



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Análise da supressão do fenótipo de
sensibilidade a temperatura do mutante
tif51A^{Q22H/L93F} em *Saccharomyces cerevisiae***

Eliane Tucamoto

Araraquara

2012



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Análise da supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} 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: Eliane Tucamoto

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientadora: Tatiana Faria Watanabe

Araraquara

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho à minha mãe, Alice, que sempre me deu suporte em qualquer passo que dei na vida.

AGRADECIMENTOS

À pessoa mais importante da minha vida pelo apoio, carinho e amor incondicionais e maternais em todos os momentos destes cinco anos de estudo,

À minha avó Kimiyo, por sempre me encorajar a obter conhecimento,

À meus tios Manoel e Luís, por acreditar no meu potencial e por despertar o meu interesse pelo novo,

À meu namorado e grande amigo Gabriel, por ter aceitado e compreendido a viver cinco anos a 270 km de distância de mim e por sempre realizar críticas construtivas que me faz uma pessoa cada vez melhor,

Às minhas amigas, Ana Carla Jordão, Bruna Poli Fattori, Camila M. Inohue, Camila L. Esteves, Diana P. Raymundo e Karina R. Lopes, por terem participado de um dos momentos mais marcantes da minha vida,

Aos membros da “família Biomol” por ter despertado o meu interesse pela pesquisa e por ter compartilhado vasto conhecimento durante toda a minha Iniciação Científica e

À todos os mestres da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela dedicação ao ensino de excelência que obtive.

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

1. Introdução	12
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
2.2.1 Clonagem de diferentes genes que codificam diferentes tRNA's (glicina, leucina, prolina, metionina e fenilalanina)	18
2.2.2 Testes de supressão em alto número de cópias de fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante estável de <i>TIF51A</i> (<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F})	18
3. Materiais.....	19
4. Métodos.....	20
4.1 Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR)	20
4.1.1 Obtenção de DNA molde: preparo de DNA genômico de levedura.....	20
4.1.2 Reação de PCR	21
4.1.3 Clonagem do produto de PCR	22
4.2 Subclonagem de DNA.....	22
4.2.1 Digestão de plasmídeos.....	22
4.2.2 Desfosforilação do vetor (quando necessário)	22

4.2.3 Purificação de inserto e vetor	23
4.2.4 Reação de ligação.....	23
4.3 Transformação bacteriana.....	23
4.3.1 Preparo de E. coli competente:	23
4.3.2 Transformação	24
4.4 Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria em pequena escala (Miniprep)	24
4.5 Transformação de leveduras	25
4.6 Sequenciamento de DNA	26
4.7 Teste de sensibilidade a temperatura	26
5. Resultados e Discussão	26
6. Conclusões.....	37
7. Referências Bibliográficas	38

RESUMO

O fator de início da tradução de eucariotos eIF5A é uma proteína essencial para a viabilidade celular, altamente conservada em arqueas e em 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 consequentemente para a viabilidade celular. eIF5A foi descrita inicialmente como um fator de início da tradução, pois estimula a síntese de metionil-puromicina *in vitro*, porém, dados recentes de nosso e de outros grupos mostraram um papel para eIF5A na etapa de elongação da tradução. eIF5A é um homólogo estrutural do fator de elongação da tradução P (EF-P) de bactérias. EF-P também estimula a síntese de metionil-puromicina, sendo essencial para viabilidade celular em bactérias, além disso EF-P também apresenta uma modificação pós-traducional semelhante à hipusinação. Recentemente, em nosso laboratório, foi isolado o RNA transportador de alanina (tRNA^{Ala}) como supressor do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} de eIF5A, sugerindo uma possível correlação funcional entre estes fatores. Tendo em vista a homologia estrutural entre eIF5A e EF-P e a possível homologia funcional entre estes fatores, pretende-se entender a relação de eIF5A com o tRNA de alanina e com isso contribuir para a caracterização do papel específico desta proteína na elongação da tradução. Portanto, foram clonados diferentes genes que codificam para diversos tRNA's (glicina, leucina, prolina, metionina e fenilalanina) para averiguar se a supressão observada para o tRNA de alanina também pode ser vista com estes outros tRNA's ou se é específica. Considerando-se que eIF5A foi descrita a mais de trinta anos sem que sua função específica fosse caracterizada, este estudo pode contribuir para elucidar seu papel durante a síntese de proteína, especificamente na etapa de elongação da tradução.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A	16
Figura 2. Comparação das estruturas tridimensionais de aIF5A e EF-P.....	17
Figura 3. Caracterização do mutante <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} que produz a proteína estável na temperatura não permissiva.....	30
Figura 4. Alinhamento dos genes que codificam para o tRNA de alanina em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Figura 5. Alinhamento dos genes que codificam para o tRNA de fenilalanina em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figura 6. Mapa do vetor (pRS426) utilizado neste estudo.....	33
Figura 7. Diagnóstico de restrição das clonagens dos tRNAs propostos no vetor pRS426.....	34
Figura 8. Supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} na presença do tRNA ^{Ala} em alto número de cópias.....	35
Figura 9. Ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade do mutante <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} na presença dos diferentes tRNAs em alto número de cópias.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celcius
µg	micrograma
µL	microlitro
mM	micromolar
BSA	soroalbumina bovina
cm	centímetro
C-terminal	carboxi-terminal
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF5A-Lis	precursor inativo de eIF5A contendo o resíduo de lisina
eIF5A-Dhp	forma intermediária da proteína eIF5A contendo o resíduo de aminoácido desoxihipusina
eIF5A-Hpu	forma madura da proteína eIF5A contendo o resíduo de aminoácido hipusina

EMS	etilmetanossulfonato
5-FOA	ácido 5-flúor-orótico
g	grama
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NAD	“nicotinamide adenine dinucleotide” (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal

PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação de polimerase em cadeia)
PDB	“Protein Data Bank”
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
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
tRNA	RNA transportador
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter

Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
UV	ultravioleta
V	volt
YNB	“yeast nitrogen base” (base nitrogenada para levedura)
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)
xg	aceleração gravitacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.....19

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.....19

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....20

1. Introdução

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 em eucariotos (Benne e Hershey, 1978; Park *et al.*, 1993a; Klier *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1997). A denominação dada a esta proteína decorreu da sua capacidade de estimular de 2 a 3 vezes a síntese de metionil-puromicina, um ensaio *in vitro* utilizado como modelo para avaliar fatores envolvidos na formação da primeira ligação peptídica durante a tradução (Benne e Hershey, 1978; Park *et al.*, 1993b).

eIF5A é a única proteína conhecida que possui o aminoácido hipusina (Cooper *et al.*, 1983) resultante de uma modificação pós traducional específica e incomum. A formação do aminoácido hipusina (do inglês “hypusine: hydroxyputrescine-lysine”) é essencial para a função de eIF5A e, consequentemente para a viabilidade celular ocorrendo através da ação sequencial de duas enzimas, desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase (Park *et al.*, 1982; Murphey e Gerner, 1987; Park *et al.*, 1996). A enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humano) catalisa a transferência do grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de um resíduo específico de lisina no precursor de eIF5A (K51 em levedura, K50 em humano) para formar um intermediário contendo o resíduo desoxihipusina. O intermediário formado é então hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humanos) completando a síntese de hipusina e, consequentemente, a maturação de eIF5A (Abbruzzese *et al.*, 1986; Park *et al.*, 1997), como pode ser observado na Figura 1. O grau de conservação dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação, nas diferentes espécies, revela a grande importância deste aminoácido

raro (Chen e Liu, 1997; Magdolen *et al.*, 1994). Mutação neste resíduo (K51R em *S. cerevisiae*) leva à produção de eIF5A não hipusinado, que não permite o crescimento de células onde *TIF51A* foi nocauteado (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 em eucariotos (Park *et al.*, 1998). De modo interessante, apesar de o 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 é uma proteína ácida (pI 5,4) e com massa molecular de 18–21kDa, dependendo da espécie (Park *et al.*, 1997) e que em *Saccharomyces cerevisiae* é codificada por dois genes homólogos que codificam para eIF5A: *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*HYP1*). Estes genes estão localizados em cromossomos distintos (Wohl *et al.*, 1992), codificam proteínas altamente similares compartilhando 90% de identidade e são regulados reciprocamente por oxigênio ou heme (Mehta *et al.*, 1990; Zitomer e Lowry, 1992; Schwelberger *et al.*, 1993). Segundo estudos, as estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de arqueas, protozoários e, recentemente, de humanos e de leveduras apresentam características comuns (Kim *et al.*, 1998; Yao *et al.* 2003; Tong *et al.*, 2009; PDB 2CPF; PDB 3ERO) e a partir desses, revelou-se que eIF5A é uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais mostra que um domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como “Translation Protein SH3-like motif”, o qual também está presente em várias proteínas ribossomais (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough *et al.*, 2001). O domínio C-

terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos 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).

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-Seutsugu *et al.*, 2004) como demonstrado na Figura 2A. EF-P possui uma estrutura bastante parecida com a estrutura global de um RNA transportador (Figura 2B), é essencial para a viabilidade celular e produz um efeito estimulatório na formação de ligações peptídicas sendo considerado, portanto, um fator de alongação da tradução (Glick e Ganoza, 1975). Assim, como eIF5A, EF-P é capaz de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* e tem sua função alterada por inibidores da atividade de peptidil-transferase do ribossomo (Ganoza *et al.*, 2002). Entretanto, recentemente a estrutura tridimensional cristalográfica de EF-P ligado ao ribossomo foi descrita, mostrando que este fator está posicionado entre os sítios P e E, interagindo com o tRNA iniciador, atuando apenas na formação da primeira ligação peptídica (Blaha *et al.*, 2009). Foi observado que determinado grupo de bactérias apresenta EF-P e que este fator sofre uma modificação pós-traducional em um resíduo específico de lisina na posição 34, correspondente ao sítio de hipusinação de eIF5A. Esta modificação, denominada de lisilação, é análoga à hipusinação e envolve a incorporação do radical lisil de uma lisina ao grupamento amino da lisina 34 de EF-P pelas enzimas YjeA e YjeK (Navarre *et al.*, 2010; Yanagisawa *et al.*, 2010; Bailly e Crécy-Lagard, 2010).

Recentemente em nosso laboratório, o estudo estrutural e funcional de eIF5A levou à obtenção de 40 mutantes novos dessa proteína (Dias e cols., 2008). Interessantemente, dois alelos condicionais novos de *TIF51A*, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}, produzem eIF5A modificada que é estável na temperatura não permissiva de crescimento. Uma provável razão para o fenótipo condicional desses dois mutantes é a perda de interações físicas na temperatura restritiva. Dessa forma, o aumento da expressão dos parceiros físicos de eIF5A nesses mutantes poderia restabelecer as interações físicas perdidas e permitir o crescimento dos mutantes na temperatura restritiva. Assim, a procura de supressores 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.

Curiosamente, 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*. Tendo em vista a similaridade estrutural entre eIF5A e EF-P e a interação genética encontrada para eIF5A e o tRNA^{Ala}, foi proposto neste Trabalho de Conclusão de Curso, o estudo da relação entre estes fatores envolvidos com a tradução e, adicionalmente diversos tRNA's (glicina, leucina, prolina, metionina e fenilalanina) para averiguar se a supressão mencionada para o tRNA de alanina também ocorrerá com estes outros tRNAs ou se é específica. Considerando-se que eIF5A foi descrita a mais de trinta anos sem que sua função específica fosse caracterizada, este trabalho contribuirá para elucidar o papel da proteína eIF5A durante a síntese proteica, especificamente na etapa de elongação da tradução.

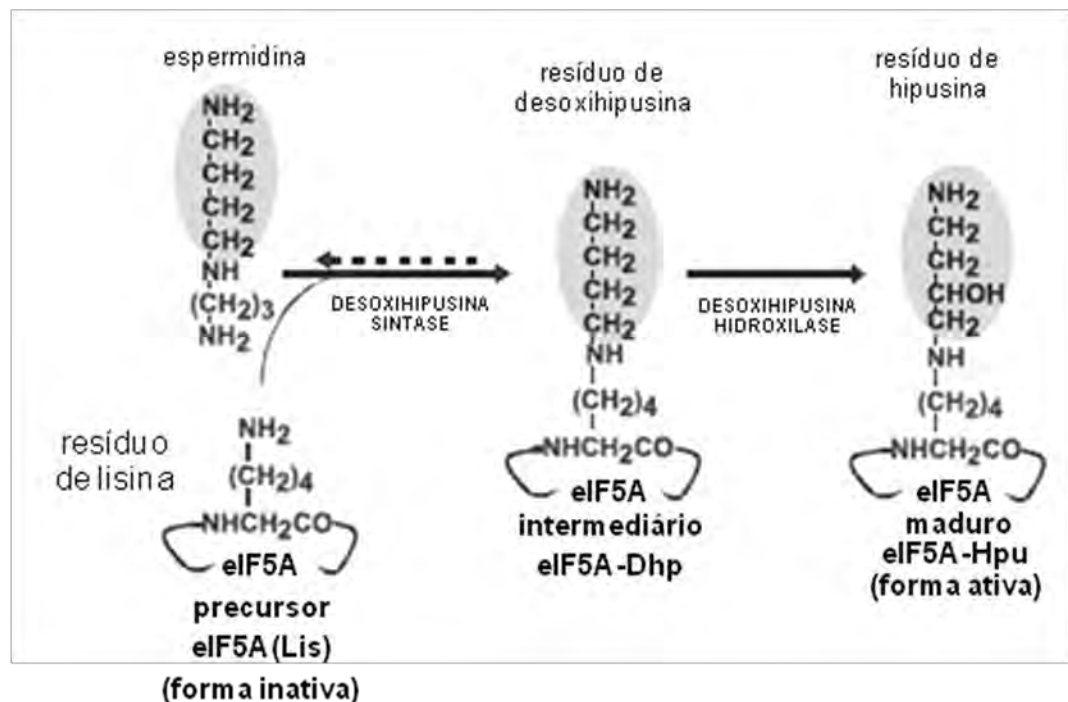


Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina está sombreada e é transferida ao resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A por meio da ação da enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humano). O intermediário resultante, agora contendo desoxihipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humano) o que resulta na ativação de eIF5A. As cadeias laterais da lisina, desoxihipusina e hipusina estão sendo mostradas (Figura adaptada de Park, 2006).

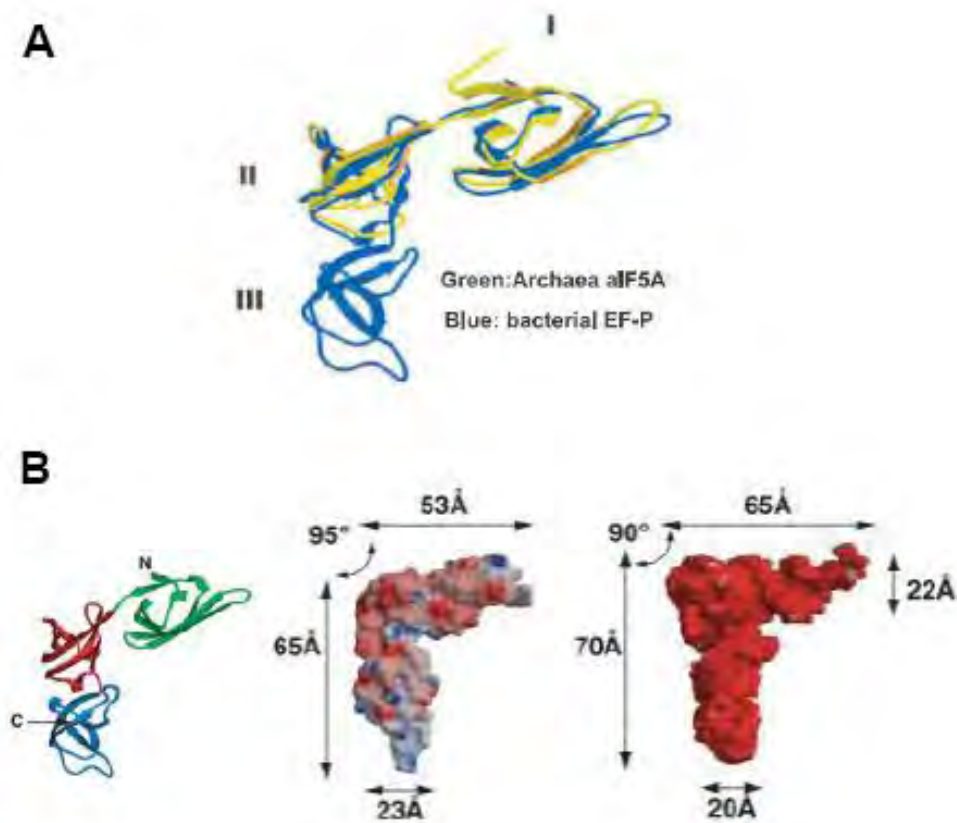


Figura 2. Comparação das estruturas tridimensionais de aIF5A e EF-P. (A) Alinhamento das estruturas cristalográficas de aIF5A e EF-P (Figura adaptada de Park, 2006). (B) Comparação da estrutura cristalográfica de EF-P (duas primeiras figuras a esquerda) e a estrutura global do RNA transportador de fenilalanina de *S. cerevisiae* (Figura adaptada de Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Análise da supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} em *Saccharomyces cerevisiae*.

Através do rastreamento de supressores em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura, obteve-se um dos genes para o tRNA de alanina (tRNA^{Ala}) caracterizado por ser um dos componentes essenciais para a elongação da tradução. Dessa maneira, uma vez que tem sido demonstrado recentemente o envolvimento direto de eIF5A com o processo de tradução, mais especificamente na etapa de elongação (GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009), o estudo do mecanismo pelo qual ocorre a supressão promovida pelo tRNA^{Ala} com certeza contribuirá para o entendimento do papel desta proteína durante a síntese proteica.

Portanto, através dos resultados obtidos da supressão de fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante de *TIF51A* (*tif51A*^{Q22H/L93F}) pelo isolamento de tRNA^{Ala}, objetiva-se clonar diferentes genes que codificam para diferentes tRNA's para averiguar se a supressão mencionada poderá ocorrer.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Clonagem de diferentes genes que codificam diferentes tRNA's (glicina, leucina, prolina, metionina e fenilalanina)

2.2.2 Testes de supressão em alto número de cópias de fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante estável de *TIF51A* (*tif51A*^{Q22H/L93F}).

3. Materiais

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
VZL821	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3</i> <i>tif51B::kanMX4</i> [pSV708]	Coleção do Laboratório
VZL838	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3</i> <i>tif51B::kanMX4</i> [pSV501]	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
pVZ1231	<i>tA(AGC)P</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo
pVZ1232	<i>tG(GCC)B</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo
pVZ1233	<i>tL(CAA)N</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo
pVZ1272	<i>tM(CAU)M</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo
pVZ1273	<i>tP(AGC)D</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo
pVZ1274	<i>tF(GAA)F</i> , <i>URA3</i> , 2 μ	Este estudo

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Gene	Sequência
SVO784	<i>tM(CAU)M F</i>	TCCCCGCGGAGCGCCGTGGCGC
SVO835	<i>tM(CAU)M R</i>	CCCAAGCTTTAGCGCCGCTCGG
SVO979	<i>tP(AGC)D F</i>	TCCCCGCGGGGGCGTGTGGTC
SVO980	<i>tP(AGC)D R</i>	CCCAAGCTTGGGGCGAGCCGGG
SVO977	<i>tF(GAA)P F</i>	TCCCCGCGGGCGGACTTAGCTC
SVO978	<i>tF(GAA)P R</i>	CCCAAGCTTTGCGAACTCTGTGG
SVO973	<i>tA(AGC)P F</i>	CCCAAGCTTCACGTAAAACACAT
SVO974	<i>tA(AGC)P R</i>	TCCCCGCGGCTAAAACGCCTTTC
SVO778	<i>tG(GCC)B F</i>	TCCCCGCGGGCGCAAGTGGTTTAG
SVO831	<i>tG(GCC)B R</i>	CCCAAGCTTTGCGCAAGCCCGG
SVO780	<i>tL(CAA)N F</i>	TCCCCGCGGGGTTGTTTGGCCG
SVO833	<i>tL(CAA)N R</i>	CCCAAGCTTTTGGTTGCTAAGAG

4. 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 padrões (GUTHRIE and FINK, 1991; AUSUBEL *et al.* 2004; AMBERG *et al.* 2005).

4.1 Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR)

4.1.1 Obtenção de DNA molde: preparo de DNA genômico de levedura

A linhagem de levedura de interesse foi crescida em 10 mL de YPD (extrato de levedura 10 g/L e peptona 20 g/L) até a saturação (D.O.600nm >1). A cultura foi

centrifugada a 3.000xg por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 500 µL de água Milli-Q. As células foram suspensas em 200 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM e EDTA 1 mM) e 200 µL de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico), e foram adicionados aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro. As células foram submetidas à agitação vigorosa por 3 a 4 minutos, adicionadas de 200 µL de TE pH 8,0 e novamente submetidas a agitação por mais 1 minuto. As células foram centrifugadas a 13.400xg por 5 minutos, e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A extração com 200 µL de PCI foi repetida por 3 vezes. Os ácidos nucléicos foram então precipitados da fase aquosa com 1 mL de etanol absoluto gelado e submetidos à centrifugação a 13.400xg por 2 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 400 µL de TE pH 8,0, adicionado de 3 µL de RNase A (10 mg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos. A extração com PCI foi repetida mais uma vez e o DNA precipitado com 10 µL de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol absoluto. O tubo foi centrifugado a 13.400xg por 2 minutos a 4°C e o precipitado lavado com 400 µL de etanol 75% gelado. O precipitado foi seco ao ar livre e suspenso em 50 µL de TE pH 8,0.

4.1.2 Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 µL de cada oligonucleotídeo; 1 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos 100 µM cada (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 5µL de tampão 10X concentrado para a enzima DNA polimerase; 1 µL de 50 mM de MgSO₄; 4 µL de DNA genômico de levedura da preparação obtida no item 4.1.1 e 2 U de enzima DNA polimerase para volume final de reação de 50 µL. As condições das reações

foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados e pode ser verificado abaixo. Após o último ciclo, as reações foram mantidas a 68°C por 10 minutos. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM) e então purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” da QIAGEN.

25 ciclos	Etapas	Temperatura/Tempo
	Desnaturação/Hot Start	95°C – 1'
	Desnaturação	95°C – 50"
	Anelamento	T _M do primer * - 50"
	Extensão	68°C – 1'/Kb
	Extensão final	68°C – 10'

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

4.1.3 Clonagem do produto de PCR

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição selecionadas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs).

4.2 Subclonagem de DNA

4.2.1 Digestão de plasmídeos

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

4.2.2 Desfosforilação do vetor (quando necessário)

Após digestão do vetor, foram adicionadas 2 unidades de fosfatase alcalina (CIAP-Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e a reação incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 75°C por 10 minutos.

4.2.3 Purificação de inserto e vetor

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

4.2.4 Reação de ligação

Os fragmentos (vetor e inserto) após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20 µL, tampão apropriado, excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 3 a 5 vezes) e 200-400 U de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 12 a 16 horas. A introdução dos produtos da reação de ligação em células de *E. coli* competentes foi realizada como descrito no item 4.3.2.

4.3 Transformação bacteriana

4.3.1 Preparo de *E. coli* competente:

Uma colônia da cepa de *E. coli* desejada foi crescida em 5mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; triptona 10 g/L) a 37°C, durante a noite e sob agitação. No outro dia, a cultura foi diluída (1:100) em 100 mL de meio fresco e crescida a 37°C, sob agitação até atingir D.O._{600nm}=0,3-0,5. A cultura bacteriana foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 1.600 xg a 4°C por 10 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 20 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. As células foram incubadas no gelo por 20 minutos. A seguir, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 1.600 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células suspensas em 2-4 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. Novamente, as células foram mantidas no gelo por 1-24 horas. A suspensão celular foi congelada em alíquotas individuais de 100-200 µL a -80°C, em glicerol 20%.

4.3.2 Transformação

Células da linhagem de *E. coli* competentes foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrifuga foram adicionados 100 µL das células competentes e 50–250 ng de DNA plasmidial ou 10 µL da reação de ligação. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos a choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL ou outro antibiótico referente à marca de seleção plasmidial) e incubadas a 37°C até a observação de colônias.

4.4 Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria em pequena escala (Miniprep)

Células da linhagem de *E. coli* DH5α contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina, ou outro antibiótico na concentração recomendada, e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000 xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0). Foram adicionados 200 µL de solução NaOH/SDS

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

4.5 Transformação de leveduras

Uma colônia da linhagem de levedura desejada foi inoculada em 5 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. 1,5 mL da cultura foram centrifugados na velocidade máxima por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com 1 mL de água estéril, suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio 100 mM e então incubadas por 5 minutos a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem, 240 µL de PEG 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de DNA de esperma de salmão, 5 µL de DNA plasmidial da preparação obtida no item 4.3, completando-se o volume de reação com 45 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 42°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas na velocidade máxima por 10 segundos. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 150 µL de água estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias.

4.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit “Big Dye Terminator” e o sequenciador de capilares ABI3130 (Applied Biosystems).

4.7 Teste de sensibilidade a temperatura

Crescer as linhagens de interesse em 5,0 mL de meio apropriado (YPD ou SC) até atingir concentração celular correspondente a $DO_{600} = 0,6$ a $0,8$. Centrifugar um volume ideal de cultura a $600 \times g$ por 7 minutos e ressuspender em meio de cultura apropriado para concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Aplicar 200 μ L de cada amostra no primeiro poço da microplaca e preencher os outros poços (5 colunas) com 180 μ L de meio de cultura apropriado. Em seguida, proceder cinco diluições seriadas (1:10) homogeneizando bem em cada etapa. Com ajuda de micropipetador multicanal, aplicar 4,0 μ L das amostras e suas respectivas diluições nos meios de cultura apropriados. Incubar nas temperaturas de interesse, sempre mantendo um controle a 25°C .

5. Resultados e Discussão

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*^{Q22H/L93F}, apresentou fenótipo de sensibilidade a temperatura porém a proteína eIF5A permaneceu estável na temperatura não permissiva (Dias *et al.*, 2008) como demonstrado na Figura 3B e 3C. Apesar de apresentar a mesma localização celular da proteína selvagem, esse mutante sensível à temperatura apresenta defeito de crescimento (Figura 3B), fenótipos anteriormente encontrados em mutantes de proteínas envolvidas com a etapa de elongação da tradução. De fato, trabalhos recentes envolvem eIF5A com a elongação da tradução (Zanelli *et al.*, 2006; Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009),

mas não definem o mecanismo pelo qual eIF5A está envolvido com esse passo da tradução.

De modo interessante, o gene codificador para o tRNA de alanina ($tRNA^{Ala}$) foi encontrado em nosso laboratório como supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante $tif51A^{Q22H/L93F}$. O entendimento do mecanismo pelo qual a superexpressão do $tRNA^{Ala}$ gera a supressão do fenótipo apresentado pelo mutante $tif51A^{Q22H/L93F}$ poderá contribuir para o entendimento do papel de eIF5A na tradução.

Assim, para averiguar se a supressão do fenótipo do mutante de eIF5A para o tRNA de alanina também ocorre com a superexpressão de outros tRNAs ou se é específica, decidiu-se neste Trabalho, clonar e analisar os genes de tRNAs para glicina, leucina, prolina, metionina e fenilalanina.

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 *et al.*, 1997). Para o tRNA de alanina, por exemplo, existem 16 genes distribuídos no genoma, divididos em dois grupos: 11 genes possuem o anticódon AGC e 4 genes possuem o anticódon TGC. Levando esses dados em consideração para decidir quais genes de tRNA devem ser utilizados neste Trabalho, foi realizada uma análise de “codon usage”. 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. Por

exemplo, o tRNA de alanina selecionado foi o tA(AGC)P presente no cromossomo 16 e o tRNA de fenilalanina escolhido para realização da clonagem possui o nome sistemático tF(GAA)F. Nas Figuras 4 e 5 são mostrados exemplos dessas análises. 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 no vetor de alto número de cópias.

Para garantir que a região promotora dos genes estivesse contida no fragmento amplificado por PCR, os oligonucleotídeos iniciadores foram posicionados 250 pares de bases antes do início da região codificadora dos tRNAs escolhidos.

Os fragmentos obtidos por PCR correspondentes aos genes dos tRNAs dos aminoácidos alanina, fenilalanina, metionina, leucina, glicina e prolina foram ligados ao vetor 2 μ (pRS426 ilustrado na Figura 6). A checagem da inserção dos genes dos tRNAs no vetor pRS426 foi realizada através da análise das digestões dos clones obtidos por gel de agarose demonstrado na Figura 7.

Todas as clonagens foram confirmadas através do sequenciamento de DNA da construção plasmidial obtida possibilitando a checagem quanto a possíveis mutações nos genes selecionados. Obtidos os plasmídeos recombinantes, a linhagem de levedura contendo o alelo mutante de *TIF51A*, *tif51A*^{Q22H/L93F}, foi transformada com os referidos plasmídeos e o ensaio de supressão foi realizado.

Assim, foram realizadas as clonagens dos tRNAs dos aminoácidos alanina, fenilalanina, metionina, leucina, glicina e prolina utilizando uma clonagem direcional nos quais foram utilizadas as enzimas *HindIII* e *SacII* nas extremidades do fragmento para averiguar uma possível supressão em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}. Como esperado,

o gene *tRNA^{Ala}* foi capaz de suprimir o fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* como ilustrado na Figura 8, porém confirmou-se que nenhum dos outros tRNAs testados (fenilalanina, metionina, leucina, glicina e prolina) foi capaz de suprimir o fenótipo observado para o mutante analisado. A Figura 9 apresenta o ensaio de sensibilidade a temperatura o qual demonstra que os diferentes tRNAs superexpressos não são capazes de melhorar o crescimento do mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* na temperatura não permissiva de crescimento.

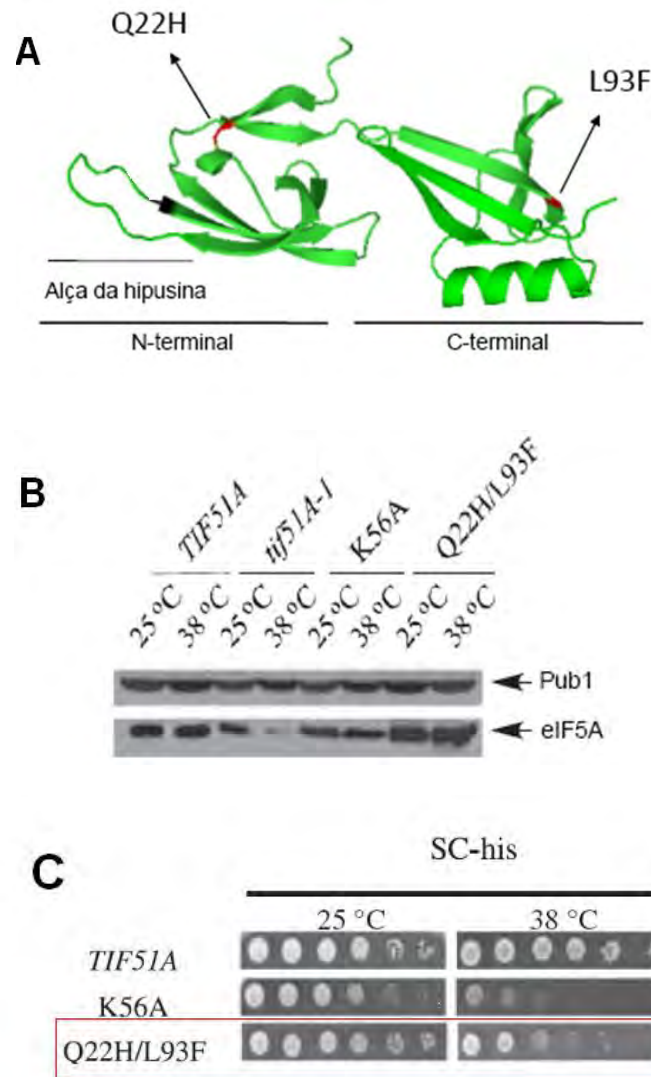


Figura 3. Caracterização do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} que produz a proteína estável na temperatura não permissiva. (A) Localização dos resíduos mutados de eIF5A. Os domínios N-terminal e C-terminal, bem como a alça de hipusinação, estão indicados por barras horizontais no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091). A localização dos resíduos mutados em eIF5A^{Q22H/L93F} estão indicados em preto e vermelho. **(B)** Análise dos níveis das proteínas eIF5A selvagem e mutadas por western blot, nas temperaturas permissiva e não permissiva. **(C)** Determinação da sensibilidade à temperatura dos mutantes *tif51A*, sob o mesmo background genético, na ausência de sorbitol no meio de cultura. (Figura adaptada de Dias *et al.*, 2008).

```

tA_AGC_DChr4      GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_FChr6      GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_GChr7      GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_HChr8      GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_JChr10     GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_K1Chr11    GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_K2Chr11    GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_LChr12     GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_M1Chr13    GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_PChr16     GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
tA_AGC_M2Chr13    GGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATT 60
*****

tA_AGC_DChr4      CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_FChr6      CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_GChr7      CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_HChr8      CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_JChr10     CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_K1Chr11    CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_K2Chr11    CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_LChr12     CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_M1Chr13    CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_PChr16     CCGGACTCGTCCA 73
tA_AGC_M2Chr13    CCGGACTCGTCCA 73
*****

```

Figura 4. Alinhamento dos genes que codificam para o tRNA de alanina em *Saccharomyces cerevisiae*. Foi feito um alinhamento utilizando-se o ClustalW2 dos 11 genes de tRNA^{Ala} que possuem o anticódon AGC, destacado na caixa vermelha, e o tRNA selecionado foi o tA(AGC)P presente no cromossomo 16.

```

tF_GAA_MChr13      GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 59
tF_GAA_P2Chr16     GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_P1Chr16     GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_H2Chr8      GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_H1Chr8      GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_GChr7       GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_FChr6       GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_BChr2       GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_NChr14      GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
tF_GAA_DChr4       GCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAATA-CTTCGGTCAAGTTATCT 60
*****

tF_GAA_MChr13      GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 91
tF_GAA_P2Chr16     GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
tF_GAA_P1Chr16     GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
tF_GAA_H2Chr8      GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
tF_GAA_H1Chr8      GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
tF_GAA_GChr7       GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
tF_GAA_FChr6       GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
tF_GAA_BChr2       GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 91
tF_GAA_NChr14      GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 91
tF_GAA_DChr4       GGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCA 92
*****

```

Figura 5. Alinhamento dos genes que codificam para o tRNA de fenilalanina em *Saccharomyces cerevisiae*. Foi feito um alinhamento utilizando-se o ClustalW2 dos 10 genes de tRNA^{Phe} que possuem o anticódon GAA, destacado na caixa vermelha, e o tRNA selecionado foi o tF(GAA)F, presente no cromossomo 6.

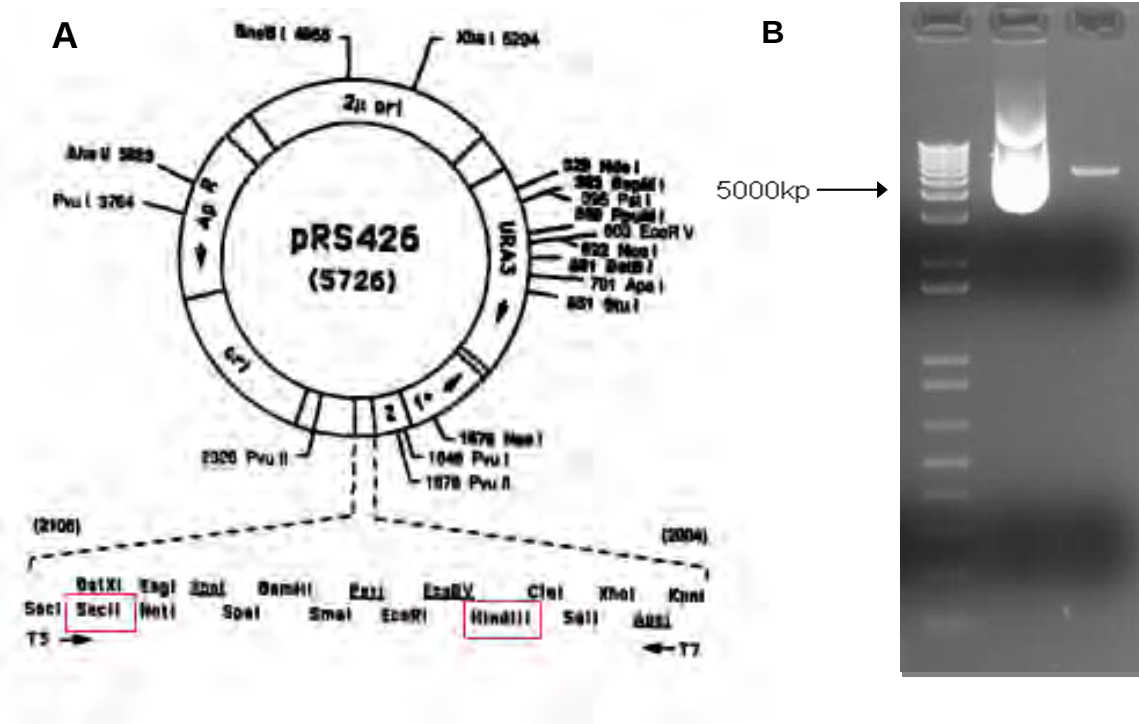


Figura 6. Mapa do vetor (pRS426) utilizado neste estudo. (A) Apresentação do mapa do vetor pSV65 ou pRS426 com seus sítios de restrição. Os genes de tRNAs mencionados foram inseridos entre os sítios *SacII* e *HindIII*. (B) Canaleta 1: padrão de massa molecular “1kb ladder plus” (Invitrogen), Canaleta 2: vetor pSV65 não digerido e Canaleta 3: vetor pSV65 digerido após purificação a partir de gel (kit de extração QUIAGEN).

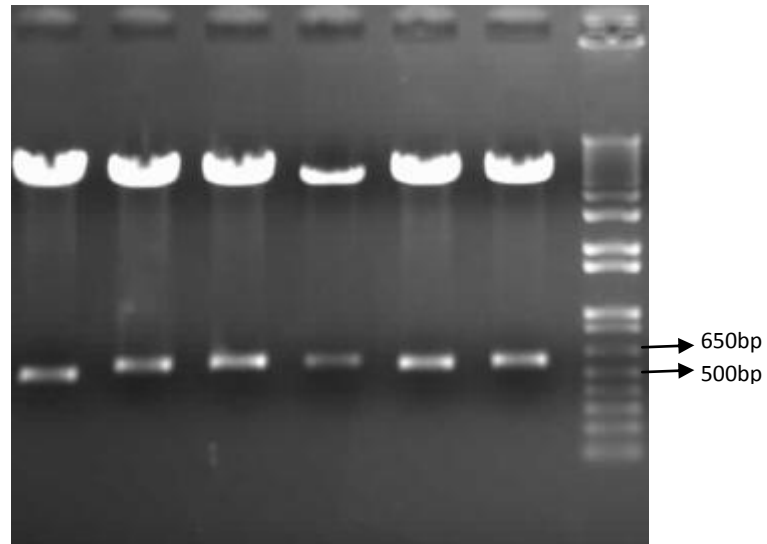


Figura 7. Diagnóstico de restrição das clonagens dos tRNAs propostos no vetor pRS426. As canaletas 1 ao 6 apresentam os clones que liberaram os genes de tRNA^{Ala} (516kb), tRNA^{Phe} (578kb), tRNA^{Gly} (587kb), tRNA^{Leu} (592kb), e tRNA^{Pro} (585kb) e tRNA^{Met} (613kb), respectivamente, após digestão com *SacII* e *HindIII*, confirmando a clonagem. A canaleta 7 apresenta o marcador de tamanho de DNA (padrão de massa molecular “1kb ladder plus” (Invitrogen).).

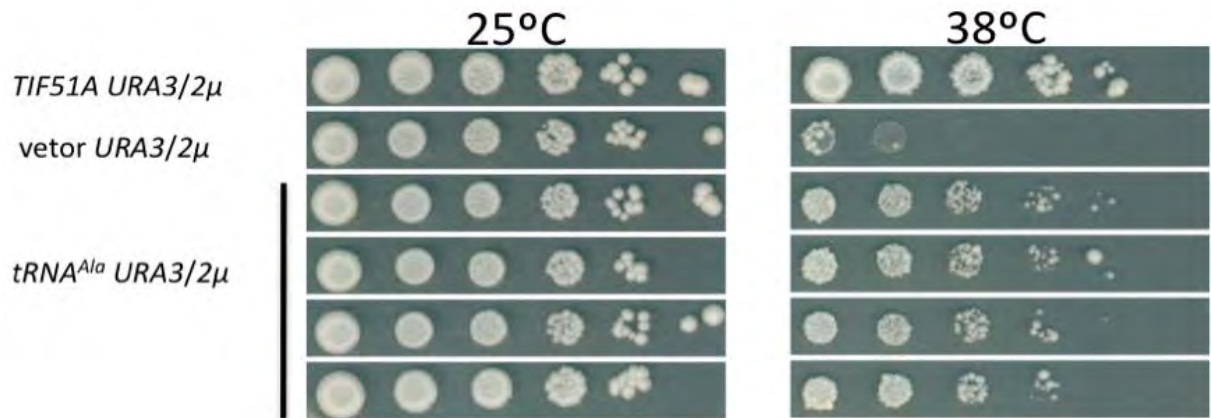


Figura 8. Supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *eIF5A*^{Q22H/L93F} (*tif51A*^{Q22H/L93F}) pela superexpressão do tRNA de alanina. Diluições seriadas das linhagens indicadas contendo os plasmídeos pSV107 (*TIF51A*, *URA3*, 2μ), pSV65 ou pRS426 (*URA3*, 2μ) ou pVZ1231 (*tRNA^{Ala}*, *URA3*, 2μ) foram crescidas por 3-4 dias em placas de SC-ura nas temperaturas indicadas

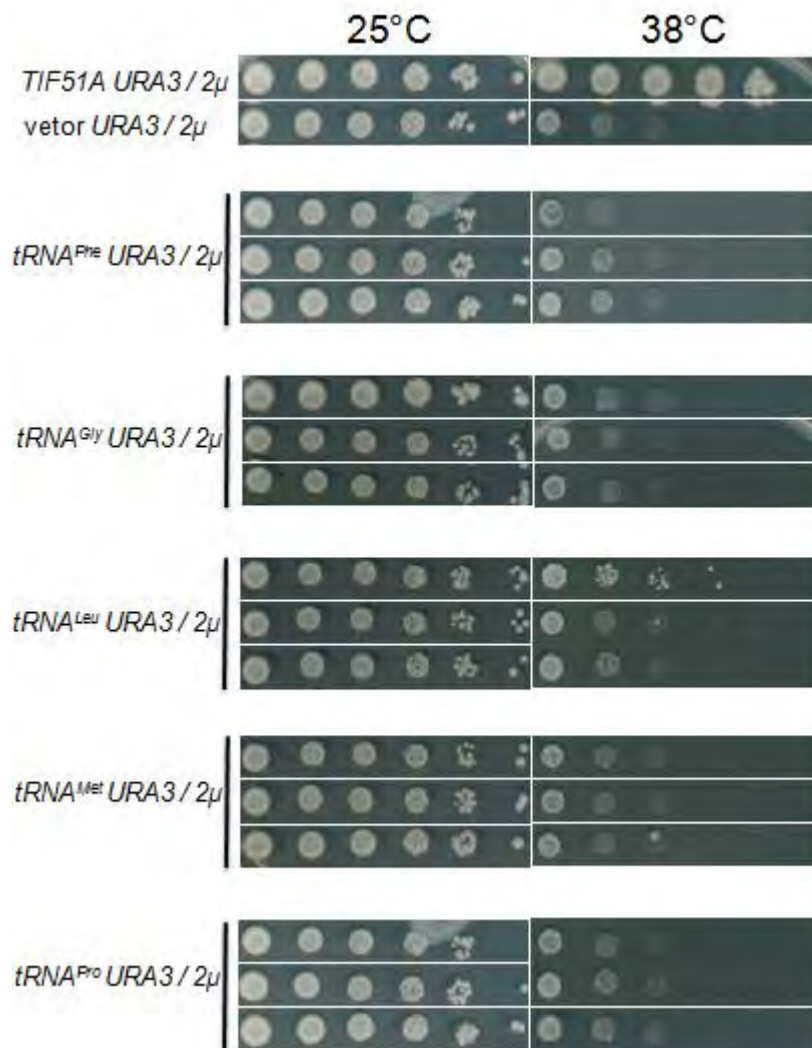


Figura 9. Ensaio de supressão do fenótipo de sensibilidade do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} na presença de diferentes tRNAs expressos em alto número de cópias. Diluições seriadas das linhagens indicadas contendo os plasmídeos pSV107 (*TIF51A*, *URA3*, 2μ), pSV65 ou pRS426 (*URA3*, 2μ) ou pVZ1231 (*tRNA^{Ala}*, *URA3*, 2μ) pVZ1274 (*tRNA^{Phe}*, *URA3*, 2μ), pVZ1232 (*tRNA^{Gly}*, *URA3*, 2μ), pVZ1233 (*tRNA^{Leu}*, *URA3*, 2μ), pVZ1272 (*tRNA^{Met}*, *URA3*, 2μ) e pVZ1273 (*tRNA^{Pro}*, *URA3*, 2μ), respectivamente foram crescidas por 3-4 dias em placas de SC-ura nas temperaturas indicadas

6. Conclusões

Através das clonagem de diferentes genes que codificam diferentes tRNA's descritos e posteriormente, a realização dos testes de supressão em alto número de cópias de fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante estável de *TIF51A* (*tif51A*^{Q22H/L93F}) deste Trabalho de Conclusão de Curso, averiguou-se que apenas o gene codificador de tRNA^{Ala} se apresentou como supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante duplo e estável de *TIF51A* e assim, os genes codificadores dos tRNAs dos aminoácidos fenilalanina, leucina, glicina, metionina e prolina não se comportaram da mesma maneira, não sendo capazes de melhorar o crescimento do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} na temperatura não permissiva de crescimento.

7. Referências Bibliográficas

ABBRUZZESE, A.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 7, p. 3085-3089, 1986.

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

BAILLY, M. & CRÉCY-LAGARD, V. Predicting the pathway involved in translational modification of Elongation factor P in a subset of bacterial species. **Biology Direct** 5 (3), 2010.

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

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, p. 966-970, 2009.

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

COOPER, H. L.; PARK, M. H.; FOLK, J. E.; SAFER, B.; BRAVERMAN, R. Identification of the hypusine-containing protein hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, n. 7, p. 1854-1857, 1983.

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

GANOZA, M. C., M. C. KIEL and H. AOKI. Evolutionary conservation of reactions in translation. **Microbiol Mol Biol Rev** 66: 460-485, 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, p. 4257-4260, 1975.

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

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

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

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

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

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

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

MURPHEY, R. J.; GERNER, E. W. Hypusine formation in protein by a two-step process in cell lysates. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 31, p. 15033-15036, 1987.

NAVARRE, W.W., ZOU, S.B., ROY, H., XIE, J.L., SAVCHENKO, A., SINGER, A., EDVOKIMOVA, E., PROST, L.R., KUMAR, R., IBBA, M., FANG, F.C. PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. **Mol Cell** 39(2), 209-221, 2010.

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

PARK, M. H.; COOPER, H. L.; FOLK, J. E. The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 12, p. 7217-7222, 1982.

PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 3, p. 1677-1683, 1998.

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. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, n. 12, p. 475-479, 1993a.

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, 1993b.

PARK, M. H.; NISHIMURA, K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, 2009. In press.

PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R.; LEE, Y. B.; WOLFF, E. C. The polyaminederived amino acid hypusine: its post-translational formation in eIF5A and its role in cell proliferation. **Amino Acids**, v. 10, p. 109-121, 1996.

PERCUDAN, R.; PAVESI, A.; OTTONELLO, S. Transfer RNA Gene redundancy and translational selection in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Mol. Biol** 268: 322-330, 1997.

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

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

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

YANAGISAWA, T., SUMIDA, T., ISHII, R., TAKEMOTO, C., YOKOYAMA, S. A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. **Nat Struct Mol Biol** 17(9), 1136-1143, 2010.

YAO, M.; OHSAWA, A.; KIKUKAWA, S.; TANAKA, I.; KIMURA, M. 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.

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