto número de cópias em levedura (pSV65). O mapa do

vetor pSV65 está demonstrado na Figura 6A e, em destaque, as endonucleases específicas utilizadas nas subclonagens (*SacII* e *HindIII*). Por fim, as subclonagens foram confirmadas por diagnóstico de restrição, como mostra a Figura 6B, seguida de sequenciamento. A eletroforese das digestões em gel de agarose apresenta, na região superior do gel o vetor digerido, e na região inferior do gel as bandas de tamanhos esperados para cada um dos genes, tRNA^{Met} na canaleta 1 e tRNA^{Lys} na canaleta 2. O padrão de peso molecular de 1 kb (canaleta 3) confirma os tamanhos esperados para cada tRNA, como mostra a Figura 6C.

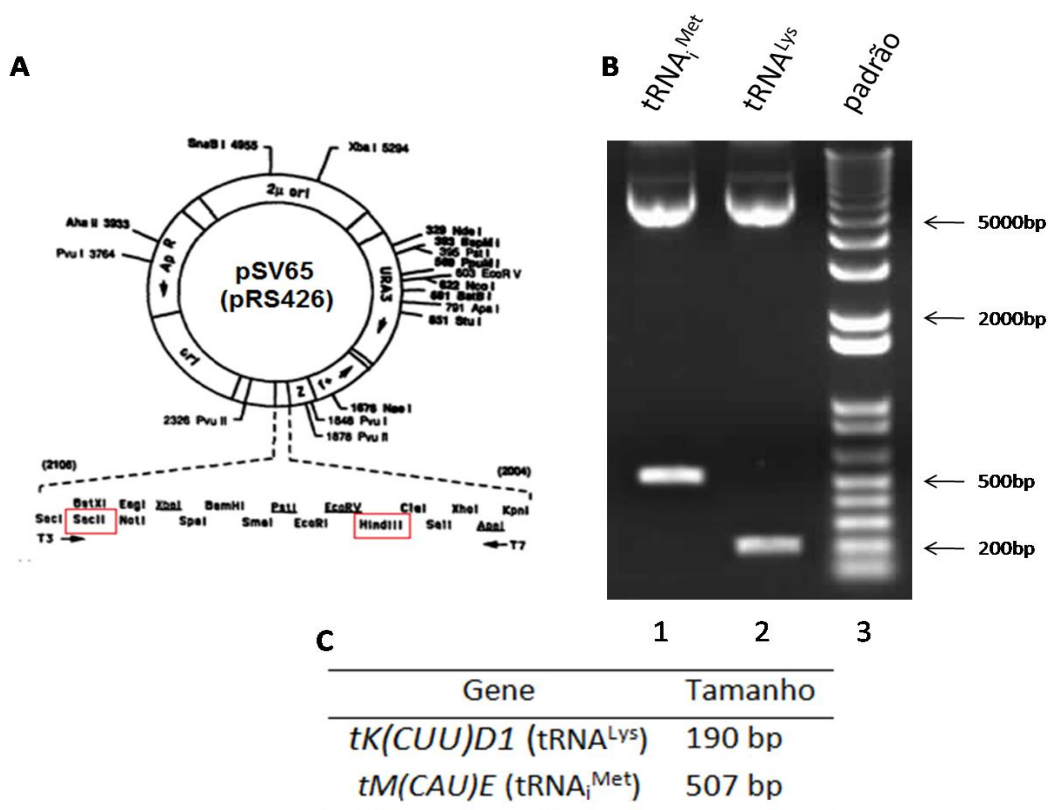


Figura 6. Clonagem dos genes para os tRNAs de metionina iniciador e lisina. (A) Mapa do vetor pSV65 e, em destaque, as enzimas de restrição utilizadas na estratégia de subclonagem. **(B)** Diagnóstico de restrição da clonagem dos genes *tM(CAU)E* - tRNA^{Met} (canaleta 1) e *tK(CUU)D* - tRNA^{Lys} (canaleta 2). O padrão de peso molecular (canaleta 3) confirma os tamanhos esperados para cada gene clonado. **(C)** Tabela com os tamanhos exatos dos fragmentos subclonados.

4.2 Ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{K56A}.

No intuito de encontrar supressores do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{K56A}, nosso laboratório realizou um rastreamento de supressores em alto número de cópias e, dentre dezenas de candidatos supressores, um gene codificador para o tRNA^{Ala} foi encontrado. Com o objetivo de encontrar a melhor condição de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do alelo *tif51A*^{K56A} frente a superexpressão do gene para o tRNA^{Ala}, o teste de supressão do fenótipo foi realizado em diferentes temperaturas e dias de incubação. Por fim, a condição ideal encontrada para evidenciar a supressão do fenótipo termo sensível do mutante *tif51A*^{K56A} foi de 38°C por 3 dias de crescimento seguido de 2 dias de crescimento a 25°C.

A partir da padronização das condições para o ensaio de supressão, foi realizado o teste de supressão em alto número de cópias de todos os tRNAs obtidos em nosso laboratório e neste trabalho (glicina, leucina, metionina iniciador e elongador, fenilalanina, lisina e prolina), com objetivo de verificar se o efeito de supressão é um efeito geral ou específico de algum(s) tRNA(s).

A Figura 7 mostra na coluna da temperatura de 25°C que todas as transformações apresentaram viabilidade celular para o experimento. Na coluna da temperatura de 38°C o gene que codifica o tRNA_i^{Met} apresentou resultado muito semelhantes ao tRNA^{Ala}, revelando forte supressão para o alelo *tif51A*^{K56A}. Quando comparado com o vetor vazio os genes dos demais tRNAs apresentaram supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura mutante *tif51A*^{K56A} só que em menores níveis do que os genes que codificam o tRNA_i^{Met} e tRNA^{Ala}.

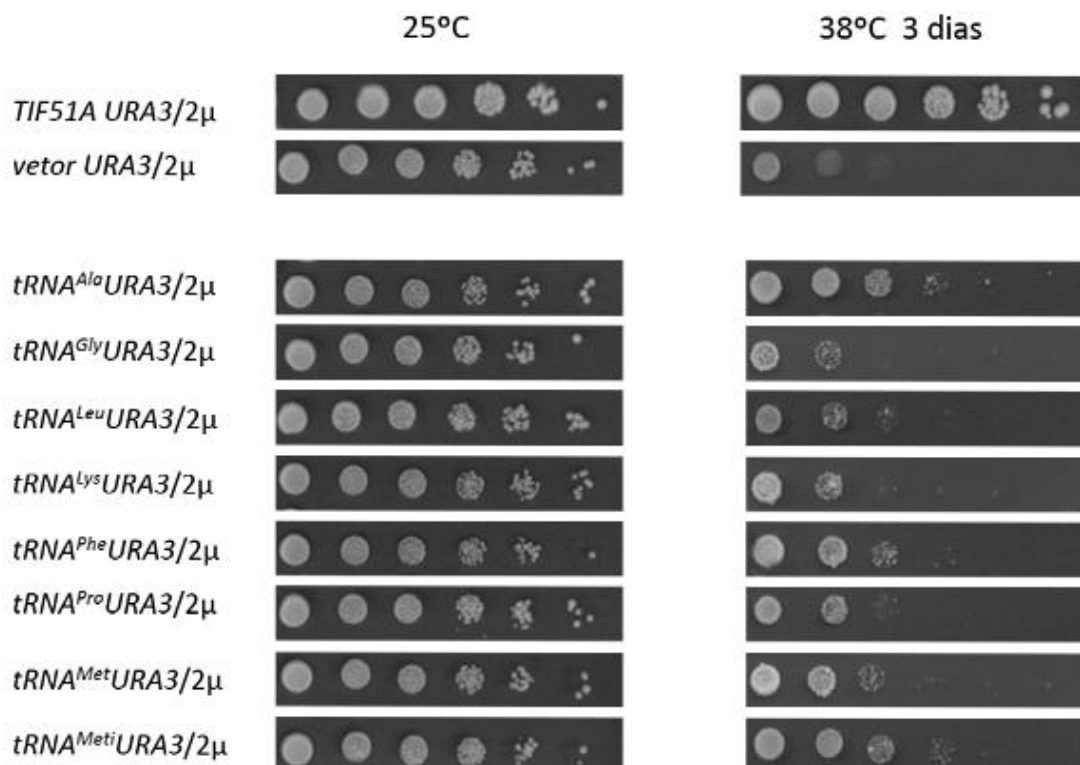


Figura 7. Ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{K56A} frente aos diferentes genes para os tRNAs indicados. Diluições seriadas do mutante *tif51A*^{K56A} (VLZ 978) transformado com os plasmídeos contendo os genes para os tRNAs indicados na figura, foram inoculadas em meio SC-ura, incubadas à 25°C e 38°C. Os controles positivo, pSV107 (*TIF51A*), e negativo, pSV65 (vetor vazio), de crescimento também foram incubados nas mesmas condições.

5. CONCLUSÃO

Durante o período de realização deste estudo dados da literatura mostraram que o fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) possui um importante papel na elongação da tradução, participando da liberação do ribossomo quando este encontra-se parado na elongação, devido ao encontro de sequências que causam essa parada, chamadas de "stalling motifs. Muitos estudos ainda precisam ser feitos tanto para compreender esse mecanismo de liberação do ribossomo quanto para descrever as sequências que necessitam da presença de eIF5A para que a tradução ocorra adequadamente.

Os dados apresentados neste trabalho de conclusão de curso, concluem que a presença de uma maior quantidade de um determinado tRNA na linhagem *tif51A-K56A*, que possuem defeito na função de eIF5A, pode suprimir parcialmente o defeito observado no seu crescimento. Apesar de ter sido observado uma supressão mais intensa frente aos tRNAs de alanina e metionina iniciador, todos os outros tRNAs também apresentaram semelhante supressão, sugerindo que os tRNAs superexpressos são capazes de recuperar parcialmente um defeito geral da tradução previamente descrito para este mutante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKALAEVA, E. Z.;PISAREV, A. V.;FROLOVA, L. Y., *et al.* In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. Cell, v.125, n.6, Jun 16, p.1125-36. 2006.

BAILLY, M.;DE CRECY-LAGARD, V. Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. Biol Direct, v.5, p.3.

BENNE, R.;HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. J Biol Chem, v.253, n.9, May 10, p.3078-87. 1978.

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, Aug 21, p.966-70. 2009.

CHEN, K. Y.;LIU, A. Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. Biol Signals, v.6, n.3, May-Jun, p.105-9. 1997.

DIAS, C. A.;CANO, V. S.;RANGEL, S. M., *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, Apr, p.1874-88. 2008.

DOERFEL, L. K.;WOHLGEMUTH, I.;KOTHE, C., *et al.* EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. Science, v.339, n.6115, Jan, p.85-8. 2013.

GANOZA, M. C.;KIEL, M. C.;AOKI, H. Evolutionary conservation of reactions in translation. Microbiol Mol Biol Rev, v.66, n.3, Sep, p.460-85, table of contents. 2002.

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, Nov, p.4257-60. 1975.

GOUGH, J.;KARPLUS, K.;HUGHEY, R., *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, Nov 2, p.903-19. 2001.

GREGIO, A. P.;CANO, V. P.;AVACA, J. S., *et al.* eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. Biochem Biophys Res Commun, v.380, n.4, Mar 20, p.785-90. 2009.

GUTIERREZ, E.;SHIN, B. S.;WOOLSTENHULME, C. J., *et al.* eIF5A promotes translation of polyproline motifs. Mol Cell, v.51, n.1, Jul 11, p.35-45. 2013.

HANAWA-SUETSUGU, K.;SEKINE, S.;SAKAI, H., *et al.* Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.26, Jun 29, p.9595-600. 2004.

JAO, D. L.;CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. J Cell Biochem, v.97, n.3, Feb 15, p.583-98. 2006.

KAPP, L. D.;LORSCH, J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. Annu Rev Biochem, v.73, p.657-704. 2004.

KLIER, H.;WOHL, T.;ECKERSKORN, C., *et al.* Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. FEBS Lett, v.334, n.3, Nov 22, p.360-4. 1993.

NAVARRE, W. W.;ZOU, S. B.;ROY, H., *et al.* PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. Mol Cell, v.39, n.2, Jul 30, p.209-21.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). J Biochem, v.139, n.2, Feb, p.161-9. 2006.

PARK, M. H.;LEE, Y. B.;JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. Biol Signals, v.6, n.3, May-Jun, p.115-23. 1997.

PARK, M. H.;NISHIMURA, K.;ZANELLI, C. F., *et al.* Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. Amino Acids, v.38, n.2, Feb, p.491-500. 2009.

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, May, p.95-104. 1993.

RODNINA, M. V.;WINTERMEYER, W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. Curr Opin Cell Biol, v.21, n.3, Jun, p.435-43. 2009.

SAINI, P.;EYLER, D. E.;GREEN, R., *et al.* Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. Nature, v.459, n.7243, May 7, p.118-21. 2009.

SCHNIER, J.;SCHWELBERGER, H. G.;SMIT-MCBRIDE, Z., *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, Jun, p.3105-14. 1991.

SONENBERG, N.;HERSHEY, J. W. B.;MATHEWS, M. B. Translational control in biology and medicine: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2007

STANSFIELD, I.;JONES, K. M.;TUIITE, M. F. The end in sight: terminating translation in eukaryotes. Trends Biochem Sci, v.20, n.12, Dec, p.489-91. 1995.

UDE, S.;LASSAK, J.;STAROSTA, A. L., *et al.* Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. Science, v.339, n.6115, Jan, p.82-5. 2013.

YANAGISAWA, T.;SUMIDA, T.;ISHII, R., *et al.* A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. Nat Struct Mol Biol, v.17, n.9, Sep, p.1136-43.

ZANELLI, C. F.;MARAGNO, A. L.;GREGIO, A. P., *et al.* eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. Biochem Biophys Res Commun, v.348, n.4, Oct 6, p.1358-66. 2006.

ZHOURAVLEVA, G.;FROLOVA, L.;LE GOFF, X., *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, Aug 15, p.4065-72. 1995.

ZOU, S. B.;ROY, H.;IBBA, M., *et al.* Elongation factor P mediates a novel post-transcriptional regulatory pathway critical for bacterial virulence. Virulence, v.2, n.2, Mar-Apr, p.147-51.

De acordo

Araraquara, ____ de Dezembro de 2013

Matheus Nanny Le Sueur Vieira

Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli