

UNESP

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia

**Estudo do Fator de Início de Tradução de
Eucariotos 5A (eIF5A) na tradução
específica e na ligação direta com
ribossomo**

Danuza Rossi

Tese de doutorado

Araraquara-SP

2013

Danuza Rossi

**Estudo do Fator de Início de Tradução de
Eucariotos 5A (eIF5A) na tradução
específica e na ligação direta com
ribossomo**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara-SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Rossi, Danuza

R831e Estudo do fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) na
tradução específica e na ligação direta com ribossomo / Danuza Rossi.
Araraquara, 2013

138 f. + anexo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Sandro Roberto Valentini

1. eIF5A. 2 Ribossomo. 3. Síntese de proteína. 4. Via secretória. I. Zanelli,
Cleslei Fernando, orient. II. Valentini, Sandro Roberto, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho à todos amigos e familiares que o tornaram possível... Entretanto, devo dedicar especialmente aos meus grandes amores, dois pedaços da minha vida: Juliano Martoní e João Paulo Rossi Martoní (in memória), sem os quais talvez nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é quase sempre uma injustiça, pois é impossível em uma página trazer tudo e todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, para tanto precisaria de mil folhas... Mas tentarei, resumidamente, agradecer os principais atores, as melhores cenas e os indispensáveis editores desta peça.

Inicialmente, a todas as divindades que me guiaram neste tempo, e que nunca me deixaram abater pelas dificuldades.

Especialmente aos meus pais, Cida e Gilmar, por me proporcionarem uma educação indiscutivelmente completa, pois me ensinaram a amar, respeitar e, sobretudo, CRITICAR!

Aos meus irmãos amados, Giuliano, Pamela, Luciene e Blain, que sempre muito próximos, participaram de (quase) todos os momentos da minha vida, ajudando a não me perder por entre elencos e cenas, mas sempre dando apoio para alcançar meus objetivos.

Um agradecimento especial ao Prof. Cleslei F. Zanelli, quem me orientou desde a graduação, pelos inúmeros momentos de discussão que guiaram meu olhar para a ciência, o que fez possível este trabalho, além de ter se tornado um amigo.

Ao co-orientador deste trabalho, Prof. Sandro R. Valentini, que contribuiu muito para as DISCUSSÕES científicas.

Aos professores Christopher Fraser e John Hershey que contribuíram significativamente para o avanço deste trabalho, além da ótima receptividade em Davis.

Aos professores Dra. Maria Célia Bertolini e Dr. Iran Malavazi pela participação e contribuição no exame geral de qualificação deste trabalho.

Aos pesquisadores Davis Ng, Jon Lorsch, Peter Walter, Colin J. Stirling, Wolf-Dietrich Heyer e John Hershey pelos reagentes doados que foram utilizados neste trabalho.

À UNESP, UCDavis e Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo apoio insitucional de infraestrutura, à FAPESP e CAPES pelas bolsas concedidas para a realização do projeto no país e no exterior. Ao CNPq, PADC-FCFAR e, novamente, à FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Às funcinárias da pós-graduação e biblioteca, sempre prontas para ajudar no que foi preciso.

Indispensável aqui, um agradecimento à todos os colegas e amigos de trabalho, cuja influência não se limitou aos experimentos e reuniões científicas, indo até os bons momentos vividos. Portanto, aos atuais e antigos companheiros do “lab” BiomolVZ: Hermano, Leonardo, Fernando, Paulo, Mariana, Juliana, Kdu, Matheus, Vitor, Oedem, Carol, Pri, Cris, Marco, Thaís, Arthur, Paulinha, Silvinha, Veridiana, Camila, Ana Paula, Juks, Luciano, etc, que hoje são partes permanentes da minha história. Aos companheiros do “lab” do Chris: Enkhee, Nancy, Kateryna, Masaaki, Brian que ajudaram muito no convívio longe de casa. E aos colaboradores sempre presentes Helen, Raquel, Gustavo e Julhyani por sempre contribuírem com discussões produtivas.

Um agradecimento especial aos queridos amigos Tatiana W., Tatiana Mary, Daniella e Fabio, pelo envolvimento diário, que fizeram desses anos todos uma vivência inesquecível, amigos que terei orgulho de tê-los para sempre.

Por fim, o agradecimento mais importante de todos, ao meu amado marido, pelo incondicional, indispensável e indubitável apoio em todos os momentos, e por me ajudar a desvendar-me a mim mesma e assim, ultrapassar os piores obstáculos e gozar dos melhores momentos!!!

Concordo: o homem é um animal criativo por excelência, condenado a tender conscientemente para um objetivo e a ocupar-se da arte da engenharia, isto é, abrir para si mesmo um caminho, eterna e incessantemente, para onde quer que seja. Mas talvez, precisamente por isso, lhe vem as vezes uma vontade de se desviar, justamente por estar condenado a abrir este caminho, e talvez ainda porque, por mais estúpido que seja um homem direto e de ação, ocorre-lhe as vezes que o caminho vai quase sempre para alguma parte, e que o principal não está em saber para onde se dirige, mas simplesmente em que se dirija, e em que a criança comportada, desprezando a arte da engenharia, não se entregue à ociosidade destruidora, que, como se sabe, é a mãe de todos os vícios. O homem gosta de criar e de abrir estradas, isto é indiscutível. Mas por que ama também, até a paixão, a destruição e o caos? Dizei-me!...

... As dignas formigas começaram pelo formigueiro e certamente acabarão por ele, o que confere grande honra a sua constância e caráter positivo. Mas o homem é uma criatura volúvel e pouco atraente e, talvez, a exemplo do enxadrista, ame apenas o processo de atingir o objetivo, e não o próprio objetivo. E, quem sabe? Não se pode garantir, mas talvez todo objetivo sobre a terra, aquele para o qual tende a humanidade, consista unicamente nesta continuidade do processo de atingir o objetivo, ou, em outras palavras na própria vida e não exatamente no objetivo, o qual, naturalmente, não deve ser outra coisa senão que dois e dois são quatro, isto é, uma fórmula; mas, na realidade, dois e dois não são mais a vida, mas o começo da morte. Pelo menos, o homem sempre temeu de certo modo este dois e dois são quatro, e eu o temo até agora. Suponhamos que o homem não faça outras coisas se não procurar este dois e dois são quatro: ele atravessa os oceanos a nado, sacrifica a vida nesta busca, mas, quanto a encontrá-lo realmente... juro por Deus, tem medo. Bem que ele sente: uma vez encontrado isto não haverá mais o que procurar.

Fiódor Dostoievski, Memórias do Subsolo

RESUMO

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado em arqueas e em eucariotos e sofre uma modificação pós-traducional única e essencial chamada hipusinação. Este fator já foi relacionado com início de tradução, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA e proliferação celular. Resultados recentes colocam essa proteína novamente no cenário da síntese proteica, mais especificamente na etapa de alongação da tradução. Estudos que relacionam eIF5A com proliferação celular e transição G1/S do ciclo celular e via secretória sugerem seu envolvimento com tradução específica de proteínas que atuam na progressão do ciclo celular. No intuito de avaliar a hipótese da participação de eIF5A na tradução de um subgrupo específico de mRNAs, envolvidos na via secretória e proliferação celular, este trabalho estudou inicialmente, o envolvimento de eIF5A na translocação de proteínas para o RE. Os resultados revelam que eIF5A não atua na via pós-traducional, mas sugere que desempenhe um papel na translocação pela via co-traducional. A análise proteômica realizada com um mutante de Dys1, que apresenta redução de eIF5A ativa, revelou diversas proteínas diferencialmente presentes, as quais participam dos processos de biogênese de ribossomo e regulação da tradução, ciclo celular, organização de membrana e via secretória. A proteína Asc1 foi selecionada para análises adicionais por ser uma proteína amplamente envolvida no controle traducional, por diversos mecanismos. Foram realizados ensaios de interação genética entre Asc1, Dys1 e eIF5A, e os resultados obtidos sugerem que essas proteínas participam, conjuntamente, da regulação do processo de tradução por afetar a tradução de grupos de mRNAs codificadores de proteínas atuantes na mesma via. Para os ensaios de ligação direta de eIF5A no ribossomo, inicialmente, foram realizados experimentos para obtenção de mutantes, análise de funcionalidade e purificação das formas mutantes de eIF5A contendo cisteína única. Por ultracentrifugação e anisotropia de fluorescência, foi possível mostrar ligação direta de eIF5A de humano e de levedura na subunidade ribossomal 60S, revelando constante de dissociação de aproximadamente 260 nM. Foi também iniciada a padronização dos ensaios de clivagem de rRNA induzida por radical hidroxil, a partir do complexo eIF5A-60S, no entanto, não foram conclusivos para determinação dos pontos de interação de eIF5A no ribossomo.

ABSTRACT

The translation initiation factor 5A (eIF5A) is highly conserved in archaea and eukaryotes and undergoes an unique and essential posttranslational modification named hypusination. This factor has been associated with translation initiation, nucleocytoplasmic transport, mRNA decay and cell proliferation. Recent results place this protein back in the protein synthesis scenario, acting specifically at the elongation step of translation. Studies that correlate eIF5A with cell proliferation, cell cycle and the secretory pathway suggest its involvement in the translation of specific mRNAs that act on cell cycle progression. In order to evaluate this hypothesis, this study has investigated the involvement of eIF5A in protein translocation into the ER. The results have shown that eIF5A does not act in the post-translational pathway, but suggest that it plays a role in protein translocation via the co-translational pathway. The proteomic analysis performed with a mutant of Dys1, which shows a reduction of active eIF5A, revealed many proteins differentially present, that participate in the process of ribosome biogenesis and regulation of translation, cell cycle, organization of membrane and secretory pathway. The protein Asc1 was chosen for further analysis due to its involvement in several mechanisms at translational control. We performed genetic interaction assays with Asc1, Dys1 and eIF5A, and the results suggest that these proteins coordinately regulate protein synthesis by affecting the translation of mRNAs encoding proteins that act in the same pathway. For the direct ribosome binding assays, it was initially obtained a series of eIF5A single cysteine mutants, their functionality was tested and the different mutant proteins were purified. Using ultracentrifugation and fluorescence anisotropy, it was possible to show direct binding of human and yeast eIF5A to the 60S ribosomal subunit, revealing a dissociation constant of approximately 260 nM. We also started the setting up for hydroxyl radical-induced rRNA cleavage assays, using the eIF5A-60S, however, preliminary experiments were not conclusive to determine the sites of interaction of eIF5A in the ribosome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de início da tradução	20
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de alongação e terminação da tradução	21
Figura 3. Esquema da modificação pós-traducional de eIF5A	26
Figura 4. Representação esquemática do ensaio de metionil-puromicina	27
Figura 5. Comparação das estruturas tridimensionais de eIF5A de archea (aIF5A) e EF-P	28
Figura 6. Representação esquemática da translocação de proteínas para RE	32
Figura 7. Ensaio de translocação do repórter SS-Ura3 pela via pós-traducional, utilizando mutantes de eIF5A, revela não envolvimento de eIF5A nesta via	75
Figura 8. Ensaio de translocação do repórter DPAP B pela via co-traducional, utilizando mutantes de eIF5A, revela o envolvimento de eIF5A nesta via	78
Figura 9. Via co-traducional de translocação de proteínas para o RE	82
Figura 10. Análises genéticas de um mutante de eIF5A com mutantes de SRP e do translocon auxiliar, revelam interação genética do tipo sintético doente	83
Figura 11. Superexpressão de componentes de SRP suprime fenótipo de termossensibilidade de mutante de eIF5A	84
Figura 12. Esquema representativo da análise proteômica por 2D-DIGE, realizada com o mutante <i>dys1-1</i>	92
Figura 13. Distribuição dos resultados obtidos nas três análises proteômicas realizadas com o mutante <i>dys1-1</i>	93
Figura 14. Quadro resumo dos processos celulares resultantes das análises proteômicas	95
Figura 15. Confirmação da diferença de expressão de Asc1 na linhagem mutante <i>dys1-1</i>	98
Figura 16. Utilização dos mutantes de cisteína única de eIF5A para derivatização com diferentes compostos	104
Figura 17. Clonagem de <i>EIF5A1</i> no vetor de expressão em levedura pYES2	105
Figura 18. Análise da funcionalidade dos mutantes de cisteína única de eIF5A de humano em <i>S. cerevisiae</i>	106

Figura 19. Análise da funcionalidade do mutante de eIF5A de <i>S. cerevisiae</i>	107
Figura 20. Ensaio de hipusinação e purificação de eIF5A em sistema de expressão heterólogo em <i>E. coli</i>	108
Figura 21. Produção e purificação de fatores de início de tradução, ribossomos e Met-tRNA _i ^{Met}	109
Figura 22. Ensaio de ultracentrifugação revelam ligação direta de eIF5A com ribossomo de levedura	112
Figura 23. Ensaio de ultracentrifugação revelam ligação direta de mutantes de cisteína única de eIF5A de humano e levedura em ribossomo de levedura	113
Figura 24. eIF5A recombinante é capaz de competir com eIF5A endógena pela ligação ao 80S previamente formado <i>in vivo</i> e a presença de hipusina afeta esta capacidade	114
Figura 25. Esquema representativo da técnica de anisotropia de fluorescência	118
Figura 26. Ensaio de anisotropia de fluorescência revela que a ligação entre eIF5A e 60S é de alta afinidade e dependente de hipusina	119
Figura 27. Esquema ilustrativo do ensaio de clivagem de rRNA por radical hidroxil	122
Figura 28. Esquema do ensaio de clivagem de rRNA por radical hidroxil para busca do local de interação direta de eIF5A na subunidade 60S (utilizando o <i>primer b</i>)	123
Figura 29. Esquema do ensaio de clivagem de rRNA por radical hidroxil para busca do local de interação direta de eIF5A na subunidade 60S (utilizando o <i>primer g</i>)	124
Figura 30. Modelo proposto para o papel de eIF5A na tradução específica	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho	34
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho	36
Tabela 3.1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento, clonagem e <i>primer extension</i>	39
Tabela 3.2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas mutações sítio-dirigidas	39
Tabela 4. Composição dos tampões utilizados neste trabalho	41
Tabela 5. Agrupamento dos genes que codificam as proteínas identificadas nos três experimentos de análise proteômica, de acordo com o envolvimento em processos metabólicos, após análise por ontologia genética	94

ABREVIATURAS

pg	picograma
ng	nanograma
µg	micrograma
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
nm	nanômetro
nM	nanomolar
µM	micromolar
mM	milimolar
M	molar
U	unidade de atividade enzimática
cDNA	DNA complementar ao mRNA
C-terminal	carboxi-terminal
N-terminal	amino-terminal
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
tRNA	RNA transportador
rRNA	RNA ribossomal
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
ddNTP	di-desoxirribonucleotídeo (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
D.O. _{600nm}	densidade óptica a 600nm
D.O. _{260nm}	densidade óptica a 260nm
D.O. _{280nm}	densidade óptica a 280nm
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
BABE	bromoacetamidobenzil-EDTA
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
KCl	ácido clorídrico
NaCl	cloreto de sódio
MgCl ₂	cloreto de magnésio

KOAc	acetato de potássio
Mg(OAc) ₂	acetato de magnésio
kDA	quilodalton
LB	meio Luria-Bertani
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura)
SC	meio sintético completo para levedura
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS	dodecil sulfato de sódio
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
BME	beta-mercaptoetanol
TCEP	tris-2-carboxietil-fosfino
S-SPO	“super-sporulation media” (meio para esporulação de levedura)
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
Tween 20	monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
DMSO	dimetilsulfóxido
xg	aceleração gravitacional
kb	kilobase
pb	pares de base
μCi	microCurie
³ H	radioisótopo de hidrogênio trício
³² P	radioisótopo de fósforo de massa 32
h	hora
min	minuto
UV	ultravioleta
PBS	“phosphate buffered saline” (solução salina tamponada com fosfato)
PBST	PBS com Tween 20
BSA	albumina do soro bovino
Cy2	cianina-2
Cy3	cianina-3
Cy5	cianina-5

mA	miliampère
Å	angstron
V	volt
V/h	volt por hora
v/v	relação volume/volume
m/z	relação massa/carga
dFP	desvio de luz polarizada
Kd	constante de dissociação
rpm	rotações por minuto
ODU	unidade de medida óptica
Ni-NTA	“nickel-nitriloacetic acid column” (coluna de purificação por níquel)
kV	quilovolt
Ω	ohm
μ F	microfaraday
tRNA _i ^{Met}	tRNA iniciador de metionina
eIF1	fator de início de tradução 1
eIF1A	fator de início de tradução 1A
eIF2	fator de início de tradução 2
eIF3	fator de início de tradução 3
eIF5	fator de início de tradução 5
eIF5B	fator de início de tradução 5B

Índice

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Mecanismo de tradução em eucariotos	18
1.2. eIF5A na tradução	22
1.3. eIF5A na progressão do ciclo celular	29
2. OBJETIVO GERAL	33
2.1. Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Materiais	34
3.2. Métodos	44
3.2.1. Transformação de Microrganismos	44
3.2.2. Isolamento de DNA plasmidial	45
3.2.3. Cura plasmidial (<i>plasmid shuffle</i>) em levedura utilizando a marca de auxotrofia <i>URA3</i>	46
3.2.4. Teste de sensibilidade a temperatura	46
3.2.5. Western Blot	47
3.2.6. Análise proteômica	48
3.2.6.1. <i>Obtenção do extrato proteico</i>	48
3.2.6.2. <i>Marcação e focalização isoelétrica das proteínas</i>	48
3.2.6.3. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise dos spots de proteína</i>	49
3.2.7. Cruzamento, esporulação e dissecção de leveduras	52
3.2.7.1. <i>Cruzamento</i>	52
3.2.7.2. <i>Esporulação</i>	52
3.2.7.3. <i>Dissecção</i>	52
3.2.7.4. <i>Caracterização de tétrades</i>	52
3.2.8. Clonagem empregando Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	53
3.2.8.1. <i>Reação de PCR</i>	53
3.2.8.2. <i>Digestão de inserto e vetor</i>	53
3.2.8.3. <i>Reação de ligação e isolamento de clones</i>	53
3.2.9. Mutagênese sítio-dirigida	54
3.2.10. Sequenciamento de DNA	55
3.2.11. Interação genética sintética utilizando mutante <i>dys1</i>	56

3.2.12. Medida de síntese proteica total <i>in vivo</i>	56
3.2.13. Perfil polissomal utilizando formaldeído	57
3.2.14. Ensaio de hipusinação <i>in vivo</i> em <i>E. coli</i>	58
3.2.14.1. <i>Preparo das células</i>	58
3.2.14.2. <i>Preparo do precipitado proteico e quantificação por cintilometria</i>	58
3.2.15. Purificação de eIF5A de humano a partir de <i>E. coli</i>	58
3.2.15.1. <i>Expressão e preparo do extrato proteico</i>	58
3.2.15.2. <i>Cromatografia de troca iônica em FPLC</i>	59
3.2.16. Purificação de eIF5A de levedura	60
3.2.16.1. <i>Expressão e preparo do extrato proteico</i>	60
3.2.16.2. <i>Cromatografia de afinidade</i>	60
3.2.16.3. <i>Cromatografia de troca iônica em FPLC</i>	60
3.2.17. Extração fenólica de ácidos nucleicos	60
3.2.18. Reação de transcrição <i>in vitro</i> a partir de produto de PCR ou plasmídeo	61
3.2.19. Purificação de fatores de início de tradução e tRNA _i ^{Met}	61
3.2.19.1. <i>eIF1, eIF1A e eIF5</i>	61
3.2.19.2. <i>eIF2</i>	62
3.2.19.3. <i>eIF3</i>	63
3.2.19.4. <i>eIF5B</i>	64
3.2.19.5. <i>tRNA_i^{Met} de levedura carregado com metionina</i>	65
3.2.20. Purificação de ribossomos de levedura	66
3.2.20.1. <i>Purificação de 80S total</i>	66
3.2.20.2. <i>Purificação das subunidades 40S e 60S</i>	67
3.2.21. Reconstituição do complexo de início de tradução	67
3.2.21.1. <i>Formação do complexo ternário (TC)</i>	67
3.2.21.2. <i>Formação do complexo 43S</i>	67
3.2.21.3. <i>Formação do complexo de iniciação 80S</i>	68
3.2.22. Ensaio de ligação direta proteína-ribossomo por ultracentrifugação	68
3.2.23. Marcação de eIF5A por modificação covalente	69
3.2.23.1. <i>Fluoresceína-5-maleimida</i>	69
3.2.23.2. <i>BABE-Fe</i>	69
3.2.24. Anisotropia ou Polarização de Luz Fluorescente (PLF)	70

3.2.25. Ensaio de clivagem de rRNA e <i>primer extension</i>	70
3.2.25.1. <i>Ligação proteína-ribossomo</i>	70
3.2.25.2. <i>Clivagem de rRNA induzida por radical hidroxil</i>	70
3.2.25.3. <i>Transcrição reversa do rRNA</i>	71
3.2.25.4. <i>Reação de primer extension para sequenciamento do rRNA 25S</i>	72
3.2.25.5. <i>Gel de primer extension para identificação dos pontos de clivagem do rRNA</i>	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1. Estudo do papel de eIF5A na translocação de proteínas para o RE e na expressão gênica diferencial em nível traducional	73
4.1.1. Análise da translocação de repórteres das vias pós-traducional e co-traducional em mutantes de eIF5A	73
4.1.1.1. <i>Pós-traducional</i>	73
4.1.1.2. <i>Co-traducional</i>	76
4.1.2. Análise de interação genética entre mutantes de eIF5A e proteínas envolvidas na via co-traducional de translocação	79
4.1.3. Análise da expressão gênica diferencial em nível traducional por análise proteômica de mutante que apresenta defeito de eIF5A	85
4.1.4. Análise da correlação funcional entre Asc1, Dys1 e eIF5A, por ensaios de interação genética	96
4.2. Estudo da interação física direta de eIF5A com ribossomo <i>in vitro</i>	99
4.2.1. Obtenção de mutantes de cisteína única de eIF5A e outros componentes do início de tradução (fatores de tradução, ribossomos, tRNA e mRNA)	99
4.2.2. Identificação do complexo ribossomal ao qual eIF5A se liga por ultracentrifugação	110
4.2.3. Definição da constante de dissociação entre eIF5A e o ribossomo por anisotropia de fluorescência	115
4.2.4. Início do mapeamento dos pontos de ligação direta de eIF5A no ribossomo pelos ensaios de clivagem induzida de rRNA utilizando mutantes de cisteína única de eIF5A complexado com ribossomo	120
5. CONCLUSÕES	125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mecanismo de tradução em eucariotos

O processo de tradução apresenta componentes altamente conservados ao longo da evolução (OUZOUNIS and KYRPIDES 1996; OLSEN and WOESE 1997), além de ser um processo complexo que envolve diversas etapas.

O início da tradução de mRNAs canônicos, em eucariotos, apresenta alto grau de regulação, envolvendo diversos fatores essenciais (Figura 1). O escaneamento do mRNA para o encontro do códon de início depende da ligação do complexo ternário (eIF2 - tRNA_i^{Met}-Met - GTP) na subunidade menor do ribossomo 40S, com a ajuda do complexo MFC (*multi factor complex* - eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5) resultando assim no complexo de pré-iniciação 43S (PIC = *preinitiation complex*). Em levedura, o MFC é muito importante para estabilização do 43S e, conseqüentemente, do início da tradução (HINNEBUSCH 2011). Enquanto isso, o mRNA maduro, contendo capacete de 7-metil-guanosina e cauda de poli(A), é estabilizado pela ligação do 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). A ligação do complexo eIF4F com PABP é importante para a correta ligação do complexo 43S ao mRNA, mediada por eIF3. A formação do complexo de pré-iniciação 48S, portanto, permite que o ribossomo escaneie o mRNA até o encontro do primeiro AUG, bem como o posicionamento do metionil-tRNA_i^{Met} no sítio P (peptidil) do 40S. A hidrólise do GTP para GDP induzida por eIF5 acarreta no desligamento de fatores de início, e promove a ligação de eIF5B-GTP. Esse último fator recruta a subunidade ribossomal 60S para formação do complexo de iniciação 80S, contendo Met-tRNA_i^{Met} posicionado no códon AUG no sítio P e pronto para iniciar o primeiro ciclo de elongação da tradução (ACKER *et al.* 2007; HINNEBUSCH 2011).

A etapa de elongação 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 and WINTERMEYER 2009). A Figura 2A mostra um esquema representativo do processo de elongação da tradução. Assim que o Met-tRNA_i^{Met} estabiliza-se no sítio P do complexo de início de tradução 80S, a elongação da cadeia polipeptídica é iniciada. O fator de elongação eEF1A (EF-Tu em bactéria) liga-se a um tRNA aminoacilado correspondente ao segundo códon do mRNA na sua forma eEF1A-GTP, e o posiciona no sítio A (aminoacil). Esse evento

leva à hidrólise do GTP e desligamento de eEF1A do ribossomo, permitindo a total acomodação do tRNA aminoacilado no sítio A. Rapidamente, o sítio catalítico ribossomal PTC (peptidyl transferase center) leva à formação da ligação peptídica. Estudos estruturais recentes do ribossomo de levedura e bactéria mostram sobreposição da região PTC, sugerindo que o mecanismo de formação da ligação peptídica seja universal (BEN-SHEM *et al.* 2010; KLINGE *et al.* 2011). A mudança de cargas e conformação dos sítios neste momento, provoca o movimento dos tRNAs para os estados híbridos do ribossomo A/P e P/E (saída). Esta translocação dos tRNAs depende da ação de eEF2-GTP (EF-G em bactéria), através de seu papel na estabilização da conformação híbrida do ribossomo. Em seguida, o ribossomo volta para sua conformação desbloqueada após a hidrólise do GTP de eEF2 e ocorre a consequente movimentação do tRNA e mRNA para posicionar o próximo códon no sítio A e, assim, bloquear o estado pós-translocação. De uma maneira geral, eEF2 previne o movimento reverso do tRNA e mRNA após translocação. Exclusivamente em fungos, este evento de estabilização da conformação pós-translocação do ribossomo é auxiliado por outro fator de alongação, o eEF3, que não apresenta homólogo em outros organismos. Ainda, esse fator teria um papel na saída do tRNA desacilado do sítio E do ribossomo (TRIANA-ALONSO *et al.* 1995; ANDERSEN *et al.* 2006) e na reciclagem do ribossomo (KURATA *et al.* 2010).

A Figura 2B mostra esquematicamente o processo de término da tradução, que por sua vez, inicia-se com o posicionamento do códon de terminação no sítio A do ribossomo. O fator de terminação eRF1 é responsável pela alta fidelidade de reconhecimento do códon e hidrólise do peptídeo do tRNA. Para a liberação do tRNA, bem como do peptídeo recém sintetizado, ocorre a participação do fator eRF3 (STANSFIELD *et al.* 1995; ZHOURAVLEVA *et al.* 1995; ALKALAEVA *et al.* 2006). Além disso, eRF3 parece estar envolvido no controle da ocupação do sítio A do ribossomo e no bloqueio de uma nova incorporação de tRNA aminoacilado (ATKINSON *et al.* 2008). Por fim, as subunidades ribossomais são recicladas (KAPP and LORSCH 2004).

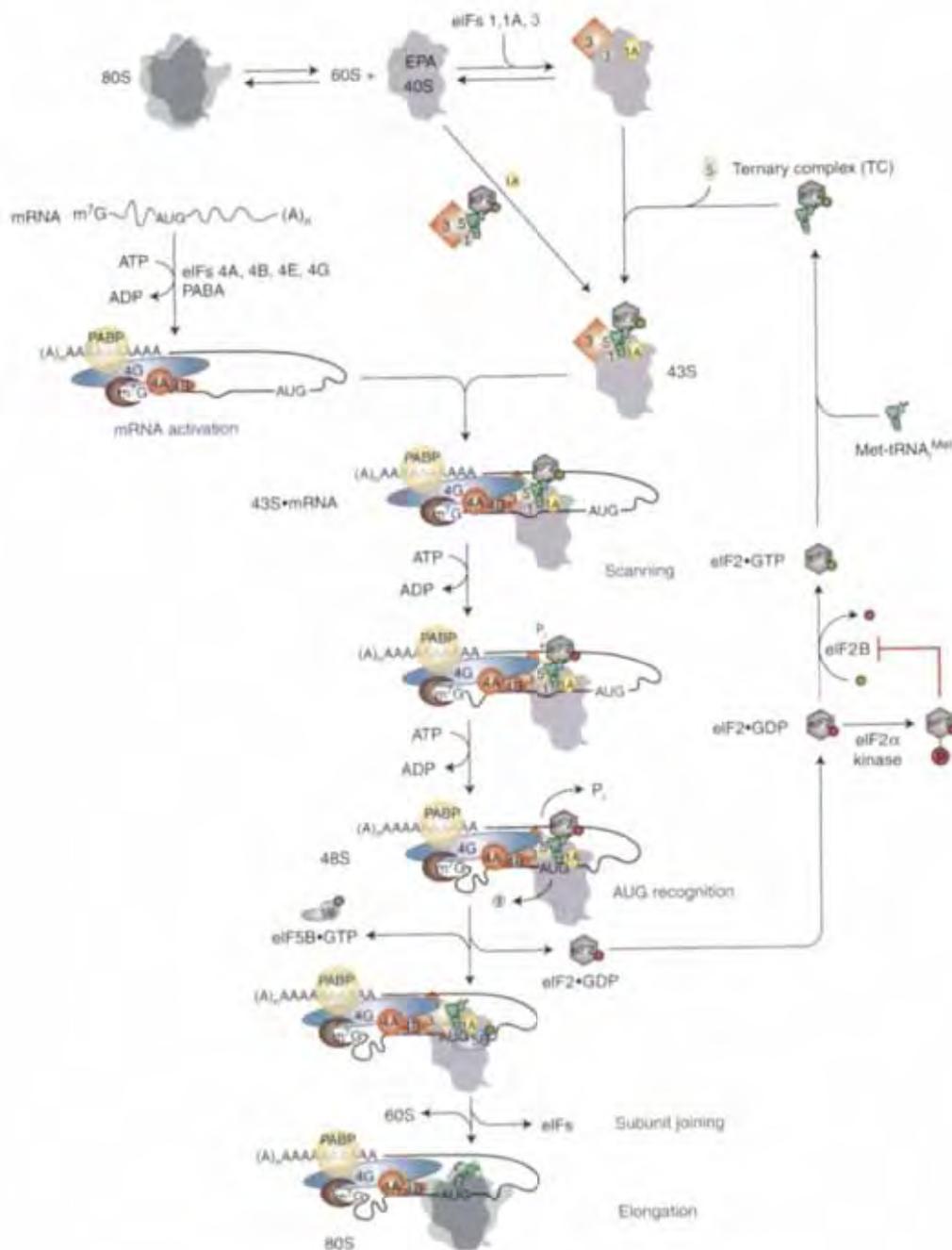


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de início da tradução. Durante a fase de início, o capacete de metilguanósina (m⁷G) do mRNA é associado ao complexo eIF4F, mediado por eIF4E. O complexo de pré-iniciação 43S, composto pelo ribossomo 40S, complexo ternário (eIF2-GTP-tRNA^{Met}), eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3, é recrutado pelas interações entre eIF4G e eIF3, formando o complexo de pré-iniciação 48S. Inicia-se o escaneamento do mRNA até o encontro do primeiro AUG. A subunidade 60S é recrutada para este complexo e fatores de iniciação são liberados. Figura adaptada de HINNEBUSCH 2011 (HERSHEY *et al.* 2012).

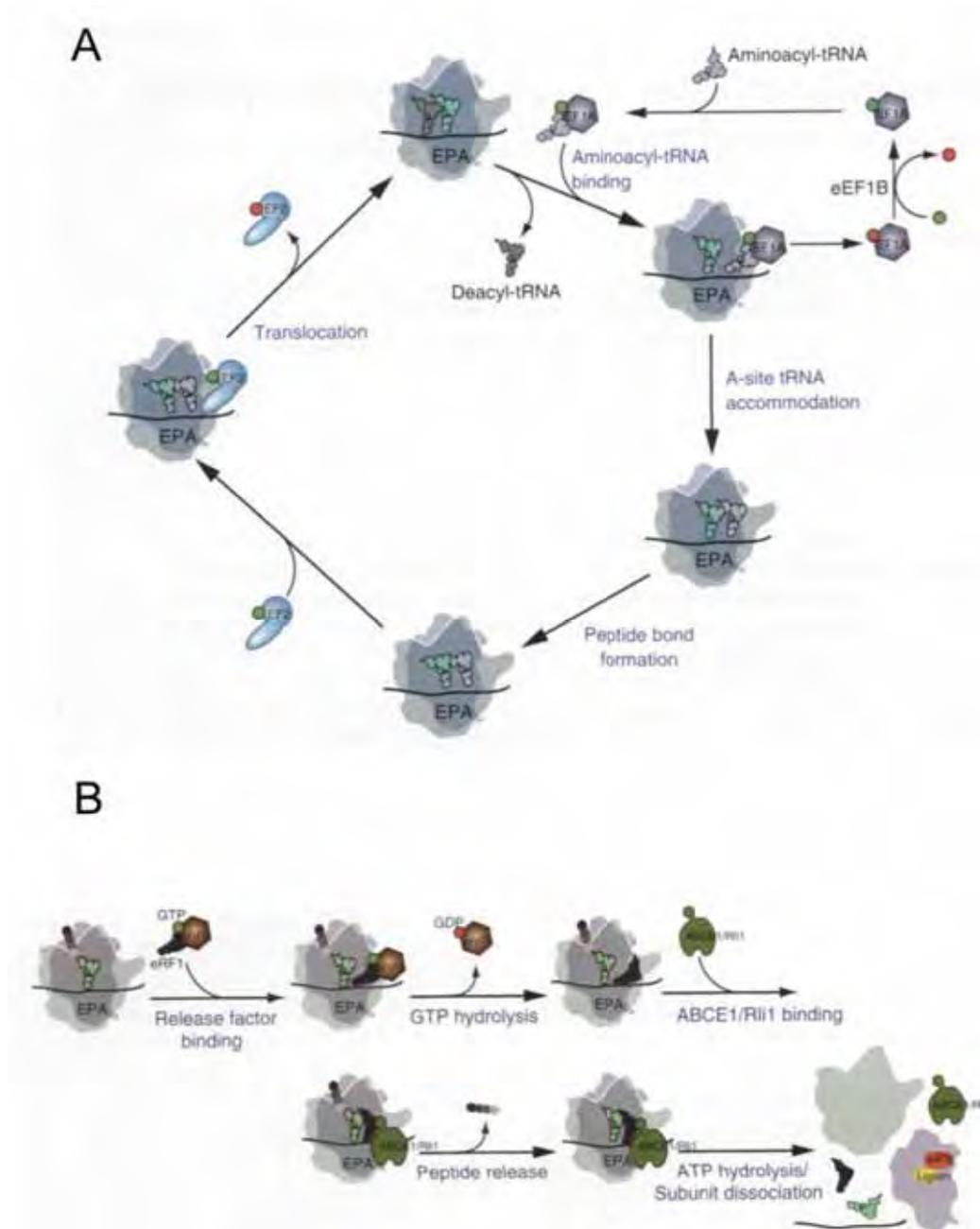


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de elongação e terminação da tradução. (A) A elongação da tradução ocorre por intermediação do fator de elongação eEF1A, que carrega os tRNAs aminoacilados para o ribossomo, e do fator eEF2, que promove a translocação. (B) Quando o códon de terminação é atingido, o fator de liberação eRF1 se liga no sítio A do ribossomo, e o fator eRF3 estimula a hidrólise de GTP e a liberação da cadeia polipeptídica, juntamente com as subunidades 40S e 60S. Figura adaptada de HERSHEY *et al.* 2012.

1.2. eIF5A na tradução

eIF5A é uma proteína pequena, de aproximadamente 17 kDa, e presente tanto em eucariotos quanto em arqueas, mas não em bactérias (PARK *et al.* 1993a; PARK *et al.* 1997; KLIER *et al.* 1993). É uma proteína essencial em todos os organismos testados e altamente conservada evolutivamente (PARK *et al.* 1993a; PARK *et al.* 1997). As proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos compartilham 63% de identidade (SCHNIER *et al.* 1991b; CHEN and LIU 1997), sendo que a proteína de humano substitui a de levedura, o que atesta sua conservação funcional (SCHNIER *et al.* 1991).

Em *S. cerevisiae*, eIF5A é codificado por dois genes homólogos *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*), gerando proteínas com 90% de identidade. Estes genes são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente (SCHNIER *et al.* 1991; WOHL *et al.* 1993; VALENTINI *et al.* 2002). Estudos utilizando linhagens expressando apenas *TIF51A* (presente no cromossomo V) ou *TIF51B* (presente no cromossomo X), sob o controle de um promotor induzível por galactose, mostraram que a expressão tanto de um gene quanto de outro é suficiente para manter o crescimento celular nas situações de aerobiose ou anaerobiose, indicando que os produtos desses dois genes possuem função indistinguível (SCHWELBERGER *et al.* 1993). Em humano, eIF5A também é codificado por diferentes genes, *EIF5A1* e *EIF5A2*, os quais são filogeneticamente conservados e presentes nos vertebrados (JENKINS *et al.* 2001). Ambas isoformas de humano são capazes de substituir a proteína de levedura (SCHNIER *et al.* 1991; CLEMENT *et al.* 2006).

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional específica e exclusiva chamada de hipusinação (CHEN and LIU 1997; PARK *et al.* 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês hypusine: hydroxyputrescine-lysine) ocorre através da transferência de um grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica, catalizada pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*; DHPS em humano), logo que a proteína é sintetizada. Em seguida, a hidroxilação deste grupo pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*; DOHH em humano) termina a maturação de eIF5A (PARK *et al.* 2010) (Figura 3). O aminoácido hipusina não é removido ou modificado até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade do processo (PARK *et al.* 1993b). 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). O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação evidencia uma atividade biológica fundamental para este fator. A importância da hipusinação para a atividade de eIF5A no processo de tradução foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina. Entretanto, quando este precursor foi modificado *in vitro* para a forma hipusinada, a proteína resultante tornou-se ativa neste ensaio (PARK 1989; SMIT-McBRIDE *et al.* 1989).

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 1X6O), 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 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). De fato, dois trabalhos publicados tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém a extensão de tais estudos ainda necessita ser ampliada para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (XU and CHEN 2001; XU *et al.* 2004).

eIF5A foi inicialmente considerado um fator de início da tradução em eucariotos (ekaryotic translation initiation factor 5A) (BENNE and HERSHEY 1978) por estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (BENNE and HERSHEY 1978). O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de metionil-tRNA^{Met}, à puromicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes fatores no início da tradução. A Figura 4A mostra esquematicamente a estrutura da puromicina e a sua incorporação à cadeia polipeptídica, pela atividade peptidil-transferase do ribossomo. A Figura 4B representa o ensaio de metionil-puromicina *in vitro*. 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 também testados: eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5 (BENNE and HERSHEY 1978). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

Dados recentes da associação de eIF5A com ribossomos ativamente engajados na tradução fortalecem o envolvimento desta proteína na síntese proteica (JAO and CHEN 2006; ZANELLI *et al.* 2006). Ensaios de co-purificação seguidos de identificação por espectrometria de massas revelaram que eIF5A interage com as proteínas ribossomais P0, S5 e L11 e com eEF2, componentes da maquinaria de tradução (ZANELLI *et al.* 2006). Além disso, defeitos observados em mutantes sensíveis a temperatura, quando cultivados na temperatura não permissiva, 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 (GREGIO *et al.* 200b). Ainda, foi verificado que os mesmos mutantes apresentam um atraso significativo no tempo de trânsito ribossomal (GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009). 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. Este efeito sobre os *P-bodies* também é consistente com um papel de eIF5A na fase de elongação de tradução (GREGIO *et al.* 2009). Além desses resultados, um mutante condicional de eIF5A tem seus defeitos de crescimento, síntese proteica e perfil polissomal suprimidos pelo aumento da expressão de eEF2, revelando uma relação funcional próxima entre eIF5A e eEF2 (DIAS *et al.* 2012). Estes dados sugerem um papel para eIF5A na etapa de elongação da tradução, no entanto, o mecanismo molecular pelo qual eIF5A afeta a tradução e se este efeito afeta a tradução global ou de um grupo específico de mRNAs, como tratado a seguir, são questões ainda em aberto.

Apesar de bactéria não possuir eIF5A, seu homólogo estrutural em bactéria é o fator de elongação da tradução EF-P. A Figura 5A mostra que EF-P possui 3 domínios (azul) e eIF5A somente 2 (amarelo), sendo os domínios I e II de EF-P sobreponível aos domínios N-terminal e C-terminal de eIF5A, respectivamente (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004). A Figura 5B mostra o grau de conservação dos

resíduos de aminoácidos entre eIF5A e EF-P (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004). EF-P possui efeito estimulatório na formação de ligações peptídicas, sendo considerado um fator de alongação da tradução (GLICK and GANOZA 1975). Apesar de EF-P não ser totalmente essencial para a viabilidade celular (BULLWINKLE *et al.* 2012), como eIF5A, EF-P é capaz de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* e tem sua função alterada por inibidores da atividade peptidil-transferase do ribossomo (GANOZA *et al.* 2002), assim como eIF5A (BENNE and HERSHEY 1978). 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 *ribosome stalling motifs*, seqüências de parada da tradução durante a alongação (DOERFEL *et al.* 2013; UDE *et al.* 2013).

Uma vez definido o envolvimento de eIF5A na tradução, é essencial a determinação do mecanismo de ação desse fator a partir da definição do tipo de complexo ribossomal ao qual eIF5A se liga, bem como dos locais de interação no ribossomo. Considerando que muitos dos mecanismos de tradução em eucarioto derivam da análise em modelos de procariotos (RODNINA and WINTERMEYER 2009), devido ao alto grau de conservação do processo ao longo da evolução, o conhecimento que se tem hoje sobre EF-P é um ponto de partida para essa análise. Apesar de os ensaios de co-cristalização, ressonância magnética nuclear (RMN) e crio-microscopia eletrônica de complexos ribossomais se tornarem cada vez mais frequentes para procariotos, esses ensaios ainda não são primeira escolha para eucariotos (AGIRREZABALA *et al.* 2012; DÖNHÖFER *et al.* 2012; GREBER *et al.* 2012). Sendo assim, outros ensaios de ligação direta de fatores de tradução no ribossomo, como os de anisotropia de fluorescência e de clivagem induzida de rRNA têm contribuído muito para a determinação estrutural e mecanística de formação dos complexos ribossomais em eucariotos (NOLLER *et al.* 1995; DINMAN 2009). Esses ensaios permitem dizer a afinidade de ligação dos fatores nos complexos ribossomais e a localização dessas interações.

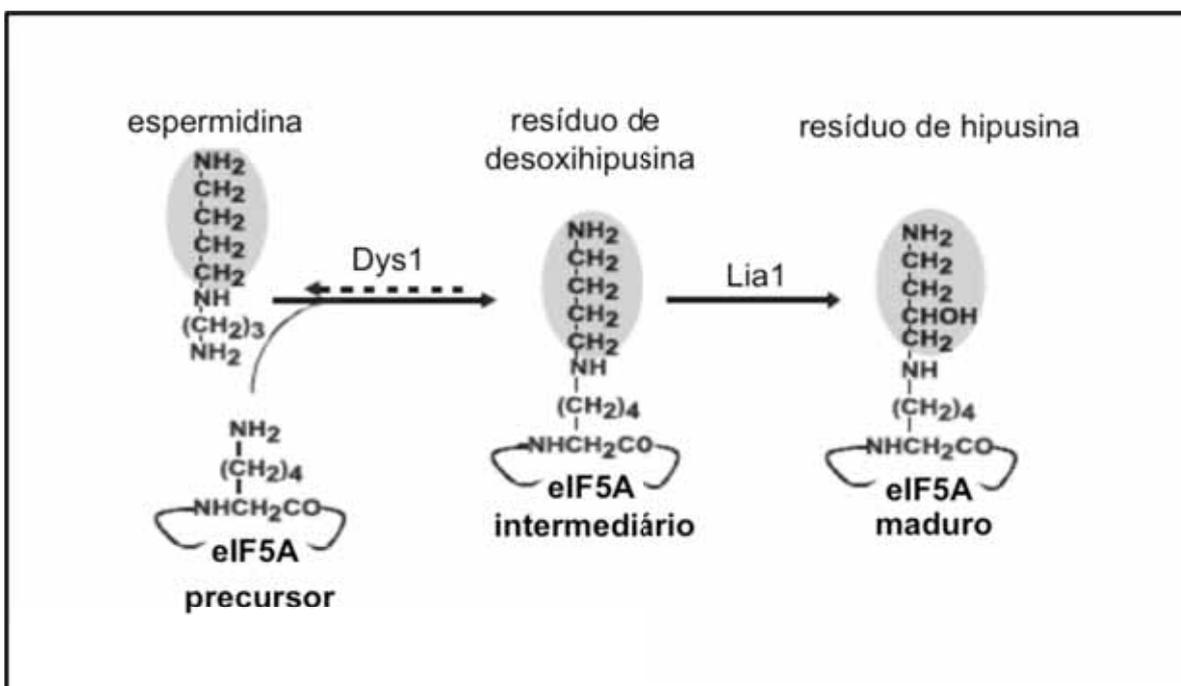


Figura 3. Esquema da modificação pós-traducional de eIF5A. O grupo aminobutil da poliamina espermidina é transferido para o aminogruppo do resíduo específico de lisina, pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1). Posteriormente, o intermediário de eIF5A é hidroxilado, pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1), formando assim eIF5A hipusinado e ativo. Figura adaptado de PARK 2006.

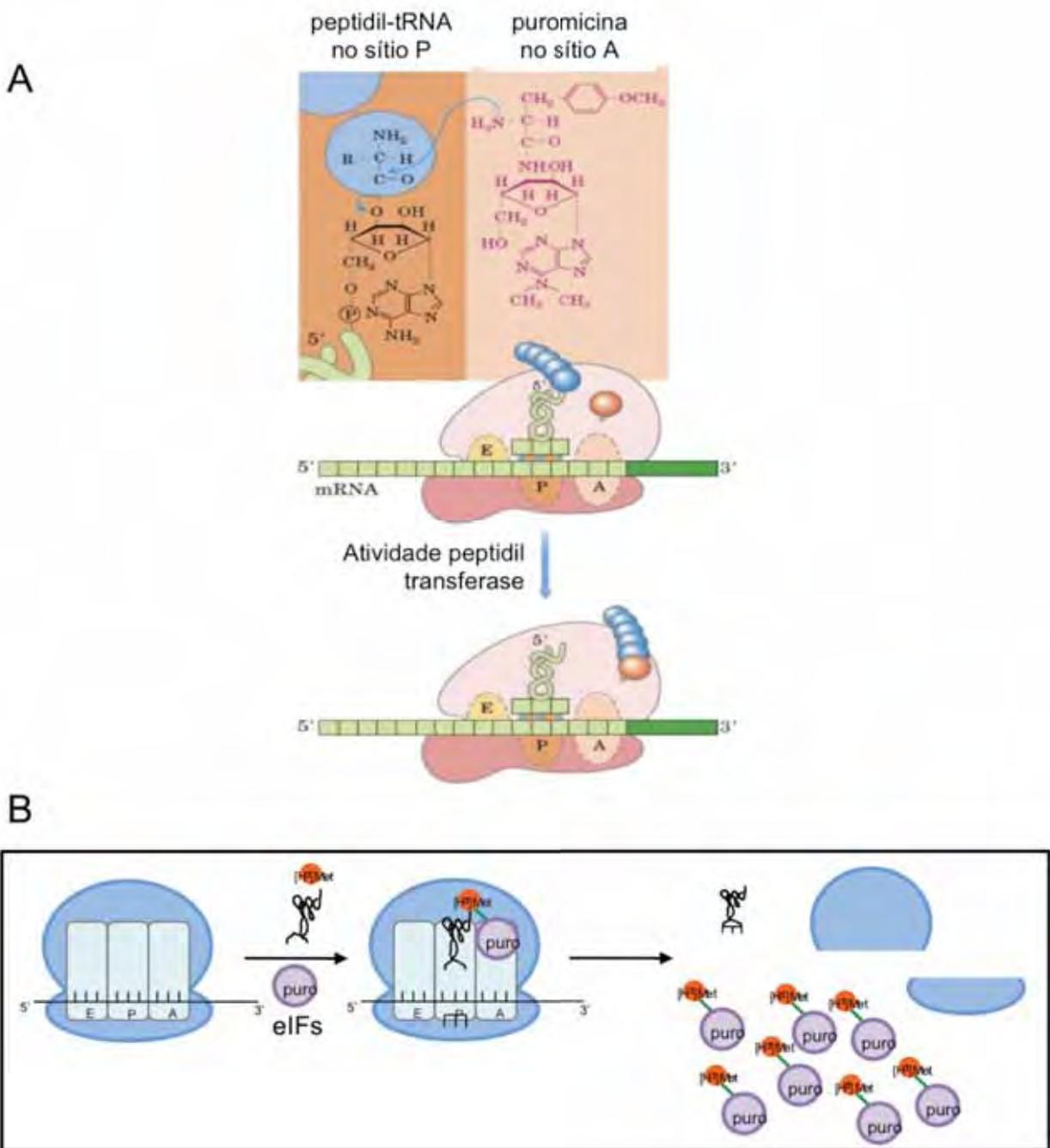


Figura 4. Representação esquemática do ensaio de metionil-puromicina. (A) Estruturas do peptidil-tRNA no sítio P e puromicina no sítio A, e a incorporação de uma molécula de puromicina à cadeia peptídica pela atividade peptidil-transferase do ribossomo (NELSON AND COX, 2004). **(B)** Esquema do ensaio de metionil-puromicina *in vitro* pela incorporação de metionina radioativa à uma molécula de puromicina, a partir de $tRNA_i^{Met}$.

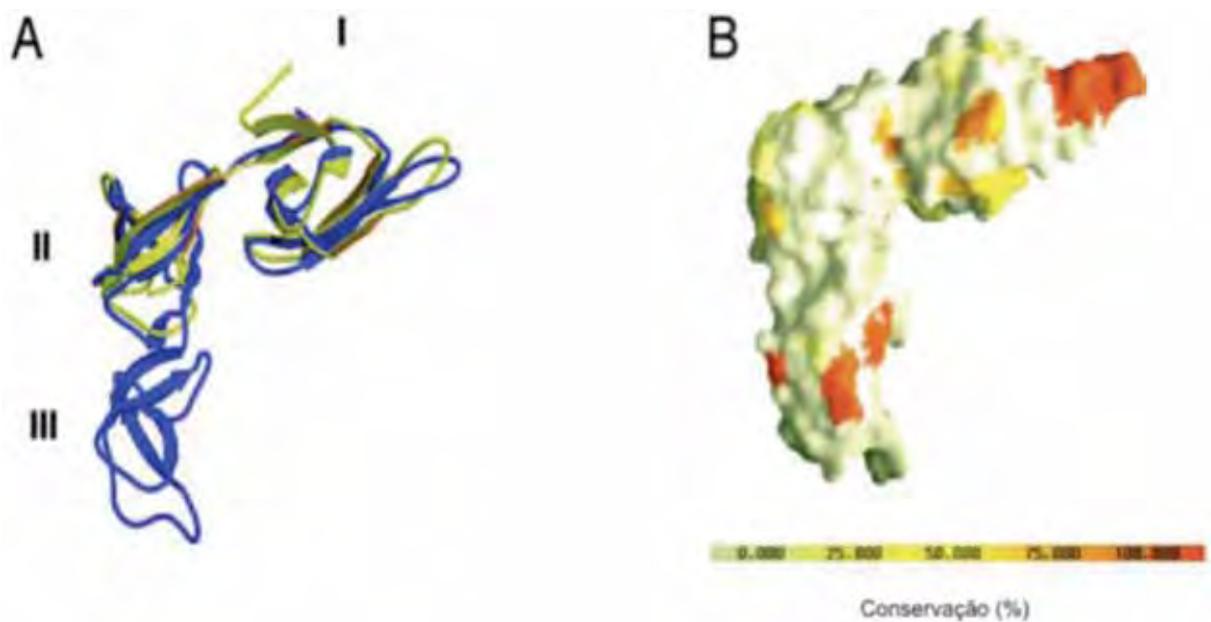


Figura 5. Comparação das estruturas tridimensionais de eIF5A de archea (aIF5A) e EF-P. (A) Estrutura de eIF5A (marcado em amarelo) mostrando os domínios I (N-terminal) e II (C-terminal) em sobreposição com os domínios I e II da estrutura de EF-P (marcado em azul). **(B)** Conservação dos resíduos de aminoácidos entre eIF5A e EF-P (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004).

1.3. eIF5A na progressão do ciclo celular

eIF5A também foi envolvido com a progressão no ciclo celular em diferentes organismos. Em *S. cerevisiae*, verificou-se que a depleção de eIF5A leva a um aumento de células na fase G1, sugerindo um papel de eIF5A na progressão do ciclo celular (KANG and 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 atue como um fator de tradução seletivo para um subgrupo específico de mRNAs, que codificam para proteínas envolvidas com progressão do ciclo celular (KANG and HERSHEY 1994; PARK *et al.* 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). Mais recentemente, utilizando mutantes condicionais de eIF5A em *S. cerevisiae*, foram isolados, em um rastreamento de alto número de cópias em nosso laboratório, fatores envolvidos com a correta morfologia celular durante a transição G1/S e estes mutantes condicionais apresentam defeito na polarização do citoesqueleto de actina, a qual é essencial para a transição G1/S nesse organismo (ZANELLI and VALENTINI 2005).

Ainda, reforçando os dados de correlação funcional de eIF5A com a proliferação celular, foi descoberto em nosso laboratório o envolvimento de eIF5A com via secretória (FRIGIERI *et al.* 2007). Em um rastreamento de letalidade sintética com um mutante de eIF5A (*tif51A-3*), foi isolado um mutante do gene *YPT1*, cujo produto Ypt1 (yeast protein transport 1) é essencial por atuar na fusão de vesículas do retículo endoplasmático (RE) no Complexo de Golgi (SEGEV 2001). A identificação da letalidade sintética entre *TIF51A* e *YPT1* revela uma conexão entre tradução e crescimento polarizado, sugerindo que o trabalho em conjunto dessas proteínas garanta a síntese e secreção proteica para a correta formação do broto durante o ciclo celular (FRIGIERI *et al.* 2008).

O envolvimento de eIF5A na via secretória por interação genética com Ypt1,

bem como por apresentar-se ligado a frações de membrana (FRIGIERI *et al.* 2008), levou à análise de transporte vesicular em mutantes de eIF5A. Os resultados obtidos revelaram que mutantes de eIF5A, diferentemente de mutantes de Ypt1, não apresentam defeito no trânsito vesicular (FRIGIERI *et al.* 2008). Assim, apesar da correlação funcional entre Ypt1 e eIF5A e da presença de eIF5A na fração de membranas, eIF5A não deve agir diretamente no transporte de vesículas.

Muitas proteínas que sofrem modificação pós-traducional, as que residem em compartimentos celulares (RE, Golgi, vacúolo, etc) e membranas, bem como as direcionadas para o broto, precisam ser direcionadas ao RE. O direcionamento, por sua vez, pode ocorrer após o término da síntese da cadeia polipeptídica (via pós-traducional) (Figura 6A) ou concomitantemente à tradução (via co-traducional) (RAPOPORT *et al.* 1999; KEENAN *et al.* 2001) (Figura 6B). Na via pós-traducional, mais comum em eucariotos inferiores (MATHEUS *et al.* 2007), o direcionamento de proteínas para o RE ocorre sem o auxílio de SRP (Signal Recognition Particle) (DESHAIES and SCHEKMAN 1989; ROTHBLATT *et al.* 1989; RAPOPORT *et al.* 1999). Neste caso, chaperonas são requeridas para manter o peptídeo nascente em estado desnaturado no citoplasma, para que este possa passar através do translocon, formado pelos complexos multiproteicos Sec61 e Sec62/Sec63, para atingir o lúmen do RE (CHIRICO *et al.* 1988; CAPLAN *et al.* 1992) (Figura 6A). E ao atingir o RE outras chaperonas, como Kar2, também auxiliam no correto enovelamento proteico (Figura 6A).

Por outro lado, a translocação da proteína para o RE mediado pelo complexo SRP, cujo receptor está localizado na membrana do RE (NG *et al.* 1996), ocorre assim que o peptídeo nascente emerge do ribossomo. Assim, SRP liga-se a uma sequência específica de aminoácidos no próprio peptídeo nascente, conhecida como sequência sinal. Esta ligação promove uma parada na elongação até que o complexo de SRP ligada a ribossomo/mRNA/peptídeo nascente (RNC – Ribosome-Nascent Chain Complex) seja direcionado ao RE e ocorra ligação ao translocon, conhecido como complexo Sec61 (NG *et al.* 1996). Este complexo é responsável pela formação de um canal na membrana do RE, que permite a translocação da proteína para o lúmen da organela (JOHNSON and VAN WAES 1999) (Figura 6B).

Levando em consideração o envolvimento de eIF5A na tradução e o reflexo de seu papel na correlação com via secretória e ciclo celular, é possível que eIF5A tenha uma atuação essencial no encontro entre síntese proteica e via secretória, no RE, isto é, um papel na tradução específica, envolvendo proteínas que necessitam da via secretória, como os componentes de membrana e parede e, principalmente, as

que são direcionadas ao broto. Com o objetivo de elucidar estas questões, este trabalho buscou entender o papel de eIF5A na translocação de proteínas para o RE e na expressão gênica diferencial por análise proteômica, utilizando diferentes mutantes que apresentam defeito em eIF5A.

Ainda, para a melhor compreensão do papel de eIF5A na tradução, é muito importante a definição do local de ligação de eIF5A no ribossomo. Como apresentado anteriormente, o modelo atual de muitos dos mecanismos de início e alongação da tradução é derivado do conhecimento estrutural dos complexos formados entre os fatores de tradução e o ribossomo. Dessa forma, este trabalho também abordou o estudo da ligação direta de eIF5A no ribossomo por ensaios de anisotropia de fluorescência e de clivagem local induzida de rRNA, utilizando mutantes de cisteína única de eIF5A.

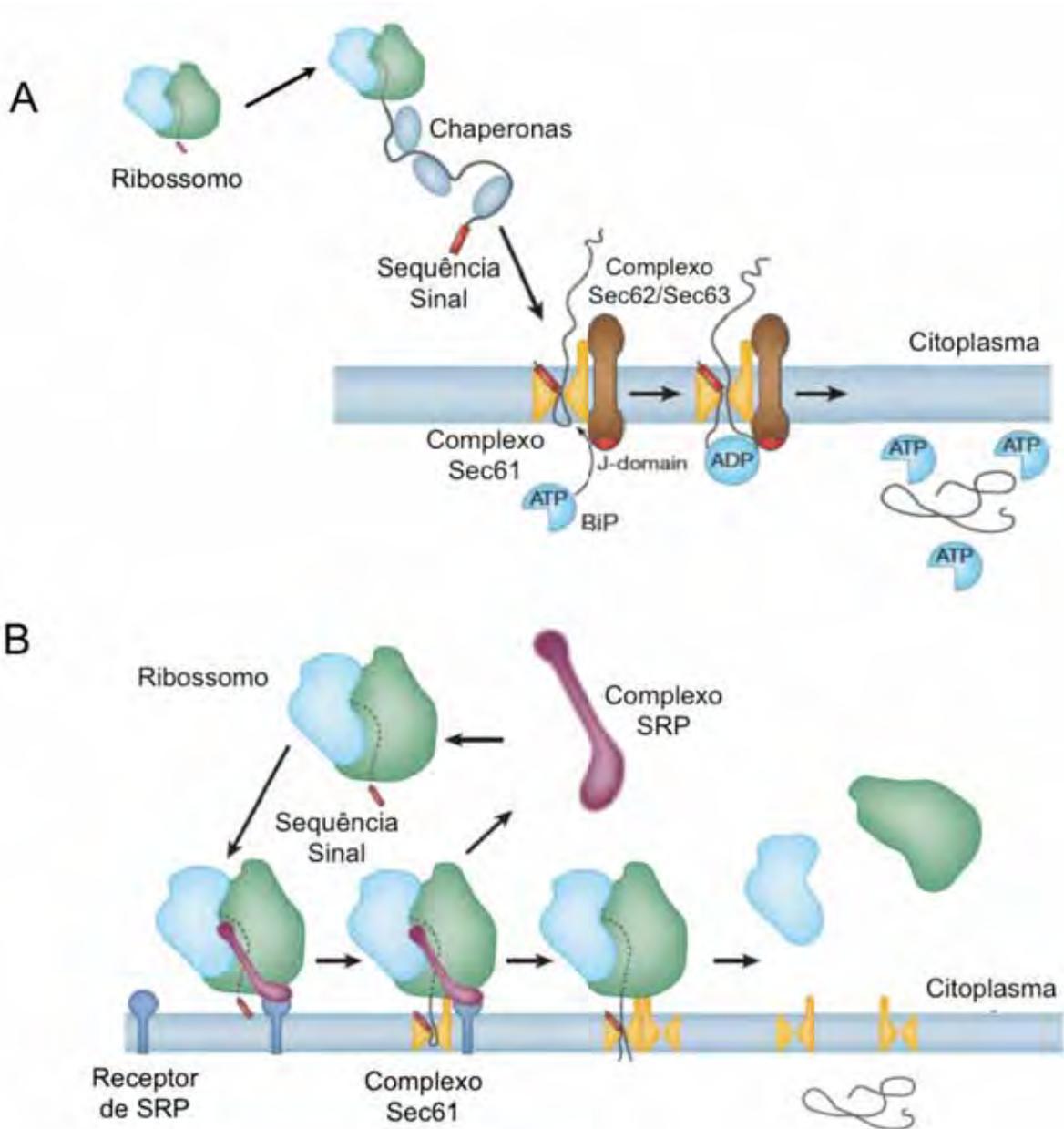


Figura 6. Representação esquemática da translocação de proteínas para o retículo endoplasmático (RE). (A) Via pós-traducional. Chaperonas ligam-se à cadeia polipeptídica enquanto está sendo sintetizada. Após o término da tradução, o polipeptídeo é direcionado para o RE e, através do translocon (complexo Sec61 associado ao complexo Sec62/63), a proteína passa para o lúmen do RE onde é corretamente enovelada, com gasto energético. (B) Via co-traducional. A sequência sinal sintetizada sinaliza para ligação com o complexo SRP (signal recognition particle), que executa uma parada temporária na elongação da tradução até que o complexo RNC (ribosome-nascent-chain) seja direcionado ao RE. O complexo SRP promove a interação ribossomo-translocon, composto por complexo Sec61, por interagir com seu receptor, adjacente ao translocon. Uma vez ligado ao translocon, o ribossomo re-inicia a elongação da tradução e a proteína recém sintetizada é direcionada ao lúmen do RE, onde assume sua conformação tridimensional adequada Figura adaptada de RAPOPORT 2007.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel de eIF5A na tradução específica, pela análise da translocação de proteínas para o retículo endoplasmático (RE) e da expressão gênica diferencial em nível traducional, bem como determinar os pontos de ligação direta de eIF5A ao ribossomo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1. Estudo do papel de eIF5A na translocação de proteínas para o RE e na expressão gênica diferencial em nível traducional:

- 2.1.1.1. Análise de repórteres de translocação das vias pós-traducional e co-traducional em mutantes de eIF5A;
- 2.1.1.2. Análise da interação genética entre mutantes de eIF5A e proteínas envolvidas na via co-traducional de translocação;
- 2.1.1.3. Análise da expressão gênica diferencial em nível traducional, por análise proteômica de mutante que apresenta defeito de eIF5A;
- 2.1.1.4. Análise da correlação funcional entre Asc1, Dys1 e eIF5A, por ensaios de interação genética.

2.1.2. Estudo da interação física direta de eIF5A com ribossomo *in vitro*:

- 2.1.2.1. Obtenção de mutantes de cisteína única de eIF5A e outros componentes do início de tradução (fatores de tradução, ribossomos, tRNA);
- 2.1.2.2. Identificação do complexo ribossomal ao qual eIF5A se liga por ultracentrifugação;
- 2.1.2.3. Definição da constante de dissociação entre eIF5A e o ribossomo por anisotropia de fluorescência;
- 2.1.2.4. Início do mapeamento dos pontos de ligação direta de eIF5A no ribossomo pelo ensaio de clivagem induzida de rRNA, utilizando mutantes de cisteína única de eIF5A complexo com ribossomo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

As Tabelas 1 e 2 descrevem todos as linhagens de *S. cerevisiae* e plasmídeos utilizados neste trabalho, respectivamente. As Tabelas 3.1 e 3.2 descrevem os oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento de DNA, clonagem, *primer extension* e mutações sítio-dirigidas. Por fim, a Tabela 4 descreve a composição química dos tampões utilizados.

Tabela 1 - Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Origem
SVL14	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i> <i>tif51A-1</i>	Coleção do laboratório
SVL32	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i> <i>tif51A-3</i>	Coleção do laboratório
SVL82 (W303)	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Pamela Silver
SVL132	<i>MAT_α leu2 ura3 his3 tif51A::HIS3</i> [<i>TIF51A/URA3/CEN</i> - pSV138]	Coleção do laboratório
SVL272 (BY4741)	<i>MAT_a leu2 ura3 his3 met15</i>	Coleção do laboratório
SVL453	<i>MAT_α leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3</i> (pSV526)	Coleção do laboratório
SVL613	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3</i> (pSV520)	Coleção do laboratório
SVL614	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3</i> (pSV730)	Coleção do laboratório
VZL959 (DNY66)	<i>MAT_α ura3 leu2 his3 trp1 ade2 sec62-101</i> [<i>S SCPY-URA3/HIS3/CEN</i>] (pVZ1064)	Davis Ng
VZL961 (DNY116)	<i>MAT_α ura3 leu2 his3 trp1 ade2 sec61-101</i> [<i>S SCPY-URA3/HIS3/CEN</i>] (pVZ1064)	Davis Ng
VZL1021	<i>MAT_α ura3 leu2 his3 trp1 ade2 sec61-101</i>	Este trabalho
VZL1074	<i>MAT_a his3 leu2 ura3::CMV-tTA</i>	Coleção do

(TH2639 modificada)	¹ kanR-tetO ₇ -TATA-TIF51A	laboratório
VZL1103 (GP3511)	<i>MATα ura3 leu2 gcn2Δ pep4::LEU2 sui2Δ</i> [<i>SUI2, SUI3, 6xHis-GCD11/URA3/2μ</i>]	Jon Lorsch
VZL1104 (LPY201)	<i>MATα ura3 leu2 prt1::kanMX4</i> [6xHis-PRT1/URA3/2 μ]	Jon Lorsch
VZL1133	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 asc1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
VZL1134	<i>MATα ura3 his3 trp1 leu2 met15</i> <i>asc1::kanMX4 dys1::HIS3 (pSV526)</i>	Este trabalho
VZL11378	<i>MATα ura3 his3 trp1 leu2 met15</i> <i>asc1::kanMX4 tif51A::HIS3</i> [TIF51A/URA3/CEN - pSV138]	Este trabalho
VZL1181	<i>MATα ade2 leu2 srp102::URA3</i> [<i>srp102^{K51I}/TRP/CEN</i>]	Peter Walter
VZL1235	<i>MATα his3 leu2 ura3 ssh1::kanMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1247 (CSY150)	<i>MATα leu2 ura3 trp1 his4 sec61-3</i>	Colin J. Stirling
VZL1248 (CSY126)	<i>MATα ura3 ade2 trp1 leu2 his3 sec65-1</i>	Colin J. Stirling
VZL1249	<i>MATα ura3 his3 leu2 trp1 pep4::HIS3 prb1</i> <i>can1</i>	Wolf-Dietrich Heyer

¹ kanR-tetO₇-TATA corresponde ao cassete contendo o promotor Tet (reprimível por tetraciclina) e a marca de resistência a geneticina (G418), kanR

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Características	Origem
pSV57 (pRS313)	<i>CEN, HIS3</i>	Coleção do Laboratório
pSV58 (pRS314)	<i>CEN, TRP1</i>	Coleção do Laboratório
pSV59 (pRS315)	<i>CEN, LEU2</i>	Coleção do Laboratório
pSV60 (pRS316)	<i>CEN, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV63 (pRS424)	<i>2μ, TRP1</i>	Coleção do Laboratório
pSV65 (pRS426)	<i>2μ, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV107	<i>TIF51A, 2μ, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV138	<i>TIF51A, CEN, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV139	<i>tif51A-1, CEN, LEU2</i>	Coleção do Laboratório
pSV146	<i>TIF51A, CEN, LEU2</i>	Coleção do Laboratório
pSV364 (YEp352)	<i>2μ, URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV374 (YEp351)	<i>2μ, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV520	<i>DYS1, TRP1, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV526	<i>DYS1, CEN, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV550 (pYES2)	<i>¹GAL1p, 2μ, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV730	<i>dys1-1, CEN, TRP1</i>	Coleção do Laboratório

pVZ975	<i>GAL1p-TIF51A, 2μ, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pVZ1009 (pST39)	<i>Amp^r</i>	Song Tan
pVZ1011	<i>pST39-EIF5A1-DHPS-DOHH</i>	Coleção do Laboratório
pVZ1012	<i>pST39-eif5a1^{K50R}-DHPS-DOHH</i>	Coleção do Laboratório
pVZ1025	<i>GAL1p-EIF5A1, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1047	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/C73A}C129, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1048	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/C129S}C73, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1049	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/C73A/C129S}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1050	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/V41C/C73A/C129S}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1051	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/V56C/C73A/C129S}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1052	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/C73A/G97C/C129S}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1053	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/G35C/C38A/C73A/C129S}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1054	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/C73A/C129S/T142C}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1064 (pDN106)	<i>²S SCPY-URA3, HIS3, CEN</i>	Davis Ng
pVZ1073	<i>GAL1p-eif5a^{C22A/C38A/C73A/C129S/L102C}, 2μ, URA3</i>	Este trabalho
pVZ1088	<i>pST39-6xHis-TIF51A-DYS1-LIA1</i>	Coleção do Laboratório
pVZ1110 (BG1805-ura3-DAP2)	<i>GAL1p-DAP2-6xHis-HA-Protease C site-ProtA, 2μ, URA3</i>	Open Biosystem
pVZ1142 (4891)	<i>pET24b-6xHis-DHPS</i>	John Hershey
pVZ1150	<i>pET28a-metionil-tRNA^{Met} sintetase de humano</i>	John Hershey
pVZ1171	<i>pUC19-tRNA_i^{Met} de <i>S. cerevisiae</i></i>	Jon Lorsch
pVZ1172	<i>pTYB2-6xHis-SUI1 (gene que codifica eIF1)</i>	Jon Lorsch

pVZ1173	pTYB2-6xHis- <i>TIF11</i> (gene que codifica eIF1A)	Jon Lorsch
pVZ1174	pTYB2-6xHis- <i>TIF5</i> (gene que codifica eIF5)	Jon Lorsch
pVZ1176	pMGA-6xHis-TEV site- <i>fun12</i> truncado (gene que codifica eIF5B)	Jon Lorsch
pVZ1246	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/C73A} C129-DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1247	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/C129S} C73-DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1248	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/C129S/C73A} DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1249	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/V56C/C73A/C129S} -DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1250	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/C73A/G97C/C129S} -DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1251	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/C73A/C129S/L102C} -DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1252	<i>pST39-eif5a</i> ^{C22A/C38A/C73A/C129S/T142C} -DHPS-DOHH	Este trabalho
pVZ1343	<i>pST39-tif51A</i> ^{C39A} C23-DYS1-LIA1	Este trabalho
pVZ1359 (pMW295)	<i>SEC65, SRP21, SRP72, 2μ, URA3</i>	Colin J. Stirling
pVZ1360 (pMW299)	<i>SCR1, SRP14, SRP54, SRP68, 2μ, LEU2</i>	Colin J. Stirling
pVZ1367	<i>GAL1p-tif51A</i> ^{C39A} C23	Este trabalho

¹ *GAL1p* corresponde ao promotor de *GAL1* (induzível por galactose).

² SSCPYPY - sequência sinal de CPY (gene *PRC1*) em fase com *URA3*.

Tabela 3.1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento, clonagem e *primer extension*

Oligonucleotídeo	Sequencia (5'-3')	Sítio de restrição ¹
SVO76 (T7 promoter)	GTAATACGACTCACTATAGGGC	-
VZO669	CGC GGATCC ATGGGATCACACCACCACCACCA CCACGCAGATGACTTGGACTTCGAGACAGGAG	<i>Bam</i> HI
VZO670	CCG GAATTC TTATTTTGGCCATGGCCTTGATTGC	<i>Eco</i> RI
VZO1264	ATGTGCCGCCCCAGCCAAACTCCCC	-
VZO1268	GTAACATTCATCAGTAGGGTAAAAC	-

¹ Os sítios de restrição estão representados em negrito

Tabela 3.2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas mutações sítio-dirigidas

Oligonucleotídeo	Sequencia (5'-3')	Gene/mutação
VZO661	GCCACCTTCCCAATGCAGGCCTCAGCATTAC GTAAG	<i>EIF5A1/C22A</i>
VZO662	GCCATTCTTACGTAATGCTGAGGCCTGCATTG GGAAGG	<i>EIF5A1/C22A</i>
VZO663	CTCAAAGGCCGGCCAGCTAAGATCGTCGAGA TG	<i>EIF5A1/C38A</i>
VZO664	CTCGACGATCTTAGCTGGCCGGCCTTTGAGC AC	<i>EIF5A1/C38A</i>
VZO665	GGGAAGAAATATGAAGATATCGCCCCGTCAA CTCATAA	<i>EIF5A1/C73A</i>
VZO666	GAGCAGAAGTACGACTCTGGAGAAGAGATCC TGATC	<i>EIF5A1/C73A</i>
VZO667	GATCTCTTCTCCAGAGTCGTA CTTCTGCTCAA TCTCC	<i>EIF5A1/C129S</i>
VZO668	GGACATCCATATTATGAGTTGACGGGGCGAT ATCTTCATATT	<i>EIF5A1/C129S</i>

VZO677	GGCCATGTAAGATCTGCGAGATGTCTAC	<i>EIF5A1/V41C</i>
VZO678	CGAAGTAGACATCTCGCAGATCTTACATG	<i>EIF5A1/V41C</i>
VZO679	GGCCACGCCAAGTGCCATCTGGTTGGTATTG	<i>EIF5A1/V56C</i>
VZO680	CAACCAGATGGCACTTGGCGTGGCCGTG	<i>EIF5A1/V56C</i>
VZO681	GGTGCTCAAATGCCGGCCATGTAAGATC	<i>EIF5A1/G35C</i>
VZO682	CTTACATGGCCGGCATTGAGCACCACAAAG	<i>EIF5A1/G35C</i>
VZO683	CATCCAGGATTGCTACCTATCACTGCTCC	<i>EIF5A1/G97C</i>
VZO684	GTGATAGGTAGCAATCCTGGATGCCAATC	<i>EIF5A1/G97C</i>
VZO685	GTCTGCCATGTGCGAGGAGGCAGCTGTTG	<i>EIF5A1/T142C</i>
VZO686	CTGCCTCCTCGCACATGGCAGACAGCAC	<i>EIF5A1/T142C</i>
VZO706	GATGGGTACCTATCACTGTGCCAGGACAGCG GGG	<i>EIF5A1/L102C</i>
VZO707	GTACCTCCCCGCTGTCCTGGCACAGTGATAG GTAC	<i>EIF5A1/L102C</i>
VZO1261	CAAGAGTAGACCAGCTAAGATTGTCGACATG TCCAC	<i>TIF51A/C39A</i>
VZO1262	GTCGACAATCTTAGCTGGTCTACTCTTGATGA CAACG	<i>TIF51A/C39A</i>

Tabela 4. Composição dos tampões utilizados neste trabalho

Tampão	Composição
TE	Tris 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0
Tampão de Lise 1	Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM e EDTA 1mM
PBS	Na ₂ HPO ₄ 0,1 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM pH 7,4, NaCl 1,4 mM, KCl 2,7 mM
PBST	PBS 1x, 0,25% Tween-20
Tampão de Lise 2	Tris 10 mM pH 7,5, uréia 7,7 M, tiouréia 2,2 M, chaps 4,4 %, inibidores de protases ¹
Tampão de Equilíbrio	Tris-HCl 50mM pH8,8, uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%
TAE	Tris 40 mM, ácido acético 0,11% e EDTA 1 mM
Tampão de Amostra	azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%
Tampão de Lise 3	50 mM de Tris-Cl pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, inibidores de proteases
Tampão A1	50 mM de Tris-Cl pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% de glicerol
Tampão B1	Tampão A1 contendo 1 M de KCl
Tampão A2	50 mM de Tris-Cl pH 7,0, 300 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 30 mM de imidazol
Tampão B2	Tampão A2 contendo 300 mM de imidazol
Tampão de Transcrição	40 mM Tris-Cl pH 8,1, 0,01% Triton X-100, 30 mM MgCl ₂
Tampão de Lise-Inteín	20 mM Hepes pH 7,4, 500 mM KCl pH 7,6, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA, inibidores de proteases
Tampão de Lavagem-Inteín	Tampão de Lise-Inteín acrescido de 1 M de KCl sem inibidores de protease
Tampão Eluição-Inteín	20 mM Hepes pH 7,4, 500 mM KCl, 1 mM EDTA, 75 mM DTT
Tampão A3	20 mM Hepes pH 7,6, 100 mM KCl, 10% de glicerol, 2 mM de DTT
Tampão B3	Tampão A3 contendo 1 M de KCl

Tampão de Estoque 1	20 mM Hepes pH 7,6, 100 mM KOAc pH 7,6, 0,1 mM Mg(OAc) ₂ , 10% glicerol, 2 mM DTT
Tampão de Lise 4	75 mM Hepes pH 7,6, 100 mM KCl, 100 μM GDP•Mg ²⁺ , 10 mM BME, inibidores de proteases
Tampão A4	20 mM Hepes pH 7,6, 500 mM KCl, 0,1 mM MgCl ₂ , 10 μM GDP•Mg ²⁺ , 10% glicerol, 20 mM imidazol, 10 mM BME, inibidores de proteases
Tampão B4	Tampão A4 contendo 250 mM de imidazol
Tampão A5	20 mM Hepes pH 7,6, 100 mM KCl, 0,1 mM MgCl ₂ , 10 μM GDP•Mg ²⁺ , 10% glicerol, 2 mM DTT
Tampão B5	Tampão A5 contendo 1 M de KCl
Tampão de Estoque 2	20 mM Hepes pH 7,6, 100 mM KOAc, 0,1 mM Mg(OAc) ₂ , 10% glicerol, 2 mM DTT
Tampão de Lise 5	10 mM MOPS pH 6,7, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 3 mM BME, inibidores de proteases
Tampão A6	Tampão de Lise 5 sem inibidores de proteases
Tampão B6	Tampão A6 contendo 250 mM de imidazol
Tampão A7	10 mM MOPS pH 6,7, 100 mM NaCl, 10 mM BME, 0,1 mM PMSF
pão B7	Tampão A7 contendo 500 mM NaCl
TBE	90 mM Tris-Cl, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA
Tampão A9	20 mM Hepes pH 7,5, 300 mM KCl, 20 mM imidazol, 1 mM DTT, inibidores de proteases
Tampão B8	Tampão A8 contendo 250 mM imidazol
Tampão de Carregamento	20 mM Tris-Cl pH 7,5, 50 mM NH ₄ Cl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0,1 mg/mL BSA
Tampão A9	20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM KCl, 5 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT, inibidores de proteases
Tampão de Ribossomo 1	20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT, 10% glicerol
Tampão de Ribossomo 2	20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM KCl, 5 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100
Tampão de Ribossomo 3	20 mM Hepes pH 7,5, 300 mM KCl, 1 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT
Tampão de	20 mM Hepes pH 7,5, 75 mM KCl, 3 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT,

Ribossomo 4	10% glicerol
Tampão Rec	20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT
Tampão de Reação	20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc) ₂ , 1 mM DTT
Tampão de Modificação 1	20 mM Hepes pH 7,0, 150 mM KCl, 5% DMSO, 10% glicerol, 1 mM TCEP, 5 mM EDTA
Tampão de Armazenamento	20 mM Hepes pH 7,0, 150 mM KCl, 10% glicerol, 5 mM EDTA
Tampão de Modificação 2	50 mM Tris-Cl pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glicerol
Tampão de Estoque 3	20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM KCl, 10% glicerol
Tampão de Clivagem	20 mM Hepes pH 7,5, 75 mM KCl, 1 mM DTT
Tampão de Extensão	130 mM Tris-Cl pH 8,5, 10 mM Mg(OAc) ₂ , 10 mM DTT

¹ Nos diferentes experimentos, foram usados diferentes inibidores de proteases de acordo com sua disponibilidade, sendo eles cOmplete EDTA-free (Roche) ou PLAC (5 mg/mL de antipaína, leupeptina, aprotinina, quimostatina e pepstatina - Sigma), acrescidos ou não de PMSF.

3.2. MÉTODOS

A manutenção e o cultivo das linhagens de levedura e de *E. coli*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e as técnicas básicas utilizadas neste trabalho seguiram procedimentos padrões (GUTHRIE e FINK, 1991; AUSUBEL *et al.* 2005; AMBERG *et al.* 2005).

3.2.1. Transformação de microrganismos

- *Químio-transformação de bactérias*

As células de *E. coli* DH5 α competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga, foram adicionados 100 μ L das células competentes e 50–250 ng de DNA plasmidial ou a reação de ligação. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 μ g/mL) e incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

- *Eletroporação de bactérias*

Dois μ L de DNA plasmidial purificado de levedura foram adicionados a 40 μ L de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Estas foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (0,1 cm) e submetidas a um pulso elétrico com as seguintes constantes elétricas: voltagem 1,7 kV, resistência 200 Ω e capacitância 25 μ F. Em seguida, as células foram removidas da cubeta com 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo para possibilitar a seleção do plasmídeo contendo a marca desejada. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C até a obtenção de colônia.

- *Transformação de alta eficiência de leveduras*

Uma colônia da linhagem de levedura de interesse foi inoculada em 10 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. A partir desta cultura, inoculou-se $5,0 \times 10^6$ células/mL em 10 mL de meio pré-aquecido. As células foram incubadas a 30°C até que a concentração atingisse $2,0 \times 10^7$ células/mL, centrifugadas a 3.000 xg por 5 minutos e lavadas com água. Após centrifugação, as

células foram suspensas em 600 µL de solução de acetato de lítio 100 mM e incubadas por 15 minutos a 30°C. Coletou-se novamente as células por centrifugação e removeu-se o sobrenadante. Foram adicionados, na seguinte ordem: 480 µL de PEG 50%, 72 µL de acetato de lítio 1 M, 50 µL de DNA de esperma de salmão e 1 µg da biblioteca de cDNA, completando-se o volume de reação com 108 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 30°C por 30 minutos. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 42°C, por 20 minutos, tomando-se cuidado de inverter o tubo a cada 5 minutos para equilíbrio da temperatura. As células foram centrifugadas como descrito acima, suspensas em 2 mL de água, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias.

3.2.2. Isolamento de DNA plasmidial

- Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em pequena escala (MiniPrep)

Células da linhagem de *E. coli* DH5α contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo 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. 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.

- Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em média escala (MidiPrep)

Uma colônia isolada de *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 100 mL de LB contendo antibiótico desejado e crescida a 37°C por 16 horas sob agitação constante. As células foram coletada por centrifugação a 6.000 xg por 15 minutos a 4°C. Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit Plasmid MidiPrep (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

- Preparação de DNA plasmidial de *S. cerevisiae* em pequena escala

De uma cultura estacionária da linhagem de levedura desejada, um volume de 1,5 mL foi centrifugado a 12.000 xg por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante foi desprezado, as células lavadas com 1 mL de água e suspensas em 200 μL de Tampão de Lise 1. Foram adicionados 200 μL da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1) e 300 mg de pérolas de vidro. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 5 minutos e centrifugado a 16.000 xg por 1 minuto. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de igual volume de isopropanol. Após centrifugação de 10 minutos a 16.000 xg , o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 μL de etanol 75% gelado. O precipitado, depois de seco, foi ressuspenso em 50 μL de água.

3.2.3. Cura plasmidial (*plasmid shuffle*) em levedura utilizando a marca de auxotrofia *URA3*

A partir de uma cultura saturada da linhagem de interesse, contendo um plasmídeo que possui marca de seleção *URA3*, as leveduras foram plaqueadas em meio de cultura SC-ura adicionado de 0,1% de ácido 5-fluorótico (5FOA) e incubadas na temperatura permissiva, por 2 dias. Colônias isoladas obtidas foram re-plaqueadas e incubadas nas mesmas condições.

3.2.4. Teste de sensibilidade a temperatura

As linhagens de interesse foram crescidas em 10 mL de meio apropriado (YPD ou SC) até atingir concentração celular correspondente à $D.O_{600nm} = 0,6$ a $0,8$. Um volume ideal de cultura foi centrifugado a 600 xg por 7 minutos e ressuspenso em meio de cultura apropriado para concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Em microplaca de 96 poços, foram aplicados 100 μL de cada amostra no primeiro poço da microplaca. Outros poços foram preenchidos com 90 μL do mesmo meio de cultura. Em seguida, foram realizadas cinco diluições seriadas (1:10), homogeneizando bem em cada etapa. Com ajuda de micropipetador multicanal, foram aplicados 2,5 μL de cada amostra e suas respectivas diluições nos meios de cultura apropriados. As placas foram incubadas nas temperaturas de interesse, sempre mantendo um controle a 25°C.

3.2.5. Western blot

- Quimioluminescente (enhanced chemiluminescence - ECL)

Amostras contendo entre 15-20 µg de proteínas totais foram aplicadas em SDS-PAGE, para separação das proteínas por peso molecular. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, sob diferença de potencial de 100 V, por uma hora. O padrão de peso molecular foi anotado com auxílio do corante Vermelho de Ponceau S. A membrana foi bloqueada com tampão PBST, contendo leite desnatado a 5% por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com uma diluição adequada de soro primário (anticorpo primário) em PBST, contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes com PBST e incubada novamente com uma diluição adequada de soro secundário (anticorpo secundário - anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase) em PBST, contendo 5% de leite desnatado, por uma hora a temperatura ambiente. Após três novas lavagens com PBST, a membrana foi submetida a tratamento com reagentes quimioluminescentes (Amershan ECL – GE Healthcare) para posterior exposição ao filme autorradiográfico, e revelação utilizando soluções reveladora e fixadora (Kodak).

- Fluorescente

Amostras contendo entre 7,5-15 µg de proteínas totais foram aplicadas em SDS-PAGE para separação das proteínas por peso molecular. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, sob diferença de potencial de 100 V, por uma hora. O padrão de peso molecular foi anotado com auxílio do corante Vermelho de Ponceau S. A membrana foi bloqueada com tampão PBST, contendo leite desnatado a 5% por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com uma diluição adequada de soro primário (anticorpo primário) em PBST, contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes com PBST e incubada novamente com anti-IgG de coelho marcado com Cy5 (Amershan ECL Plex – GE Healthcare) diluído 1:5000 em PBST, por 45 minutos a temperatura ambiente. Após três novas lavagens com PBST e uma com água Milli-Q, a membrana foi escaneada utilizando o equipamento Scanner Typhoon Trio (GE Healthcare). As

imagens obtidas foram tratadas utilizando o programa ImageQuantTL (GE Healthcare), para quantificação das bandas. Os valores absolutos de quantificação das bandas de interesse foram normalizados pelas bandas de uma proteína controle da mesma amostra. Os valores relativos das proteínas de interesse foram analisados utilizando o programa Excel.

3.2.6. Análise proteômica

3.2.6.1. Obtenção do extrato proteico

As linhagens de interesse (SVL613 – selvagem e SVL614 – *dys1-1*) foram crescidas em meio YPD acrescido de 1 M de sorbitol na temperatura permissiva (25°C) até atingir $D.O_{600nm} = 1,0$. A cultura foi centrifugada a 14.000 xg por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS 1x gelado. Em seguida, as células foram lisadas adicionando ao precipitado celular o mesmo volume de Tampão de Lise 2 e o mesmo volume de contas de vidro. O microtubo contendo células, tampão e contas de vidro foi submetido a agitação vigorosa no aparelho FastPrep, a 4°C (3 ciclos de 20 seg de agitação a 4 m/s - 1 min descanso). O lisado foi centrifugado a 20.000 xg por 20 minutos a 4°C. O extrato proteico total obtido foi quantificado pelo método de Bradford, utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).

3.2.6.2. Marcação e focalização isoelétrica das proteínas

A partir do extrato proteico quantificado, as amostras foram marcadas separadamente em microtubos: 50 μg de proteína total da SVL613 com 400 pg do fluoróforo Cy3 (emissão máxima ou $\lambda_{em} = 580$ nm); 50 μg de proteína total da SVL614 com 400 pg do fluoróforo Cy5 ($\lambda_{em} = 670$ nm); 25 μg de proteína total de cada linhagem com 400 pg do fluoróforo Cy2 ($\lambda_{em} = 520$ nm, utilizado na amostra normalizadora dos lisados) (GE Healthcare). Para o gel preparativo, de onde foram recortados os *spots*, foi separado em outro microtubo um volume correspondente a 300 μg de proteína total (150 μg de cada linhagem). Cada tira de gradiente de pH foi reidratada aplicando uma mistura composta de extrato proteico das 3 amostras marcadas (Cy3, Cy5 e Cy2) ou da mistura preparada para o gel preparativo, adicionado de 1,5% de IPGBuffer na faixa de pH correspondente a tira utilizada (GE Healthcare) e de solução DeStreak (GE Healthcare) para um volume final de 250 μL .

As tiras foram então incubadas em suporte adequado, protegidas da luz, calor e umidade, por 16-24 horas. Em seguida, as tiras foram submetidas ao processo de focalização isoeletrica, a fim de separar as proteínas na matriz de acordo com seus pontos isoeletricos. Para tanto, foi utilizado o aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Para tiras de 13 cm, foram usados os seguintes parâmetros para a focalização: *step* – 300 V por 12 horas; *grad* – 1.000 V até acumular 1.000 V/h; *grad* – 8.000 V até acumular 8.000 V/h; *step* – 8.000 V até acumular 20.000 V/h; *step* – 8.000 V por mais 4 horas, ou até acumular 36.000 a 40.000 V/h.

3.2.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise dos spots de proteínas

Após a focalização das proteínas, as tiras de gradiente de pH foram tratadas com DTT (ditiotreitól 10 mg/mL em Tampão de Equilíbrio) e ioadacetamida (25 mg/mL em tampão de equilíbrio, adicionado de azul de bromofenol), por 20 minutos cada, à temperatura ambiente, para promover a redução e alquilação de grupamentos reativos, permitindo boa migração das proteínas e ausência de alguns artefatos. Após o tratamento, as tiras foram aplicadas em contato com gel de poliacrilamida 12,5%, para realização da eletroforese em cuba SE600 (GE Healthcare), utilizando a amperagem de 15-20 mA por gel e potência e voltagem máximas, utilizando a fonte EPS601 (GE Healthcare). A eletroforese foi acompanhada até o corante atingir o limite inferior do gel (8-10 horas). Por fim, os géis analíticos foram escaneados no Scanner Typhoon Trio (GE Healthcare) e as imagens obtidas foram analisadas utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). O gel preparativo, por sua vez, foi submetido ao protocolo de coloração com o corante fluorescente DeepPurple, de acordo com instruções do fabricante (fixação de proteínas no gel com etanol 15% e ácido cítrico 1% por 16 h; coloração DeepPurple 200 x diluído em solução de borato de sódio – 1 h; lavagem com etanol 15%; fixação/descoloração com solução de fixação – 24 h). Após coloração do gel preparativo, este foi também escaneado no Scanner Typhoon Trio e armazenado em tampão de fixação a 4°C, até o recorte dos *spots* de proteínas. Os *spots* identificados como diferencialmente presentes entre as linhagens analisadas foram validados por teste *t* de Student, utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum, e então recortados do gel com auxílio do aparelho Ettan Spot Picker (GE Healthcare).

- *Tratamento dos spots recortados do gel e identificação das proteínas por MALDI ToF-ToF*

Os *spots* foram lavados quatro vezes com bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM em acetonitrila (ACN) 50%, para a remoção do SDS presente na amostra. Em seguida, foram desidratados com adição de ACN 100% e mantidos à temperatura ambiente por 16 horas. A reidratação foi feita com a adição de 20 μL de NH_4HCO_3 100 mM (pH 8,0), contendo 0,5 mg de tripsina *sequencing grade* (Promega) por 1 h à temperatura ambiente. Após a reidratação, 50 μL de NH_4HCO_3 10 mM foram adicionados aos *spots* e incubados em banho seco a 37°C por 24 horas. A hidrólise foi interrompida com adição de ácido fórmico 5% e incubação à temperatura ambiente por 3 horas, para permitir a difusão dos peptídeos hidrolisados do gel para a solução. Esta etapa foi repetida duas vezes. As frações obtidas foram reunidas e concentradas em concentrador a vácuo. Os peptídeos concentrados foram purificados utilizando ponteiros de micropipeta contendo resina hidrofóbica C18 VydacTM (Grace Davison Discovery Sciences), empacotadas manualmente. A solução concentrada de peptídeos foi aplicada na resina ativada com metanol 100% e equilibrada com ácido fórmico 0,2% (v/v). As lavagens foram feitas com ácido fórmico 0,2% (v/v) e eluição com solução contendo ácido fórmico 5% (v/v) e metanol 60% (v/v). A solução de peptídeos purificados foi concentrada em concentrador a vácuo e ressuspendida em 10 μL de uma solução da matriz orgânica ácido α -ciano-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich), preparada em ácido trifluoroacético e ACN. Somente 2 μL dessa solução foi aplicada na placa de MALDI (*Matrix-assisted laser desorption ionization*) e levada ao espectrômetro de massas modelo AXIMA Performance (Shimadzu). As listas de m/z dos íons, geradas a partir dos espectros MS/MS, foram submetidas à análise pelo programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), alimentado com banco de dados de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Homo sapiens*, sendo o segundo apenas para detecção de proteínas contaminantes no experimento. Para tanto, foram utilizados os seguintes parâmetros de análise: 1) enzima: tripsina; 2) modificação fixa: carbamidometilação, devido ao fato de as proteínas serem alquiladas e reduzidas em processos anteriores à identificação; 3) modificações variáveis: oxidação, pois pode haver oxidação dos resíduos de metionina durante o tratamento das amostras; 4) falha de clivagem: 1, visto que a tripsina pode ter deixado de clivar alguns sítios; 5) tolerância de massa de peptídeos e fragmentos: 0,5-0,8 Da; 6) significância: 0,5; 7) *top hits* de proteínas: 10; e 8) valor de *score* limite para identificação dos peptídeos: 50 ($p \leq 0,05$).

As etapas de digestão das amostras, concentração dos peptídeos hidrolisados, aplicação das amostras no espectrômetro de massas, bem como análise dos dados, foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Lewis Greene do Centro de Química de Proteínas, USP - Ribeirão Preto, com auxílio das alunas de doutorado Helen Cristina Miranda e Helen Julie Laure. Os resultados das duas primeiras análises proteômicas foram obtidos com esta colaboração.

- Tratamento dos spots recortados do gel e identificação das proteínas por ESI Q-ToF

Os *spots* foram lavados quatro vezes com bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM em acetonitrila (ACN) 50%, para a remoção do SDS presente na amostra. Em seguida foram desidratados com adição de ACN 100% por 5 minutos. ACN foi evaporada em evaporador e os *spots* foram submetidos a tratamento de redução e alquilação com adição de uma solução de DTT 10 mM e, em seguida, de iodacetamida 50 mM, com incubações de 30 minutos a temperatura ambiente. Ao fim do tratamento, foi adicionada aos *spots* uma solução de NH_4HCO_3 100 mM por 10 minutos. Os *spots* foram novamente desidratados com ACN 100% e os peptídeos hidrolisados pela adição de uma solução 20 ng/mL de tripsina *sequencing grade* (Promega) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM, por 30 minutos em banho de gelo. O excesso de solução de tripsina foi removido e os *spots* incubados a 37°C por 16 horas. A extração dos peptídeos do gel foi repetida duas vezes, com adição da solução de ácido fórmico 5% em ACN 50%. As frações foram unidas e concentradas em concentrador a vácuo até aproximadamente 1 μL . Por fim, o concentrado de peptídeos foi ressuspensão em 20 μL de ácido fórmico 5% para aplicação de todo o volume no espectrômetro de massas Q-ToF Premier – Micromass (Waters), utilizando a fonte de ionização ESI (electrospray ionization). As listas de m/z dos íons, geradas a partir dos espectros MS/MS, também foram submetidas à análise pelo programa MASCOT. Os parâmetros de análise utilizados foram os mesmos descritos anteriormente. Todo o protocolo de tratamento dos *spots* e identificação de proteínas foi desenvolvido em nosso laboratório, utilizando protocolos estabelecidos pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), vinculado ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), onde realizamos a espectrometria de massas. Os resultados da terceira análise proteômica foram obtidos com esta colaboração.

3.2.7. Cruzamento, esporulação e dissecação de leveduras

3.2.7.1. Cruzamento

Cepas haplóides de interesse, de *S. cerevisiae*, foram cruzadas na superfície de ágar YPD e incubadas por uma noite a 25°C. A seleção de diplóides foi feita pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para a placa de meio duplo seletivo, de acordo com as marcas auxotróficas de cada linhagem. As placas foram incubadas a 25°C até o aparecimento de massa celular no meio duplo seletivo. O crescimento obtido foi repassado para o mesmo meio seletivo, para isolamento de colônias dos diplóides.

3.2.7.2. Esporulação

Após seleção adequada do diplóide, foi preparado inóculo deste em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracila e tirosina; 20 mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100 mg de fenilalanina e 350 mg de treonina em 1 litro de água destilada) e incubado a 25°C, sob agitação, até a formação de ascos (cerca de 5 a 10 dias).

3.2.7.3. Dissecação

Foram centrifugados momentaneamente 200 µL da cultura submetida à esporulação. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 100 µL de sorbitol 20%. A quebra de parede do asco se deu com a adição de 1,5 µL de zimoliase (10 µg/µL, β-glucuronidase) e incubação da reação a temperatura ambiente por 8 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de sorbitol 20% para diluir a reação de digestão e as células ficaram em gelo até a dissecação. A dissecação dos ascos foi realizada utilizando microscópio de dissecação, em placa de meio YPD, que posteriormente foi incubada a 25°C até a obtenção de colônias isoladas.

3.2.7.4. Caracterização de tétrades

As marcas de auxotrofia para os haplóides obtidos foram determinadas utilizando diferentes meios de cultura seletivos. O *mating type* foi determinado através do cruzamento com cepas de *mating type* conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo apropriado. Outras marcas, como resistência a antibióticos e análogos tóxicos, como 5-FOA, também foram analisadas utilizando placas de meio YPD/SC-ura contendo esses reagentes.

3.2.8. Clonagem empregando Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

3.2.8.1. Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 μ M de cada oligonucleotídeo, VZO669 e VZO670, 40 ng de DNA molde (biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano - Clontech), 2 U da enzima pFU DNA polimerase (New England Biolabs) e 2 μ L de uma mistura de desoxiribonucleotídeos (10 mM cada), num volume final de reação de 100 μ L. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 5 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Então, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE, contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado Tampão de Amostra e a solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido a diferença de potencial de 80 V, por 1 hora. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho Alphamager 2200 (Alpha Innotech Corporation).

3.2.8.2. Digestão do inserto e vetor

O produto amplificado foi purificado utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN) e submetido a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs), por 16 horas a 37°C. O vetor foi também digerido com as mesmas enzimas e os produtos das digestões foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN).

3.2.8.3. Reação de ligação e isolamento dos clones

Por fim, foi preparada a reação de ligação num volume de 20 μ L final, utilizando tampão apropriado, com um excesso de 10 vezes de inserto em relação ao vetor, e 200 U de T4 DNA ligase. A reação foi então incubada a 16°C por 16 horas. Uma alíquota da bactéria *E. coli* DH5 α ultracompetente foi transformada com todo o volume todo da reação de ligação. A placa de transformação foi incubada por 16 horas a 37°C, e as colônias crescidas foram analisadas contra o controle negativo da

ligação. As colônias da placa da ligação foram submetidas a preparação de DNA plasmidial e o mesmo foi analisado por diagnóstico de restrição para confirmação da clonagem e seleção do clone.

3.2.9. Mutagênese sítio-dirigida

O vetor de interesse, contendo o inserto a ser mutagenizado, foi preparado a partir de extração de DNA plasmidial utilizando kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). A preparação plasmidial foi quantificada por D.O._{260nm} e, em seguida, a reação de PCR para mutagênese sítio dirigida foi preparada. Os oligonucleotídeos para induzir as modificação de bases nitrogenadas foram desenhados seguindo recomendações descritas no kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) e estão mostrados na Tabela 3.2, juntamente com as respectivas mutações. Em um microtubo foram pipetados os seguintes reagentes:

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

		Etapas	Temperatura/Tempo
12-18 ciclos	}	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'

* utilizar T_m entre 45-62°C

Metade do volume do produto da PCR foi digerido com a enzima *DpnI* (NEB), adicionando 1,0 µL da enzima, 2,5 µL do seu tampão próprio e 9 µL de água Milli-Q. A reação de digestão foi incubada por 12-16 horas a 37°C. Em seguida, todo o volume da reação foi transformado em *E. coli* ultracompetente e as células plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico para seleção do plasmídeo utilizado. A placa foi incubada por 12-16 horas a 37°C. Em paralelo à reação de mutagênese sítio dirigida, foi preparada outra reação com os mesmos componentes, entretanto, na ausência de DNA polimerase, a qual foi utilizada como controle negativo da mutagênese. O crescimento de colônias nas placas da reação e do controle negativo foi analisado. Quando o crescimento de colônias na placa da reação for $\geq 5x$ o controle negativo, significa que a mutagênese foi eficiente e, portanto, deve-se prosseguir com a identificação de clones mutagenizados. Cinco a dez colônias foram inoculadas em LB líquido contendo o mesmo antibiótico e incubadas por 12-16 horas a 37°C. A preparação plasmidial das culturas utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) seguiu conforme protocolo do fabricante. Por fim, foi realizado o sequenciamento do gene de interesse a partir dos plasmídeos purificados.

3.2.10. Sequenciamento de DNA

Após preparação e quantificação do DNA plasmidial obtido por kit Plasmid Miniprep (QIAGEN), foi realizada a reação de PCR para sequenciamento e detecção da mutação pontual no gene de interesse, utilizando reagentes da Applied Biosystems. Em um microtubo de 200 µL, foram pipetados 400 ng do DNA molde, 1 µL do oligonucleotídeo que flanqueia o gene de interesse (3,2 µM) (na maioria dos casos foi usado SVO76), 1 µL de BigDye diluído 8x e 3,5 µL do tampão de seqüenciamento 5x, completando o volume final para 20 µL final com água Milli-Q. As condições da reação utilizadas estão na tabela abaixo:

Etapas	Temperatura/Tempo
Desnaturação/Hot Start	96°C – 1'
Desnaturação	96°C – 10"
Anelamento	T _m do primer – 5"
Extensão	60°C – 4'
Extensão final	60°C – 5'

25
ciclos

Em seguida, foi realizada a purificação do produto de PCR utilizando o kit Big Dye X-Terminator (Applied Biosystems). Para tanto, foram pipetados 45 μ L do tampão SAM e 10 μ L da resina de precipitação de DNA sobre 10 μ L da reação de PCR. O microtubo ficou sob agitação vigorosa 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugado por 2 minutos a 1000 xg . Durante todo o procedimento, as amostras foram protegidas da luz. Após centrifugação, as amostras foram aplicadas no aparelho sequenciador 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.2.11. Interação genética sintética utilizando o mutante *dys1-1*

Devido à severidade e alta taxa de surgimento de revertentes do mutante *dys1-1* (dados não mostrados), decidiu-se realizar a substituição do alelo selvagem pelo alelo mutante, por *plasmid shuffle*, após geração dos haplóides de interesse. Para tanto, o haplóide contendo nocaute duplo nos genes *ASC1* e *DYS1* foram gerados utilizando as linhagens SVL453 (*dys1::HIS3* e VZL1133 (*asc1::kanMX4*) (3.2.7). Os esporos de interesse foram selecionados na presença de geneticina e na ausência de histidina e uracila. O haplóide foi então transformado com os plasmídeos de interesse e, após seleção dos transformantes, foi realizada a troca do plasmídeo contendo o alelo selvagem *DYS1* (item 3.2.3)

3.2.12. Medida de síntese proteica total *in vivo*

As linhagens de levedura contendo alelos selvagem e mutante do gene *DYS1* foram cultivadas em 10 mL de meio YPD adicionado de sorbitol 1 M e 2 μ Ci/mL de [3 H] leucina (PerkinElmer), até D.O._{600nm} = 0,5 a 25°C. Alíquotas das culturas foram recolhidas de hora em hora até 3 horas, as células coletadas por centrifugação a 1.500 xg por 5 minutos e congeladas a -80°C. Os precipitados celulares foram ressuspensos em uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 15% e incubados em gelo durante 15 min. As amostras foram aquecidas a 72°C durante 30 min seguido de incubação em gelo por 15 min. O precipitado proteico foi obtido por centrifugação a 15.000 xg , a 4°C, por 10 min, seguido de quatro lavagens com TCA 10% para remoção da [3 H] leucina livre. Os precipitados finais foram ressuspensos em 100 μ L de 0,2 M de NaOH, e alíquotas de 50 μ L foram utilizadas para determinar a

radioatividade, incorporada durante a síntese de proteínas, em cintilador Beckman Scintillation Counter (Beckman Coulter). A quantificação de proteínas totais, após precipitação proteica, foi obtida usando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific), seguindo recomendações do fabricante. A relação entre os valores obtidos no cintilador e o conteúdo total de proteínas foi calculado para cada amostra separadamente, e os dados foram apresentados em gráficos obtidos no programa Microsoft Excel.

3.2.13. Perfil polissomal utilizando formaldeído

As linhagens de interesse foram incubadas em 100 mL de meio rico e cultivadas na temperatura permissiva até $D.O_{.600nm} = 0,6$. As células foram submetidas a *crosslinking* pela adição de 1% de formaldeído, durante 1 h, em banho de gelo. O formaldeído foi, então, neutralizado com adição de 125 mM de glicina, e as células foram coletadas por centrifugação. A lise celular foi realizada conforme o protocolo de *western blot* (item 3.2.5) e a quantificação de RNA total do extrato foi realizada por $D.O_{.260nm}$. Cerca de 15 ODU foram aplicadas em gradiente de sacarose 10-50%, preparado em tampão de lise no equipamento GradientMaster (Biocomp), seguindo instruções do fabricante. Os gradientes foram centrifugados durante 3 h a 39.000 rpm a 4°C em rotor Beckman SW41-Ti. Os gradientes foram subsequentemente fracionados através de deslocamento para cima com uma solução de 60% de sacarose (m/v), utilizando um fracionador de gradiente ligado a uma unidade de controle de UV (Amersham), para a determinação contínua da absorbância a 254 nm. As frações de perfil polissomal foram, coletadas, tratadas para purificação de proteínas por TCA, como descrito no item 3.2.12, e analisadas por *western blot* (item 3.2.5). Os filmes de *western blot* foram escaneados utilizando ImageScanner III (GE Healthcare). A quantificação das bandas de interesse foi realizada utilizando o programa ImageQuantTL (GE Healthcare), e os níveis da proteína de interesse foram normalizados pelos níveis da proteína ribossomal Rpl5. Os valores relativos da proteína de interesse, em cada fração, foram comparados entre as diferentes linhagens analisadas. O gráfico representa o valor médio obtido da triplicata experimental.

3.2.14. Ensaio de hipusinação *in vivo* em *E. coli*

3.2.14.1. Preparo das células

Uma colônia isolada da bactéria *E. coli* BL21, co-expressando a chaperona groES (pG-KJE8 –Taraka Bio) e contendo o plasmídeo de expressão policistrônico pST39 indicado para cada amostra, foi inoculada em 5 mL de LB adicionado dos antibióticos ampicilina (100 mg/mL) e cloranfenicol (32 mg/mL) e incubada a 16°C por 16 horas. A cultura foi diluída 100x para um novo frasco contendo 10 mL do mesmo meio adicionado de tetraciclina (1 ng/mL) para indução da expressão da chaperona e 5 µCi/mL de [³H] espermidina. Quando a cultura atingiu D.O._{600nm} de aproximadamente 0,5, foi adicionado 1 mM de IPTG, para indução da expressão da proteína eIF5A de interesse. A cultura foi incubada por mais 4 horas na mesma temperatura.

3.2.14.2. Preparo do precipitado proteico e quantificação por cintilometria

Ao final, as células foram coletadas, lavadas com PBS 1x e lisadas sob agitação e com adição de uma solução de TCA 15%, adicionada de 1 mM de espermidina e espermina. O precipitado proteico formado foi mantido em gelo por 10 min e, em seguida, aquecido a 96°C por 10 min. Outra incubação em gelo foi realizada e a separação do precipitado foi feita por centrifugação a 20.000 xg por 20 min. O precipitado foi lavado cerca de 10x com acetona 100% gelada e, por fim, ressuspenso em 50 µL de uma solução de NaOH 200 mM. A radioatividade presente em uma alíquota de 10 µL foi determinada em cintilador, após adição de 5 mL de solução amplificadora de sinal (PerkinElmer). Novamente, a normalização do conteúdo proteico de cada amostra analisada foi realizada por quantificação do conteúdo total de proteínas pelo método de BCA Protein Assay (Thermo Scientific). A relação entre os valores de radioatividade e de proteína total, para cada amostra, foi mostrada em gráfico obtido no programa Microsoft Excel.

3.2.15. Purificação de eIF5A de humano a partir de *E. coli*

Este protocolo foi baseado em PARK *et al.* 2011.

3.2.15.1. Expressão e preparo do extrato protéico

A linhagem de *E. coli* BL21, co-expressando a chaperona groES, foi transformada com um plasmídeo codificando a enzima desoxi-hipusina sintase de humano (DHPS – pVZ1142) e as formas selvagem ou mutadas de cisteína única de eIF5A de humano, todas em vetor pST39. Uma colônia isolada de cada transformante foi crescida em 100 mL de meio de cultura LB contendo 50 µg/mL de cloranfenicol (seletivo para o plasmídeo codificando groES), 50 µg/mL de kanamicina (seletivo para o plasmídeo codificando DHPS) e 100 µg/mL de ampicilina (seletivo para o plasmídeo codificando eIF5A), por 16 horas a 37°C, sob agitação constante. Essa cultura foi diluída em 4 litros do mesmo meio de cultura, acrescido de 1 ng/mL de tetraciclina (indução da expressão de groES) e incubada nas mesmas condições até atingir $D.O_{600nm} = 0,6$. A indução da expressão de eIF5A, bem como DHPS, foi feita acrescentando 1 mM de IPTG na cultura e incubando a 30°C por 4 horas sob agitação constante. As células foram coletadas por centrifugação a 8.800 xg por 10 minutos e lavadas com PBS 1x gelado, antes de serem ressuspensas em 50 mL de Tampão de Lise 3 e lisadas em sonicador (ciclo de 15 minutos: 5 segundos ON e 10 segundos OFF, amplitude de 60%). O lisado foi clarificado por centrifugação a 20.000 xg por 30 minutos a 4°C. O extrato protéico foi coletado e submetido à precipitação em alta concentração de sal, adicionando sulfato de amônio até saturação de 75% (cerca de 24 g de sal para cada 50 mL de extrato). Após uma hora a 4°C e sob agitação, as proteínas foram separadas por centrifugação e, em seguida, ressuspensas em 50 mL de Tampão A e dialisadas contra um litro do Tampão A por 16 horas a 4°C. O dialisado foi filtrado em membrana de 0,22 µm diâmetro de poro e submetido a cromatografia.

3.2.15.2. Cromatografias de troca iônica em FPLC

O extrato filtrado foi aplicado em coluna HiTrap Q HP de 5 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada com o Tampão A em fluxo constante de 1 mL/min. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e, em seguida, as proteínas foram eluídas em gradiente de 0-60% de Tampão B, também em fluxo de 1 mL/min. As frações correspondentes a 7-20% de Tampão B foram analisadas em SDS-PAGE após coloração por Coomassie Blue R. As frações que apresentaram eIF5A foram reunidas e dialisadas contra Tampão A por 16 horas a 4°C.

O dialisado foi aplicado em coluna HiTrap SP HP de 5 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada com Tampão A, em fluxo constante de 1 mL/min. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e, em seguida, as proteínas foram eluídas em gradiente de 0-60% de Tampão B, também em fluxo de 1 mL/min. As frações correspondentes

aos 2 picos vistos no cromatograma (Figuras 20B e 20C) foram analisados em SDS-PAGE após coloração por Coomassie Blue R. As frações que apresentaram apenas as formas de eIF5A não hipusinada (primeiro pico) ou hipusinada (segundo pico) foram reunidas, concentradas utilizando concentradores Amicon de 3 kDa de poro (Millipore), quantificadas por D.O._{280nm}, aliquotadas para congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

3.2.16. Purificação de eIF5A de levedura a partir de *E. coli*

Este protocolo foi baseado em PARK *et al.* 2011.

3.2.16.1. Expressão e preparo do extrato proteico

Esta etapa da purificação foi realizada de acordo com o descrito no item 3.2.15.1.

3.2.16.2. Cromatografia de afinidade

O extrato filtrado foi incubado por 1 hora a 4°C sob branda agitação com *beads* de agarose NiNTA (QIAGEN) (50 mL de extrato : 5 mL de *beads*), para afinidade com a cauda de 6xHis contida na proteína. O extrato foi filtrado por gravidade em coluna, as *beads* foram lavadas com Tampão A2 e a eluição foi realizada em duas etapas de 10 mL de Tampão B2 cada após breve incubação (10 minutos) das *beads* com o tampão. As duas frações de eluição foram analisadas em SDS-PAGE após coloração por Coomassie Blue R, reunidas e dialisadas contra 1 L de Tampão A.

3.2.16.3. Cromatografia de troca iônica em FPLC

Esta cromatografia foi realizada conforme o item 3.2.15.2.

3.2.17. Extração fenólica de ácidos nucleicos

Em um volume de solução de ácido nucleico, foi adicionado o mesmo volume de PCI (Phenol:Clorofórmino:Álcool Isoamílico, 25:24:1) tamponado em pH 4,5 para tRNA e 8,0 para rRNA e DNA e a mistura foi vortexada por 15 segundos e centrifugada por 1,5 min a 16.000 xg a temperatura ambiente. A fase orgânica e interface foram retiradas com auxílio de micropipetador e foi adicionado novamente o

mesmo volume de PCI. Esta etapa foi repetida 3 vezes. Em seguida, foi adicionado à fase aquosa o mesmo volume de clorofórmio, a mistura foi vortexada e centrifugada seguindo os critérios anteriores. Esta etapa também foi repetida 3 vezes. Por fim, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo e foi adicionado 10% do volume de NaAc 3 M e 2,5x o volume de etanol 100%. A mistura foi incubada em banho de gelo seco com etanol por 20 minutos e centrifugada a 16.000 xg por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado com auxílio de um micropipetador e o precipitado deixado secar por 10 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, o ácido nucleico foi ressuspensão em volume apropriado de tampão de eluição comercial QIAGEN ou água Milli-Q estéril e livre de DNase/RNase e estocado a -20°C.

3.2.18. Reação de transcrição *in vitro* a partir de produto de PCR ou plasmídeo

Inicialmente, o molde para a transcrição *in vitro* (PCR ou plasmídeo) foi purificado (3.2.17) e utilizado em reações de 100 µL finais contendo 1 mM de espermidina, 5 mM DTT, 8 mM de cada nucleosídeos triposfatados (CTP, GTP, ATP e UTP), 0,4 mg/mL da enzima T7 RNA polimerase e 100 µg/mL de DNA molde, em Tampão de Transcrição 1x. A reação foi incubada a 37°C por 4 horas e, em seguida, centrifugada para separação do precipitado branco formado durante a reação de transcrição.

3.2.19. Purificação de fatores de início de tradução e tRNA_i^{Met}

Os fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF5 e eIF5B e tRNA_i^{Met} foram purificados para serem usados nos ensaios de reconstituição do complexo de início de tradução, seguindo protocolos estabelecidos previamente (PHAN *et al.* 1998; ACKER *et al.* 2007). Segue, resumidamente, cada uma das purificações.

3.2.19.1. eIF1, eIF1A e eIF5

Uma colônia isolada de *E. coli* BL21, contendo pLysS, e transformada com pVZ1172 (pTYB2-eIF1), pVZ1173 (pTYB2-eIF1A) ou pVZ1174 (pTYB2-eIF5) foi inoculada em 2 L de LB contendo ampicilina (100 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL). O vetor de expressão em *E. coli* pTYB2 possui um *tag* de *chitin binding domain* (CBD) em fusão com um inteín que possibilita a auto-clivagem do CBD (sistema IMPACT,

NEB). Quando a cultura atingiu $D.O_{600nm} = 0,6$, foi adicionado 0,3 mM de IPTG e a mesma foi incubada a 18°C por 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas, congeladas em -80°C e, em seguida, ressuspensas em 30 mL de Tampão de Lise-Intein. As células foram lisadas em sonicador (ciclo de 15 minutos: 5 segundos ON e 10 segundos OFF, amplitude de 60%) e o lisado foi clarificado por centrifugação a 20.000 xg por 30 minutos a 4°C e filtrado em membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro. Cerca de um mL de Chitin Beads (NEB) foram lavadas no mesmo tampão de lise sem inibidores de proteases e, em seguida, incubadas com o extrato proteico filtrado por 1,5 horas sob agitação branda, a 4°C. O extrato foi filtrado por gravidade em coluna, as *beads* foram lavadas com Tampão de Lavagem-Intein e a eluição foi realizada com adição de 2 mL de Tampão Eluição-Intein e incubação de 16 horas à temperatura ambiente. A adição de grande concentração de DTT ativa a auto-clivagem do intein. Após incubação, a eluição foi repetida mais 4 vezes com adição de 2 mL do mesmo tampão porém sem DTT. As frações foram analisadas em SDS-PAGE, após coloração por Coomassie Blue R, reunidas e diluídas para concentrações finais de 20 mM Hepes pH 7,6; 100 mM KCl; 10% de glicerol; 2 mM de DTT. Em seguida, foi aplicada em coluna de HiTrap Heparin de 1 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada com o mesmo Tampão A3. A coluna de heparina liga uma grande variedade de proteínas, entre elas as que ligam ácidos nucleicos, como fatores de início de tradução. Após lavagem da coluna com Tampão A3, as proteínas foram eluídas em gradiente linear de 60 mL de 0-100% de Tampão B3 (eIF1, eIF1A e eIF5 eluíram, respectivamente, em 350, 600 e 450 mM KCl). As frações correspondentes aos picos do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE, após coloração por Coomassie Blue R, e aquelas que apresentaram as proteínas puras foram reunidas e dialisadas contra 2 L de Tampão de Estoque por 16 horas a 4°C. Por fim, as soluções proteicas foram concentradas utilizando concentradores Amicon de 3 kDa de poro (Millipore), quantificadas por $D.O_{280nm}$, aliquotadas para congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocadas em -80°C.

3.2.19.2. eIF2

Uma cultura saturada de 50 mL da linhagem VZL1103 (superexpressão de 6xHis-eIF2) foi diluída em 10 L de meio de cultura YPD e incubada a 30°C por 16 horas, até atingir a saturação. As células foram coletadas por centrifugação (cerca de 100 g), lavadas com PBS 1x gelado, congeladas a -80°C e, em seguida, ressuspensas em 250 mL de Tampão de Lise 4. As células foram lisadas em tubos

cônicos de 50 mL, contendo contas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (1 v de células : 3 v de contas de vidro). A lise foi realizada com auxílio de um vortex (6 ciclos: 1 minuto de agitação e 1 minuto em gelo). O lisado foi clarificado por centrifugação a 20.000 xg por 30 min, a 4°C e submetido à precipitação de proteínas, adicionando sulfato de amônio até saturação de 75% (cerca de 48 g de sal para cada 100 mL de extrato). Após uma hora a 4°C e sob agitação, as proteínas foram separadas por centrifugação a 40.000 xg por 35 min e, em seguida, ressuspensas em 150 mL de Tampão A4. O extrato proteico foi filtrado em membrana de 0,22 µm diâmetro de poro e aplicado em duas colunas em série do tipo HiTrap Chelating HP de 5 mL (GE Healthcare) contendo Ni²⁺, após equilibrá-las com Tampão A4 sem inibidores de proteases. A eluição foi feita com 120 mL de gradiente linear de 0-100% de Tampão B4. As frações correspondentes aos picos do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram as 3 subunidades de eIF2 (eIF2α (Sui2) – 35kDa, eIF2β (Sui3) – 32kDa e eIF2γ (Gcd11) – 58kDa) foram reunidas e diluídas, cuidadosamente e lentamente, para concentração final de 100 mM de KCl e 2 mM de DTT. O extrato proteico foi filtrado novamente em membrana de 0,22 µm diâmetro de poro e aplicado na coluna HiTrap Heparina HP de 5 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada com Tampão A5. As proteínas foram eluídas em 60 mL de gradiente linear de 0-100% de Tampão B5. As frações correspondentes aos picos do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram somente as 3 subunidades de eIF2 foram reunidas e dialisadas contra 2 L de Tampão de Estoque 2 por 16 horas a 4°C. Por fim, a solução proteica foi concentrada utilizando concentradores Amicon de 30 kDa de poro (Millipore), quantificada por D.O._{280nm}, aliquoteada para congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocada a -80°C.

3.2.19.3. eIF3

Uma cultura saturada de 50 mL da linhagem VZL1104 (superexpressão de 6xHis-eIF3) foi diluída em 10 L de meio de cultura YPD e incubada a 30°C por 16 horas, até atingir D.O._{600nm} = 1,0. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 3,5 L de YP e incubadas a 30°C por 10 minutos sob vigorosa agitação. Em seguida, as células foram coletadas e o precipitado celular de 20 g foi ressuspenso em 30 mL de Tampão A6. As etapas de lise, clarificação do extrato protéico e cromatografia por afinidade em apenas uma coluna HiTrap Chelating HP de 5 mL (GE Healthcare) carregada com Ni²⁺ foram realizadas de acordo com o protocolo de purificação de eIF2 (3.2.19.2). As frações correspondentes ao pico do

cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram as 5 subunidades de eIF3 (eIF3b (Prt1) – 88 kDa, eIF3c (Nip1) – 93 kDa, eIF3g (Tif35) – 30kDa, eIF3i (Tif34) – 38kDa) foram reunidas e concentradas utilizando concentrador Amicon de 30 kDa de poro, até volume aproximado de 200 μ L. Esta solução proteica concentrada foi aplicada em coluna de gel filtração Superose 12 (120 mL) (GE Healthcare), em fluxo contínuo de 0,2 mL/min de Tampão de Estoque. As frações correspondentes ao pico do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram somente as 5 subunidades de eIF3 foram reunidas, concentradas utilizando concentrador Amicon de 100 kDa, quantificadas por D.O._{280nm}, aliqüotadas para congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

3.2.19.4. eIF5B

Uma colônia isolada de *E. coli* BL21, contendo pLysS, e transformada com pVZ1176 (pMGA-HisTEV5B) foi inoculada em 2 L de LB contendo canamicina (50 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL). Quando a cultura atingiu D.O._{600nm} = 0,6, foi adicionado 1 mM de IPTG e a mesma foi incubada a 37°C, por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas, congeladas a -80°C, e em seguida ressuspensas em 70 mL de Tampão de Lise 5. As células foram lisadas e clarificadas conforme descrito no item 3.2.19.1. O extrato total foi aplicado em coluna de HisTrap crude de 1 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada com Tampão A6 (mesmo tampão de lise sem inibidores de proteases). Após lavagem da coluna com Tampão A6, as proteínas foram eluídas em gradiente linear de 0-100% de Tampão B6. As frações correspondentes aos picos do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram eIF5B foram reunidas, diluídas para a composição do Tampão A7 e aplicadas em coluna HiTrap Q HP de 5 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada com mesmo tampão. A eluição também foi realizada em gradiente linear de 80 mL de 0-100% de Tampão B7. As frações correspondentes aos picos do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram eIF5B foram reunidas, concentradas até 100 μ L e aplicadas em coluna Superdex 75 (35 mL) (GE Healthcare). As frações foram analisadas em SDS-PAGE e aquelas que apresentaram somente eIF5B foram coletadas, concentradas utilizando concentradores Amicon de 30 kDa de poro (Millipore), quantificadas por D.O._{280nm}, aliqüotadas para congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

3.2.19.5. $tRNA_i^{Met}$ de levedura carregado com metionina

- **Obtenção do $tRNA_i^{Met}$:** Uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pZV1171 (pUC19- $tRNA_i^{Met}$) foi inoculada em 150 mL de meio de cultura LB contendo ampicilina, incubada a 37°C por 16 horas sob agitação. Esta cultura foi submetida ao protocolo de isolamento e purificação de DNA plasmidial (item 3.2.2, MidiPrep). O DNA plasmidial foi digerido com 10 U da enzima de restrição BstNI (NEB) numa reação final de 500 μ L, contendo 1 mg de plasmídeo, incubada a 60°C por 16 horas. Após digestão, o DNA foi purificado (item 3.2.17) utilizando PCI tamponado em pH básico (6,6-7,6). O produto da purificação fenólica foi utilizado na reação de transcrição *in vitro* (item 3.2.18). Ao produto da transcrição, foi adicionado Mg^{2+} para concentração final de 60 mM $MgCl_2$ e o RNA sintetizado foi incubado a 95°C por 2 minutos, seguido de 2 minutos no gelo, condição necessária para a correta clivagem do $tRNA_i^{Met}$ pela ribozima. Mesmo volume de formamida foi adicionado ao microtubo e aplicado em gel de acrilamida desnaturante (10% acrilamida-bis 29:1, 8 M uréia, 1x Tampão TBE). Após visualização do RNA por UV *shadowing*, o gel foi recortado na altura da banda correspondente ao $tRNA$ e triturado com auxílio de uma pipeta de vidro livre de RNase/DNase em solução aquosa, e submetido a agitação branda a 4°C por 16 horas. A solução obtida foi filtrada utilizando *bottle top filter* com membrana de 0,22 μ m (Fisher), concentrada até volume de 500 μ L, em concentrador Amicon de 3 kDa (Millipore) e submetida a nova purificação (item 3.2.20). O $tRNA_i^{Met}$ não carregado e purificado foi aliquoteado e estocado a -20°C.

- **Purificação da enzima Metionil-tRNA sintetase (MetRS) de humano:** uma colônia isolada de *E. coli* BL21, contendo pVZ1150 (pET28a-MetRS), foi inoculada em 150 mL de meio de cultura LB contendo canamicina (50 mg/mL) e incubada a 37°C até atingir $D.O._{600nm} = 0,8$, a qual foi adicionado 1 mM de IPTG e incubada por mais 3 horas na mesma temperatura. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em 4 mL de Tampão A8 para serem lisadas em sonificador (ciclo de 5 minutos: 1 segundos ON e 1 segundos OFF). O lisado foi clarificado por centrifugação a 20.000 xg por 30 minutos a 4°C e filtrado em membrana de 0,45 μ m de diâmetro de poro. Cerca de 300 μ L de *beads* NiNTA (QIAGEN) foram lavadas no mesmo tampão sem inibidores de proteases e, em seguida, incubadas com o extrato proteico por 1 hora sob agitação branda a 4°C. As

beads foram separadas do extrato por centrifugação a 1.000 $\times g$ por 5 minutos, a 4°C, e lavadas 5 vezes com 800 μL de Tampão A8. A proteína foi eluída em 100 μL de Tampão B8, concentrada em Amicon de 30 kDa de poro (Millipore), quantificada por D.O._{280nm}, aliquotada para congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocada a -80°C.

- **Carregamento do tRNA_i^{Met} com metionina:** o tRNA purificado foi aquecido a 65°C por 20 minutos e resfriado lentamente, para assumir sua correta conformação. Uma reação de volume final de 500 μL , contendo 10 μM do tRNA purificado, 40 μM de metionina, 5 mM ATP e 1x de Tampão de Carregamento foi aquecida previamente a 30°C por 5 minutos e, então, 2 mM da enzima MetRS foi adicionado, seguida de nova incubação de 15 minutos, na mesma temperatura. O produto da reação de carregamento foi purificado (item 3.2.17) e o precipitado foi ressuspenso em 50 μL de 10 mM de NaAc pH 5,6, 2 mM MgCl₂ e 1 mM DTT. O produto da reação de carregamento foi re-purificado em resina de exclusão de peso molecular BioSpin 6 (Bio-Rad), seguindo recomendações do fabricante. Amostras de tRNA_i^{Met} carregado e não carregado foram analisados em gel de poli-acrilamida desnaturante ácido (Figura 21F).

3.2.20. Purificação de ribossomos de levedura

Este protocolo foi baseado em alguns outros previamente determinados (Christopher S. Fraser, dados não publicados; BEN-SHEM, 2010)

3.2.20.1. Purificação do 80S total

Uma cultura saturada de 50 mL da linhagem VZL1249 foi diluída em 10 L de meio de cultura YPD e incubada a 30°C por 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspenso em 3,5 L de YP e incubadas a 30°C por mais 10 min. As células foram coletadas novamente (cerca de 36 g), lavadas com água Milli-Q gelada e congeladas a -80°C. As células foram ressuspenso em 50 mL de Tampão A9, foram lisadas e o extrato clarificado conforme protocolo de purificação de eIF2 (3.2.19.2). Cada 25 mL do extrato clarificado foi aplicado em um tubo para o rotor Beckman Ti45 e, em seguida, 40 mL de uma solução de sacarose 20% (600 mM sacarose; 20 mM Hepes pH 7,5; 100 mM KCl; 5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM DTT) foi aplicada no fundo do tubo. Os tubos foram centrifugados a 84.500 $\times g$ por 14 horas, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado enxaguado com água Milli-Q

gelada e ressuspensão em 5 mL de Tampão de Ribossomo 1 com auxílio de um homogeneizador Dounce de 50 mL. A concentração de $Mg(OAc)_2$ foi ajustada para 5 mM e 0,1% de Triton X-100 foi adicionado ao homogeneizado que, em seguida, foi aplicado em uma coluna de gel filtração Sephacryl S400 HR (400 mL) previamente equilibrada com Tampão de Ribossomo 2 e, em fluxo constante de 0,5 mL/min, os ribossomos 80S de levedura eluíram após 225 mL de passagem do tampão. As frações correspondentes ao maior pico foram unidas e concentradas em concentrador Amicon de 30 kDa de poro, alíquotadas, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e estocadas a $-80^\circ C$.

3.2.20.2. *Purificação das subunidades 40S e 60S*

Cerca de 100 ODU de ribossomos purificados foram incubados com 1,5 mM de puomicina por 10 min em gelo, incubou-se por 10 min a $30^\circ C$ e, por fim, 3 min no gelo. Este material foi aplicado sobre 35 mL de gradiente de sacarose 10-40% em Tampão de Ribossomo 3 e centrifugado em rotor Beckman SW28 a $96.500 \times g$, por 14 horas, a $4^\circ C$. Cada gradiente foi fracionado usando um sistema BR-188 Density Gradient Fractionation (Brandel) e a $D.O_{260nm}$ foi monitorada por leitor de UV. As frações correspondentes aos picos de 40S e 60S foram coletadas, unidas e dialisadas contra 2 L de Tampão de Ribossomo 4. Por fim, as frações foram concentradas usando Amicon de 30 kDa até 50-100 ODU/mL, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e estocadas a $-80^\circ C$.

3.2.21. **Reconstituição do complexo de início de tradução**

A reconstituição do complexo de início de tradução foi realizada com base em protocolos pré-estabelecidos (ACKER *et al.* 2006; ACKER *et al.* 2007).

3.2.21.1. *Formação do complexo ternário (TC)*

Em um microtubo, foram adicionados 18 μL de Tampão Rec contendo 2 μM de eIF2 e 500 μM de $GTP \cdot Mg^{2+}$ (1:1) a $26^\circ C$ por 10 minutos. A este volume, foi adicionado 2 μL de $tRNA_i^{Met}$ -Met (concentração final de 4 μM) e a reação foi incubada novamente a $26^\circ C$ por 10 min.

3.2.21.2. *Formação do complexo 43S*

3.2.23. Marcação de eIF5A por modificação covalente

Os protocolos de modificação de eIF5A foram baseados em FRASER *et al.* 2007.

3.2.23.1. Fluoresceína-5-Maleimida

As diferentes formas mutadas de eIF5A de humano e levedura foram submetidas a marcação fluorescente com fluoresceína-5-maleimida, através da ligação covalente ao resíduo único de cisteína, após diálise contra o Tampão de Modificação 1 para completa exclusão do DTT. Uma reação de volume final de 400 μL , contendo 60 μM de proteína eIF5A e 300 μM de fluoresceína-5-maleimida (Thermo), em mesmo tampão, foi incubada à temperatura ambiente por 1,5 horas, sob proteção da luz. Esta reação foi submetida a diálise contra o Tampão de Armazenamento. Por fim, as proteínas marcadas foram re-purificadas em coluna de exclusão de peso molecular BioSpin 6 (Bio-Rad) seguindo recomendações do fabricante. O manuseio da fluoresceína e o cálculo da concentração final de proteínas marcadas foram realizados de acordo com recomendações do fabricante (Thermo).

3.2.23.2. BABE-Fe

Outra marcação realizada nos mesmos mutantes de eIF5A foi a incorporação de uma molécula de BABE conjugada ao íon Fe (BABE-Fe) ao resíduo único de cisteína. Para isso, as proteínas mutadas de eIF5A foram dialisadas três vezes contra 1 L de Tampão de Modificação 2 por 1 hora a 4°C. A quantidade de 1 mg de BABE foi pesada e dissolvida em 10 μL de DMSO e, em seguida, adicionada de 50 μL de Tampão de Modificação 2, gerando uma solução final de 30 mM BABE. A modificação de eIF5A contendo uma única cisteína foi realizada com a adição de 120 μg da proteína dialisada e 7 μL de solução final de BABE num volume final de 130 μL , incubado à temperatura ambiente, sob agitação suave por 4,5 horas. Em seguida, foi realizado o controle da marcação eIF5A-BABE, remarcando uma alíquota dessa mesma reação com fluoresceína-maleimida (item 3.2.23.1). Todas as amostras marcadas foram analisadas em gel SDS-PAGE e visualizadas sob exposição à luz UV, seguido de coloração por Coomassie Blue R. As proteínas que foram corretamente marcadas com BABE não foram marcadas com fluoresceína, em comparação com a alíquota de proteína não incubada com BABE. Após o tempo total de 5 horas de marcação com BABE, estas proteínas foram re-dialisadas contra 1 L de

Tampão de Estoque 3 por 16 horas a 4°C. As amostras foram re-quantificadas, aliquotadas para rápido congelamento em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

3.2.24. Anisotropia ou Polarização de Luz Fluorescente

Após marcação das proteínas mutantes de cisteína única de eIF5A de levedura e de humano com fluoresceína-maleimida, essas proteínas foram utilizadas no ensaio de polarização de luz fluorescente. Para tanto, eIF5A-fluoresceína foi submetida a diluição seriada de 1 µM a 5 nM e 20 µL de cada concentração foi aplicada em uma microplaca de 384 poços, a qual foi lida no equipamento fluorímetro VICTOR X5 Multilabel Plate Reader para determinação da concentração fixa mínima de eIF5A-fluoresceína a ser utilizada nos ensaios de anisotropia. Em seguida, 1 µM de ribossomo (40S, 60S ou 80S de levedura ou de humano) foi seriadamente diluído até 25 nM em Tampão Rec e, em seguida, foi adicionado 20 nM de eIF5A-fluoresceína, numa reação final de 25 µL. As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, 20 µL foram transferidos para o mesmo tipo de microplaca e lida no mesmo equipamento para quantificação da polarização de luz fluorescente. Os valores de fluorescência total e polarização de luz foram analisados no programa KaleidaGraph para determinação da fração ligada de eIF5A ao ribossomo e, conseqüentemente o cálculo da constante de dissociação de eIF5A ao ribossomo ou subunidade ribossomal testados (Kd).

O cálculo de dFP e fração de ligação foi realizado pelo colaborador Dr. Christopher Fraser.

3.2.25. Ensaio de clivagem de rRNA e *primer extension*

3.2.25.1. Ligação proteína-ribossomo

Previamente à formação do complexo eIF5A-ribossomo, foi necessária a diálise destes componentes contra 1 L de Tampão de Clivagem durante 2 horas, sob constante agitação. Após formação dos complexos ribossomo-proteína (item 3.2.21) em volume final de 50 µL contendo 1 µM de 60S e 2 µM de eIF5A-BABE-Fe, foi realizado o ensaio de clivagem do rRNA.

3.2.25.2. Clivagem de rRNA induzida por radical OH•

A indução da clivagem de rRNA pelo radical hidroxil, cuja formação é induzida por Fe^{2+} ligado à eIF5A-BABE foi estimulada pela adição de 0,025% de água oxigenada e 4 mM de ácido ascórbico (reação de Fenton: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$). A reação foi incubada por 10 minutos em gelo, e rapidamente interrompida com a adição de 8 mM de tiouréia, 280 mM KCl, 5 mM EDTA e 0,8% de SDS, necessariamente nesta ordem. Neste momento, um precipitado branco gelatinoso foi formado e, em seguida, foi solubilizado por aquecimento a 90°C por 1 min. Imediatamente após solubilização do precipitado, foi realizada a purificação fenólica do rRNA, adicionando 100 μL de fenol tamponado em pH 8,0 (USB Corporation), vortexando por 10 s e centrifugando por 1,5 min a 16.000 xg. A fase orgânica, inferior, foi removida do microtubo com auxílio de micropipetador e novos 100 μL de fenol foram adicionados. Esta etapa foi repetida 5 vezes. A continuação da purificação fenólica seguiu o item 3.2.17.

Paralelamente à reação de clivagem do rRNA induzida por BABE-Fe, uma série de reações controle foi realizada, como indicado nas Figuras 28 e 29.

3.2.25.3. *Transcrição Reversa do rRNA (primer extension)*

Após purificação dos rRNAs clivados e controles, estes foram quantificados e adicionados a reações de transcrição reversa, utilizando *primers* de DNA marcados com radioisótopo ^{32}P . Para a marcação, os *primers* de DNA foram desnaturados por aquecimento a 90°C por 2 minutos e resfriamento imediatamente em gelo. Em seguida, os *primers* de DNA foram submetidos a fosforilação pela enzima polinucleotídeo quinase (PNK) numa reação final de 40 μL contendo 100 pmol de *primer*, 10 μL de ^{32}P γ -ATP (100 μCi) (Perkin Elmer), 10 μL do tampão da enzima PNK, 4 μL PEG 8000 50% e 2 μL de PNK (preparação feita no laboratório do Dr. Christopher Fraser). A reação foi incubada a 37°C por 1,5 h e submetida a purificação (3.2.17). O precipitado de DNA foi ressuspensão em 50 μL de água Milli-Q. Após marcação, os *primers* foram utilizados nas reações de transcrição reversa, iniciando com o anelamento do *primer* no molde de rRNA. Para tanto, foi preparada uma mistura de *primer* contendo 6 μL de *primer* marcado e purificado, 12 μL de tampão de anelamento 4,5x (225 mM Hepes pH 7,5; 450 mM KCl) e 30 μL de água Milli-Q. 4 μL desta mistura foram pipetados em microtubos de PCR (200 μL) e foi adicionado 1 μL de cada amostra de rRNA (cerca de 500 ng/ μL). A reação foi aquecida a 90°C seguido de um resfriamento gradual até 40°C com diminuição de 5°C a cada 45 s. Os microtubos foram centrifugados brevemente e foram adicionados 2 μL de Tampão de

Extensão 1x contendo 3 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e 17 µg/µL de enzima MMLV RT (preparação feita no laboratório do Dr. Christopher Fraser). A reação de transcrição reversa foi incubada a 42°C por 45 minutos e, em seguida, o volume foi transferido para microtubo de 1,5 mL, adicionado 1 µL de NaAc 3 M pH 5,2 e 100 µL de etanol 100%, vortexado e incubado na bancada por 20 min. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 16.000 xg por 15 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 10 µL de formamida contendo azul de bromofenol.

3.2.25.4. Reação de primer extension para sequenciamento do rRNA 25S

Paralelamente ao preparo do item anterior, uma amostra contendo apenas a subunidade 60S do ribossomo intacto foi utilizada como molde para o sequenciamento do rRNA 25S. Para tanto, esta amostra foi submetida às mesmas etapas descritas acima, porém a reação de transcrição reversa utilizada neste caso inclui a adição de 30 mM de ddNTP, separadamente em 4 diferentes reações, para contemplar todos os nucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

3.2.25.5. Gel de primer extension para identificação dos pontos de clivagem de rRNA

O gel de dimensões de 38cmX44cmX0,5mm para aplicação das amostras, tanto de sequenciamento do rRNA 25S, quanto de clivagem do rRNA, foi preparado em volume final de 75 mL contendo 10% de acrilamida:bis (29:1), 0,42 g/mL de uréia, 0,05% de APS e 0,08% de TEMED em tampão TBE 0,5x. Após polimerização, o gel foi submetido a pré-corrída de 2 horas a 45 W. Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 90°C por 5 min e 3 µL de cada amostra foram aplicados no gel, que foi submetido a uma corrida de 2000 V por 2,5 horas. O gel foi então desidratado e exposto em tela de captura de fosfoimagem e depois escaneado no equipamento Storm 860 Phosphorimager / Fluorimager (GE Healthcare).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo do papel de eIF5A na translocação de proteínas para o RE e na expressão gênica diferencial em nível traducional

4.1.1. Análise da translocação de repórteres das vias pós-traducional e co-traducional em mutantes de eIF5A

4.1.1.1. Via pós-traducional

Sabe-se que eIF5A não participa do tráfego vesicular de uma maneira geral, pois mutantes de eIF5A não apresentam defeito no processamento da protease vacuolar carboxipeptidase (CPY) (FRIGIERI *et al.* 2008). Esse dado sugere que eIF5A também não participa da translocação pela via pós-traducional, uma vez que CPY é translocada exclusivamente por esta via.

No intuito de confirmar que eIF5A não influencia a translocação de proteínas pela via pós-traducional, foi realizado um ensaio utilizando como repórter uma versão modificada da enzima Ura3, fusionada à sequência sinal (SS) de CPY (Ng *et al.* 1996). A Figura 7A mostra, esquematicamente, o funcionamento do repórter. A enzima Ura3 selvagem possui localização citoplasmática e é essencial para produção de uracila e, portanto, para capacidade de crescimento da linhagem em meio desprovido de uracila (prototrofia para uracila). Quando essa enzima encontra-se em fusão com uma sequência sinal responsável por direcioná-la para o RE, ela deixa de ser encontrada livre no citoplasma e leva ao fenótipo de auxotrofia para o aminoácido uracila. Assim, a presença de mutações que prejudicam a translocação da proteína repórter para o RE levam ao acúmulo da enzima no citoplasma, local onde é ativa, permitindo que a célula cresça na ausência de uracila (Ng *et al.* 1996).

Para avaliar a participação de eIF5A na via secretória através da translocação pela via pós-traducional, ensaios utilizando o repórter discutido acima foram realizados com dois mutantes condicionais de eIF5A, *tif51A-1* e *tif51A-3* e uma linhagem selvagem como controle. As linhagens foram transformados com o vetor vazio e o repórter SS-Ura3. Os transformantes foram cultivados em meio seletivo para o vetor e para o repórter (SC-his e SC-his,-ura, respectivamente), nas temperaturas permissiva e semi-permissivas para os alelos mutantes de *TIF51A*. A linhagem mutante *sec61-101* foi utilizada como controle de defeito na translocação do repórter

SS-Ura3. Apesar das diferenças entre translocons das duas vias de translocação, como apresentado na Introdução, a proteína Sec61 é o componente majoritário de ambos (CORSI and SCHEKMAN 1996). Portanto, o mutante *sec61-101* apresenta defeito na translocação de proteínas ao RE pelas duas vias (Ng *et al.* 1996). Assim, a Figura 7B mostra que o alelo *sec61-101* apresenta crescimento em meio SC-his,-ura, nas temperaturas testadas, comprovando que o defeito na translocação pela via pós-traducional leva ao acúmulo de SS-Ura3 no citoplasma.

Ainda na Figura 7B, as linhagens contendo os alelos *tif51A-1* e *tif51A-3*, transformadas com o repórter SS-Ura3 apresentaram crescimento no meio SC-his, como esperado, entretanto, não apresentaram crescimento em meio SC-his,-ura. Assim, pode-se concluir que a proteína SS-Ura3 é direcionada integralmente para o RE, não indicando defeito na translocação pela via pós-traducional nos mutantes de eIF5A.

O fato de os diferentes mutantes de eIF5A não apresentarem defeito no direcionamento de SS-Ura3 está de acordo com o fato de estes mutantes não demonstrarem nenhuma alteração na maturação de CPY endógena (FRIGIERI *et al.* 2008). Assim, podemos concluir que eIF5A não atua na via secretória no passo de translocação de proteínas pela via pós-traducional.

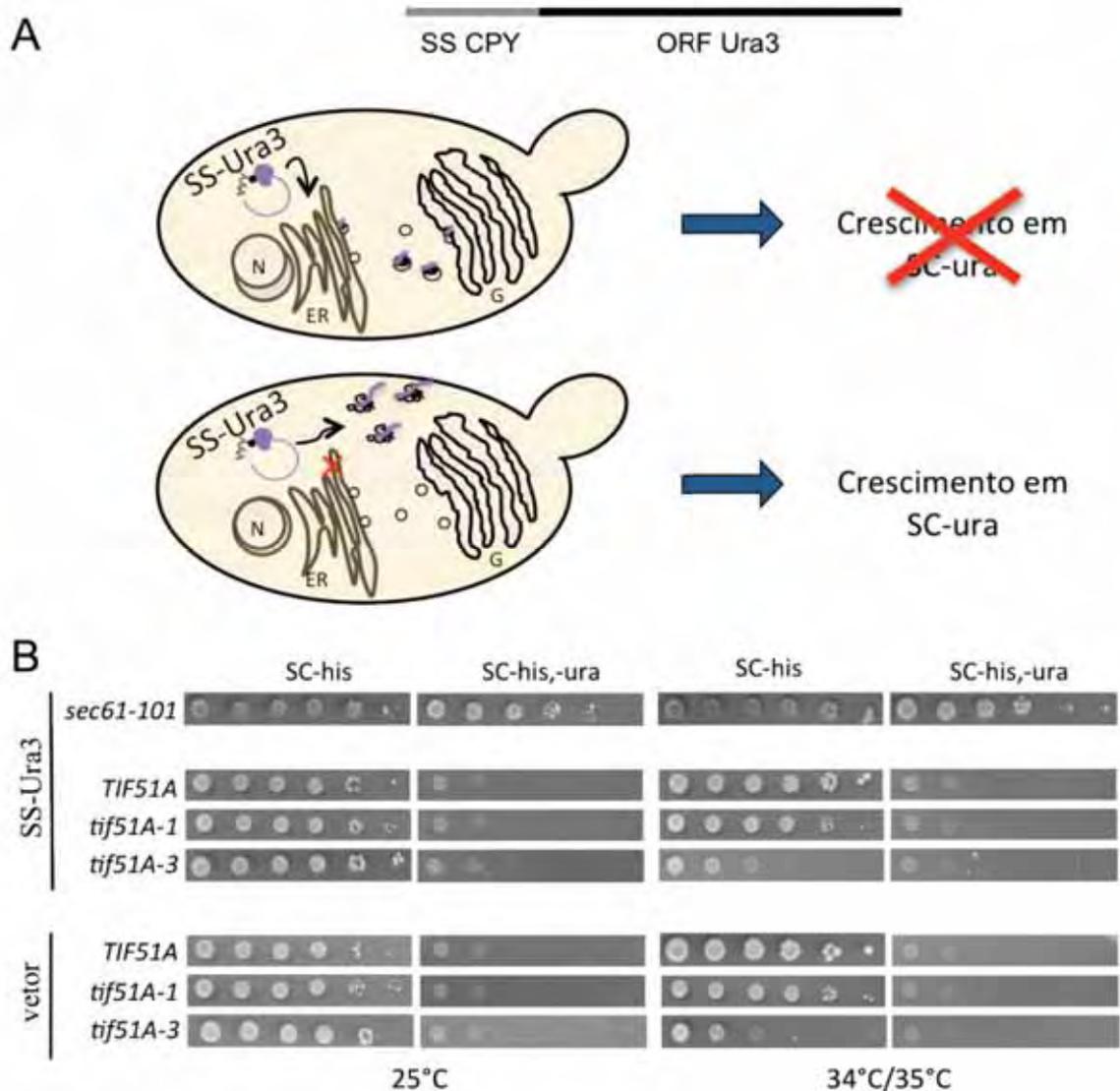


Figura 7. Ensaio de translocação do repórter SS-Ura3 pela via pós-traducional, utilizando mutantes de eIF5A, revela não envolvimento de eIF5A nesta via. (A) Esquema do mecanismo de translocação de SS-Ura3. Defeitos na via pós-traducional levam ao acúmulo citoplasmático de Ura3, local onde a enzima é ativa, permitindo crescimento em SC-ura. A linhagem selvagem promove a completa translocação da proteína repórter e não apresenta crescimento no meio seletivo. **(B)** Diluições seriadas das linhagens contendo os alelos *tif51A-1* (SVL14), *tif51A-3* (SVL32) e *TIF51A* (SVL82), transformadas com vetor vazio (pSV57) ou SS-Ura3 (pVZ1064), foram aplicadas nos meios seletivos SC-his e SC-his,-ura e incubadas nas temperaturas permissiva (25°C) e semi-permissivas para os alelos *tif51A-1* (35°C) e *tif51A-3* (34°C) por 3 e 4 dias, respectivamente. A linhagem VZL961 (*sec61-101*), contendo o repórter SS-Ura3, utilizada como controle de defeito na via pós-traducional, foi aplicada nos meios seletivos e as placas foram incubada a 34°C por 4 dias.

4.1.1.2. Via co-traducional

Como apresentado também na Introdução deste trabalho, a translocação de proteínas para o RE pela via co-traducional ocorre de maneira dependente de SRP (*Signal Recognition Particle*). Em *S. cerevisiae*, o translocon responsável pela via co-traducional é composto por três a quatro cópias do heterotrímero Sec61-Sbh1-Sss1p, Sec63, Sec71p e Sec72p (PANZNER *et al.* 1995; SPILLER and STIRLING 2011). Sbh1p e seu homólogo Sbh2p, juntamente com Ssh1p (Sec Sixty-one Homolog, proteína hómologa a Sec61 e não essencial) e Sss1, por sua vez, fazem parte de um translocon auxiliar também envolvido com a translocação pela via co-traducional (FINKE *et al.* 1996; JIANG *et al.* 2008).

Uma vez comprovada a ausência do envolvimento de eIF5A na translocação de proteínas pela via pós-traducional, foi avaliado o seu envolvimento na via co-traducional. Sendo assim, foram realizados experimentos de análise de translocação da proteína DPAP B (dipeptidil aminopeptidase B), uma protease vacuolar codificada pelo gene *DAP2*, a qual sofre translocação para o RE exclusivamente pela via co-traducional. Para este ensaio, foi utilizado o gene *DAP2* clonado em fusão com as sequências dos tags HA, 6xHis e ProtA no C-terminal. Esse gene em fusão está sob controle transcricional do promotor de *GAL1* (induzível por galactose), ou seja, sempre que cultivado na presença de galactose como única fonte de carbono, o repórter *DAP2-tag* será expresso. É importante ressaltar que DPAP B fusionado a tag HA é igualmente funcional a DPAP B selvagem (NG *et al.* 1996).

A Figura 8A mostra, esquematicamente, o ensaio com o repórter *DAP2-tag*. No RE, a proteína DPAP B sofre sucessivas glicosilações, alterando seu peso molecular de 93 kDa para 120 kDa. Enquanto uma linhagem selvagem apresenta predominantemente a forma madura de DPAP B, mutantes com defeitos na via co-traducional apresentam diminuição da forma madura dessa proteína (ROBERTS *et al.* 1989; NG *et al.* 1996). Para este ensaio, as linhagens *tif51A-1*, *tif51A-3*, selvagem e o controle de defeito na via co-traducional, *sec61-101*, foram transformadas com o plasmídeo repórter *DAP2-tag* e submetidas à indução da expressão de DPAP B. A Figura 8B, portanto, mostra o resultado do ensaio de *western blot* para detecção de DPAP B, tanto da forma precursora (pDPAP B \approx 93 kDa) quanto da forma madura (mDPAP B \approx 120 kDa). Como pode ser observado, a linhagem selvagem apresenta uma mistura das duas formas de DPAP B, entretanto não é observado, em nenhuma linhagem testada, um aumento da forma madura quando na diminuição da forma precursora, o que pode ser explicado devido ao fato de a proteína superexpressa ser

rapidamente degradada quando acumulada no citoplasma. Ainda a detecção da forma precursora, em todas as linhagens testadas, pode ser devido ao fato de o gene *DAP2* estar sendo superexpresso (vetor de alto número de cópias e promotor forte de *GAL1*). De acordo com o esperado, a linhagem controle de defeito na via co-traducional *sec61-101* apresenta apenas pDPAP B, revelando seu defeito no processamento de DPAP B. De maneira semelhante ao controle de defeito na via co-traducional, ambos os mutantes de *TIF51A*, quando cultivados na temperatura não permissiva, apresentam apenas pDPAP B. Diferentemente do que ocorre com o alelo *tif51A-1*, a presença apenas de pDPAP B no alelo *tif51A-3* ocorre mesmo na temperatura permissiva. Este resultado pode ser explicado devido à maior severidade do alelo *tif51A-3* em comparação com *tif51A-1* (DIAS *et al.* 2008).

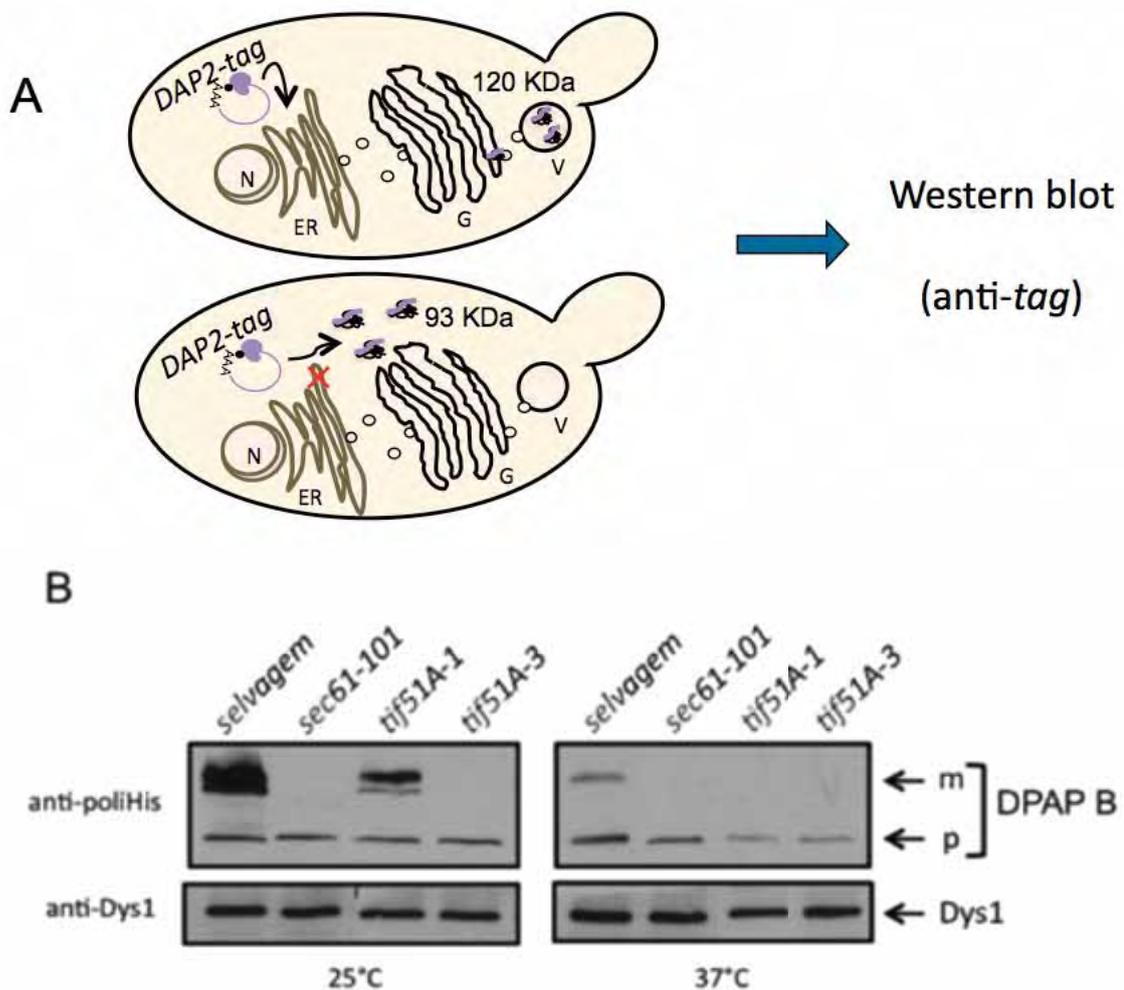


Figura 8. Ensaio de translocação do repórter DPAP B pela via co-traducional, utilizando mutantes de eIF5A, revela o envolvimento de eIF5A nesta via. (A) Esquema do mecanismo de modificação de DPAP B. Defeitos na via co-traducional levam ao acúmulo citoplasmático de DPAP B, gerando apenas pDPAP B (93 kDa), enquanto que a linhagem selvagem apresenta a forma de 120 kDa, proteína glicosilada no RE (mDPAP B). **(B)** As linhagens SVL14 (*tif51A-1*), SVL32 (*tif51A-3*), SVL82 (*TIF51A* – selvagem) e VZL1021 (*sec61-101* - controle de defeito na via co-traducional) foram transformadas com pVZ1110 (GAL1p-DAP2-6xHis) e cultivadas em meio seletivo. A produção da proteína repórter foi induzida por adição de galactose 2% durante 3 horas, tanto na temperatura permissiva (25°C), quanto na não permissiva aos alelos *tif51A-1* e *tif51A-3* (37°C). Após lise celular, 15 µg de proteína total foi utilizada em ensaio de *western blot* utilizando o anticorpo anti-poliHis (Sigma), para detecção de pDPAP B (93 kDa) e mDPAP B (120 kDa). A proteína Dys1 foi utilizada como controle de carregamento das amostras (45 kDa).

4.1.2. Análise de interação genética entre mutantes de eIF5A e proteínas envolvidas na via co-traducional de translocação

Diante dos resultados deste trabalho, que sugerem um provável papel para eIF5A no encontro da tradução com a via secretória, no momento da translocação de proteínas para o RE pela via co-traducional, outros ensaios foram propostos e realizados para estudar possíveis interações genéticas entre mutantes de eIF5A e mutantes de componentes específicos da via co-traducional, como proteínas componente do complexo SRP, receptor de SRP no RE e do translocon (Figura 6B). Ensaios genéticos são uma ferramenta importante na determinação da função de proteínas no modelo de *S. cerevisiae* (GUARENTE 1993). Este objetivo foi feito em colaboração com os alunos do nosso laboratório de iniciação científica Hermano Martins Bellato e de doutorado Leonardo Biancolino Marino.

Como apresentado anteriormente, a via co-traducional é dependente do complexo ribonucleoproteico SRP, composto por 7 subunidades em levedura: Srp21, Srp14, Sec65, Srp54, Srp68, Srp72 e 7S RNA (scR1) (MASON *et al.* 2000), como mostra esquematicamente a Figura 9A. Assim que o polipeptídeo nascente emerge do ribossomo com seu N-terminal hidrofóbico, chamado de peptídeo sinal (sinal para o reconhecimento de SRP), Srp54 reconhece a sequência e ocorre uma mudança conformacional no complexo, mais especificamente das subunidades Srp68 e Srp72, que funcionam como uma dobradiça do complexo. Como resultado dessa alteração conformacional, SRP passa a interagir com o ribossomo desde o sítio E até a região de interação com eEF2, o que leva a uma parada na elongação da tradução. A partir disso, o complexo SRP-Ribosome Nascent Chain (SRP-RNC) é direcionado à membrana do RE, onde interage com o receptor de SRP, como mostra a Figura 9B. Em *S. cerevisiae*, este receptor é composto por um heterodímero formado por Srp101 (SR α) e Srp102 (SR β) (OGG *et al.* 1992). SR β contém um domínio transmembrana que ancora o receptor de SRP no RE (Figura 9B). Quando SRP se desliga do ribossomo, a elongação da tradução é retomada e o peptídeo nascente é simultaneamente translocado para o lúmen do RE (HALIC *et al.* 2004).

O primeiro ensaio de interação genética foi realizado com as linhagens mutante de eIF5A (*tif51A-3*) e SR β (*srp102^{K51I}*), que foram geneticamente combinadas para a obtenção de haplóides contendo ambos alelos mutantes. A Figura 10A mostra, nos painéis superiores, os controles das linhagens parentais, isto é, defeito de crescimento do mutante *tif51A-3* na temperatura restritiva de 34°C. As temperaturas

usadas no ensaio não foram capazes de revelar a sensibilidade a temperatura do mutante de SR β . Nos painéis inferiores, pode-se observar que a presença de ambos mutantes no mesmo haplóide (*srp102^{K511} / tif51A-3*) leva a um fenótipo de sensibilidade a temperatura significativamente mais severo que o do mutante mais doente, o *tif51A-3*. Este resultado demonstra uma interação genética do tipo sintético doente entre os mutantes de eIF5A e da subunidade β do receptor de SRP.

Além do complexo SRP e do seu receptor na membrana do RE, o translocon também é outro complexo essencial para a translocação. O translocon responsável pela via co-traducional em levedura é composto por três a quatro cópias do heterotrímero Sec61-Sbh1-Sss1p, Sec63, Sec71p e Sec72p (PANZNER *et al.* 1995; SPILLER and STIRLING 2011). Sbh1p e seu homólogo Sbh2p, juntamente com Ssh1p (Sec Sixty-one Homolog, proteína hómologa a Sec61 e não essencial) e Sss1, por sua vez, fazem parte de um translocon auxiliar também envolvido com a translocação pela via co-traducional (FINKE *et al.* 1996; JIANG *et al.* 2008).

Assim, foi também realizada a análise de interação genética sintética entre o mutante *tif51A-3* e *ssh1 Δ* . A manipulação genética permitiu gerar haplóides contendo o mutante *tif51A-3::URA3* com *ssh1::kanMX4*. Os resultados apresentados na Figura 10B, painéis inferiores, evidenciam uma piora significativa do fenótipo de crescimento do haplóide que possui os dois genes mutados, quando comparado às linhagens parentais, apresentadas nos painéis superiores, ou aos haplóides que carregam apenas um dos mutantes na mesma tétrade, revelando novamente uma interação genética do tipo sintético doente.

Por fim, outra interação genética avaliada foi o teste de supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A-3* de eIF5A pela superexpressão (através de plasmídeo de alto número de cópias) de todos os genes que codificam para componentes de SRP em levedura: *SEC65*, *SRP21*, *SRP72*, *SCR1*, *SRP14*, *SRP54* e *SRP68* (WILLER *et al.* 2003). As linhagens *tif51A-3*, *sec61-3*, *sec65-1* e selvagem foram transformadas com os plasmídeos vazios ou contendo os genes de SRP. O resultado do teste de superexpressão, mostrado na Figura 11, revela considerável melhora no fenótipo de sensibilidade a temperatura de *tif51A-3* (painéis inferiores), similar ao obtido para o mutante *sec61-3* (controle de interação genética positiva). No caso do mutante *sec65-1*, a melhora do crescimento foi total, pois trata-se de um controle de complementação pela presença *SEC65* no plasmídeo.

Os resultados obtidos nas análises genéticas reforçam de maneira significativa a correlação funcional entre eIF5A e translocação co-traducional de

polipeptídeos para o RE, visto que todas as análises realizadas com componentes específicos de via co-traducional revelam uma interação genética da função das proteínas testadas com eIF5A.

Os resultados apresentados até o momento sugerem o envolvimento de eIF5A na translocação de proteínas pela via co-traducional, ou por participar no controle traducional de mensageiros que codificam proteínas que são translocadas por esta via, ou ainda, por interferir com a maquinaria de parada da elongação ocorrida após a ligação de SRP no ribossomo.

Ainda, novas análises genéticas estão sendo propostas para este objetivo, com intuito de melhorar o entendimento do papel de eIF5A na via co-traducional, utilizando mutantes que afetam especificamente a ligação do complexo ribossomo/peptídeo nascente/mRNA na molécula de SRP ou o ancoramento do ribossomo/peptídeo nascente/mRNA/SRP no translocon (*RPL25-GFP*, *sec61^{R275E/R406E}* e *sec65-1*) (DALLEY *et al.* 2008). Esses resultados poderão ajudar para a definição do momento em que eIF5A atua na translocação de proteínas para o RE.

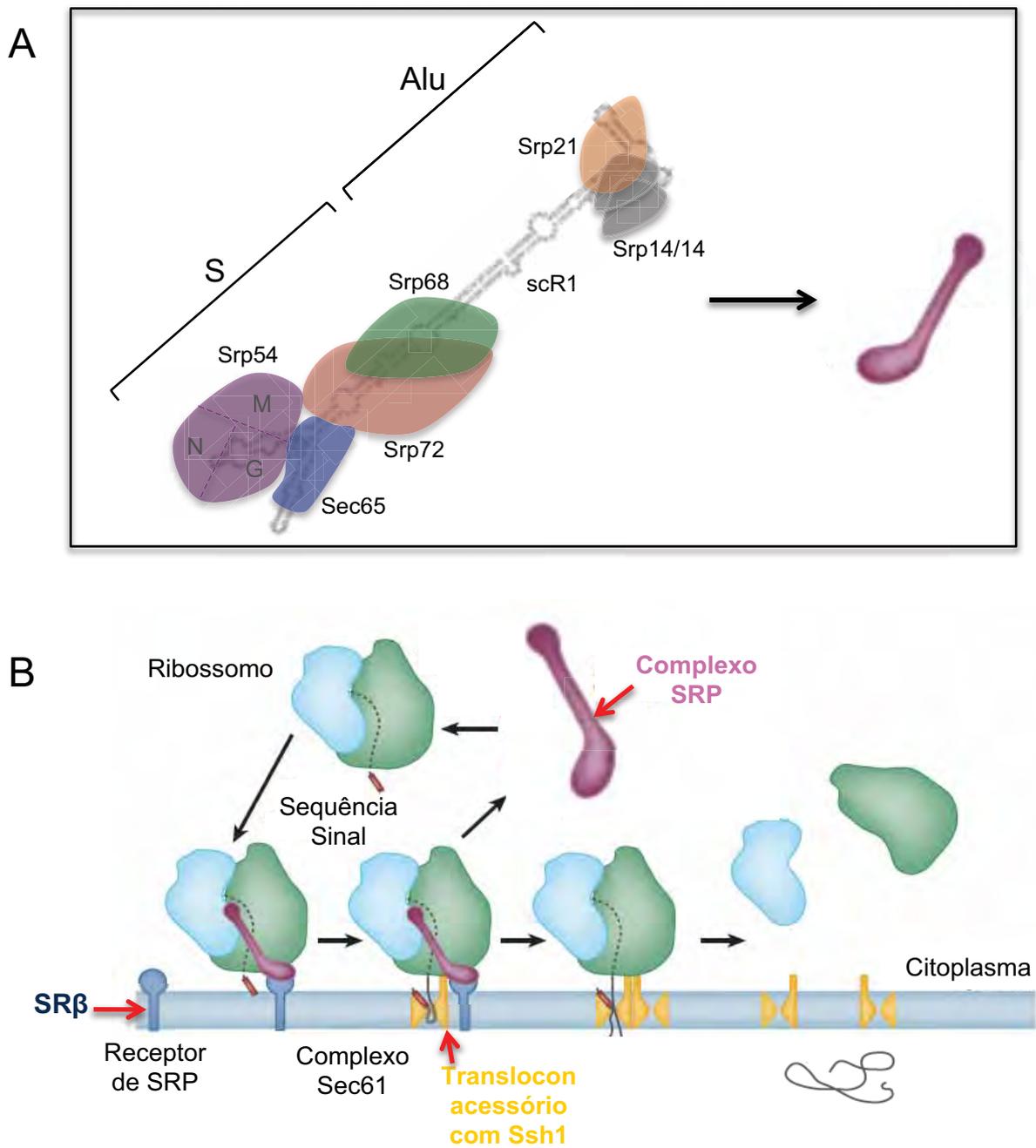
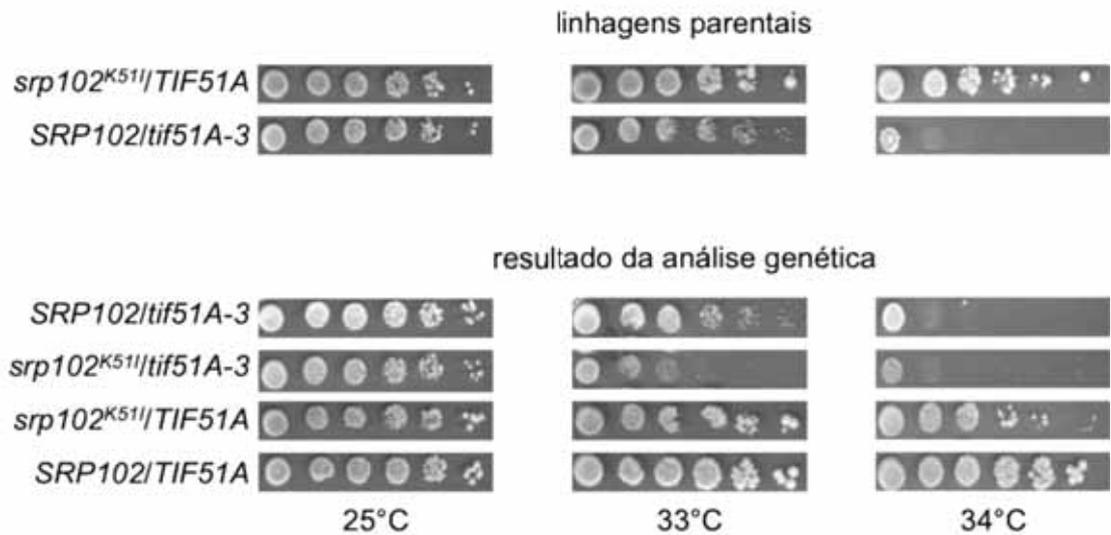


Figura 9. Via co-traducional de translocação de proteínas para o RE. (A) Figura esquemática do complexo ribonucleoproteico SRP, com seus principais domínios e subunidades. **(B)** Funcionamento da via co-traducional de translocação de proteínas em *S. cerevisiae*. Está representado o ribossomo em parada de tradução devido à sua interação com SRP e o complexo sendo direcionado para a membrana do retículo endoplasmático, onde se associará com o receptor de SRP para interagir com translocon. Nota-se que as proteínas SRβ do receptor de SRP, Ssh1 do translocon acessório e o complexo SRP estão em destaque.

A



B

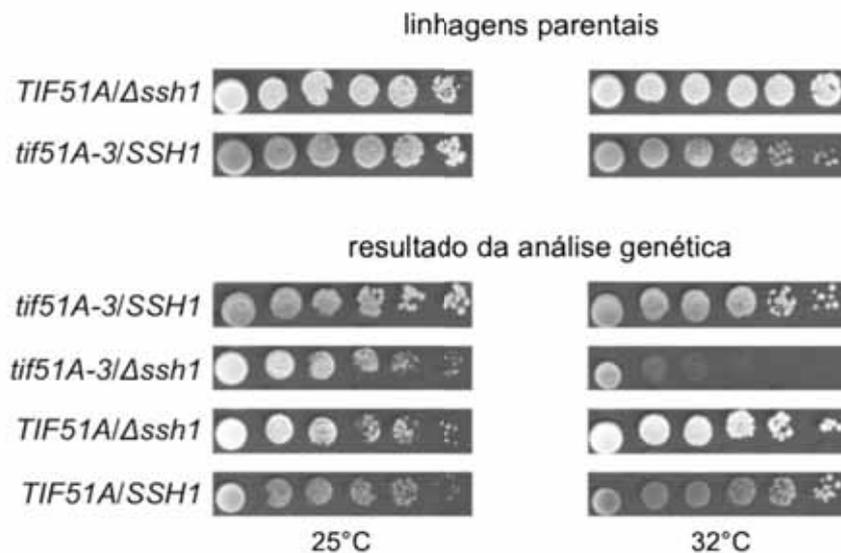


Figura 10. Análises genéticas de um mutante de eIF5A com mutantes do receptor de SRP e do translocon auxiliar revelam interação genética do tipo sintético doente. (A) Diluições seriadas dos quatro haplóides de uma mesma tétrade obtidas do cruzamento entre *tif51A-3* (SVL102) e *srp102^{K511}* (VZL1181) foram aplicadas em meio YPD e incubadas por 2 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens parentais *tif51A-3* e *srp102^{K511}* foram usadas como controle de crescimento. (B) Diluições seriadas dos quatro haplóides de uma mesma tétrade obtidas do cruzamento entre *tif51A-3::URA3* (SVL447) e *ssh1::kanMX4* (VZL1235) foram aplicadas em meio YPD e incubadas por 2 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens parentais *tif51A-3::URA3* e *ssh1::kanMX4* foram usadas como controle de crescimento.

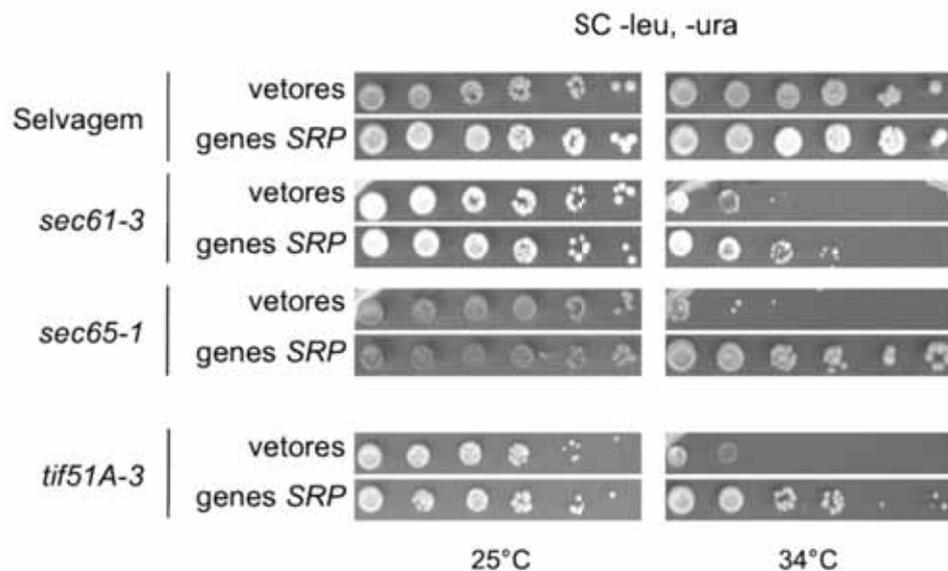


Figura 11. Superexpressão de componentes do complexo SRP suprime o fenótipo de termossensibilidade de mutante de eIF5A. Crescimento das linhagens selvagem (SVL82) e mutante *tif51A-3* (SVL32), transformadas com os vetores vazios (pSV364 e pSV374) e com plasmídeos superexpressando subunidades de SRP (pVZ1359 - *SEC65/SRP21/SRP72/SCR1* e pVZ1360 - *SRP14/SRP5/SRP68*) e incubadas por 3 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens *sec61-3* (VZL1247) e *sec65-1* (VZL1248) foram usadas como controle positivo de supressão e complemetação, respectivamente.

4.1.3. Análise da expressão gênica diferencial em nível traducional por análise proteômica de mutante que apresenta defeito na função de eIF5A

Além da correlação funcional de eIF5A com a via secretória, interações genéticas de mutantes de eIF5A com fatores envolvidos com integridade celular e ciclo celular em *S. cerevisiae* foram descritas em nosso laboratório (VALENTINI *et al.* 2002; ZANELLI and VALENTINI 2005). No entanto, até o momento não foi determinado como se estabelece esta correlação funcional. O recente envolvimento direto de eIF5A com a etapa de alongação da tradução (GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009) torna possível sugerir que estas correlações reveladas por interações genéticas sejam resultado do efeito de eIF5A na tradução diferencial de diferentes mRNAs (tradução específica). Mesmo fatores que atuam no processo geral da tradução podem afetar diferencialmente a tradução de determinados mRNAs, como é o caso do controle traducional do mRNA de *CLN3* (ciclina G1/S) por eIF4E. Inclusive, o gene para o fator eIF4E (*CDC33*) foi originalmente identificado em um rastreamento de mutantes de ciclo celular, justamente por defeitos nesse fator geral de início da tradução gerar um acúmulo de células paradas em G1 (DANAIE *et al.* 1999). Por mais que a etapa de alongação não seja tão amplamente regulada como o início da tradução (MERRICK 1992), mutantes de eIF5A de *S. cerevisiae* possuem defeitos de ciclo celular e o bloqueio da hipusinação em células de mamíferos também causa parada reversível no ciclo celular (ZANELLI and VALENTINI 2007).

Além disso, o suposto envolvimento de eIF5A no direcionamento de proteínas ao RE pode estar relacionado com a regulação da tradução de mRNAs envolvidos com o brotamento e progressão do ciclo celular em *S. cerevisiae*, eventos estes que são dependentes da via secretória.

Considerando essas possibilidades, é esperado que mutantes que levam à perda de função de eIF5A tenham alterações na tradução de subgrupos de mRNAs e, conseqüentemente, apresente conteúdo proteico diferente do alelo selvagem. Dessa forma, neste trabalho a pesquisa de genes diferencialmente expressos foi realizada por meio de análise proteômica, utilizando um mutante da enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*). Como apresentado anteriormente, Dys1 é a primeira enzima da modificação de eIF5A, responsável pela transferência do grupamento aminobutil de uma espermidina para um único resíduo de lisina em eIF5A (Figura 3).

O mutante *dys1-1*, caracterizado recentemente em nosso laboratório cresce somente a 25°C e na presença do estabilizador osmótico sorbitol (Figura 1 do Anexo I). Este mutante apresenta níveis reduzidos da proteína Dys1 na célula, o que leva a uma diminuição da hipusinação de eIF5A em cerca de 60% (Figura 2 do Anexo I).

Em função do tipo de fenótipo condicional de crescimento apresentado pelo mutante *dys1-1* (presença de sorbitol) e pela severidade do mesmo, torna-se mais interessante utilizá-lo para ensaios de análise proteômica, quando em comparação ao fenótipo de sensibilidade a temperatura dos mutantes de eIF5A (VALENTINI *et al.* 2002; DIAS *et al.* 2008). A necessidade de troca (*shift*) de temperatura para os mutantes de eIF5A, para que ocorra a perda da função da proteína, pode gerar defeitos secundários causados pelo estresse, bem como por impossibilitar o controle do efeito de morte celular nesses mutantes. O mutante *dys1-1* apresenta defeitos claros na síntese proteica (Figura 3 do Anexo I) e, principalmente, nos níveis de eIF5A ativo (Figura 2 do Anexo I), mesmo quando cultivado na única condição permissiva ao seu crescimento (sorbitol 1 M a 25°C).

A eletroforese bidimensional é uma importante ferramenta na análise proteômica descritiva e comparativa (KEENAN *et al.* 2001). 2D-DIGE (Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) é um método recentemente desenvolvido de eletroforese bidimensional diferencial, que consiste na marcação das amostras proteicas com fluoróforos antes da focalização. A tecnologia DIGE é baseada na propriedade espectral de excitação e emissão de cada um dos fluoróforos utilizados na marcação das amostras, chamada CyDye DIGE Fluor (Cy2 λ_{em} = 520nm; Cy3 λ_{em} = 580nm ; Cy5 λ_{em} = 670nm). O uso das 3 marcações permite que duas diferentes amostras marcadas (Cy3 e Cy5) sejam separadas por ponto isoelétrico (pI) e peso molecular em um único gel, oferecendo maior confiança para os dados de localização bidimensional do conteúdo proteico em análise, por minimizar as variações experimentais, além de corrigir erros internos utilizando outro fluoróforo (Cy2) para marcação de um normalizador interno formado pela junção de ambas as amostras. Ainda, a técnica DIGE possui alto grau de sensibilidade e resolução, pois a marcação proteica com os fluoróforos é específica e o poder de detecção da fluorescência é alto, obtendo imagens de boa qualidade.

Extratos proteicos das linhagens selvagem (*DYS1*) e mutante *dys1-1* foram submetidos aos ensaios de eletroforese bidimensional, seguindo o esquema da Figura 12. Triplicatas biológicas das mesmas linhagens foram utilizadas para obtenção de extrato proteico total, bem como marcação cruzada das proteínas com

diferentes fluoróforos (*dye-swap*), útil para exclusão de eventual diferença na eficiência de marcação. As amostras foram focalizadas e submetidas a 2D-DIGE. Os géis representados na Figura 12 são resultados reais de um dos experimentos realizados. A partir da sobreposição das imagens obtidas, foi gerada uma relação de possíveis *spots* diferencialmente presentes nas linhagens, após validação estatística pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0,05$. A identificação das proteínas presentes nos *spots* diferenciais é feita por espectrometria de massas, utilizando amostras proteicas presentes nos *spots* de um gel preparativo.

O primeiro experimento DIGE, realizado com fita de faixa de pH 3-10, levou à validação de 74 *spots* diferencialmente presentes, dos quais 41 tiveram correlação no gel preparativo. Nem todos os *spots* puderam ser recortados do gel preparativo, devido à problemas no ajuste do equipamento *Ettan Spot Picker*. Dos *spots* recortados, 17 foram analisados por espectrometria de massas e 16 proteínas puderam ser identificadas. Este problema também foi resolvido na análise seguinte. Este experimento obteve 23% de aproveitamento dos dados, isto é, dos 74 *spots* selecionados inicialmente, 17 deles levaram ao resultado de uma ou mais proteínas. Os resultados de cada etapa da análise proteômica estão apresentados na Figura 13, juntamente com a lista das proteínas identificadas.

No segundo experimento DIGE, também utilizando fita de faixa de pH 3-10, foi possível validar 39 *spots* na triplicata experimental, e mais da metade foi identificado e recortado do gel preparativo (26 *spots*). A análise por espectrometria de massas resultou na identificação de 12 proteínas diferencialmente presentes. O aproveitamento de dados deste experimento, portanto, foi de 67%, isto é, dos 39 *spots* selecionados inicialmente, 26 deles levaram à identificação de 12 proteínas por espectrometria de massas. Novamente, os resultados de cada etapa e as proteínas identificadas estão mostrados na Figura 13.

Por fim, o terceiro experimento DIGE, utilizando fita de faixa de pH 4-7, levou à validação estatística de 51 *spots*. Desses, 31 foram reconhecidos no gel preparativo e recortados, e 21 proteínas foram identificadas, demonstrando eficiência de aproveitamento de dados de 41%. Os resultados de cada etapa e as proteínas identificadas também estão mostrados na Figura 13.

As três análises proteômicas, portanto, levaram à identificação de 41 proteínas diferencialmente presentes nas linhagens selvagem e mutante *dys1-1*, sendo que a grande maioria apareceu aumentada de 1,5 a 2,5 vezes na linhagem mutante em relação ao selvagem. Os resultados brutos das três análises podem ser vistos nas

Tabelas 1, 2 e 3 do Anexo II. Apesar de poucas proteínas coincidentes entre todos os experimentos, é importante destacar que Eno2 apareceu diferencialmente expressa entre as linhagens nos três experimentos realizados. Da mesma forma, as proteínas Ssa1, Ssb1, Ssb2, Tdh1, Pkg1 e Tpi1 também apareceram repetidas em dois experimentos. Sendo assim, cerca de 17% das proteínas identificadas como diferencialmente presentes nas amostras analisadas são coincidentes em pelo menos dois experimentos.

Todas as proteínas identificadas nos diferentes experimentos foram submetidas à análise de ontologia genética (<http://www.yeastgenome.com/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>) e os dados brutos, tanto de processos celulares, quanto de componentes celulares obtidos, pode ser visto na Tabela 4 do Anexo II. Os resultados de maior interesse neste trabalho encontram-se resumidos na Tabela 5 (página 94), cuja grande maioria dos processos mostrados foram relevantes em pelo menos duas análises proteômicas diferentes. Os processos em destaque (negrito) na Tabela 4 são aqueles com os quais eIF5A já foi funcionalmente envolvido (ZANELLI and VALENTINI 2005; GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009; DIAS *et al.* 2012). Na Figura 14, no gráfico de setores, está mostrada a frequência dos processos da Tabela 4, reunidos segundo o tipo de processo celular em que participam.

A análise de ontologia genética destaca, portanto, as proteínas identificadas nas análises diretamente envolvidas na tradução (Asc1, Ssa1, Ssb1, Rpl16a, Rps21b, Rps21a, Rpp0, Rpl36a, Rpl16b, Ssb2, Rps15, Rpl5, Sui1, Tef1) e via secretória (Cdc48, Trx2, Eno2, Arf1, Trx2). Apesar de não aparecer de forma relevante em todas as análises proteômicas, as proteínas envolvidas com ciclo celular, organização de citoesqueleto e parede celular foram relevantes em pelo menos uma delas. Dado o envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular, e o fato de mutantes de eIF5A apresentarem defeito na organização de citoesqueleto, as proteínas Tsa1, Cdc48 e Zeo1 tornam-se também resultados importantes deste trabalho.

Um grande grupo de proteínas aumentadas no mutante de Dys1 está envolvida com metabolismo de macromoléculas. Linhagens submetidas a condições de estresse apresentam perfil proteico com muitas proteínas superexpressas, provavelmente na tentativa de compensar defeitos em diferentes vias do metabolismo celular (MATIS *et al.* 2005; MATHY *et al.* 2006; VALERIUS *et al.* 2007). O levantamento de análises proteômicas realizadas com alguns organismos modelo, como camundongo, rato e humano mostra a predominância de algumas famílias de proteínas que aparecem diferencialmente expressas (PETRAK *et al.* 2008). Dados

semelhantes são vistos para *S. cerevisiae* em estudos do perfil proteômico de linhagens submetidas a diversas condições de estresse (MATIS *et al.* 2005; MATHY *et al.* 2006; VALERIUS *et al.* 2007). Esses estudos sugerem que apesar dessas proteínas aparecerem em todas análises proteômicas, não se tratam de artefatos, mas sim de proteínas responsivas a inúmeras condições adversas de crescimento. Assim, os resultados obtidos nos três experimentos DIGE apoiam essas evidências da literatura, uma vez que grande parte das proteínas identificadas estão entre essas proteínas, denominadas *déjà vu* (PETRAK *et al.* 2008), tais como: 1- proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, com destaque àquelas participantes da via glicolítica; 2- fatores envolvidos no dobramento correto de proteínas, sendo a maioria delas membros da família HSP70 (*heat shock proteins*).

Além destas análises proteômicas utilizando o mutante *dys1-1*, outros ensaios com mutante condicional de eIF5A (*tif51A-3*), que leva à degradação da proteína na temperatura não permissiva, foram realizados anteriormente (Ana Letícia Moragno, dados não publicados de nosso laboratório). Estas análises foram realizadas por 2D utilizando corante Coomassie Blue e os resultados obtidos revelaram proteínas predominantemente envolvidas com o processo de tradução, sendo que muitas são coincidentes com as análises proteômicas deste trabalho (dados não mostrados). Estes dados sugerem que os efeitos celulares dos mutantes de eIF5A e Dys1 sejam similares, por apresentarem diminuição de eIF5A funcional na célula. Assim como ocorre para os fenótipos de melhora do crescimento na presença de sorbitol, defeito na alongação da tradução e interação genética com Pkc1 (VALENTINI *et al.* 2002; GREGIO *et al.* 2009 e Anexo I).

Outra ferramenta muito útil na análise de diferença de expressão gênica na busca de alvos regulados por eIF5A é a análise de perfil transcricional e traducional utilizando *microarray*. O perfil transcricional analisa os níveis relativos de transcritos obtidos a partir de extrato total celular, enquanto o perfil traducional analisa os níveis relativos de transcritos obtidos a partir apenas das frações de polissomos do perfil polissomal, isto é, apenas transcritos que estão sendo traduzidos na célula. Estas análises já foram anteriormente realizadas em nosso laboratório, utilizando o mutante de depleção de eIF5A *tif51A-1* (Cleslei Fernando Zanelli, dados não publicados). Os dados obtidos nesta análise revelam também a presença marcante de processos coincidentes com os obtidos nas análises proteômicas, tais como os de transporte vesicular, organização de organelas e vesículas, metabolismo de rRNA, mRNA e tRNA e de proteínas (dados não mostrados).

Uma análise geral de todos os ensaios de expressão gênica diferencial associados, realizados em nosso laboratório, apontam o envolvimento de eIF5A com diversos processos celulares básicos. Entretanto, é notável a alteração nos níveis de expressão gênica que codificam proteínas envolvidas nos processos de síntese proteica, de metabolismo de RNA e proteínas, de transporte vesicular e de controle do ciclo celular em mutantes com defeitos de eIF5A. Apesar de serem necessários ensaios confirmatórios, os dados até o momento podem apontar um envolvimento de eIF5A na tradução diferencial de genes envolvidos com os processos citados.

Ainda, considerando a alta frequência de proteínas relacionadas com o processo de tradução nas análises de expressão gênica diferencial, principalmente proteínas ribossomais, sabe-se que o genoma de *S. cerevisiae* contém 137 genes que codificam para proteínas ribossomais, dos quais 19 codificam uma única proteína ribossomal e 118 (59 pares) são duplicadas. A transcrição de genes que codificam proteínas ribossomais é altamente regulada em resposta a diversos estímulos de crescimento e condições ambientais, e esse mecanismo de regulação é um dos pontos chave pelo qual as células ajustam sua capacidade adequada de síntese de proteínas frente a alterações de condições ambientais (JU and WARNER 1994; GASCH *et al.* 2000; CAUSTON *et al.* 2001).

Apesar de os dados apresentados e discutidos acima apontarem uma série de grupos de mRNAs cuja tradução pode ser regulada direta ou indiretamente por eIF5A, não é possível neste momento definir claramente quais seriam estes mRNA, muito menos por qual mecanismo traducional eIF5A faria este controle. Além disso, outras análises dos dados de expressão gênica, considerando-se dados publicados (SCHRADER *et al.* 2006) e não publicados citados acima, precisam ainda ser realizadas. Entretanto, é possível sugerir que os genes envolvidos nos processos celulares de tradução, via secretória e ciclo celular podem ser alvos da regulação direta ou indireta de eIF5A e devem ser investigados. Estes ensaios confirmatórios de regulação diferencial dos níveis totais de mRNA e também de seus níveis de tradução, principalmente para genes de proteínas ribossomais, ciclo celular e via secretória, estão propostos em um novo projeto de mestrado do laboratório, por meio de PCR em tempo real a partir de mRNAs traducionalmente ativos (extraídos de polissomos) de linhagens mutantes de eIF5A e de Dys1.

Como apresentado na Introdução deste trabalho, mais recentemente, o homólogo de eIF5A em bactéria, EF-P, é essencial para a síntese de proteínas contendo sequência PPP (prolina-prolina-prolina) ou PPG (prolina-prolina-glicina)

(DOERFEL *et al.* 2013; UDE *et al.* 2013). Em bactérias, cerca de 15% de todas as proteínas conhecidas possuem essas sequências, sendo bem representadas por enzimas metabólicas, reguladores da transcrição e transportadores de membrana (DOERFEL *et al.* 2013). Apesar de não essencial, a deleção de EF-P gera defeitos pleiotrópicos celulares, o que pode ser explicado pela redução na tradução de proteínas envolvidas em diversos processos celulares (BUSKIRK and GREEN 2013). Já em *S. cerevisiae*, menos de 10% de todas as proteínas contêm PPP ou PPG. Entretanto, proteínas que participam de processos como regulação e início de tradução, organização de citoesqueleto e de parede celular, regulação do ciclo celular, direcionamento de proteínas e brotamento celular são bem representadas entre as proteínas de levedura contendo PPP ou PPG (dados não mostrados). Como discutido anteriormente, eIF5A já foi envolvido funcionalmente com muitos desses processos citados. Adicionalmente, o processo de brotamento celular, também já foi correlacionado com eIF5A por ensaios genéticos (ZANELLI and VALENTINI 2005). Apesar de não haver uma alta frequência de proteínas com PPP ou PPG identificadas como reduzidas na análise proteômica do mutante *dys1-1*, é interessante ressaltar que proteínas como Cdc48 (proteína reduzida no mutante *dys1-1*) e Bni1 (suppressor em alto número de cópias de *tif51A-1* (ZANELLI and VALENTINI 2005) possuem sequências PPP ou PPG. O mecanismo pelo qual EF-P age e eIF5A agiria na tradução específica dessas sequências ainda é desconhecido.

No momento, em nosso laboratório, estão sendo analisadas as proteínas contendo PPP ou PPG de *S. cerevisiae* para seleção de um grupo de proteínas cuja tradução poderia estar diminuída em mutantes de eIF5A e de Dys1 e que possam contribuir para o entendimento de como a ação de eIF5A na tradução gera os diferentes fenótipos observados nestes mutantes.

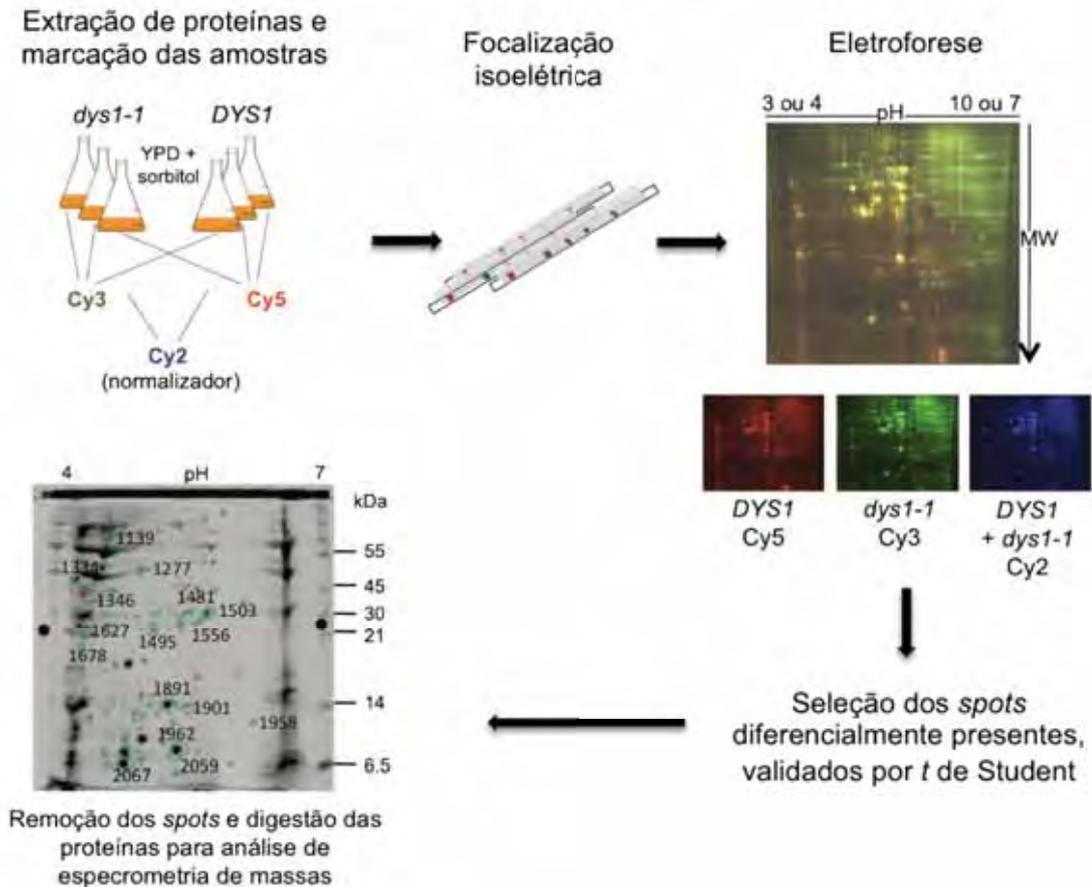


Figura 12. Esquema representativo da análise proteômica por 2D-DIGE, realizada com o mutante *dys1-1*. Culturas de *DYS1* (SVL613) e *dys1-1* (SVL614) em YPD acrescido de sorbitol 1 M foram utilizadas para obtenção do extrato proteico e marcação com os fluoróforos Cy5 e Cy3, como indicado. Uma amostra contendo ambos extratos foi também marcada com Cy2 (normalizador interno). As amostras marcadas foram aplicadas em mesma fita de faixa de pH 3-10 ou pH 4-7, e submetidas à focalização isoeétrica e, em seguida, à eletroforese (SDS-PAGE). As imagens de um mesmo gel são aqui mostradas em vermelho (selvagem-Cy5), verde (*dys1-1*-Cy3) e azul (ambas linhagens-Cy2). O gel maior corresponde à sobreposição das 3 imagens obtidas de um mesmo gel DIGE analisado. Com essa análise, foi obtida uma lista de spots diferencialmente presentes, após validação estatística, por teste *t* de Student. A partir de um gel preparativo, os spots validados foram recortados e a identificação das proteínas foi realizada por espectrometria de massas.

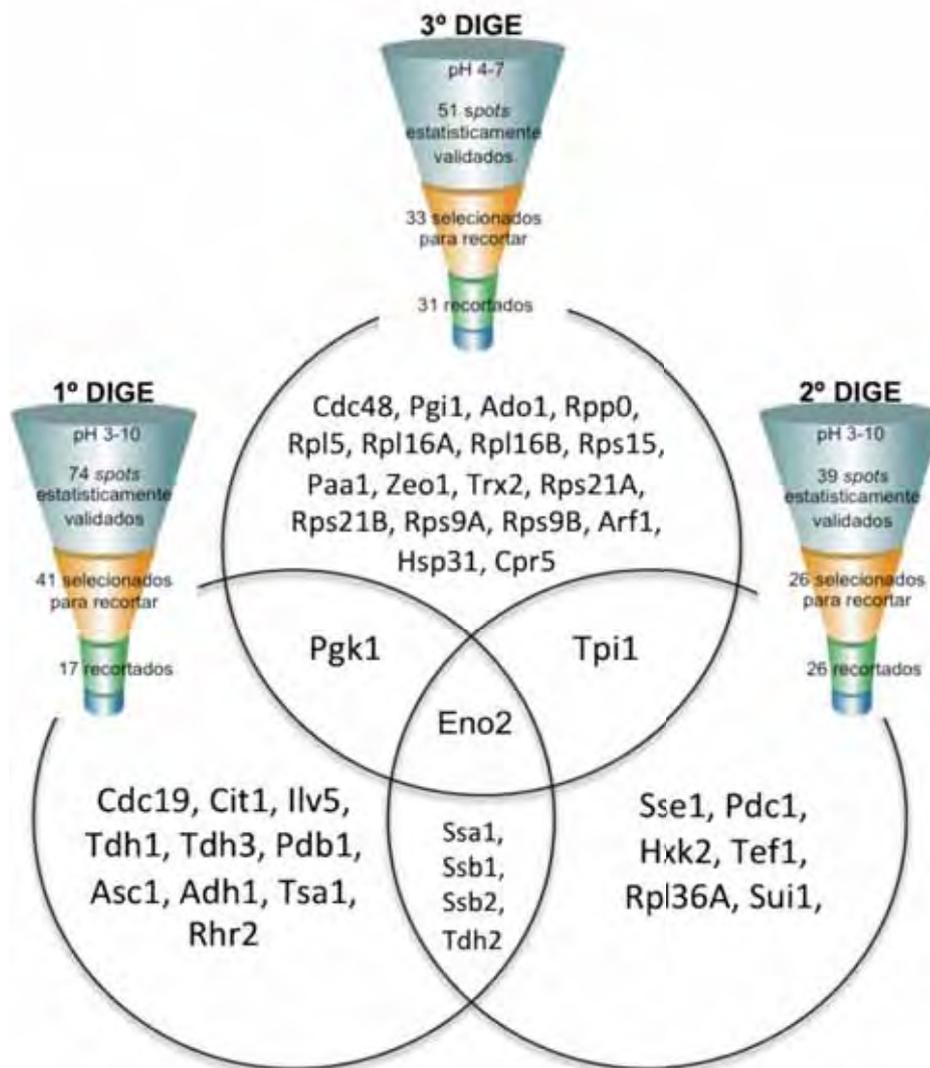


Figura 13. Distribuição dos resultados obtidos nas três análises proteômicas realizadas com o mutante *dys1-1*. No cones estão apresentados os valores obtidos em cada etapa de cada análise proteômica. A identidade das proteínas anotadas estão apresentadas nos círculos. A intersecção dos círculos corresponde às proteínas coincidentes entre as análises proteômicas numeradas.

Tabela 5. Agrupamento dos genes que codificam as proteínas identificadas nos três experimentos de análise proteômica, de acordo com o envolvimento em processos metabólicos, após análise por ontologia genética.

Processo	Freq análise / Freq genoma (%)	Genes
metabolismo de carboidratos	30,6 / 4,2	<i>CDC19,PGK1,TPI1,HXK2,TDH3,ENO2,RHR2,TDH1,TDH2,PDC1,ADH1</i>
geração de precursores metabólicos e energia	27,8 / 2,5	<i>CDC19,PGK1,TPI1,HXK2,TDH3,ENO2,TDH1,TDH2,PDC1,ADH1</i>
tradução citoplasmática	27,8 / 2,7	<i>SSA1,SSB1,RPL16A,RPS21B,RPS21A,RPP0,RPL16B,SSB2,RPS9A,RPL5</i>
processamento de rRNA	16,7 / 4,7	<i>RPS9B,SSB1,RPS21B,RPS21A,SSB2,RPS9A</i>
dobramento de proteínas	13,9 / 1,4	<i>SSA1,SSB1,TSA1,SSB2,SSE1</i>
elongação da tradução	11,1 / 5,2	<i>RPS9B,SSB1,RPP0,SSB2</i>
biogênese da subunidade menor do ribossomo	11,1 / 2,0	<i>RPS9B,RPS21B,RPS21A,RPS9A</i>
regulação da tradução	11,1 / 1,4	<i>RPS9B,SSB1,ASC1,SSB2</i>
ciclo celular	8,3 / 4,7	<i>CDC48,RAD61,CDC25</i>
metabolismo de aminoácidos	8,3 / 3,8	<i>PDC1,ILV5,ADH1</i>
transporte nuclear	8,3 / 2,6	<i>SSA1,SSB1,SSB2</i>
fusão de membranas	8,3 / 1,2	<i>CDC48,TRX2,ENO2</i>
organização de vacúolos	5,6 / 1,1	<i>TRX2,ENO2</i>
regulação do ciclo celular	5,6 / 3,0	<i>CDC25,TSA1</i>
montagem do ribossomo	5,6 / 0,9	<i>RPP0,RPL5</i>
sinalização	5,6 / 3,6	<i>CDC25,ASC1</i>
biogênese da subunidade maior do ribossomo	5,6 / 1,3	<i>RPP0,RPL5</i>
organização e formação de parede celular	2,8 / 2,9	<i>ZEO1</i>
início da tradução	2,8 / 0,9	<i>SUI1</i>
resposta à estresse osmótico	2,8 / 1,3	<i>RHR2</i>



Figura 14. Quadro resumo dos processos celulares resultantes das análises proteômicas. Os resultados obtidos de todas as análises proteômicas após análise por ontologia genética de acordo com processo celular (<http://www.yeastgenome.com/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>). A frequência está anotada dentro de cada secção.

4.1.4. Análise da correlação funcional entre Asc1, Dys1 e eIF5A por ensaios de interação genética

Os estudos da correlação funcional entre Asc1, Dys1, e eIF5A, juntamente com dados de caracterização do mutante condicional *dys1-1*, foram reunidos no manuscrito “The deoxyhypusine synthase mutant *dys1-1* reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity”, submetido à revista Plos One, em fase final de revisão (Anexo I)

Dos diferentes grupos interessantes de proteínas diferencialmente presentes nas linhagens *tif51A-3* e *dys1-1*, encontra-se aquele relacionado com o processo de tradução. Destaca-se nesse grupo, a proteína Asc1, devido à sua correlação funcional com Pkc1 (MELAMED *et al.* 2010), um supressor em alto número de cópias do mutante *tif51A-1* de eIF5A (VALENTINI *et al.* 2002). Além desta correlação funcional, Asc1 já foi anteriormente identificada sendo mais expressa em mutantes de eIF5A em nível traducional, por ensaios de análise proteômica, (Ana Letícia Moragno, dados não publicados; Rainer Schrader, dados não publicados) e em nível transcricional, por ensaios de *microarray* (Cleslei F. Zanelli, dados não publicados).

Com o objetivo confirmar os resultados obtidos na análise proteômica, foi realizado *western blot* quantitativo de Asc1 nas mesmas linhagens utilizadas nas análises proteômicas. A Figura 15A mostra uma representação gráfica da topografia de um *spot* identificado como aumentado no mutante em relação ao selvagem, como mostra o gráfico de expressão relativa (painel inferior). Esse *spot* aumentado levou à identificação da proteína Asc1. A confirmação da expressão diferencial de Asc1 na linhagem *dys1-1* está mostrada na Figura 15B, pelo gráfico de expressão relativa mostrando aumento médio de aproximadamente 1,7 vezes de Asc1 no mutante de Dys1.

Asc1 é um ortólogo da proteína RACK1 de mamífero, um componente do 40S do ribossomo, e que atua também como uma subunidade β da proteína G envolvida com sinalização em resposta à glicose, Gpa2 (GERBASI *et al.* 2004; ZELLER *et al.* 2007). Curiosamente, um íntron de *ASC1* possui *SNR24*, que codifica para um RNA *small nucleolar* (snoRNA), importante para a maturação do 60S (KISS-LÁSZLÓ *et al.* 1996; CHANTREL *et al.* 1998). Asc1 é uma proteína altamente conservada na evolução e participa ativamente na regulação da tradução, apesar de não ser essencial em *S. cerevisiae* (GERBASI *et al.* 2004). Apesar da deleção de *ASC1* levar ao aumento na taxa de síntese proteica (GERBASI *et al.* 2004), diferentemente do que

ocorre com mutantes de eIF5A (DIAS *et al.* 2008; GREGIO *et al.* 2009) e Dys1 (Figura 3A do Anexo I), ambos demonstram defeitos na integridade e na morfologia celulares (ZANELLI and VALENTINI 2005; VALERIUS *et al.* 2007). Apesar de não termos perseguido o mecanismo que leva ao aumento de Asc1 em linhagens com defeito em eIF5A, esse aumento pode ser algum tipo de resposta compensatória de defeitos celulares dos mutantes *tif51A-3* e *dys1-1*.

A seguir, realizamos uma análise de interação genética sintética entre *dys1-1* e *asc1Δ* e os resultados revelaram letalidade sintética entre esses genes (Figura 4B do Anexo I). Um mutante pontual de Asc1 que apresenta defeito na ligação com ribossomo, mas não na sinalização de resposta a glicose, também demonstrou letalidade sintética com *dys1-1* (Figura 7 do Anexo I), revelando que esta correlação funcional está ligada ao papel dessas proteínas na tradução. Foi revelado também, que a superexpressão de *TIF51A* ou *DYS1* é tóxica para a célula na ausência de Asc1 (Figura 4C do Anexo I). Ainda, a semelhança dos fenótipos de lise celular e sensibilidade a algumas drogas, observadas para mutantes de Dys1 de Asc1, aproximam essas proteínas nos processos celulares (Figuras 1C, 1D e 6 do Anexo I). Esses resultados sugerem que existe um equilíbrio entre as funções de Asc1 e eIF5A na tradução.

Para verificar se Asc1 altera a associação de eIF5A com ribossomos traducionalmente ativos, foi realizada a análise da ligação de eIF5A ao longo do perfil polissomal em mutante de deleção de Asc1. Esta análise revelou um aumento na associação de eIF5A com 80S e polissomo na ausência de Asc1 (Figura 5 do Anexo I), corroborando com a idéia de haver um balanço entre essas proteínas no controle da síntese proteica. Ao contrário do que vemos para *dys1-1* (Figura 3B e 3C do Anexo I), o aumento de eIF5A ligada aos polissomos na ausência de Asc1 pode favorecer a tradução de um grupo diferente daqueles mRNAs identificados recentemente como sendo regulados por Asc1 (RACHFALL *et al.* 2013).

Por fim, Asc1 foi envolvida com manutenção da parede celular próximo aos locais do broto, que ocorrem durante a fase G1 do ciclo celular de *S. cerevisiae* (MELAMED *et al.* 2010). Da mesma maneira, eIF5A foi relacionada com progressão do ciclo celular durante a fase G1 (ZANELLI and VALENTINI 2005; KROGAN *et al.* 2006). Sendo assim, a relação entre essas proteínas ocorre em nível traducional, possivelmente envolvendo a regulação de mRNAs de integridade celular e progressão no ciclo celular.

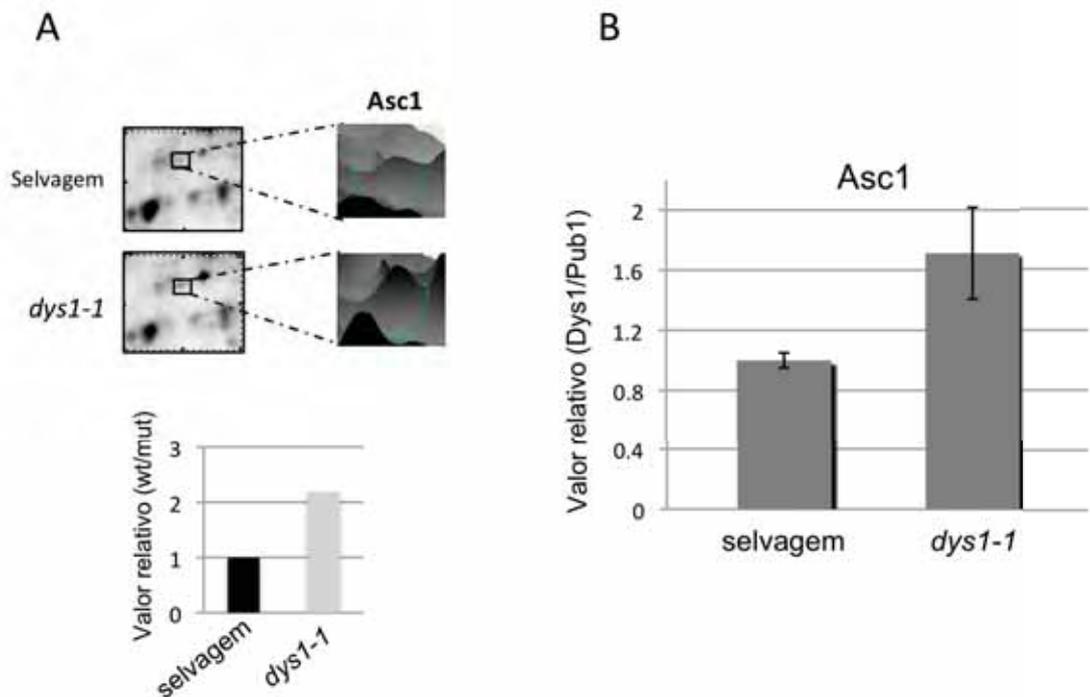


Figura 15. Confirmação da diferença de expressão de Asc1 na linhagem mutante *dys1-1*. (A) Topologia dos *spots*, bem como das imagens nos géis analíticos, da proteína Asc1 identificada por espectrometria de massas, acompanhada do gráfico que representa a quantificação relativa dos *spots* nas linhagem selvagem (*DYS1*) / mutante *dys1-1*. (B) Confirmação da diferença de expressão de *ASC1* por *western blot* quantitativo de Asc1. O gráfico representa a quantificação relativa das bandas de Asc1 (normalizado por Pub1) nas linhagens selvagem e mutante *dys1-1*.

4.2. Estudo da interação física direta de eIF5A com ribossomo *in vitro*

4.2.1. Obtenção de mutantes de cisteína única de eIF5A e outros componentes do início da tradução (fatores de tradução, ribossomos, tRNA e mRNA)

Apesar do grande avanço recente no entendimento do papel de eIF5A na tradução, bem como a identificação de parceiros genéticos que ajudam na compreensão do reflexo da função de eIF5A na célula, ainda não é conhecida a ação mais específico de eIF5A na elongação da cadeia polipeptídica e como essa ação gera outros resultados no metabolismo celular, observados pelos fenótipos e interações genéticas de mutantes de eIF5A. Uma informação importante para o entendimento do mecanismo de eIF5A na síntese proteica é a localização de onde ocorre sua ligação no ribossomo. Assim, apesar de ter sido demonstrada a interação física de eIF5A com o ribossomo (ZANELLI *et al.* 2006), ainda não se sabe qual o local específico do ribossomo em que esta interação ocorre e a que tipo de complexo ribossomal eIF5A se liga durante o processo de tradução na célula. O modelo atual dos mecanismos de tradução é derivado em grande parte do conhecimento estrutural dos complexos formados entre os fatores de tradução e o ribossomo.

Por outro lado, para EF-P, o homólogo estrutural de eIF5A em procariotos, já foi descrito o local de sua interação com o ribossomo de *E. coli*, através de cristalografia (TAYLOR *et al.* 2009). O complexo EF-P-70S também inclui o tRNA^{Met} iniciador N-formilado (fMet-tRNA_i^{fMet}), e EF-P interage com ambas subunidades 50S e 30S e ocupa um local entre os sítios P e E do ribossomo, além de interagir diretamente com o fMet-tRNA_i^{fMet}, próximo do centro de atividade peptidil-transferase do ribossomo (PTC). Dessa forma, foi sugerido que EF-P atue na manutenção do correto posicionamento do fMet-tRNA_i^{fMet} durante a formação da primeira ligação peptídica (BLAHA *et al.* 2009). Apesar de ser bastante provável que haja conservação funcional entre eIF5A e EF-P, é importante ressaltar que eIF5A possui apenas dois domínios, enquanto EF-P possui três (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004). Dessa maneira, é essencial determinar se essa diferença estrutural reflete diferenças na localização dessas proteínas no ribossomo. No entanto, apesar de os ensaios de co-cristalização de fatores e complexos com ambas subunidades de ribossomos se tornarem cada vez mais frequentes para procariotos, esses não são ainda primeira escolha para eucariotos (AGIRREZABALA *et al.* 2012; DÖNHÖFER *et al.* 2012; GREBER *et*

al. 2012). Este conhecimento estrutural em eucarioto envolve técnicas como anisotropia de fluorescência e ensaios de clivagem local induzida de rRNA (NOLLER *et al.* 1995; DINMAN 2009). Essas técnicas são capazes de revelar a força de ligação da proteína de interesse no complexo analisado *in vitro*, bem como os pontos de interação direta entre eles.

Para o desenvolvimento dessas técnicas usadas para eucariotos, é necessária a geração de mutantes de cisteína única da proteína de interesse, pois é possível modificar especificamente o grupamento sulfidríla com grupamentos maleimida ou bromoacetamidobenzila (Figura 16A), que, por sua vez, podem estar ligados a moléculas que possibilitam os ensaios citados acima: a fluoresceína, para o ensaio de anisotropia de fluorescência, e o BABE-Fe, para o ensaio de clivagem de rRNA por radical hidroxil (Figura 16B). Essas técnicas serão abordadas ao longo deste objetivo. É importante ressaltar que grande parte desse estudo foi realizado durante o doutorado sanduíche na Universidade da Califórnia, Davis-CA, EUA, sob supervisão do Prof. Dr. Christopher S. Fraser e do Prof. Dr. John W. Hershey.

O primeiro passo para obtenção dos mutantes de cisteína única de eIF5A de humano foi a clonagem de *EIF5A1* em pYES2 (pSV550). O plasmídeo de expressão em levedura pYES2 apresenta o promotor de *GAL1* como controlador da transcrição do gene de interesse, ou seja, a proteína será produzida sempre que a levedura contendo esse plasmídeo for cultivada em meio contendo galactose como fonte de carbono e ausência de glicose. A Figura 17 mostra esquematicamente a clonagem de 6xHis-helF5A no vetor pYES2, mostrando a banda de aproximadamente 500 pb, na canaleta 4, corresponde ao tamanho do fragmento de *EIF5A1* clonado. Após clonagem, o gene foi confirmado por sequenciamento.

Após a clonagem, foram definidos diferentes pontos da superfície de helF5A, baseando-se na estrutura de eIF5A de humano (PDB ID: 3CPF, Figura 18A), para troca de resíduos por cisteínas. Esses pontos foram escolhidos com o auxílio do Prof. Dr. Fraser, tentando cobrir o maior número de sítios possíveis de contato entre a proteína e o ribossomo. Com isso, foram realizadas as mutações sítio-dirigidas utilizando oligonucleotídeos iniciadores contendo as mutações de interesse para geração *in vitro* de cópias mutadas do plasmídeo contendo o gene em estudo. Os nove plasmídeos contendo mutantes, confirmados por sequenciamento, estão mostrados na Tabela 2: pVZ1047 (C129), pVZ1048 (C73), pVZ1049 (ausência de cisteína), pVZ1050 (V41C), pVZ1051 (V56C), pVZ1052 (G97C), pVZ1053 (G35C), pVZ1054 (T142C) e pVZ1073 (L102C).

Em seguida, foram realizados ensaios de funcionalidade da proteína modificada, uma vez que a preservação da função da proteína é essencial para identificação do correto posicionamento no ribossomo. A funcionalidade das proteínas *heIF5A* mutadas foi testada pela capacidade de complementação em *S. cerevisiae*, uma vez *eIF5A* de humano supre a ausência de *eIF5A* de levedura (SCHNIER *et al.* 1991). Para tanto, as construções mutagenizadas de *EIF5A1*, o gene selvagem de humano, *EIF5A1*, e o gene selvagem de levedura, *TIF51A* (estes dois últimos utilizados como controles da complementação), clonados no pYES2, foram transformados em uma linhagem cuja expressão do gene de *eIF5A* endógeno é controlada por promotor reprimível por tetraciclina (VZL1074). Os transformantes foram inoculados em meio de cultura SC-ura (seletivo para o plasmídeo) adicionado de glicose. Em seguida, os transformantes foram submetidos a teste de sensibilidade a tetraciclina, sendo plaqueados em SC-ura + tetraciclina adicionado de galactose (indução da expressão da *heIF5A* plasmidial) ou glicose (repressão da expressão de *eIF5A* plasmidial). No meio com tetraciclina ocorre repressão da expressão de *eIF5A* cromossomal e só ocorrerá crescimento da linhagem VZL1047 se a construção analisada de *heIF5A* for funcional. A Figura 18B mostra o ensaio de complementação dos nove mutantes gerados, bem como dos controles de crescimento negativo (vetor vazio) e positivos (*TIF51A* e *EIF5A1*). Como esperado, nenhum transformante foi capaz de crescer em meio seletivo contendo tetraciclina e glicose, uma vez que nesta condição não ocorre produção de *eIF5A* na célula, nem de fonte cromossomal nem de fonte plasmidial. Adicionalmente, VZL1074 não é capaz de crescer na presença de tetraciclina, provando que tetraciclina é capaz de inibir a expressão do gene cromossomal de *eIF5A*. Por outro lado, *eIF5A* selvagem de levedura ou de humano apresentam igual crescimento em meio contendo tetraciclina e galactose, provando que ambas proteínas são funcionais e capazes de complementar a ausência da proteína endógena. Todos os mutantes testados, com exceção do mutante G35C (pVZ1053), apresentaram crescimento semelhante ao selvagem, revelando que os mutantes podem ser usados nos ensaios de ligação direta de *eIF5A* no ribossomo, pois são funcionais.

A mesma estratégia utilizada para produção de mutantes de cisteína única de *eIF5A* de humano foi usada para produção de mutantes de cisteína única de *eIF5A* de levedura. Com isso, é possível testar a ligação de *eIF5A* de diferentes organismos em ribossomos de levedura e analisar as possíveis diferenças na interação. Para tanto, foi obtido um mutante de cisteína única de *eIF5A* de levedura utilizando o

plasmídeo da coleção do laboratório, pVZ975 (pYES2-*TIF51A*). A Figura 19A mostra a estrutura de eIF5A de levedura (PDB ID: 3ER0) apontando os únicos dois resíduos de cisteína naturais, e a Figura 19B mostra o ensaio de complementação do único mutante obtido até o momento (yeIF5A^{C39A}C23 – pVZ1367), chamado daqui em diante de yeIF5A^{C23}, revelando ser igualmente funcional, em comparação com o gene selvagem.

Após definidos os mutantes de humano e levedura funcionais, as proteínas devem ser purificadas na sua forma ativa, ou seja, precisam estar hipusinadas para serem funcionais (WOLFF *et al.* 2007) e ligar ao ribossomo (ZANELLI *et al.* 2006). Para isso, foi utilizado o sistema de expressão heteróloga em *E. coli*, utilizando o vetor de expressão pST39 co-expressando as enzimas necessárias para a hipusinação (PARK *et al.* 2011). Todas as mutações descritas acima, foram feitas em *EIF5A1* ou *TIF51A* clonados no vetor policistrônico de expressão em bactéria contendo *DHPS* e *DOHH* ou *DYS1* e *LIA1*, respectivamente (PARK *et al.* 2011).

Antes mesmo da produção e purificação dos mutantes de eIF5A, foi realizado um ensaio de hipusinação *in vivo* em bactéria, para confirmar a funcionalidade deste sistema. O gene selvagem e o mutante K50R (incapaz de sofrer hipusinação) foram usados como controle positivo e negativo de hipusinação, respectivamente. Uma bactéria BL21 expressando a chaperona groES foi transformada com esses controles e alguns dos mutantes de eIF5A de humano (C129, C73, sem Cys, V56C, G97C, L102C e T142C) para o ensaio de hipusinação *in vivo*, utilizando [³H] espermidina adicionada ao meio de cultura. O gráfico apresentado na Figura 20A mostra que os mutantes são hipusinados neste sistema, apesar de apresentarem uma menor taxa de incorporação de espermidina radioativa comparados à proteína selvagem. Devido ao fato de todas as proteínas de humano, tanto selvagem quanto mutadas, terem sido funcionais e capazes de ser hipusinadas, não foi necessário realizar o ensaio de hipusinação *in vivo* com [³H] espermidina para as proteínas de levedura.

Sendo assim, as proteínas eIF5A de humano e de levedura (selvagens e mutadas) foram purificadas, seguindo o mesmo sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. As Figuras 20B e 20C mostram o cromatograma da purificação por SP sepharose (à esquerda do painel) e o SDS-PAGE das frações de interesse (à direita do painel) de eIF5A de humano e de levedura, respectivamente. O primeiro e segundo picos de eluição dos cromatogramas revelam as bandas de eIF5A não hipusinado e eIF5A hipusinado, respectivamente. A presença/ausência de hipusina

nas amostras dos picos mostrados foi confirmada por espectrometria de massas (dados não mostrados). Todos os mutantes analisados foram purificados seguindo o mesmo protocolo, e os resultados obtidos foram muito semelhantes, isto é, quantidades consideráveis de eIF5A hipusina e não hipusina após cromatografia em coluna SP (dados não mostrados).

Após purificação de eIF5A, outros elementos essenciais da tradução, como fatores de início de tradução, tRNA iniciador e ribossomos foram purificados para serem usados nos ensaios de ligação de eIF5A aos complexos ribossomais. A reconstituição *in vitro* de ribossomos ativos é uma ferramenta importante para se investigar o mecanismo de tradução (ACKER *et al.* 2007). A capacidade de controlar os passos deste processo permite a análise de parâmetros importantes, como, por exemplo, medir a afinidade de ligação de eIF5A no ribossomo na presença de diferentes componentes da maquinaria de tradução.

Para tanto, eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF5B foram purificados a partir de expressão heteróloga em bactéria (pVZ1172, pVZ1173, pVZ1174 e pVZ1176, respectivamente) (ACKER *et al.* 2006; ACKER *et al.* 2007) (Figura 21A). Os fatores de início de tradução contendo várias subunidades, eIF2 (Figura 21B) e eIF3 (Figura 21C), foram purificados a partir de levedura (VZL1103, VZL1104) (PHAN *et al.* 1998; ACKER *et al.* 2007). Os ribossomos, tanto 80S pré-formado endogenamente (*in vivo*), quanto as subunidades 40S e 60S foram também purificados a partir de levedura (Figura 21D). Por fim, o tRNA^{Met} foi sintetizado e carregado com metionina em reações *in vitro* (Met-tRNA_i^{Met}), como é mostrado nas Figuras 21E e 21F. Sendo assim, todos os elementos essenciais para reconstituição do início da tradução *in vitro* foram preparados para serem utilizados em ensaios de ligação de eIF5A ao ribossomo.

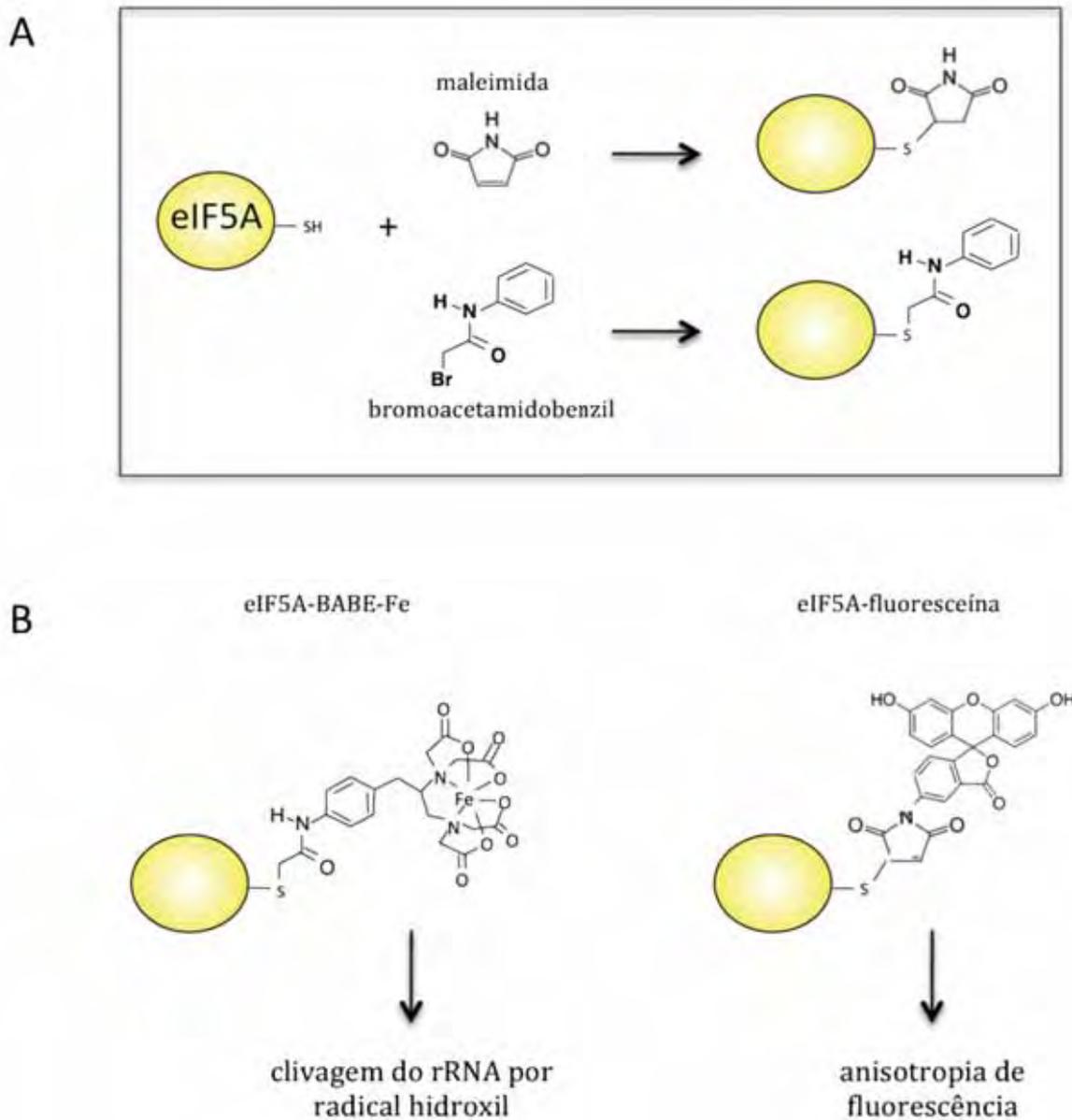


Figura 16. Utilização dos mutantes de cisteína única de eIF5A para derivatização com diferentes compostos. O grupamento sulfidríla (-SH) de um resíduo de cisteína única em eIF5A pode ser modificado covalentemente pelos grupamentos maleimida ou bromoacetamidobenzila, gerando derivatizações da proteína mutante, para serem utilizados em técnicas de anisotropia de fluorescência e clivagem de rRNA por radical hidroxil, respectivamente.

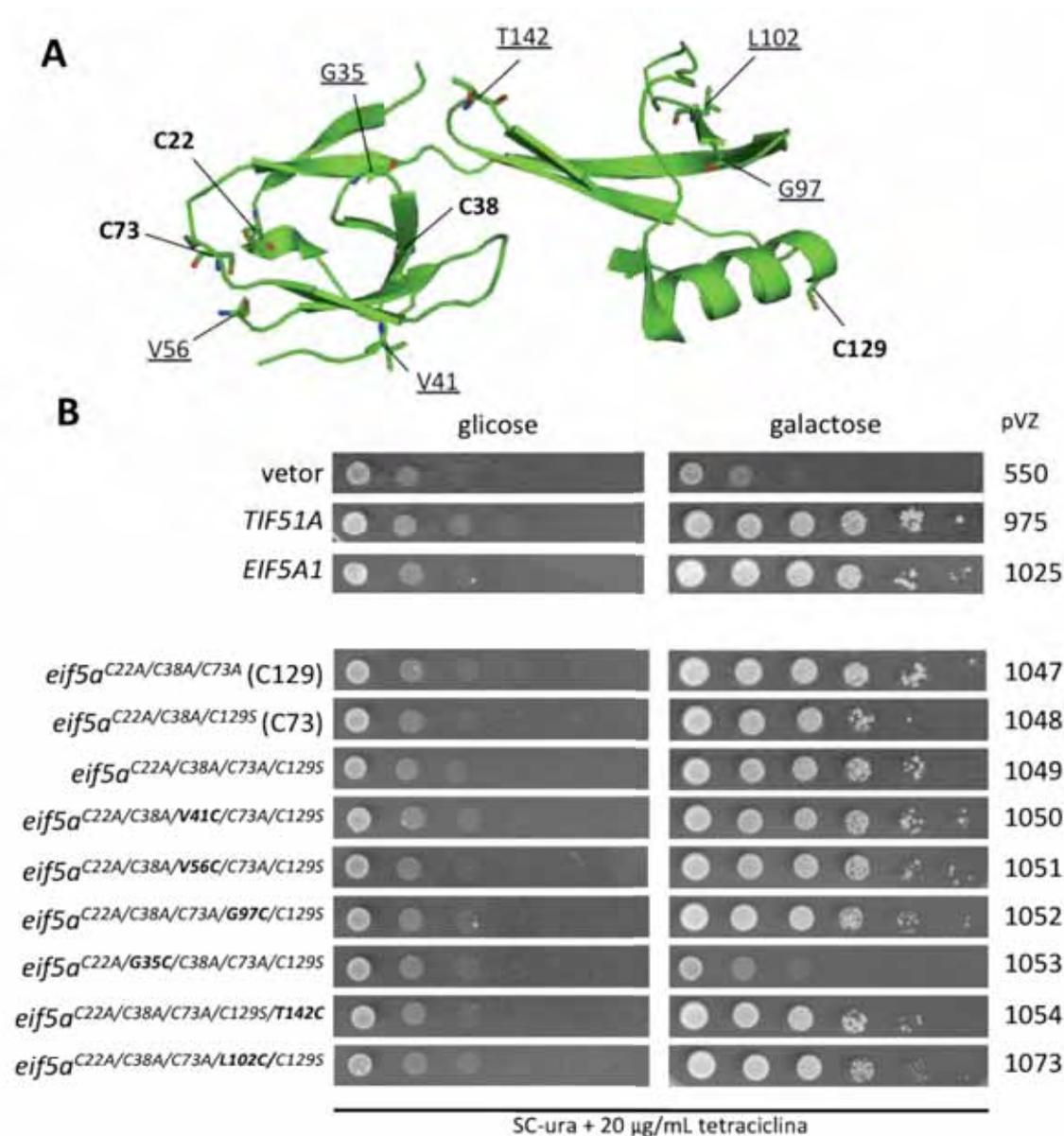


Figura 18. Análise da funcionalidade dos mutantes de cisteína única de eIF5A de humano em *S. cerevisiae*. (A) Representação estrutural de eIF5A de humano (3CPF) indicando os resíduos de aminoácidos que sofreram substituições. Em negrito estão as cisteínas naturais e sublinhados estão indicados os resíduos que foram substituídos para cisteína. (B) Ensaio de complementação dos mutantes de cisteína única de hEIF5A. Diluições seriadas da linhagem VZL1074 contendo pSV550 (vetor pYES2 - controle negativo), pVZ975 (*TIF51A* - controle de complementação), pVZ1025 (*EIF5A1* - controle do gene selvagem) ou os plasmídeos carregando os mutantes de *EIF5A1* foram inoculadas em meio SC-ura adicionado de 20 µg/mL de tetraciclina (repressão da expressão de eIF5A endógeno), contendo glicose ou galactose, e incubados a 25°C por 3 dias.

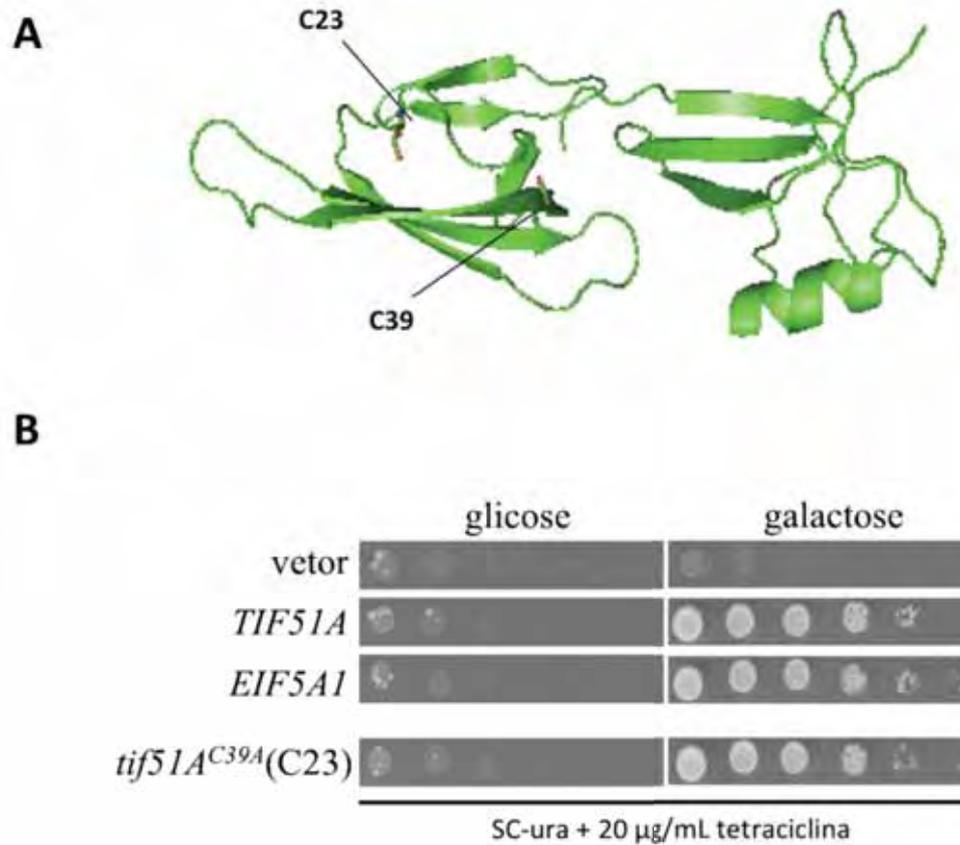


Figura 19. Análise da funcionalidade do mutante de eIF5A de *S. cerevisiae*. (A) Representação estrutural de eIF5A de levedura (3ER0) indicando as cisteínas naturais. (B) Ensaio de complementação funcional do mutante de cisteína única de yelF5A. Diluições seriadas da linhagem VZL1074 contendo pSV550 (vetor pYES2 - controle negativo), pVZ975 (*TIF51A* - controle de complementação) ou o plasmídeo carregando o mutante yelF5A^{C23} (pVZ1367) foram inoculadas em meio SC-ura adicionado de 20 µg/mL de tetraciclina (repressão da expressão de eIF5A endógeno), contendo glicose ou galactose, e incubados a 25°C por 3 dias.

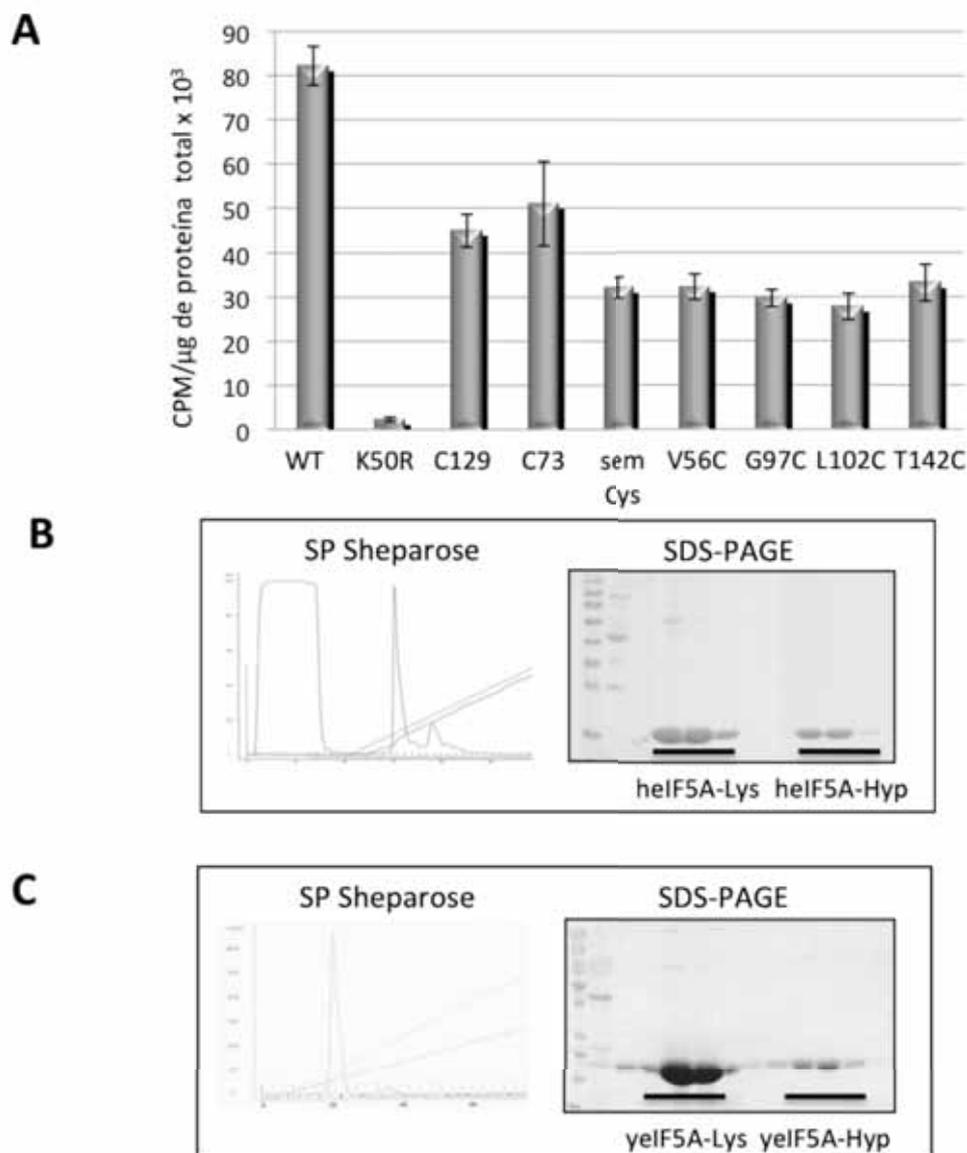


Figura 20. Ensaio de hipusinação e purificação de eIF5A em sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. (A) BL21 expressando a chaperona groES e transformada com helF5A selvagem (pVZ1011), K50R (pVZ1012) ou mutantes de cisteína única em vetor policistrônico (C129 – pVZ1246; C73 – pVZ1247; sem Cys – pVZ1248; V56C – pVZ1249; G97C – pVZ1250; L102C – pVZ1251 e T142C – pVZ1252) foi submetida ao ensaio de hipusinação *in vivo* e os níveis de incorporação relativos de [³H] espermidina estão mostrados no gráfico. (B e C) Cromatografia da purificação de helF5A e yelF5A selvagens em coluna SP Sepharose após co-expressão em *E. coli* com as enzimas modificadoras de eIF5A. O cromatograma (painel da direita) e o SDS-PAGE das frações de interesse (painel da esquerda) mostram que o primeiro e segundo picos correspondem a eIF5A não hipusinado e hipusinado, respectivamente. O padrão de peso molecular 10 kDa (Fermentas) está representado no gel.

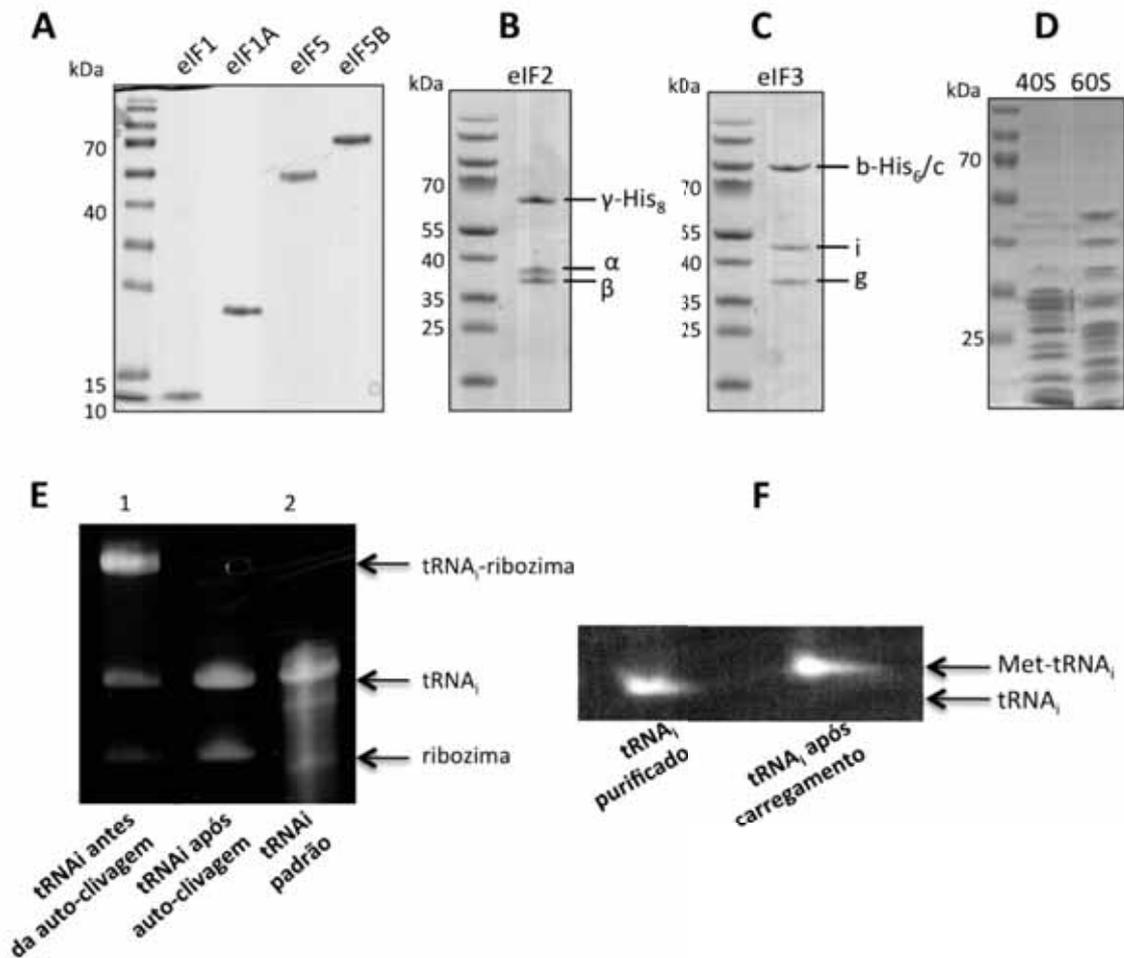


Figura 21. Produção e purificação de fatores de início de tradução, ribossomos e Met-tRNA_i^{Met}. (A) Os fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF5B são mostrados em SDS-PAGE após purificação a partir de sistema de expressão em bactéria. (B e C) Os complexos eIF2 (subunidades α , β , e γ -6xHis) e eIF3 (subunidades a, b-6xHis, c, i e g) são mostrados em SDS-PAGE após purificação a partir de levedura. (D) As subunidades 40S e 60S de ribossomos são mostradas em SDS-PAGE após purificação a partir de levedura. (E) Eletrofore em gel ácido de poliácridamida para ribozima-tRNA_i^{Met} produzido por transcrição *in vitro*, mostrando antes e depois da auto-clivagem. (F) Eletrofore em gel ácido de poliácridamida para tRNA_i^{Met} purificado de E e após carregamento com metionina (Met-tRNA_i^{Met}).

4.2.2. Identificação do complexo ribossomal ao qual eIF5A se liga por ultracentrifugação

Apesar do fato de eIF5A interagir e, portanto, copuficar ribossomos a partir de extrato celular total (ZANELLI *et al.* 2006), não está publicado o dado de ligação direta de eIF5A a complexos ribossomais *in vitro*. Assim, uma vez gerados os reagentes descritos acima, foram realizados ensaios que demonstram a ligação direta de eIF5A a complexos ribossomais *in vitro*. O ensaio de ultracentrifugação para precipitação de ribossomos em colchão de sacarose (MORENO *et al.* 1998; SHIN *et al.* 2002) foi utilizado para testar a interação de eIF5A em diferentes complexos ribossomais *in vitro*.

O primeiro ensaio apresentado foi realizado para avaliar a diferença de ligação de eIF5A de humano selvagem hipusinado (heIF5A-Hyp) às subunidades ribossomais 40S e 60S, ao ribossomo reconstituído 80S (40S+60S) e ao complexo de início de tradução reconstituído (Figura 22A). O resultado revela a proteína ribossomal da subunidade maior Rpp0 de levedura em todas as frações P das amostras que contêm 60S, mostrando sucesso na precipitação de ribossomo, bem como presença de eIF5A nas mesmas frações, apontando para a ligação de eIF5A no 60S. Apesar da sutil contaminação de 60S na amostra de 40S, não foi possível detectar eIF5A na ligação com 40S. Diferentes replicatas deste experimento revelaram ligação de eIF5A ao 60S, no entanto, não houve reprodutibilidade do ponto de vista quantitativo das intensidades de bandas de eIF5A obtidas nos precipitados de 60S, 40S+60S e complexo de início de tradução reconstituído, o que não permite apontar para diferenças na afinidade de ligação de eIF5A com relação a este ensaio

O mesmo ensaio foi realizado para avaliar a ligação direta de eIF5A de levedura selvagem e hipusinada (yeIF5A-Hyp) às subunidades ribossomais de levedura 40S e 60S e ao ribossomo reconstituído 80S (40S+60S) (Figura 22B). Neste caso, não foi testada a interação de eIF5A com maquinaria de início de tradução reconstituído, por não ter sido identificada nenhuma diferença relevante na ligação com eIF5A de humano. A Figura 22B mostra resultados muito semelhantes aos apresentados na Figura 22A, isto é, ligação direta de eIF5A no 60S, revelado pela presença de eIF5A nas frações de P das amostras contendo 60S. Igualmente, yeIF5A não apresentou ligação com a subunidade menor do ribossomo, apesar da pequena contaminação com 60S.

Apesar dos mutantes de cisteína única de eIF5A, tanto de humano quanto de levedura, demonstrarem complementação em levedura, indicando para a funcionalidade dos mesmos e, portanto, para ligação funcional no ribossomo, é necessário testar se os mesmos mutantes também são capazes de ligar ribossomos *in vitro*. Sendo assim, as Figuras 23A e 23B mostram, respectivamente, o ensaio de ultracentrifugação realizado com os mutantes de cisteína única de humano T142C (heIF5A^{T142C}-Hyp) e de levedura C23 (yeIF5A^{C23}-Hyp), utilizando as subunidades 40S e 60S de levedura isoladamente ou o ribossomo reconstituído 80S (40S+60S). Novamente, os resultados mostram ligação direta de eIF5A no 60S e ausência de ligação no 40S.

Outros mutantes também foram testados neste mesmo ensaio, revelando resultados semelhantes ao das Figuras 22 e 23 (dados não mostrados), o que permite afirmar que toda proteína eIF5A de humano e de levedura funcional é capaz de se ligar de forma específica na subunidade ribossomal 60S.

Por fim, a técnica de ultracentrifugação também foi utilizada em ensaio de competição da ligação de eIF5A em amostra de 80S de levedura previamente formado *in vivo*. Interessantemente, eIF5A endógena de levedura foi identificada ligada nesse complexo ribossomal 80S formado *in vivo* e purificado, antes da separação das subunidades com tratamento de puomicina, como mostra a Figura 24A. O *western blot* (painel à direita da Figura 24A) revela a presença de yeIF5A somente na canaleta correspondente ao 80S purificado, mas não nas subunidades 40S e 60S, que foram obtidas após tratamento do 80S com puomicina, o que leva ao término da tradução com o desligamento dos fatores de tradução e desmontagem das subunidades ribossomais. Uma vez que ambas proteínas, yeIF5A e heIF5A, ligaram o 60S *in vitro*, tornou-se interessante testar se essa ligação é capaz de competir com a yeIF5A endógena e se essa competição é dependente de hipusinação.

Assim, as mesmas quantidades das proteínas recombinantes heIF5A-Hyp e heIF5A-Lys e yeIF5A-Hyp foram testadas quanto à capacidade de se ligar competitivamente ao 80S formado *in vivo*, contendo yeIF5A endógena. A Figura 24B revela que ocorre competição entre todas as proteínas eIF5A recombinantes e endógena. Além disso, apesar de terem sido comparadas apenas as formas não hipusinada e hipusinada de humano, heIF5A-Lys e heIF5A-Hyp, respectivamente, houve reprodutibilidade entre as diferentes replicatas na capacidade maior de substituição de yeIF5A endógena por heIF5A-Hyp em comparação com heIF5A-Lys (Figura 24B).

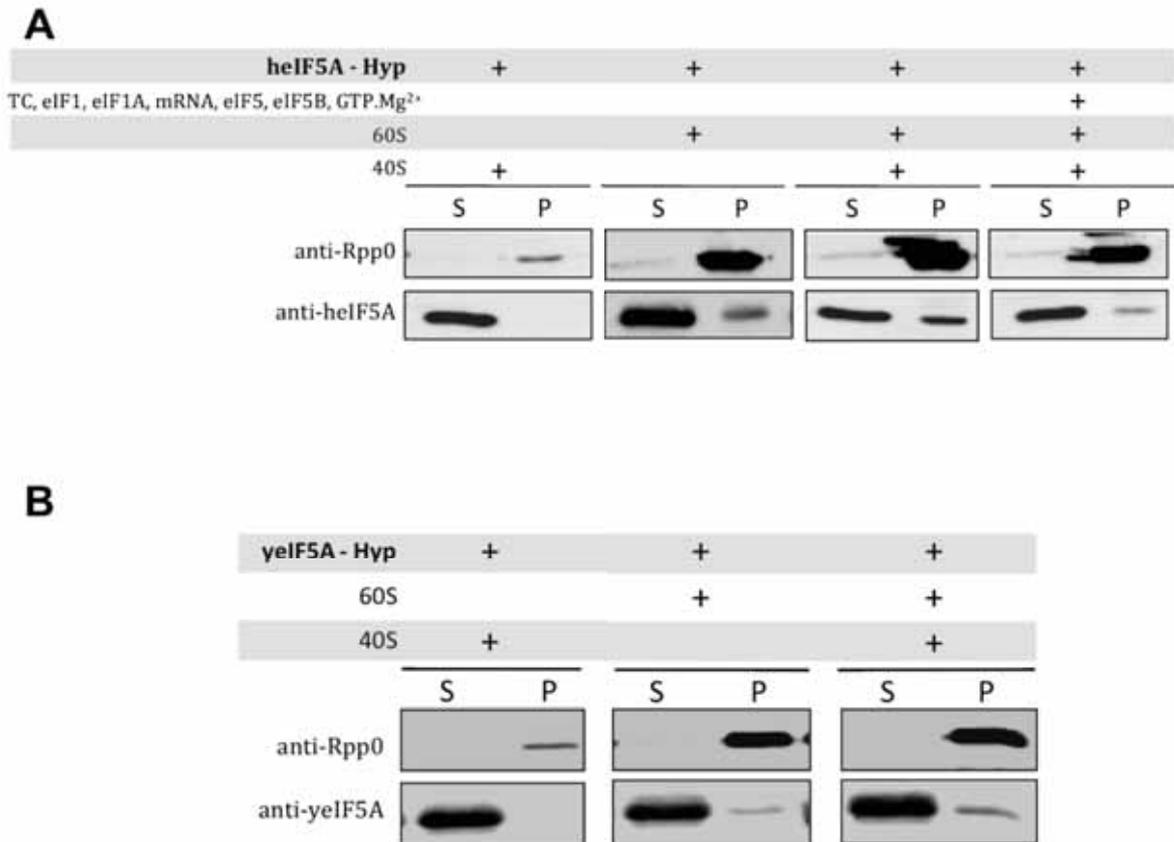


Figura 22. Ensaio de ultracentrifugação revelam ligação direta de eIF5A com ribossomo de levedura. Após reconstituição dos diferentes complexos ribossomais com adição dos componentes livres como 40S, 60S, fatores de início de tradução e/ou eIF5A, as diferentes misturas foram aplicadas sob um colchão de sacarose 10% e submetidas à ultracentrifugação a 250.000 *xg* por 60 minutos. As frações de sobrenadante (S) e precipitado (P) obtidas foram analisadas por *western blot* e a proteína ribossomal Rpp0 foi usada como controle de 60S. **(A)** Análise das frações de S e P do ensaio de ligação de heIF5A-Hyp às subunidades 40S e 60S, ao 80S reconstituído (40+60) e ao complexo de início de tradução reconstituído (40S, 60S, complexo ternário (TC), mRNA, eIF1, eIF1A, eIF5, eIF5B-GTP.Mg²⁺), na presença de 2,5 mM de MgOAc₂. **(B)** Análise das frações S e P do ensaio de ligação de yeIF5A-Hyp às subunidades 40S e 60S e aos complexos ribossomais 80S reconstituído.

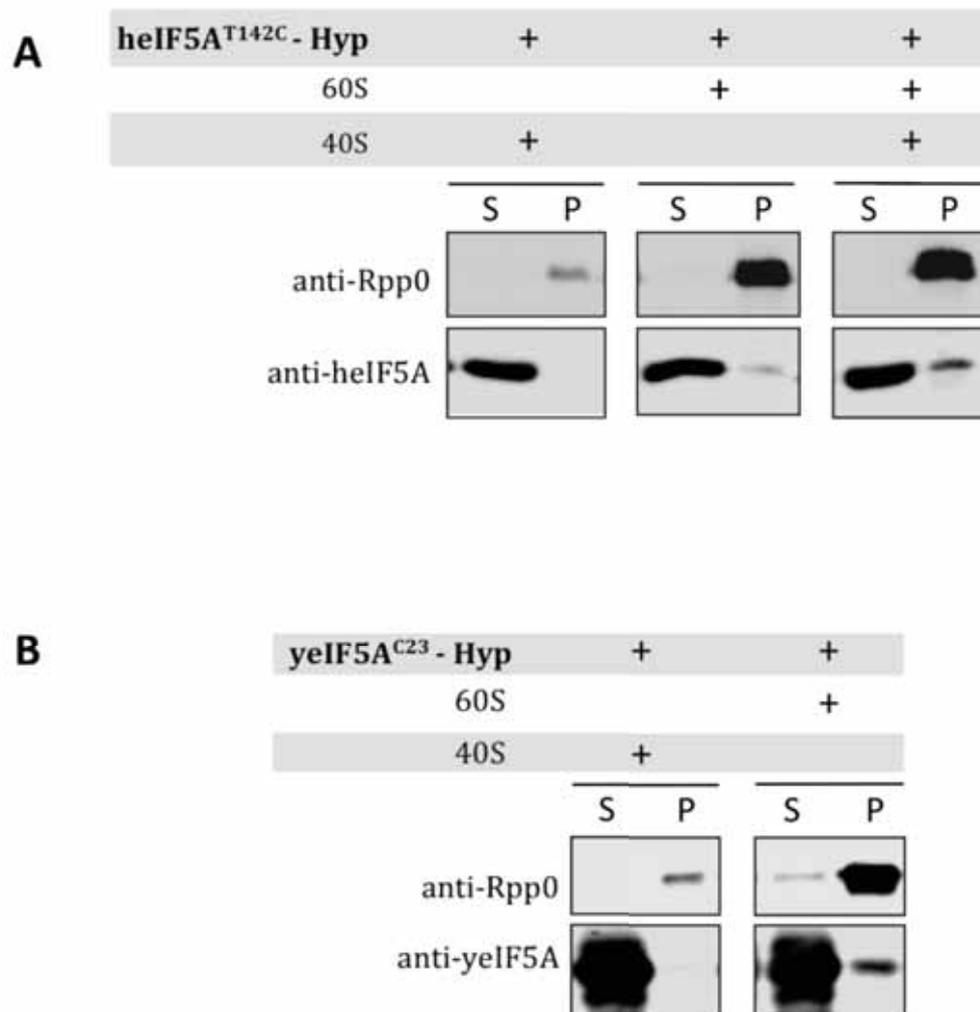


Figura 23. Ensaio de ultracentrifugação revelam ligação direta de mutantes de cisteína única de eIF5A de humano e levedura em ribossomo de levedura. (A) Análise das frações de S e de P do ensaio de ligação do mutante heIF5A^{T142C}-Hyp às subunidades 40S e 60S e ao ribossomo 80S reconstituído. **(B)** Análise das frações de S e de P do ensaio de ligação do mutante yeIF5A^{C39A}C23-Hyp às subunidades ribossomais 40S e 60S.

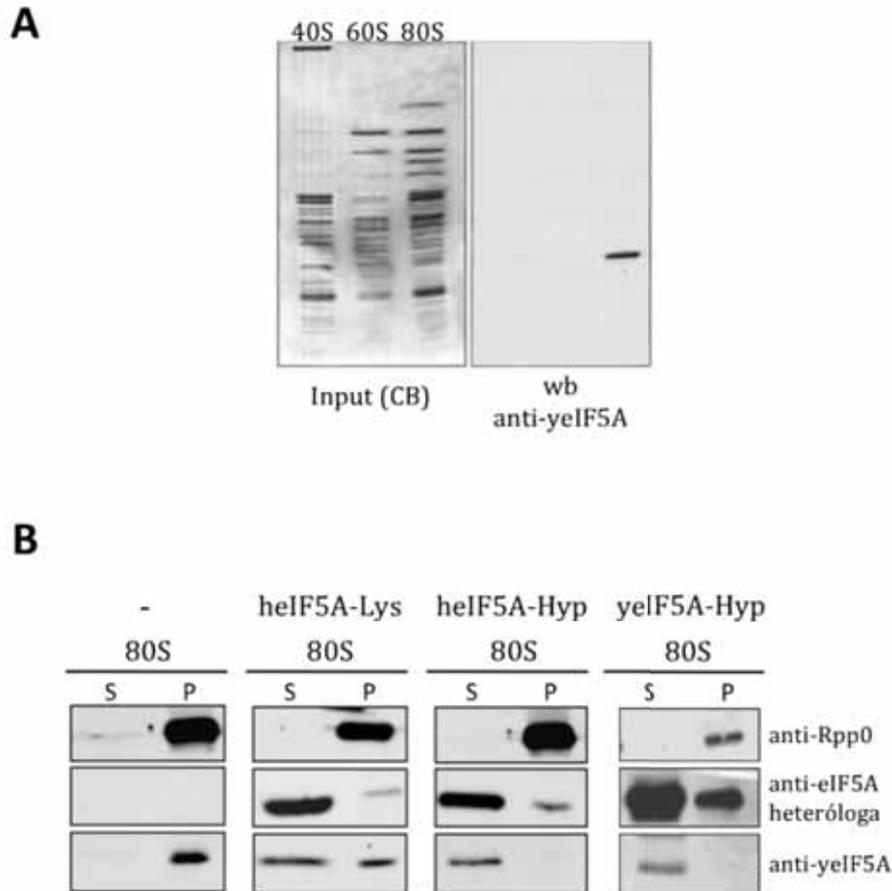


Figura 24. eIF5A recombinante é capaz de competir com eIF5A endógena pela ligação ao 80S previamente formado *in vivo* e a presença de hipusina afeta esta capacidade. (A) Análise de eIF5A endógeno nas amostras 40S, 60S e 80S nativo, por *western blot*. O painel da esquerda mostra o gel *input* das amostras analisadas. (B) Análise das frações de S e de P do ensaio de competição da ligação de heIF5A hipusinado (heIF5A-Hyp) e não hipusinado (heIF5A-Lys) e yelF5A hipusinado (yelF5A-Hyp) no complexo ribossomal 80S previamente formado *in vivo* contendo yelF5A endógena. A detecção das proteínas heterólogas foi realizada utilizando anti-heIF5A específico para heIF5A e anti-6xHis para yelF5A.

4.2.3. Definição da constante de dissociação entre eIF5A e o ribossomo por anisotropia de fluorescência

Uma vez definido, por ultracentrifugação, a ligação de eIF5A ao 60S, e confirmado que os mutantes de cisteína única de eIF5A, tanto de humano quanto de levedura, purificados a partir de bactéria, são funcionais e apresentam equivalente capacidade de ligação ao ribossomo, é possível modificar os mutantes de cisteína única de eIF5A e realizar ensaios de anisotropia de fluorescência para determinação da constante de dissociação do complexo formado *in vitro*.

A anisotropia de fluorescência é baseada no fato de que um fluoróforo em solução, quando excitado com luz polarizada, emite fluorescência de maneira polarizada inversamente proporcional a sua mobilidade nesta solução. Uma vez que uma proteína livre tem maior mobilidade em solução em comparação com uma proteína em complexo com o ribossomo, por exemplo, é possível utilizar uma marcação com fluoróforo nesta proteína e medir a anisotropia de fluorescência para avaliar a capacidade dessa proteína de se ligar ao ribossomo. O esquema apresentado na Figura 25, mostra a proteína mutante de cisteína única de eIF5A derivatizada com uma molécula de fluoresceína-5-maleimida, sendo excitada por um feixe de luz polarizada. Quando a proteína está livre, é capaz de emitir uma luz fluorescente despolarizada, e quando a proteína está complexada com o ribossomo, emite um feixe de luz fluorescente mais polarizado. A medida desta polarização de luz fluorescente é convertida em variação de luz polarizada (dFP – deviation of Fluorescence Polarization). Essa medida, por sua vez, é convertida em um gráfico que expressa a fração de ligação da proteína no complexo, levando em consideração as concentrações de ribossomo utilizadas. Por fim, o ponto médio da curva de fração de ligação exprime o valor da constante de dissociação (Kd) entre a proteína e o complexo, mostrando que quanto mais precocemente a curva atinge o platô, menor é a Kd, portanto, maior é a afinidade entre a proteína e o complexo.

Utilizando, portanto, esta técnica e um mutante de cisteína única de levedura, yelF5A^{C23} hipusinado, a Figura 26A mostra as constantes de dissociação da ligação entre eIF5A de levedura às subunidades ribossomais 40S e 60S e ao ribossomo 80S reconstituído (40S+60S). O gráfico revela um valor muito semelhante entre as constantes de dissociação com a subunidade 60S (Kd=211 nM) e com o ribossomo 80S (Kd=408 nM), mostrando que a montagem do ribossomo 80S *in vitro* não favorece a ligação de eIF5A, uma vez que os valores são biologicamente

relevantes, mas não significativamente diferentes. Por outro lado, o valor da constante de dissociação obtido para a ligação de eIF5A com 40S é muito alto ($K_d=7,2 \mu\text{M}$), e pode ser considerado produto de ligação inespecífica.

Da mesma forma como foi testado nos ensaios de ultracentrifugação, aqui também foi avaliada a influência da hipusina na ligação de eIF5A ao ribossomo. Assim, a Figura 26B mostra o gráfico de fração de ligação do mutante yeIF5A^{C23} não hipusinado na subunidade ribossomal 60S, revelando altíssimo valor de constante de dissociação ($K_d=5,9 \mu\text{M}$), semelhante ao valor de K_d obtido para ligação de eIF5A hipusinado na subunidade ribossomal 40S. O ensaio de ligação da proteína não hipusinada na subunidade 40S não permitiu a obtenção de um valor de K_d , visto que os valores obtidos de dFP (variação de luz polarizada) não puderam ser convertidos à fração de ligação (Figura 26C). Portanto, como esperado, não há qualquer tipo de ligação entre eIF5A não hipusinado e a subunidade menor do ribossomo.

Da mesma maneira, a ligação de um mutante de eIF5A de humano (heIF5A^{T142C}-Hyp) na subunidade 60S foi testada, para averiguar se as constantes seriam próximas, em virtude da semelhança nos resultados de ultracentrifugação. Como esperado, a constante de dissociação da ligação de eIF5A de humano na subunidade 60S de levedura ($K_d=264 \text{ nM}$) é muito semelhante ao de eIF5A de levedura (Figura 26D), corroborando o dado funcional, observado no ensaio de complementação (*in vivo*), e bioquímico, obtido no ensaio de ligação direta por ultracentrifugação (*in vitro*), vistos tanto para eIF5A de humano quanto de levedura.

Diferentes técnicas mostram fatores de alongação da tradução ligando ribossomo ou proteínas ribossomais, tanto de eucarioto quanto de procarioto, com constantes de dissociação de mesma ordem de grandeza daquelas reveladas neste trabalho. A ligação de eEF2 e eEF3 ao ribossomo, por exemplo, apresentam $K_d=500 \text{ nM}$ (RAO and BODLEY 1996) e $K_d=280 \text{ nM}$ (GONTAREK *et al.* 1998), respectivamente. Para fatores de início de tradução, a análise é mais complexa, visto que a estabilidade da ligação desses fatores ao 40S é extremamente variável dependendo de outros fatores, ou ainda, dependendo da ordem em que ocorre a formação dos diversos complexos ribossomais (ACKER *et al.* 2007). Considerando estas evidências, podemos afirmar que eIF5A liga-se diretamente e com alta afinidade à subunidade ribossomal 60S, não apresentando ligação específica com a subunidade menor do ribossomo (40S).

Apesar de a ligação específica de eIF5A no ribossomo ter sido comprovada tanto com a proteína de humano quanto de levedura, ainda seria interessante testar

se a formação prévia de outros tipos de complexos ribossomais poderia alterar esta constante. Para isto, será necessário ensaiar a ligação de eIF5A no ribossomo com adição de fatores de início e alongação da tradução, bem como tRNA_i e outros tRNAs carregados e mRNA, para determinação da cinética de ligação de eIF5A no ribossomo, bem como para busca de fatores da tradução que possam agir como competidores ou auxiliares dessa ligação. Essas propostas estão contempladas no meu projeto de pós-doutorado, em julgamento na FAPESP (Processo 2012/23890-9).

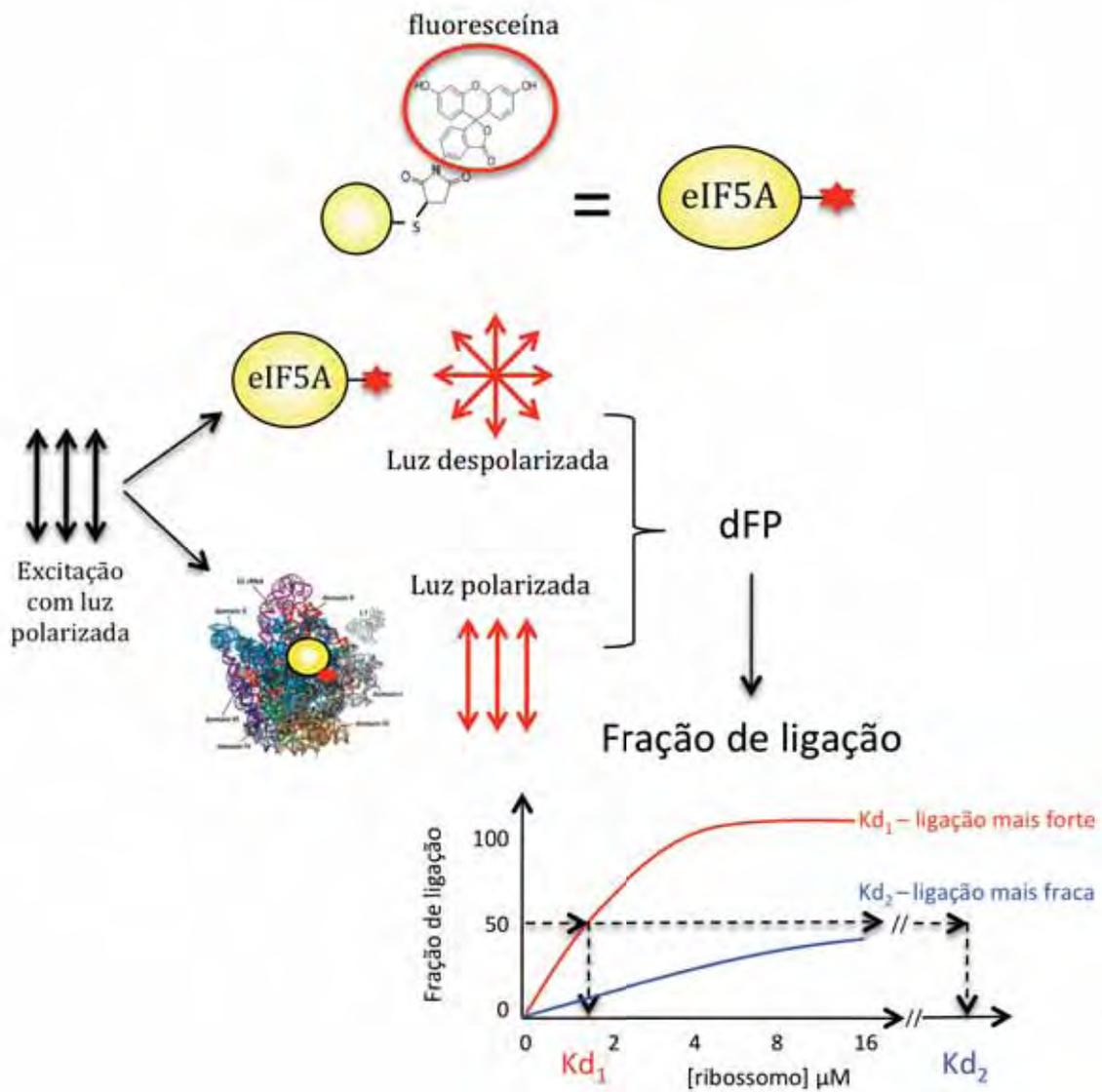


Figura 25. Esquema representativo da técnica de anisotropia de fluorescência. Um feixe de luz polarizada incide sobre moléculas de eIF5A ligadas covalentemente com fluoresceína-maleimida em resíduo único de cisteína. Quando a proteína encontra-se livre, a dispersão de luz é menos polarizada, e quando complexada com o ribossomo, ocorre maior polarização da luz emitida pelo fluoróforo. O gráfico representa o cálculo de constante de dissociação (K_d) obtido a partir dos valores de polarização de luz fluorescente (dFP), mostrando que quanto antes a curva de polarização de luz encontra o platô, menor é o K_d , e, portanto, maior afinidade do complexo.

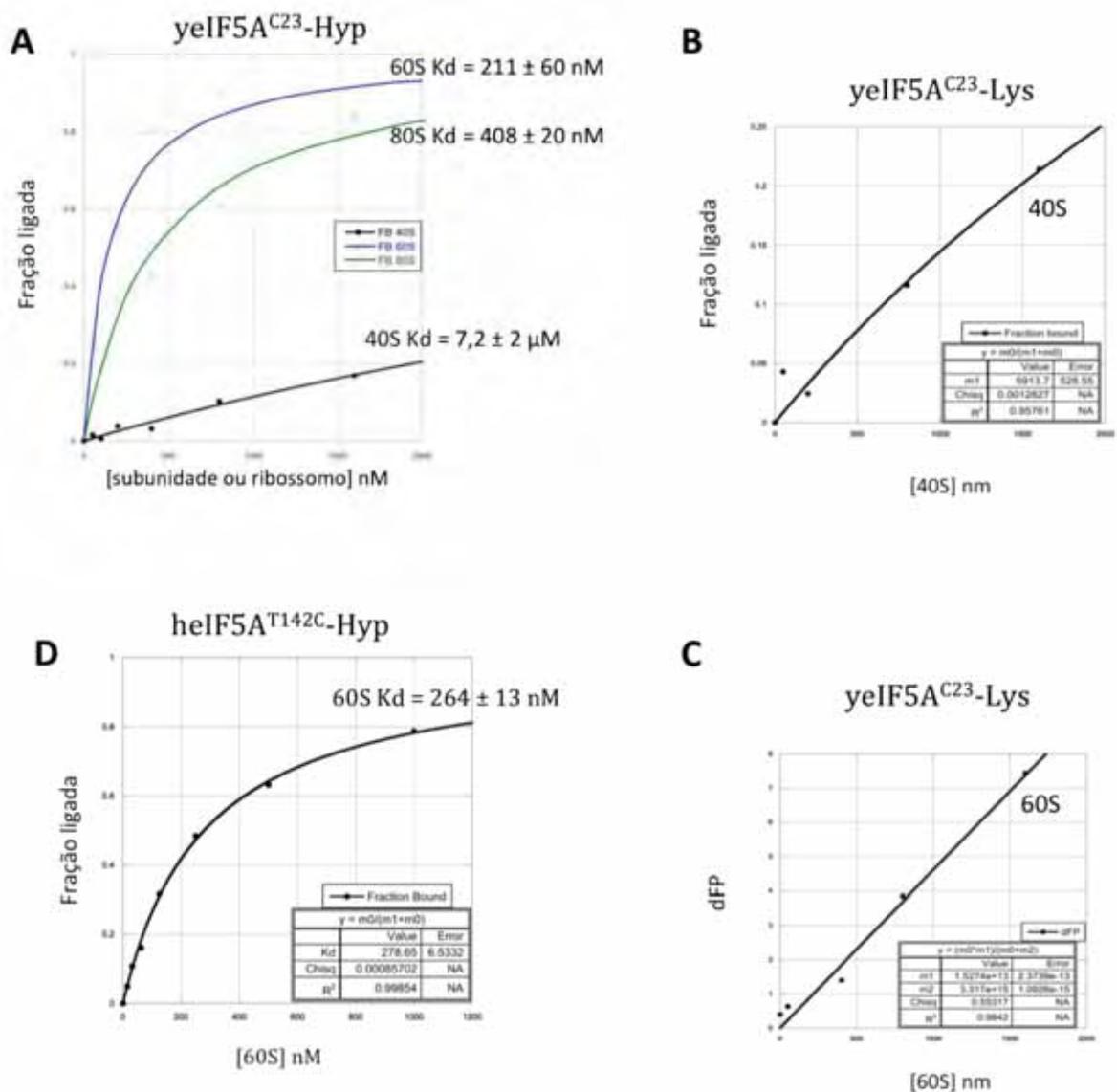


Figura 26. Ensaio de anisotropia de fluorescência revela que a ligação entre eIF5A e 60S é de alta afinidade e dependente de hipusina. (A) Gráfico das frações ligadas de yeIF5A^{C23} hipusinado às subunidades ribossomais 40S e 60S e ao ribossomo 80S reconstituído (40+60S), mostrando os valores das constantes de dissociação (Kd) obtidos. **(B e C)** Gráfico da fração ligada e a diferença de polarização de luz (dFP) de yeIF5A^{C23} não hipusinado às subunidades ribossomais 40S e 60S, respectivamente. **(D)** Gráfico da fração ligada de heIF5A^{T142C} hipusinado à subunidade 60S, mostrando o valor de Kd obtido.

4.2.4. Início do mapeamento dos pontos de ligação direta de eIF5A no ribossomo, pelo ensaio de clivagem induzida de rRNA, utilizando mutantes de cisteína única de eIF5A complexado com ribossomo

Uma vez determinada a constante de dissociação entre eIF5A e a subunidade 60S, tanto para proteína de humano quanto de levedura, essas proteínas foram utilizadas para derivatização com BABE-Fe e utilizadas em ensaios de clivagem do rRNA por radical hidroxil, para posterior determinação dos pontos de interação direta de eIF5A no ribossomo.

O ensaio de clivagem utilizado é baseado na indução da clivagem de rRNA por radical reativo hidroxil gerado por íon Fe^{+2} , acoplado artificialmente a resíduos únicos de cisteína presentes na superfície de eIF5A (Figura 27). O radical hidroxil (gerado a partir de H_2O_2 – reação de Fenton) é altamente reativo e capaz de clivar o rRNA quando gerado na proximidade de aproximadamente 10 Å, podendo, assim, definir a posição de interação no ribossomo, uma vez que se conhece o sítio de formação do radical (resíduo único de cisteína). Esta proteína é então utilizada na formação de complexo com ribossomo e, em seguida, é induzida a clivagem do rRNA por adição de ácido ascórbico e H_2O_2 . Os locais de clivagem são então identificados pelo ensaio de *primer extension* e utilizados na geração de modelos tridimensionais que localizam os pontos de interação da proteína de interesse com o ribossomo.

Diferentes *primers* devem ser usados neste rastreamento para determinar corretamente os pontos de interação. Tendo em vista os locais de interação de EF-P nos domínios III e V (onde se situa o PTC) da subunidade ribossomal 50S (BLAHA *et al.* 2009), cinco *primers* diferentes foram obtidos e marcados para serem utilizados nas reações de *primer extension*, tanto da sequência íntegra do rRNA (sem indução de clivagem), quanto dos fragmentos obtidos após clivagem por eIF5A-BABE-Fe. Os painéis A das Figuras 28 e 29 mostram os dois *primers* utilizados até o momento, devido ao fato de serem os únicos que tiveram boa marcação com [^{32}P] γ ATP.

A Figura 28B mostra o gel de *primer extension* de rRNA, utilizando o *primer* b, para o ensaio de ligação de 60S com diferentes mutantes de cisteína única de eIF5A de humano (C129, V56C e G97C) e de levedura (C23). A reação de *primer extension* também foi feita apenas com 60S e com 60S adicionado de EDTA, como controles da atividade inespecífica de clivagem do rRNA. Além disso, as proteínas eIF5A de humano e levedura não derivatizadas também foram ensaiadas como controle de ausência de clivagem, mostrando que a clivagem deve ser

especificamente gerada por radical BABE-Fe, acoplado aos mutantes de cisteína única. Por fim, o sequenciamento da sequência primária do rRNA íntegro é mostrado à extrema esquerda do gel, com o uso de ddNTPs (Figura 28B).

A Figura 29 mostra outro gel de *primer extension*, utilizando mesmas reações e condições descritas acima, porém utilizando o *primer g*, que hibridiza em outro local na sequência do rRNA. Diferentemente do descrito para a Figura 28, este ensaio foi realizado somente com mutantes de cisteína única de humano, além dos mesmos controles descritos.

Infelizmente, ambos *primers* utilizados ainda não possibilitaram a identificação dos pontos de contato direto entre eIF5A e o ribossomo. Muitas são as variáveis que podem ser modificadas neste tipo de ensaio, como, por exemplo, o uso de novos ddNTPs, visto que o ddTTP apresentou defeito na reação de sequenciamento. Também é importante que sejam testados outros *primers*, que hibridizam em outras regiões do 60S, para que o mapeamento dos pontos de interação entre eIF5A e o ribossomo seja completo. Sendo assim, este objetivo também está contemplado na proposta do meu projeto de pós-doutorado.

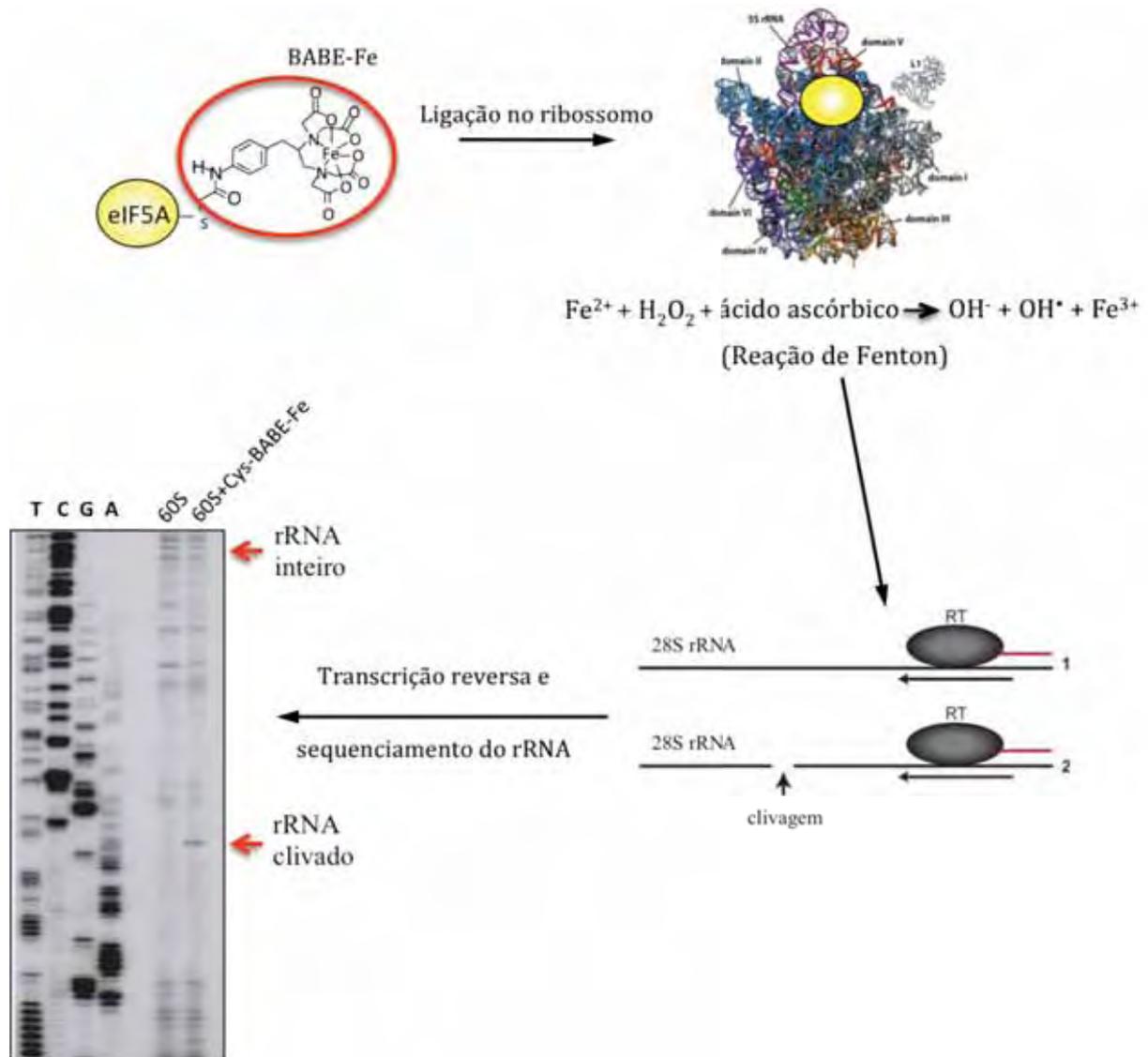


Figura 27. Esquema ilustrativo do ensaio de clivagem de rRNA por radical hidroxil. O complexo formado entre eIF5A mutante de cisteína única-BABE-Fe e o ribossomo é submetido à reação de clivagem do rRNA por radical $\text{OH}\cdot$, com a adição de água oxigenada e ácido ascórbico. Os fragmentos de rRNAs são submetidos a reação de *primer extension*, com uso de *primers* específicos. Paralelamente, outra reação de *primer extension* é realizada com o rRNA íntegro, tanto para comparação com o rRNA clivado quanto para sequenciamento do rRNA e, com isso, mapear os pontos de interação entre eIF5A e o ribossomo. Nesta figura é mostrado um gel ilustrativo (LEBARON *et al.* 2012)

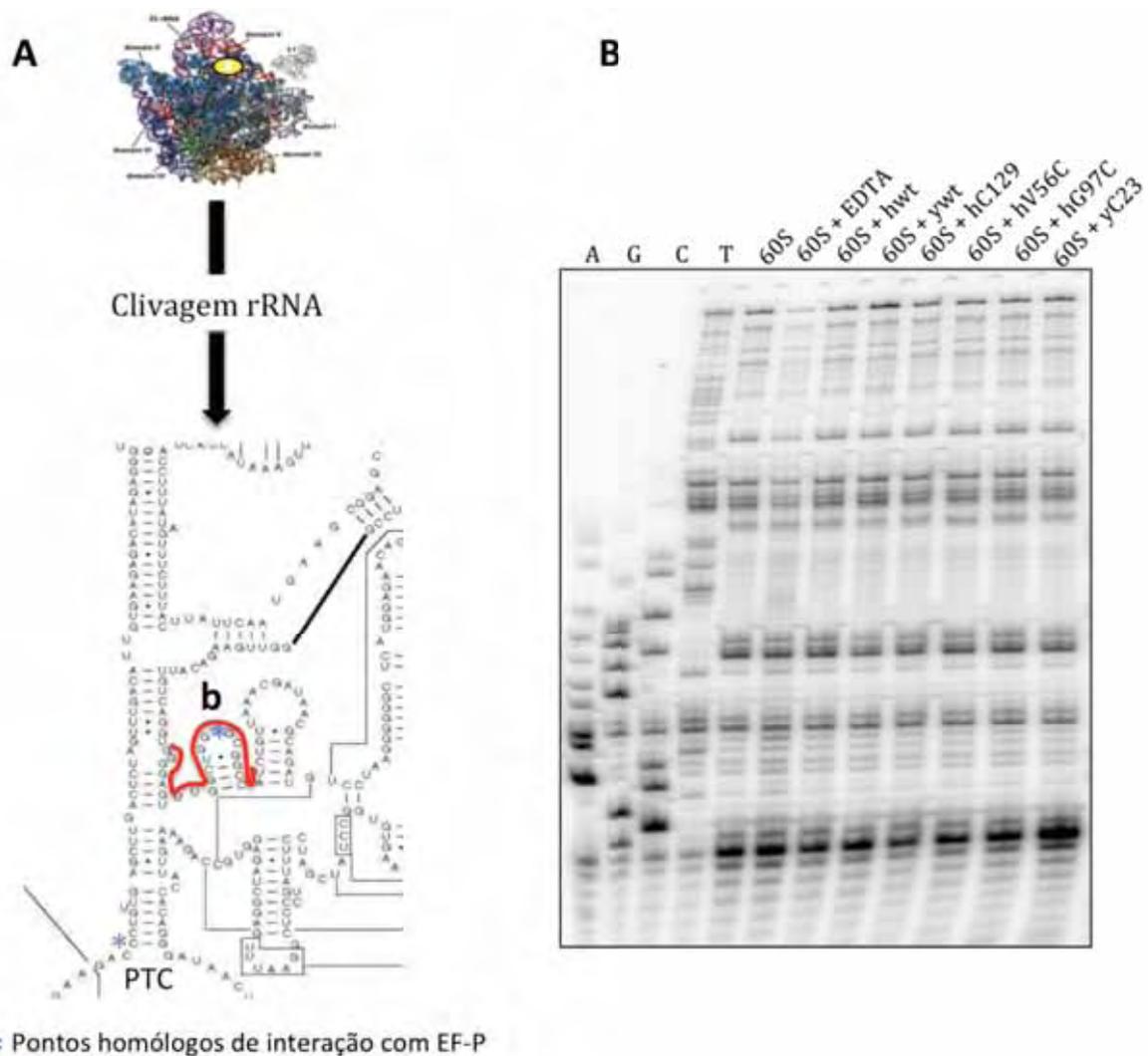


Figura 28. Esquema do ensaio de clivagem de rRNA induzida por radical hidroxil para busca do local de ligação direta de eIF5A na subunidade 60S (utilizando o *primer b*). Após modificação de mutante de cisteína única de eIF5A com BABE-Fe, e ligação na subunidade 60S, a clivagem local induzida foi rastreada pelo sequenciamento dos fragmentos de rRNA e do rRNA íntegro utilizando o *primer b* (VZO1264). A extremidade da esquerda do gel mostra o resultado de *primer extension* da região analisada pelo *primer* utilizado e as canaletas seguintes estão representando as amostras que foram testadas.

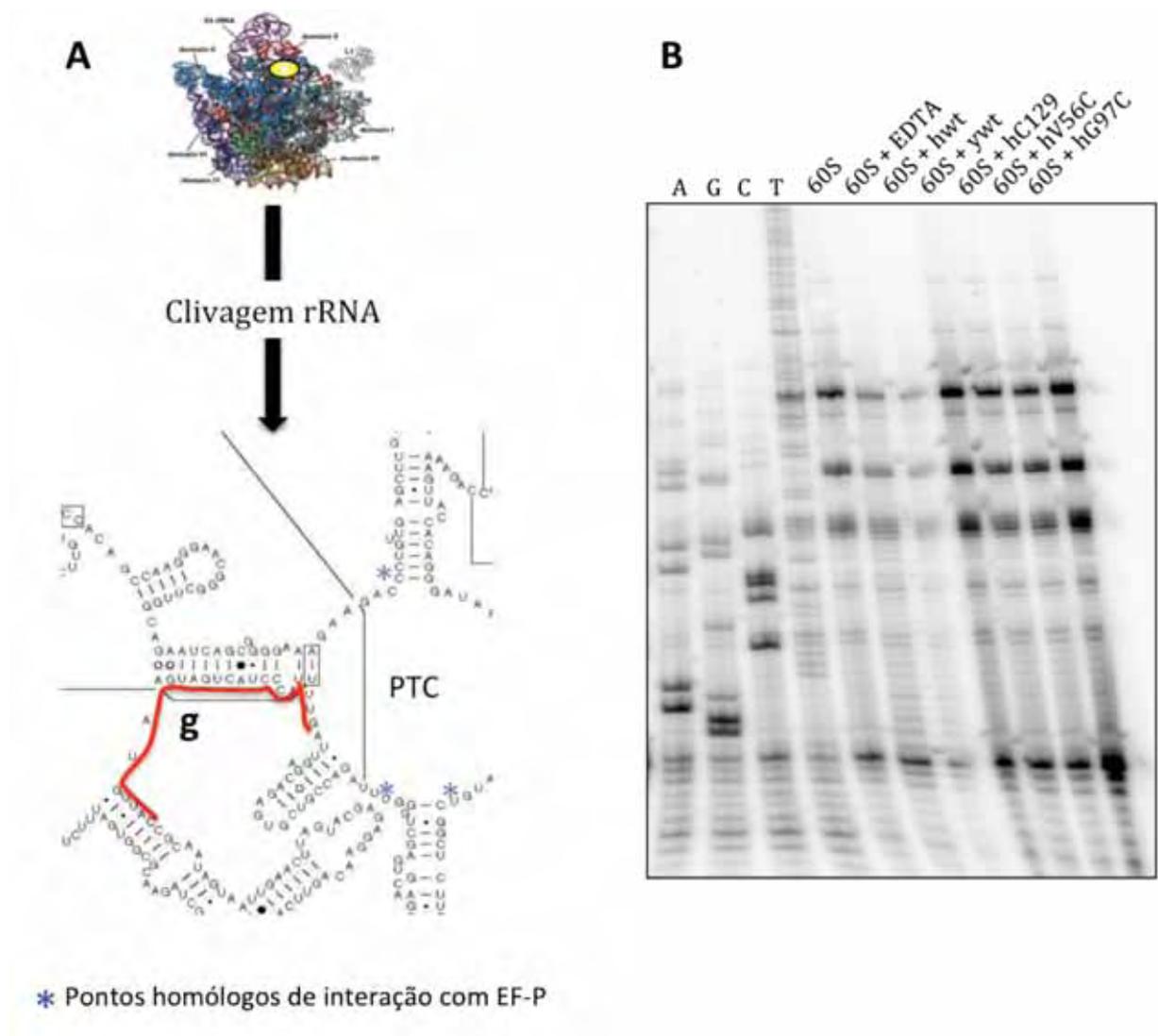


Figura 29. Esquema do ensaio de clivagem de rRNA induzida por radical hidroxil para busca do local de ligação direta de eIF5A na subunidade 60S (utilizando o *primer g*). Após modificação de mutante de cisteína única de eIF5A com BABE-Fe, e ligação na subunidade 60S, a clivagem local induzida foi rastreada pelo sequenciamento dos fragmentos de rRNA e do rRNA íntegro utilizando o *primer g* (VZO1268). A extremidade da esquerda do gel mostra o resultado do *primer extension* da região analisada pelo *primer* utilizado e as canaletas seguintes estão representando as amostras que foram testadas.

5. CONCLUSÕES

- 5.1. Os ensaios de translocação utilizando os repórteres específicos de via pós-traducional (CPY) e co-traducional (DPAP B), além das interações genéticas com componentes de SRP e de translocon da via co-traducional, sugerem que eIF5A participa especificamente da translocação de proteínas pela via co-traducional;
- 5.2. Os resultados de análise proteômica nos permite sugerir que a tradução de um possível grupo de mRNAs é regulada por eIF5A, sendo eles envolvidos na regulação do processo de tradução, na progressão do ciclo celular e na via secretória;
- 5.3. A descoberta de interações genéticas entre Asc1, Dys1 e eIF5A sugerem que estas proteínas participem na regulação da tradução de mRNAs envolvidos nos mesmos processos celulares;
- 5.4. eIF5A de levedura e humano são capazes de se ligar diretamente e especificamente na subunidade maior (60S) do ribossomo de levedura, de maneira dependente de hipusina;
- 5.5. Os resultados de ultracentrifugação e anisotropia de fluorescência demonstram não haver diferença na afinidade de eIF5A com a subunidade ribossomal 60S e o ribossomo 80S reconstituído;
- 5.6. O ribossomo 80S previamente formado *in vivo*, purificado de levedura, apresenta eIF5A endógeno ligado, e eIF5A heteróloga tanto de levedura quanto de humano é capaz de competir por esta ligação, também de maneira dependente da hipusina.

Sendo assim, de acordo com as conclusões obtidas neste trabalho e com base na literatura atual, o modelo proposto para o papel de eIF5A na tradução específica encontra-se resumido na Figura 30. A Figura 30A mostra esquematicamente a correlação estrutural entre os ribossomos de procarioto e

eucarioto. Enquanto EF-P interage tanto com 50S (domínios I e II) entre os sítios P e E e com 30S (domínio III) no sítio E (BLAHA *et al.* 2009), é possível que eIF5A deva interagir somente com a subunidade maior do ribossomo, por possuir apenas domínios homólogos aos domínios I e II de EF-P. Os dados de ultracentrifugação e anisotropia confirmam esta hipótese, mostrando que eIF5A interage especificamente e com alta afinidade com o 60S (Figuras 22, 23 e 26). Entretanto, não foi possível determinar em que momento do ciclo de elongação da tradução eIF5A participa (Figura 30B, painéis superiores), e se sua função é na formação da ligação peptídica, como determinado para EF-P (BLAHA *et al.* 2009; BULLWINKLE *et al.* 2012; DOERFEL *et al.* 2013; UDE *et al.* 2013). Sabe-se também que a ligação do complexo SRP no ribossomo através da ligação do RNA 7S da SRP e das proteínas do complexo, tanto com os RNAs quanto com as proteínas das duas subunidades ribossomais (HALIC *et al.* 2004; POOL *et al.* 2002; TERZI *et al.* 2004), impede a ligação dos fatores de elongação eEF1A e eEF2 próximo ao sítio A do ribossomo (Figura 30B, painéis superiores). A correlação funcional entre eIF5A e a via co-traducional, mostrada nas Figuras 8, 10 e 11, pode ser explicada pela hipótese de eIF5A atuar não somente na formação da ligação peptídica, mas também na estabilização do complexo SRP-ribossomo, favorecendo a translocação de proteínas para RE (Figura 30B, painéis inferiores). O papel de eIF5A na tradução específica pode ser consequência desta interação física/funcional, e eIF5A favoreceria a síntese de proteínas envolvidas com progressão do ciclo celular, como foi mostrado nos dados de análise proteômica (Figuras 13 e 14).

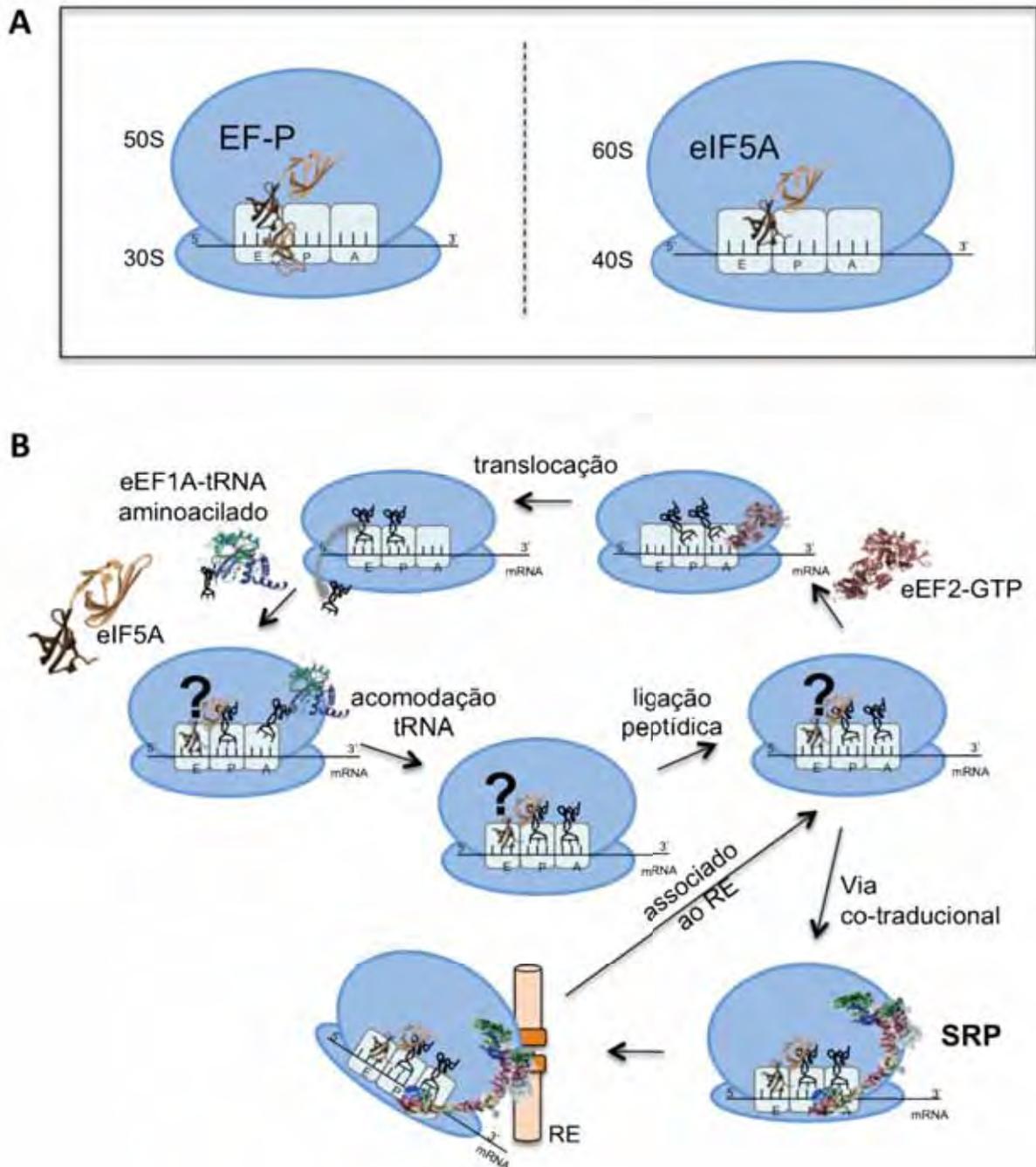


Figura 30. Modelo proposto para o papel de eIF5A na tradução específica. (A) Esquema representando a correlação dos ribossomos de procaríoto e eucaríoto contendo EF-P e eIF5A, respectivamente, com base nas homologia estrutural dessas proteínas. **(B)** O ciclo de elongação da tradução depende dos fatores de elongação da tradução eEF1A na ligação do tRNA amino-acilado no sítio A, de eEF2 na translocação do ribossomo e de eIF5A. A molécula SRP liga-se nos mesmos sítios de ligação de eEF2, causando uma parada na tradução, e direciona a maquinaria de tradução para o RE, onde retoma a tradução quando o ribossomo ancora na membrana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, M. G., S. E. KOLITZ, S. F. MITCHELL, J. S. NANDA and J. R. LORSCH, 2007
Reconstitution of yeast translation initiation. *Methods Enzymol* **430**: 111-145.
- ACKER, M. G., B. S. SHIN, T. E. DEVER and J. R. LORSCH, 2006 Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* **281**: 8469-8475.
- AGIRREZABALA, X., H. Y. LIAO, E. SCHREINER, J. FU, R. F. ORTIZ-MEOZ *et al.*, 2012
Structural characterization of mRNA-tRNA translocation intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6094-6099.
- ALKALAEVA, E. Z., A. V. PISAREV, L. Y. FROLOVA, L. L. KISSELEV and T. V. PESTOVA, 2006
In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**: 1125-1136.
- ANDERSEN, C. B., T. BECKER, M. BLAU, M. ANAND, M. HALIC *et al.*, 2006 Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* **443**: 663-668.
- ATKINSON, G. C., S. L. BALDAUF and V. HAURYLIUK, 2008 Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evol Biol* **8**: 290.
- BEN-SHEM, A., L. JENNER, G. YUSUPOVA and M. YUSUPOV, 2010 Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **330**: 1203-1209.
- BENNE, R., and J. W. HERSHEY, 1978 The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**: 3078-3087.
- BEVEC, D., H. KLIER, W. HOLTER, E. TSCHACHLER, P. VALENT *et al.*, 1994 INDUCED GENE-EXPRESSION OF THE HYPUSINE-CONTAINING PROTEIN EUKARYOTIC INITIATION-FACTOR 5A IN ACTIVATED HUMAN T-LYMPHOCYTES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10829-10833.
- BLAHA, G., R. E. STANLEY and T. A. STEITZ, 2009 Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* **325**: 966-970.
- BULLWINKLE, T. J., S. B. ZOU, A. RAJKOVIC, S. J. HERSCH, S. ELGAMAL *et al.*, 2012 (R)- β -lysine modified elongation factor P functions in translation elongation. *J Biol Chem*.

- BUSKIRK, A. R., and R. GREEN, 2013 Biochemistry. Getting past polyproline pauses. *Science* **339**: 38-39.
- CAPLAN, A. J., D. M. CYR and M. G. DOUGLAS, 1992 YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**: 1143-1155.
- CARAGLIA, M., M. MARRA, G. GIUBERTI, A. M. D'ALESSANDRO, A. BUDILLON *et al.*, 2001 The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. *Amino Acids* **20**: 91-104.
- CAUSTON, H. C., B. REN, S. S. KOH, C. T. HARBISON, E. KANIN *et al.*, 2001 Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 323-337.
- CHANTREL, Y., M. GAISNE, C. LIONS and J. VERDIÈRE, 1998 The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics* **148**: 559-569.
- CHEN, K. Y., and A. Y. C. LIU, 1997 Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biological Signals* **6**: 105-109.
- CHEN, Z. P., Y. P. YAN, Q. J. DING, S. KNAPP, J. A. POTENZA *et al.*, 1996 Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. *Cancer Letters* **105**: 233-239.
- CHIRICO, W. J., M. G. WATERS and G. BLOBEL, 1988 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**: 805-810.
- CLEMENT, P. M., H. E. JOHANSSON, E. C. WOLFF and M. H. PARK, 2006 Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. *Febs J* **273**: 1102-1114.
- CORSI, A. K., and R. SCHEKMAN, 1996 Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**: 30299-30302.
- DALLEY, J. A., A. SELKIRK and M. R. POOL, 2008 Access to ribosomal protein Rpl25p by the signal recognition particle is required for efficient cotranslational translocation. *Mol Biol Cell* **19**: 2876-2884.
- DANAIE, P., M. ALTMANN, M. N. HALL, H. TRACHSEL and S. B. HELLIWELL, 1999 CLN3 expression is sufficient to restore G1-to-S-phase progression in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in translation initiation factor eIF4E. *Biochem J* **340 (Pt 1)**: 135-141.

- DESHAIES, R. J., and R. SCHEKMAN, 1989 SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**: 2653-2664.
- DIAS, C. A., V. S. CANO, S. M. RANGEL, L. H. APPONI, M. C. FRIGIERI *et al.*, 2008 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.
- DIAS, C. A., A. P. GREGIO, D. ROSSI, F. C. GALVÃO, T. F. WATANABE *et al.*, 2012 eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids* **42**: 697-702.
- DINMAN, J. D., 2009 The eukaryotic ribosome: current status and challenges. *J Biol Chem* **284**: 11761-11765.
- DOERFEL, L. K., I. WOHLGEMUTH, C. KOTHE, F. PESKE, H. URLAUB *et al.*, 2013 EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* **339**: 85-88.
- DÖNHÖFER, A., S. FRANCKENBERG, S. WICKLES, O. BERNINGHAUSEN, R. BECKMANN *et al.*, 2012 Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16900-16905.
- FINKE, K., K. PLATH, S. PANZNER, S. PREHN, T. A. RAPOPORT *et al.*, 1996 A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S-cerevisiae*. *Embo Journal* **15**: 1482-1494.
- FRASER, C. S., K. E. BERRY, J. W. HERSHEY and J. A. DOUDNA, 2007 eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Mol Cell* **26**: 811-819.
- FRIGIERI, M. C., M. V. JOAO LUIZ, L. H. APPONI, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2008 Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics* **280**: 211-221.
- FRIGIERI, M. C., G. M. THOMPSON, J. R. PANDOLFI, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2007 Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics and Molecular Research* **6**: 152-165.
- GANOZA, M. C., M. C. KIEL and H. AOKI, 2002 Evolutionary conservation of reactions in translation. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 460-485, table of contents.
- GASCH, A. P., P. T. SPELLMAN, C. M. KAO, O. CARMEL-HAREL, M. B. EISEN *et al.*, 2000 Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.

- GERBASI, V. R., C. M. WEAVER, S. HILL, D. B. FRIEDMAN and A. J. LINK, 2004 Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol* **24**: 8276-8287.
- GLICK, B. R., and M. C. GANOZA, 1975 Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 4257-4260.
- GONTAREK, R. R., H. LI, K. NURSE and C. D. PRESCOTT, 1998 The N terminus of eukaryotic translation elongation factor 3 interacts with 18 S rRNA and 80 S ribosomes. *J Biol Chem* **273**: 10249-10252.
- GOUGH, J., K. KARPLUS, R. HUGHEY and C. CHOTHIA, 2001 Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol* **313**: 903-919.
- GREBER, B. J., D. BOEHRINGER, V. GODINIC-MIKULCIC, A. CRNKOVIC, M. IBBA *et al.*, 2012 Cryo-EM structure of the archaeal 50S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6 and implications for ribosome evolution. *J Mol Biol* **418**: 145-160.
- GREGIO, A. P., V. P. CANO, J. S. AVACA, S. R. VALENTINI and C. F. ZANELLI, 2009 eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **380**: 785-790.
- GUARENTE, L., 1993 Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1639-1641.
- HALIC, M., T. BECKER, M. R. POOL, C. M. T. SPAHN, R. A. GRASSUCCI *et al.*, 2004 Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* **427**: 808-814.
- HANAUSKEABEL, H. M., M. H. PARK, A. R. HANAUSKE, A. M. POPOWICZ, M. LALANDE *et al.*, 1994 INHIBITION OF THE G1-S TRANSITION OF THE CELL-CYCLE BY INHIBITORS OF DEOXYHYPUSINE HYDROXYLATION. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1221**: 115-124.
- HANAWA-SUETSUGU, K., S. SEKINE, H. SAKAI, C. HORI-TAKEMOTO, T. TERADA *et al.*, 2004 Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9595-9600.
- HERSHEY, J. W. B., SONENBERG, N., MATHEUS, M. B. *Translational Control in Biology and Medicine*, New York: CSHL Press, 2012.
- HINNEBUSCH, A. G., 2011 Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 434-467, first page of table of contents.

- JAO, D. L. E., and K. Y. CHEN, 2006 Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**: 583-598.
- JENKINS, Z. A., P. G. HAAG and H. E. JOHANSSON, 2001 Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics* **71**: 101-109.
- JIANG, Y., Z. CHENG, E. C. MANDON and R. GILMORE, 2008 An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *Journal of Cell Biology* **180**: 1149-1161.
- JOHNSON, A. E., and M. A. VAN WAES, 1999 The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 799-842.
- JU, Q., and J. R. WARNER, 1994 Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 151-157.
- KANG, H. A., and J. W. B. HERSHEY, 1994 EFFECT OF INITIATION-FACTOR EIF-5A DEPLETION ON PROTEIN-SYNTHESIS AND PROLIFERATION OF *SACCHAROMYCES-CEREVISIAE*. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 3934-3940.
- KAPP, L. D., and J. R. LORSCH, 2004 The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**: 657-704.
- KEENAN, R. J., D. M. FREYMAN, R. M. STROUD and P. WALTER, 2001 The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* **70**: 755-775.
- KIM, K. K., L. W. HUNG, H. YOKOTA, R. KIM and S. H. KIM, 1998 Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10419-10424.
- KISS-LÁSZLÓ, Z., Y. HENRY, J. P. BACHELLERIE, M. CAIZERGUES-FERRER and T. KISS, 1996 Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**: 1077-1088.
- KLIER, H., T. WOHL, C. ECKERSKORN, V. MAGDOLEN and F. LOTTSPEICH, 1993 DETERMINATION AND MUTATIONAL ANALYSIS OF THE PHOSPHORYLATION SITE IN THE HYPUSINE-CONTAINING PROTEIN HYP2P. *Febs Letters* **334**: 360-364.
- KLINGE, S., F. VOIGTS-HOFFMANN, M. LEIBUNDGUT, S. ARPAGAUS and N. BAN, 2011 Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* **334**: 941-948.

- KROGAN, N. J., G. CAGNEY, H. YU, G. ZHONG, X. GUO *et al.*, 2006 Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-643.
- KURATA, S., K. H. NIELSEN, S. F. MITCHELL, J. R. LORSCH, A. KAJI *et al.*, 2010 Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 10854-10859.
- LEBARON, S., C. SCHNEIDER, R. W. VAN NUES, A. SWIATKOWSKA, D. WALSH *et al.*, 2012 Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 744-753.
- LEE, L. A., L. K. ELFRING, G. BOSCO and T. L. ORR-WEAVER, 2001 A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. *Genetics* **158**: 1545-1556.
- MASON, N., L. F. CIUFO and J. D. BROWN, 2000 Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *Embo Journal* **19**: 4164-4174.
- MATHY, G., R. NAVET, P. GERKENS, P. LEPRINCE, E. DE PAUW *et al.*, 2006 *Saccharomyces cerevisiae* mitoproteome plasticity in response to recombinant alternative ubiquinol oxidase. *J Proteome Res* **5**: 339-348.
- MATIS, M., M. ZAKELJ-MAVRIC and J. PETER-KATALINIĆ, 2005 Global Analysis of the *Hortaea werneckii* proteome: studying steroid response in yeast. *J Proteome Res* **4**: 2043-2051.
- MATHEUS, M. B., SONENBERG, N., HERSHEY, J. W. B. *Translational Control in Biology and Medicine*, New York: CSHL Press, 2007.
- MELAMED, D., L. BAR-ZIV, Y. TRUZMAN and Y. ARAVA, 2010 Asc1 supports cell-wall integrity near bud sites by a Pkc1 independent mechanism. *PLoS One* **5**: e11389.
- MERRICK, W. C., 1992 Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* **56**: 291-315.
- MORENO, J. M., J. KILDGAARD, I. SIWANOWICZ, K. K. MORTENSEN and H. U. SPERLING-PETERSEN, 1998 Binding of *Escherichia coli* initiation factor IF2 to 30S ribosomal subunits: a functional role for the N-terminus of the factor. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 465-471.
- NELSON, D. L., COX, M. M. 2004 Protein metabolism. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, cap. 28, p. 1066.

- NG, D. T., J. D. BROWN and P. WALTER, 1996 Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**: 269-278.
- NOLLER, H. F., R. GREEN, G. HEILEK, V. HOFFARTH, A. HUTTENHOFER *et al.*, 1995 Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem Cell Biol* **73**: 997-1009.
- OGG, S. C., M. A. PORITZ and P. WALTER, 1992 SIGNAL RECOGNITION PARTICLE RECEPTOR IS IMPORTANT FOR CELL-GROWTH AND PROTEIN SECRETION IN SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Molecular Biology of the Cell* **3**: 895-911.
- OLSEN, G. J., and C. R. WOESE, 1997 Archaeal genomics: An overview. *Cell* **89**: 991-994.
- OUZOUNIS, C. A., and N. C. KYRPIDES, 1996 The core histone fold: Limits to functional versatility. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 541-542.
- PANZNER, S., L. DREIER, E. HARTMANN, S. KOSTKA and T. A. RAPOPORT, 1995 Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**: 561-570.
- PARK, J. H., C. A. DIAS, S. B. LEE, S. R. VALENTINI, M. SOKABE *et al.*, 2011 Production of active recombinant eIF5A: reconstitution in E.coli of eukaryotic hypusine modification of eIF5A by its coexpression with modifying enzymes. *Protein Eng Des Sel* **24**: 301-309.
- PARK, M. H., 1989 The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* **264**: 18531-18535.
- PARK, M. H., 2006 The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* **139**: 161-169.
- PARK, M. H., Y. B. LEE and Y. A. JOE, 1997 Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biological Signals* **6**: 115-123.
- PARK, M. H., K. NISHIMURA, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2010 Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* **38**: 491-500.
- PARK, M. H., E. C. WOLFF and J. E. FOLK, 1993a HYPUSINE - ITS POSTTRANSLATIONAL FORMATION IN EUKARYOTIC INITIATION FACTOR-5A AND ITS POTENTIAL ROLE IN CELLULAR-REGULATION. *Biofactors* **4**: 95-104.

- PARK, M. H., E. C. WOLFF and J. E. FOLK, 1993b IS HYPUSINE ESSENTIAL FOR EUKARYOTIC CELL-PROLIFERATION. *Trends in Biochemical Sciences* **18**: 475-479.
- PEAT, T. S., J. NEWMAN, G. S. WALDO, J. BERENDZEN and T. C. TERWILLIGER, 1998 Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* **6**: 1207-1214.
- PETRAK, J., R. IVANEK, O. TOMAN, R. CMEJLA, J. CMEJLOVA *et al.*, 2008 Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8**: 1744-1749.
- PHAN, L., X. ZHANG, K. ASANO, J. ANDERSON, H. P. VORNLOCHER *et al.*, 1998 Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol Cell Biol* **18**: 4935-4946.
- POOL, M. R., J. STUMM, T. A. FULGA, I. SINNING and B. DOBBERSTEIN, 2002 Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science* **297**: 1345-1348.
- RACHFALL, N., K. SCHMITT, S. BANDAUI, N. SMOLINSKI, A. EHRENREICH *et al.*, 2013 RACK1/Asc1p, a Ribosomal Node in Cellular Signaling. *Mol Cell Proteomics* **12**: 87-105.
- RAO, S., and J. W. BODLEY, 1996 Expression, purification, and characterization of the G domain of *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2. *Protein Expr Purif* **8**: 91-96.
- RAPOPORT, T. A., 2007 Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**: 663-669.
- RAPOPORT, T. A., K. E. MATLACK, K. PLATH, B. MISSELWITZ and O. STAECK, 1999 Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **380**: 1143-1150.
- ROBERTS, C. J., G. POHLIG, J. H. ROTHMAN and T. H. STEVENS, 1989 Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol* **108**: 1363-1373.
- RODNINA, M. V., and W. WINTERMEYER, 2009 Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 435-443.
- ROTHBLATT, J. A., R. J. DESHAIES, S. L. SANDERS, G. DAUM and R. SCHEKMAN, 1989 Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* **109**: 2641-2652.

- SAINI, P., D. E. EYLER, R. GREEN and T. E. DEVER, 2009 Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**: 118-121.
- SCHNIER, J., H. G. SCHWELBERGER, Z. SMIT-McBRIDE, H. A. KANG and J. W. HERSHEY, 1991 Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 3105-3114.
- SCHWELBERGER, H. G., H. A. KANG and J. W. HERSHEY, 1993 Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* **268**: 14018-14025.
- SCHRADER, R., C. YOUNG, D. KOZIAN, R. HOFFMANN and F. LOTTSPEICH, 2006 Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J Biol Chem* **281**: 35336-35346.
- SEGEV, N., 2001 Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 500-511.
- SHIN, B. S., D. MAAG, A. ROLL-MECAK, M. S. AREFIN, S. K. BURLEY *et al.*, 2002 Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* **111**: 1015-1025.
- SMIT-McBRIDE, Z., J. SCHNIER, R. J. KAUFMAN and J. W. HERSHEY, 1989 Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J Biol Chem* **264**: 18527-18530.
- SPILLER, M. P., and C. J. STIRLING, 2011 Preferential Targeting of a Signal Recognition Particle-dependent Precursor to the Ssh1p Translocon in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **286**.
- STANSFIELD, I., K. M. JONES and M. F. TUIITE, 1995 The end in sight: terminating translation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **20**: 489-491.
- TAYLOR, D. J., B. DEVKOTA, A. D. HUANG, M. TOPF, E. NARAYANAN *et al.*, 2009 Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. *Structure* **17**: 1591-1604.
- TERZI, L., M. R. POOL, B. DOBBERSTEIN and K. STRUB, 2004 Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. *Biochemistry* **43**: 107-117.
- TRIANA-ALONSO, F. J., K. CHAKRABURTTY and K. H. NIERHAUS, 1995 The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. *J Biol Chem* **270**: 20473-20478.

- UDE, S., J. LASSAK, A. L. STAROSTA, T. KRAXENBERGER, D. N. WILSON *et al.*, 2013
Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* **339**: 82-85.
- VALENTINI, S. R., J. M. CASOLARI, C. C. OLIVEIRA, P. A. SILVER and A. E. MCBRIDE, 2002
Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* **160**: 393-405.
- VALERIUS, O., M. KLEINSCHMIDT, N. RACHFALL, F. SCHULZE, S. LÓPEZ MARÍN *et al.*, 2007
The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1968-1979.
- WILLER, M., A. J. JERMY, G. J. STEEL, H. J. GARSIDE, S. CARTER *et al.*, 2003
An in vitro assay using overexpressed yeast SRP demonstrates that cotranslational translocation is dependent upon the J-domain of Sec63p. *Biochemistry* **42**: 7171-7177.
- WOHL, T., H. KLIER, H. AMMER, F. LOTTSPREICH and V. MAGDOLEN, 1993
The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. *Mol Gen Genet* **241**: 305-311.
- WOLFF, E. C., K. R. KANG, Y. S. KIM and M. H. PARK, 2007
Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* **33**: 341-350.
- XU, A., and K. Y. CHEN, 2001
Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem* **276**: 2555-2561.
- XU, A., D. L. JAO and K. Y. CHEN, 2004
Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* **384**: 585-590.
- YAO, M., A. OHSAWA, S. KIKUKAWA, I. TANAKA and M. KIMURA, 2003
Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem (Tokyo)* **133**: 75-81.
- ZANELLI, C. F., A. L. MARAGNO, A. P. GREGIO, S. KOMILI, J. R. PANDOLFI *et al.*, 2006
eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 1358-1366.

- ZANELLI, C. F., and S. VALENTINI, 2007 Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids* **33**: 351-358.
- ZANELLI, C. F., and S. R. VALENTINI, 2005 Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* **171**: 1571-1581.
- ZELLER, C. E., S. C. PARNELL and H. G. DOHLMAN, 2007 The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* **282**: 25168-25176.
- ZHOURAVLEVA, G., L. FROLOVA, X. LE GOFF, R. LE GUELLEC, S. INGE-VECHTOMOV *et al.*, 1995 Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J* **14**: 4065-4072.

ANEXO I

The deoxyhypusine synthase mutant *dys1-1* reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity

Fábio Carrilho Galvão[#]; Danuza Rossi[#]; Wagner da Silva Silveira; Sandro Roberto Valentini and Cleslei Fernando Zanelli*

Department of Biological Sciences, Univ Estadual Paulista – UNESP, Araraquara-SP, Brazil

[#]These two authors contributed equally to this work.

*Corresponding author:

Cleslei F. Zanelli

zanellicf@fctfar.unesp.br

Tel: +55 16 3301-6938

Fax: +55 16 3301-6940

ABSTRACT

The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved protein among archaea and eukaryotes that has recently been implicated in the elongation step of translation. eIF5A undergoes an essential and conserved posttranslational modification at a specific lysine to generate the residue hypusine. The enzymes deoxyhypusine synthase (Dys1) and deoxyhypusine hydroxylase (Lia1) catalyze this two-step modification process. Although several *Saccharomyces cerevisiae* eIF5A mutants have importantly contributed to the study of eIF5A function, no conditional mutant of Dys1 has been described so far. In this study, we generated and characterized the *dys1-1* mutant, which showed a strong depletion of mutated Dys1 protein, resulting in more than 2-fold decrease in hypusine levels relative to the wild type. The *dys1-1* mutant demonstrated a defect in total protein synthesis, a defect in polysome profile indicative of a translation elongation defect and a reduced association of eIF5A with polysomes. The growth phenotype of *dys1-1* mutant is severe, growing only in the presence of 1 M sorbitol, an osmotic stabilizer. Although this phenotype is characteristic of Pkc1 cell wall integrity mutants, the sorbitol

requirement from *dys1-1* is not associated with cell lysis. We observed that the *dys1-1* genetically interacts with the sole yeast protein kinase C (Pkc1) and Asc1, a component of the 40S ribosomal subunit. The *dys1-1* mutant was synthetically lethal in combination with *asc1Δ* and overexpression of *TIF51A* (eIF5A) or *DYS1* is toxic for an *asc1Δ* strain. Moreover, eIF5A is more associated with translating ribosomes in the absence of Asc1 in the cell. Finally, analysis of the sensitivity to cell wall-perturbing compounds revealed a more similar behavior of the *dys1-1* and *asc1Δ* mutants in comparison with the *pkc1Δ* mutant. These data suggest a correlated role for eIF5A and Asc1 in coordinating the translational control of a subset of mRNAs associated with cell integrity.

INTRODUCTION

Initially purified from the ribosomes of reticulocyte lysates, the putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) was shown to stimulate the synthesis of methionyl-puromycin *in vitro*, indicating a role in the formation of the first peptide bond [1]. However, the depletion of eIF5A in yeast only showed a small decrease in the overall rate of protein synthesis, arguing against an essential role for eIF5A in general translation [2,3]. Therefore, it has been proposed that eIF5A plays a role in the translation of mRNAs encoding specific proteins, such as those required for cell cycle progression [4].

eIF5A has also been implicated in several mechanisms, such as mRNA decay. However, the time of growth arrest of the yeast eIF5A mutants used in the studies do not correlate with the time of mRNA degradation defect [5], the mRNA degradation defect and block of formation of P-bodies is identical to the effect of the translation elongation blocker cycloheximide [6] and another translation elongation mutant, the *cca1-1*, also demonstrate an mRNA degradation defect [7], suggesting that the effect of eIF5A on mRNA decay is actually secondary. Besides, eIF5A was involved with the nuclear export of HIV1 Rev by the Crm1/Xpo1 transporter [8-10], nevertheless, results generated by other groups failed to confirm physical and functional interactions between eIF5A and HIV-1 Rev or the Crm1/Xpo1 transporter in different experimental models [5,11-14].

Although there might be a role for eIF5A in translation initiation [15], it has been demonstrated that eIF5A physically interacts with the 80S ribosome and translation elongation factors [16,17] and functionally interacts with elongation factor 2 [18]. Furthermore, the accumulation of polysomes and an increase in the average ribosomal transit time has been observed in yeast eIF5A mutants, supporting a role for eIF5A in translation elongation instead of translation initiation [6,19].

Interestingly, eIF5A requires a unique and essential posttranslational modification in which a specific lysine is converted to hypusine. This specific lysine (K51 in *S. cerevisiae*) is located at the tip of an exposed loop in the N-terminal domain of eIF5A [20-23]. eIF5A is the only protein containing a hypusine residue, which results from a posttranslational modification in which the enzyme deoxyhypusine synthase (Dys1 in *S. cerevisiae*) transfers an aminobutyl moiety from polyamine spermidine to the amino group of a specific lysine residue to form

deoxyhypusine, followed by the addition of a hydroxyl group, which is catalyzed through deoxyhypusine hydroxylase (Lia1 in *S. cerevisiae*) activity [4]. Curiously, the deoxyhypusine synthase gene (*DYS1*) is only essential for growth in *S. cerevisiae*, and deoxyhypusine hydroxylase function is only essential in higher eukaryotes [24,25]. Although posttranslational modification is essential for eIF5A activity, and the mechanism of hypusination has been extensively characterized, the role of the hypusine residue in eIF5A remains obscure.

To further investigate the function of eIF5A and its unique hypusine residue, we generated a conditional *DYS1* mutant at the *dys1-1* allele and characterized its hypusine content, growth phenotype, total protein synthesis and polysome profile. We also identified the genetic interactions of the *dys1-1* mutant with *PKC1* and *ASC1* mutants, implicating a role for eIF5A and Asc1 in the maintenance of cell integrity at the translational level in a distinct pathway associated with the well-known Pkc1 pathway.

RESULTS

The osmotic stabilizer requirement for *dys1-1* growth is not associated with cell lysis

To generate a conditional *DYS1* mutant for the characterization of the role of the hypusine modification in eIF5A, we used site-directed mutagenesis to target conserved residues of deoxyhypusine synthase and selected for mutations that would impair the capacity of the *DYS1* gene to complement a *dys1Δ* yeast strain. Because it has previously been shown that eIF5A mutants exhibit suppression of the temperature-sensitive phenotype in the presence of an osmotic stabilizer such as sorbitol [5,26], we supplemented the growth medium with 1 M sorbitol. One of the mutants generated was able to complement the *dys1Δ* yeast strain in the presence of an osmotic stabilizer at 25°C (permissive condition) and also showed a temperature-sensitive phenotype at 35°C (restrictive condition) (Figure 1A). Furthermore, this mutant exhibited a reduced growth rate, even under the permissive growth condition (Figure 1B). These phenotypes demonstrate a more severe growth defect when compared with eIF5A mutants [5,26].

As expected from the mutation of conserved residues, this mutant carried a T118A substitution in the Dys1 protein. However, two additional and unexpected mutations (W75R and A147T) were revealed in this mutant. When verified, W303 background strains naturally contained R75 and T147 instead of W75 and A147, which are found in S288C background strains. We also generated the T118A mutation in the S288C *DYS1*, but no phenotype was observed. Moreover, a *dys1Δ* yeast strain complemented by either W303 *DYS1* (R75, T147) or S288C *DYS1* (W75, A147) alleles show no distinguishable phenotypes (data not shown). Therefore, although R75 and T147 are naturally occurring variations in the sequence coded by *DYS1* in W303 and do not impair Dys1 function in this background, together with the T118A mutation, they significantly impair Dys1 function. The triple mutant *dys1*^{W75R, T118A, A147T} was named here *dys1-1*.

Mutations in the Pkc1 cell integrity pathway result in an osmolarity support for vegetative growth phenotype due to increased cell lysis [27]. To determine whether the *dys1-1* mutant shows increased lysis compared with the wild type strain, we conducted methylene blue staining and zymolyase sensitivity assays according to standard procedures [28,29]. As observed in the vital staining experiment (Figure

1C), the *dys1-1* mutant revealed almost no cell lysis in the presence of 1 M sorbitol and a small cell lysis defect (<20%) in the absence of 1 M sorbitol, a condition in which the *dys1-1* mutant does not grow (Figure 1A). A similar result was observed in the experiment using zymolyase (Figure 1D). However, the *pkc1Δ* mutant showed almost 40% cell lysis, even in the presence of 1 M sorbitol, and approximately 80% cell lysis in the absence of 1 M sorbitol. These results suggest a minor cell lysis defect in the *dys1-1* mutant, which could not produce the severe growth impairment observed for this mutant. Therefore, although the *dys1-1* mutant is viable only in the presence of an osmotic stabilizer (1 M sorbitol), this phenotype does not reflect cell lysis, as shown for cell wall integrity mutants, such as *pkc1Δ* [27].

The *dys1-1* mutant is hypusine deficient and shows a defect in translation elongation

To further characterize the *dys1-1* mutant, we first analyzed the expression of Dys1 and hypusine-containing eIF5A protein. The haploid yeast strain, carrying only the *dys1-1* allele, showed a dramatic decrease in Dys1 protein levels and an expected reduction in the amount of hypusine-containing, but not total, eIF5A (Figure 2A and 2B). The quantification of the hypusine-containing eIF5A protein revealed that the *dys1-1* mutant showed a 60% decrease compared with wild type cells (Figure 2C).

As previously demonstrated, different eIF5A mutants display a significant decrease in total cellular protein synthesis, and the polysome profiles showed an increase of polysomes compared with monosomes, consistent with a defect in translation elongation [6,19]. As the modification hypusine is essential for eIF5A activity [24], we examined whether the *dys1-1* mutant strain would also show these defects. As observed in Figure 3A, protein synthesis analysis of the *dys1-1* mutant revealed a 50% decrease in [³H]leucine incorporation in total cellular protein. Moreover, the polysome profile analysis of the *dys1-1* mutant demonstrated a significant increase in the polysome to monosome (P/M) ratio (Figure 3B, upper panels; Supplementary Figure S4). These results are consistent with defects in translation elongation and support the idea that eIF5A plays a role in this step of protein synthesis. These findings reveal that the reduced levels of hypusine formation in the *dys1-1* mutant results in translation elongation defects similar to those observed for eIF5A mutants [6,17,19,26].

We also investigated the association of eIF5A with ribosomes purified from the fractionation of the polysome profiles of wild type and *dys1-1* mutant strains. Although no decrease in total eIF5A levels was observed in the *dys1-1* mutant (Figure 2B), a significantly reduced amount of eIF5A was associated with polysomal fractions in this mutant (Figure 3B and 3C). This observation is consistent with our previous data showing that the mutant eIF5A^{K51R}, which is defective for hypusine modification, is significantly impaired for ribosome binding [17].

DYS1* and *TIF51A* genetically interacts with *ASC1* and eIF5A binding to translating ribosomes is enhanced in the absence of *Asc1

The overexpression of *PKC1* suppresses the temperature-sensitive phenotype of the *tif51A-1* mutant of eIF5A [5]; therefore, we determined whether the overexpression of *PKC1* also rescues the growth defects of the *dys1-1* mutant. However, neither the requirement for osmolarity support nor the temperature sensitivity of the *dys1-1* mutant was suppressed after the overexpression of *PKC1* (data not shown). We also determined whether the overexpression of inactive (K853R) or constitutively active (R398A) Pkc1 affects the growth of the *dys1-1* mutant. Interestingly, whereas both mutated forms of Pkc1 reduced the growth of the wild type strain (Figure 4A, upper panels), the inactive Pkc1 (K853R) form did not affect the *dys1-1* mutant (Figure 4A, lower panels).

Curiously, the *asc1Δ* mutant also exhibits a marked resistance to the overexpression of the inactive Pkc1 mutant (K853R) [29]. Asc1 is an ortholog of mammalian RACK1, a core component of the small (40S) ribosomal subunit that is also involved in Gpa2 signaling in response to glucose sensing as a G-protein β-subunit [30,31]. Because both eIF5A and Asc1 are directly associated with translation and genetically related to *PKC1*, we characterized the genetic interaction between eIF5A mutants or the *dys1-1* mutant with the *asc1Δ* mutant.

Notably, an intron of *ASC1* contains the gene *SNR24* encoding for the small nucleolar RNA (snoRNA) U24 [32], which is involved in the maturation of the large subunit rRNA [33]. To distinguish the genetic interactions with *ASC1* from those with *SNR24*, the genetic analysis was performed in a double *asc1Δ snr24Δ* haploid mutant strain complemented with *ASC1* (without *SNR24*), *SNR24* alone or the entire *ASC1* gene (*ASC1+SNR24*) (Supplementary Figure S1).

Although a clear synthetic lethality between the eIF5A mutants and the *asc1Δ* mutant was not observed (data not shown), the haploid strain harboring both *dys1-1* and *asc1Δ* alleles was not viable, suggesting synthetic lethality between these two genes (Figure 4B). This genetic interaction was specific to the absence of *ASC1* alone, as the strain without the *SNR24* gene did not exhibit a synthetic lethality with the *dys1-1* mutant. This synthetic lethality between *dys1-1* and *asc1Δ* suggests that wild type levels of hypusine-containing eIF5A in the cell are necessary to compensate for the absence of Asc1 function, and therefore both proteins might function at the translational level to ensure the correct expression of the genes associated with cell wall integrity.

We further examined whether the overexpression of *ASC1* was able to suppress the conditional growth phenotypes of the eIF5A and *dys1-1* mutants. However, no suppression was observed (Supplementary Figure S2). We also examined the effect of eIF5A (*TIF51A*) and *DYS1* overexpression in the *asc1Δ* mutant. As shown in Figure 4C, the overexpression of both *TIF51A* or *DYS1* was toxic in the *asc1Δ* mutant (lower panels), but had no effect on the growth of the wild type *ASC1* strain (upper panels). This toxic effect was reproducible and suggests that eIF5A and Asc1 act in a competitive manner to differentially regulate mRNA translation in the cell.

We also tested whether presence or absence of Asc1 in the cell influences eIF5A binding to ribosomes. As shown in Figure 5, quantification of eIF5A binding to ribosomes, relative to ribosomal protein L5 as a loading control, demonstrates an increase of eIF5A association with 80S and polysome fractions in the absence of Asc1. The increase in eIF5A binding to translating ribosomes is in agreement with the idea that there must be a balance between Asc1 and eIF5A in the control of protein synthesis.

In addition, to evaluate the biological effects of Asc1 and eIF5A/Dys1 in the cell, we examined the sensitivity of *asc1Δ* and *dys1-1* mutants to three compounds that affect cytoplasmic membrane and/or cell wall integrity: caffeine, a phosphodiesterase inhibitor that activates the Pkc1p-MAP kinase cell integrity pathway; tunicamycin, a general inhibitor of protein N-glycosylation; and caspofungin, an inhibitor of $\beta(1,3)$ -glucan synthase. The different genetic strain backgrounds significantly affected the sensitivity to some compounds, and the sensitivity analysis

using the *tif51A-1* mutant of eIF5A was not informative (data not shown). However, comparing *dys1-1*, *asc1Δ* and *pkc1Δ* with their respective wild type controls revealed that the *dys1-1* and the *asc1Δ* mutants were much less sensitive to all three compounds than the *pkc1Δ* mutant (Figure 6A and 6B). The *asc1Δ* mutant did not show any sensitivity to caspofungin.

These results demonstrate a broader sensitivity of the *pkc1Δ* mutant compared with the *dys1-1* and *asc1Δ* mutants, potentially reflecting a more direct role for Pkc1 in several pathways involved in cell wall maintenance, while Asc1 and the hypusine-containing eIF5A protein might impact the cell membrane and cell wall integrity in a more specific manner through the control of gene expression at the translational level.

Genetic interaction between *DYS1* and *ASC1* is dependent on Asc1 binding to the ribosome

The association of Asc1 with the 40S ribosomal subunit has been well established, and its association with the ribosome is required for translation-associated functions [34-36]. That is, the absence of Asc1 in the cell causes phenotypes associated with the process of protein synthesis, and *ASC1* point mutations generate Asc1 protein with reduced ribosome binding and also exhibit these phenotypes [34,35]. However, ribosome binding is not required for Asc1 function as a G-protein β -subunit in glucose sensing, as the mutant *asc1*^{R38D,K40E}, which shows reduced binding to the 40S subunit, is not defective in haploid invasive growth [34].

To confirm that the functional link between hypusine-containing eIF5A and Asc1 is associated with translation, we characterized the genetic interaction between the *dys1-1* mutant and the mutants *asc1*^{R38D,K40E} and *asc1*^{D109Y}, which generate Asc1 proteins defective in binding to the 40S ribosomal subunit [34,35]. As shown in Figure 7, *dys1-1* was synthetically lethal with both *asc1*^{R38D,K40E} and *asc1*^{D109Y} mutants, phenocopying the data of synthetic lethality observed between *dys1-1* and *asc1Δ* (Figure 4B). Unfortunately, there is no *ASC1* point mutant that specifically shows defects in the glucose-sensing pathway.

This result suggests that the functions of Asc1 associated with protein synthesis are necessary in the absence of wild type levels of hypusine-containing

eIF5A in the cell and further supports the idea that functions of Asc1 and eIF5A in mRNAs the translation are required for cell viability.

DISCUSSION

The functional characterization of the putative translation factor eIF5A has primarily been conducted in the model organism *S. cerevisiae* [37,38]. Although several conditional mutants of eIF5A have previously been isolated and used in different studies, no conditional mutant for the gene encoding the enzyme Dys1, which is responsible for deoxyhypusine formation in eIF5A, has been described so far. As hypusine modification is essential for the function and ribosome binding of eIF5A, the use of a conditional mutant of *DYS1* might provide insight into the aspects specifically associated with the loss of the hypusine residue in eIF5A, instead of using the depletion of eIF5A in the cell. Herein, we describe the generation of a conditional *dys1-1* mutant to further characterize the role of eIF5A and the hypusine residue in the maintenance of cell integrity.

The *dys1-1* mutant shows a marked reduction of Dys1 protein levels and a consequent reduction of hypusine-containing eIF5A. Therefore, *dys1-1* is an interesting mutant to study the function of the hypusine residue in eIF5A and compare the effects of hypusine depletion versus total eIF5A depletion in the cell. Although eIF5A is an abundant protein, our data suggest that hypusine content less than half of that of wild type (~40%) in the *dys1-1* mutant is not sufficient to promote protein synthesis optimally and, therefore, results in severe growth defects. On the other hand, it could be suggested that non-hyposinated eIF5A has a deleterious effect on protein synthesis. However, the non-hyposinatable eIF5A^{K51R} protein does not bind to the translational machinery or any other proteins in general [17,39] and, hence, could not compete with hypusine-containing eIF5A. Also, overexpression of the eIF5A^{K51R} mutant had no deleterious effect on growth of a wild type yeast strain (Supplementary Figure S3). In addition, the conditional mutant eIF5A^{K56A}, which shows a reduced content of hypusinated eIF5A to approximately 60% of that of the wild type, also shows a growth defect already at the permissive temperature [26].

In addition to exhibiting defects associated with protein synthesis and translation machinery, the *dys1-1* mutant showed complete dependence on an osmotic stabilizer (1 M sorbitol) for growth, which is a well-known phenotype for mutants of the Pkc1 cell wall integrity pathway, such as the *pkc1Δ* mutant [27]. A similar phenotype has also been observed for temperature-sensitive eIF5A mutants,

which are suppressed using an osmotic stabilizer at the restrictive temperature [5,26]. Nevertheless, while the *pkc1Δ* mutant requires an osmotic stabilizer due to lysis of a large fraction of cells in liquid culture (approximately 80%) and exhibits hypersensitivity to zymolyase treatment, the *dys1-1* mutant shows only a modest amount of cell lysis in the absence of osmotic stabilizer (less than 20%) and a minor sensitivity to zymolyase treatment compared with the wild type control. These results suggest that cell lysis does not influence the severe growth defect phenotype of the *dys1-1* mutant, even in the presence of the osmotic stabilizer. Therefore, we suggest that, although eIF5A is functionally associated with Pkc1 signaling [5], the consequence of depleting the hypusine modification in eIF5A does not completely mimic the lack of Pkc1 function in the cell.

We also show that the *dys1-1* mutant is resistant to the toxic effects of the overexpression of the inactive Pkc1^{K853R} mutant, which is consistent with a previous result obtained for the *tif51A-1* mutant [5]. This genetic interaction further supports the hypothesis that eIF5A and Pkc1 function in different cellular pathways to maintain cell integrity. Because the *asc1Δ* mutant also showed resistance to the toxic effects of the overexpression of the inactive Pkc1^{K853R} mutant [29], we analyzed the functional correlation between eIF5A, Dys1 and Asc1. Interestingly, both eIF5A and Asc1 have previously been associated with the translation of specific mRNAs necessary for correct bud formation during cell cycle progression or bud site localization, respectively [29,40].

The synthetic genetic interaction revealed between the *dys1-1* and *asc1Δ* mutants suggest that these factors are functionally linked. Moreover, the overexpression of either *TIF51A* or *DYS1* causes cell toxicity in the absence of *ASC1* and eIF5A binding to the translating ribosomes is enhanced in the absence of Asc1. Taken together, these genetic interactions suggest that a precise balance between hypusine-containing eIF5A and Asc1 is necessary for the correct expression of cell integrity-related genes at the translational level. In addition, *dys1-1* and *asc1Δ* mutants tend to show a similar pattern of sensitivity to compounds that interfere with cell integrity and are less sensitive than the *pkc1Δ* mutant. These results further support a closer functional link between eIF5A and Asc1 compared with Pkc1. Furthermore, the genetic interaction between eIF5A/Dys1 and Asc1 is associated

with the ability of Asc1 to bind to the 40S ribosomal subunit, confirming that these proteins are associated through their respective functions in translation.

The increased eIF5A binding to translating ribosomes in the absence of Asc1 may favor translation of a group of mRNAs different from those mRNAs recently demonstrated to be regulated by Asc1 [41]. The precise mechanism whereby eIF5A can differentially affect translation of specific mRNAs and which mRNAs are more dramatically influenced by eIF5A function in translation are currently being addressed in our laboratory and further efforts will be necessary to address these questions. Interestingly, the structural homologue of eIF5A in eubacteria, EF-P, has recently been demonstrated to affect membrane integrity, cell response to environmental stresses, virulence and motility [42-47]. Also, EF-P more drastically affects the translation of poly-proline tract-containing proteins [48,49]. However, the precise mRNAs that are translated less in the absence of EF-P to lead to the observed phenotypes are not yet determined. Whether eIF5A also affects translation of proteins harboring consecutive proline residues is also under investigation.

Finally, Asc1 has been implicated in the maintenance of cell wall integrity near bud sites [29], which likely occurs after bud emergence during the G1 phase of the cell cycle. Hypusine-containing eIF5A has also been implicated in cell cycle progression during G1 [40,50] for the positive control of the expression of cell integrity mRNAs, which might also occur in a cell cycle-related manner. The suggestion that eIF5A is more associated with Asc1 than to Pkc1 could explain the discrete cell lysis phenotype observed during the depletion of hypusine modification in eIF5A in the *dys1-1* mutant, and because Pkc1 is important for cell wall integrity during the entire cell cycle, Pkc1 mutants display a major cell lysis defect in the absence of an osmotic stabilizer.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmids and standard procedures

The yeast strains are listed in Table 1. The plasmids used in this study include pRS314 (*TRP1/CEN*), pRS316 (*URA3/CEN*), pRS426 (*URA3/2 μ*), pRS424 (*TRP1/2 μ*), pSV223 (Gal1 promoter - *PKC1/URA3/2 μ*), pSV224 (Gal1 promoter - *PKC1^{K853R}/URA3/2 μ*), pSV225 (Gal1 promoter - *PKC1^{R398A}/URA3/2 μ*) and the plasmids listed in Table 1. The procedures for cell growth and genetic manipulations were performed according to standard protocols [51].

Isolation of conditional *DYS1* mutants

The *DYS1* mutants were generated using site-directed mutagenesis in which a plasmid vector (pRS314) containing *DYS1* from the W3O3 wild type strain was used as a template. To generate the mutations, site-directed mutagenesis was performed on selected conserved residues in Dys1 using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The presence of the specific mutations was confirmed through DNA sequencing. The plasmid constructs containing different mutated *DYS1* alleles were introduced into the SVL452 strain and plated onto SC media supplemented with 5-fluoroorotic acid (5-FOA) to negatively select cells that did not contain the *URA3* plasmid (plasmid shuffle). The resulting Dys1 mutant strains, which complemented the absence of wild type allele, did not exhibit a temperature-sensitive phenotype. Subsequently, the mutated alleles that did not complement the *dys1 Δ* strain were reintroduced into the SVL452 strain and plasmid shuffle was performed in the presence of an osmotic stabilizer (1 M sorbitol), as sorbitol suppresses the thermosensitivity of eIF5A mutants [5].

Western blot analysis

To determine specific protein levels in the strains used in this study, the cells were grown to mid-log phase under permissive conditions and subsequently lysed in protein extraction buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5; 2 mM dithiothreitol; 2 mM EDTA and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of pepstatin, leupeptin, aprotinin and chymostatin). Total protein was resolved using SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The proteins of interest

were detected through immunoblotting with specific antibodies using a chemiluminescence detection system.

***In vivo* hypusine synthesis**

Yeast strains carrying the wild type or *dys1-1* allele were grown to mid-log phase ($OD_{600nm}=0.5$) at 25°C in 5 mL of YPD medium. The cultures were diluted and [³H]spermidine (PerkinElmer, MA, USA) was added to the medium to a final concentration of 7 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cultures were subsequently incubated at 25°C, grown to the log phase ($OD_{600nm}=1.0$), harvested at 4°C and frozen at -80°C. The yeast extracts containing radiolabeled eIF5A were subjected to eIF5A immunoprecipitation, as previously described [52]. The cell pellet was resuspended and subjected to SDS-PAGE analysis. The polyacrylamide gel was stained with Coomassie Blue and total eIF5A was observed. To analyze the levels hypusine-containing eIF5A, the polyacrylamide gel was incubated with Amplify (Amersham Bioscience), dried and exposed to an autoradiography film. The quantification was performed using the Image Scanner III and Image Quant TL software (GE Healthcare Life Sciences) and the data were expressed as the percentage relative to the wild type (100%).

Protein synthesis assay

Yeast strains carrying the wild type or *dys1-1* allele were grown to mid-log phase ($OD_{600nm}=0.5$) at 25°C in 10 mL of YPD medium. [³H]leucine (PerkinElmer, MA, USA) was added to the medium to a final concentration of 2 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cultures were subsequently incubated at 25°C, and 1.5 mL aliquots from the cultures were collected at 1, 2 and 3 h after the addition of [³H]leucine, harvested at 4°C and frozen at -80°C. All frozen cell pellets were resuspended in 15% cold trichloroacetic acid solution and incubated on ice for 15 min. The samples were heated at 72°C for 30 min and subsequently incubated on ice for 15 min. Trichloroacetic acid precipitates were collected using centrifugation (15,000 *g*, 4°C, 10 min) and washed four times with 10% trichloroacetic acid to remove free [³H]leucine. The final washed pellets were resuspended in 100 μL of 0.2 M NaOH, and 50 μL aliquots were used to determine the radioactivity incorporated during protein synthesis in a Beckman Scintillation Counter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The total protein concentration was determined using the BCA protein assay (Thermo Scientific, IL,

USA), with 5 μL aliquots of each sample. The amount of total protein synthesis was calculated for each sample as c.p.m. μg^{-1} total cell protein.

Polysome profiling using formaldehyde

The cells from the 100 mL cultures were grown to mid-log phase ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6$) and cross-linked with 1% formaldehyde for 1 h in an ice bath. The extracts were used for each sucrose gradient. Briefly, 15 $A_{260\text{nm}}$ units of cell lysates were layered onto 10-50% sucrose gradients and centrifuged for 3 h at 39,000 rpm at 4°C in a Beckman SW41-Ti rotor. The gradients were subsequently fractionated through upward displacement with 60% (w/v) sucrose using a gradient fractionator connected to a Control Unit UV-1 monitor (Amersham Pharmacia Biotech) for the continuous measurement of the absorbance at 254 nm. The polysomal profile fractions were quantified using NIH Image J software. The polysome profile sucrose gradient fractions were collected, and the proteins were precipitated with acetone and subjected to western blot analysis. Quantification of eIF5A associated to ribosomes was performed as before [36]. Briefly, western blot signals of all the fractions quantified using ImageScanner III from GE Healthcare, Life Sciences and normalized to 60S ribosomal protein L5 levels, and the mean eIF5A/60S ratio was determined from at least three replicate experiments. The values obtained for the indicated yeast strains were then plotted in percentages relative to wild type.

Growth analysis

Solid medium: The strains of interest were grown at the permissive condition and equal amounts of the cultures were subsequently harvested. Ten-fold serial dilutions were plated onto specific media (supplemented or not with different compounds) and grown at the indicated temperatures for 3 or 4 days. **Liquid medium (growth curve):** The strains of interest were grown at the permissive condition to mid-log phase and subsequently diluted 10^7 cells.mL⁻¹. At this time, the cells were counted to monitor the time course of growth.

Synthetic lethality

The double knockouts were generated by standard crossing and sporulation methods. Spores of interest were selected in the presence of geneticin (*asc1 Δ ::kanMX4*) and absence of histidine and uracil (*dys1 Δ ::HIS3* harboring

DYS1/URA3/CEN). The strains were then transformed with *dys1-1/TRP1/CEN* or *DYS1/TRP1/CEN* plasmids and with other plasmids containing the genes indicated in the respective figures. After transformation, a plasmid shuffle [53], allowed exchange of the *DYS1/URA3/CEN* for the *dys1-1/TRP1/CEN* or *DYS1/TRP1/CEN* plasmids. Briefly, the plasmid shuffle assay was used to select the strains that, due to natural plasmid loss, do not harbor the *URA3* plasmid after growth in media containing uracil. The selection against the *URA3* plasmid is due to the toxic effect of 5-fluoro-orotic acid (5-FOA) in cells that harbor a *URA3* gene, since the 5-FOA is converted into a highly toxic metabolite (5-fluorouracil) by the *URA3* gene product.

Drug sensitivity assay

The indicated strains were grown and manipulated as described in Growth analysis for solid medium, plated in the presence of the indicated compounds and grown at 25°C for 3 days. The quantification of cell growth was performed by visual analysis of the plates, considering the growth of the strains in the serially diluted spots, normalized to their respective isogenic wild type strains, assuming growth of wild type strains as 100%. All the growth analyses were performed with 3 different colonies of each strain and repeated 3 times.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to S. R. V and C. F. Z. from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADC from Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. We also thank FAPESP for fellowships awarded to the authors (F. C. G and D. R). We also thank Anne McBride for critical reading of this manuscript and valuable suggestions.

REFERENCES

1. Acker MG, Kolitz SE, Mitchell SF, Nanda JS, Lorsch JR (2007) Reconstitution of yeast translation initiation. *Methods Enzymol* 430: 111-145.
2. Kang HA, Hershey JW (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 3934-3940.
3. Zuk D, Jacobson A (1998) A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *Embo Journal* 17: 2914-2925.
4. Park MH, Lee YB, Joe YA (1997) Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biological Signals* 6: 115-123.
5. Valentini SR, Casolari JM, Oliveira CC, Silver PA, McBride AE (2002) Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 160: 393-405.
6. Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF (2009) eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 785-790.
7. Peltz SW, Donahue JL, Jacobson A (1992) A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12: 5778-5784.
8. Ruhl M, Himmelspach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H, et al. (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* 123: 1309-1320.
9. Bevec D, Jaksche H, Oft M, Wohl T, Himmelspach M, et al. (1996) Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* 271: 1858-1860.
10. Rosorius O, Reichart B, Kratzer F, Heger P, Dabauvalle MC, et al. (1999) Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2369-2380.
11. Henderson BR, Percipalle P (1997) 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* 274: 693-707.
12. Shi XP, Yin KC, Waxman L (1997) 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* 6: 143-149.
13. Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Kraft R, Kostka S, et al. (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *Embo J* 19: 4362-4371.
14. Jao DL, Yu Chen K (2002) Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. *J Cell Biochem* 86: 590-600.
15. Henderson A, Hershey JW (2011) Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: 6415-6419.

16. Jao DLE, Chen KY (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of Cellular Biochemistry* 97: 583-598.
17. Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, et al. (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1358-1366.
18. Dias CA, Gregio AP, Rossi D, Galvão FC, Watanabe TF, et al. (2011) eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids*.
19. Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE (2009) Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459: 118-121.
20. Kim KK, Hung LW, Yokota H, Kim R, Kim SH (1998) Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10419-10424.
21. Peat TS, Newman J, Waldo GS, Berendzen J, Terwilliger TC (1998) Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* 6: 1207-1214.
22. Tong Y, Park I, Hong BS, Nedyalkova L, Tempel W, et al. (2009) Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* 75: 1040-1045.
23. Yao M, Ohsawa A, Kikukawa S, Tanaka I, Kimura M (2003) Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: A homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *Journal of Biochemistry* 133: 75-81.
24. Park MH (2006) The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139: 161-169.
25. Thompson GM, Cano VSP, Valentini SR (2003) Mapping eIF5A binding sites for *Dys1* and *Lia1*: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *Febs Letters* 555: 464-468.
26. Dias CA, Cano VS, Rangel SM, Apponi LH, Frigieri MC, et al. (2008) 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.
27. Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189: 1145-1175.
28. Krause SA, Gray JV (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12: 588-593.
29. Melamed D, Bar-Ziv L, Truzman Y, Arava Y (2010) Asc1 supports cell-wall integrity near bud sites by a Pkc1 independent mechanism. *PLoS One* 5: e11389.
30. Gerbasi VR, Weaver CM, Hill S, Friedman DB, Link AJ (2004) Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol* 24: 8276-8287.

31. Zeller CE, Parnell SC, Dohlman HG (2007) The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* 282: 25168-25176.
32. Chantrel Y, Gaisne M, Lions C, Verdière J (1998) The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics* 148: 559-569.
33. Kiss-László Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85: 1077-1088.
34. Coyle SM, Gilbert WV, Doudna JA (2009) Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* 29: 1626-1634.
35. Kuroha K, Akamatsu M, Dimitrova L, Ito T, Kato Y, et al. (2010) Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11: 956-961.
36. Kouba T, Rutkai E, Karásková M, Valášek L (2012) The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res* 40: 2683-2699.
37. Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38: 491-500.
38. Dever TE, Green R (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
39. Jao DL, Chen KY (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97: 583-598.
40. Zanelli CF, Valentini SR (2005) Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 171: 1571-1581.
41. Rachfall N, Schmitt K, Bandau S, Smolinski N, Ehrenreich A, et al. (2013) RACK1/Asc1p, a Ribosomal Node in Cellular Signaling. *Mol Cell Proteomics* 12: 87-105.
42. Bearson SM, Bearson BL, Brunelle BW, Sharma VK, Lee IS (2011) A mutation in the *poxA* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium alters protein production, elevates susceptibility to environmental challenges, and decreases swine colonization. *Foodborne Pathog Dis* 8: 725-732.
43. Kaniga K, Compton MS, Curtiss R, Sundaram P (1998) Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* 66: 5599-5606.
44. Navarre WW, Zou SB, Roy H, Xie JL, Savchenko A, et al. (2010) PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39: 209-221.
45. Peng WT, Banta LM, Charles TC, Nester EW (2001) The *chvH* locus of *Agrobacterium* encodes a homologue of an elongation factor involved in protein synthesis. *J Bacteriol* 183: 36-45.

46. Zou SB, Roy H, Ibba M, Navarre WW (2011) Elongation factor P mediates a novel post-transcriptional regulatory pathway critical for bacterial virulence. *Virulence* 2: 147-151.
47. Zou SB, Hersch SJ, Roy H, Wiggers JB, Leung AS, et al. (2012) Loss of elongation factor P disrupts bacterial outer membrane integrity. *J Bacteriol* 194: 413-425.
48. Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, et al. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339: 82-85.
49. Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, et al. (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339: 85-88.
50. Yu L, Peña Castillo L, Mnaimneh S, Hughes TR, Brown GW (2006) A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Mol Biol Cell* 17: 4736-4747.
51. Guthrie C, Fink GRE (1991) *Guide to Yeast Genetics*. Academic Press, New York, NY.
52. Kang HA, Schwelberger HG, Hershey JW (1993) Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 14750-14756.
53. Lorsh J (2007). *Methods in enzymology*. In: Bumjun Lee, Tsuyoshi Udagawa, Chingakham Ranjit Singh, and Katsura Asano. *Yeast Phenotypic Assays on Translational Control*. pp 105-137

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The *dys1-1* mutant shows a severe growth defect that is not associated with cell lysis. (A) Serial dilutions of the wild type and *dys1-1* mutant strains were plated onto YPD medium in the presence or absence of 1 M sorbitol at the indicated temperatures. (B) Growth curves of the wild type and *dys1-1* mutant strains. The strains were grown at 25°C in YPD medium containing 1 M sorbitol, and the cell numbers were counted to monitor the 16- h growth rate. (C) The cells were grown as in Figure 1B, to mid-log phase, treated with methylene blue and counted to analyze the cell lysis. The quantification is shown relative to the wild type (100%). (D) Sensitivity to zymolyase. The cells were grown as in Figure 1C and treated with zymolyase. The turbidity was measured at the indicated time points after the cells were treated with SDS.

Figure 2. The *dys1-1* mutant reveals a drastic reduction in Dys1 protein levels resulting in a reduction in hypusine-containing eIF5A. (A) Determination of mutant Dys1 protein levels. Wild type and *dys1-1* mutant strains were grown to mid-log phase at the permissive temperature in YPD medium containing 1 M sorbitol. The cells were lysed and 10 µg of total protein were blotted with the indicated antibodies. Samples were probed for eEF2 as a loading control. (B) Detection of hypusine-containing eIF5A of wild type and *dys1-1* mutant strains. Total eIF5A was immunoprecipitated and subjected to SDS-PAGE. Hypusine-containing eIF5A was revealed by autoradiography. (C) Quantification of relative hypusination levels after analysis of hypusine-containing versus total eIF5A, comparing the *dys1-1* mutant with the wild type (*DYS1*) and expressed the quantification as percent of wild type.

Figure 3. The reduction in hypusine formation in *dys1-1* mutant results in a reduction in total protein synthesis, and the polysome profile is characteristic of translation elongation defects. (A) The indicated strains were grown to mid-log phase, as in Figure 1B and radiolabeled [³H]leucine was added to the medium. The incorporation of [³H]leucine into total proteins was measured as described in the Materials and Methods. (B) The whole cell extracts (WCE) of the indicated strains were fractionated through centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans

(OD_{254nm}) of the gradients are shown. The areas of the 80S and polysome peaks were compared to calculate the P/M ratio. The polysome profile fractions and the WCE were collected and blotted against the indicated antibodies.

Figure 4. Dys1 and eIF5A genetically interact with Pkc1 and Asc1. (A) The wild type and mutant strains harboring wild type, inactive or constitutively active forms of Pkc1 protein under a galactose-inducible promoter were plated onto SC-ura medium containing 1 M sorbitol plus glucose (growth control) and plus galactose (inducible condition) and grown at 25°C for 3 days. (B) The indicated strains were plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle. (C) The indicated strains harboring the empty vector, *TIF51A* or *DYS1* high-copy plasmids (2μ) were grown at the permissive and restrictive conditions for 3 days.

Figure 5. The Dys1, Asc1 and Pkc1 mutants showed a distinguished sensitivity to compounds affecting cytoplasmic membrane and cell wall integrity. (A) The strains were plated onto medium supplemented with the indicated drugs and grown at 25°C for 3 days. (B) The growth was measured relative to each respective isogenic wild type strain (100%).

Figure 6. Genetic interaction between Dys1 and Asc1 is related to Asc1 binding to the 40S ribosome subunit. The indicated strains were plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle.

Figure 7. Dys1 and Asc1 genetically interact in a ribosome binding dependence. The indicated strains, harboring two Asc1 ribosome-binding defect mutants, were plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle.

Table 1. Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
SVL82 (W303)	<i>MAT_a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ssd1-d</i>	Pamela Silver
SVL95	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his4 can1 pkc1::LEU2</i>	Anne McBride
SVL132	<i>MAT_α leu2 ura3 his3 tif51A::HIS3 [TIF51A/URA3/CEN - pSV138]</i>	Lab Collection
VZL272 (BY4741)	<i>MAT_a leu2 ura3 his3 met15</i>	Anita Corbett
SVL452	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	This study
SVL453	<i>MAT_α leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	This study
SVL613	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN - pSV520]</i>	This study
SVL 614	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1^{W75R,T118A,A147T}/TRP1/CEN - pSV730]</i>	This study
VZL1133	<i>MAT_a ura3 his3 leu2 met15 asc1::kanMX4</i>	Knockout Collection
VZL1134	<i>MAT_α ura3 his3 leu2 trp1 met15 asc1::kanMX4 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	This study
VZL1173 (EG123)	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his4 can1</i>	Arava Yoav
VZL1178	<i>MAT_α ura3 his3 trp1 leu2 met15 asc1::kanMX4 tif51A::HIS3 [TIF51A/URA3/CEN - pSV138]</i>	This study

Supplementary Material and Methods and Figure legends

Polysome profiling using cycloheximide

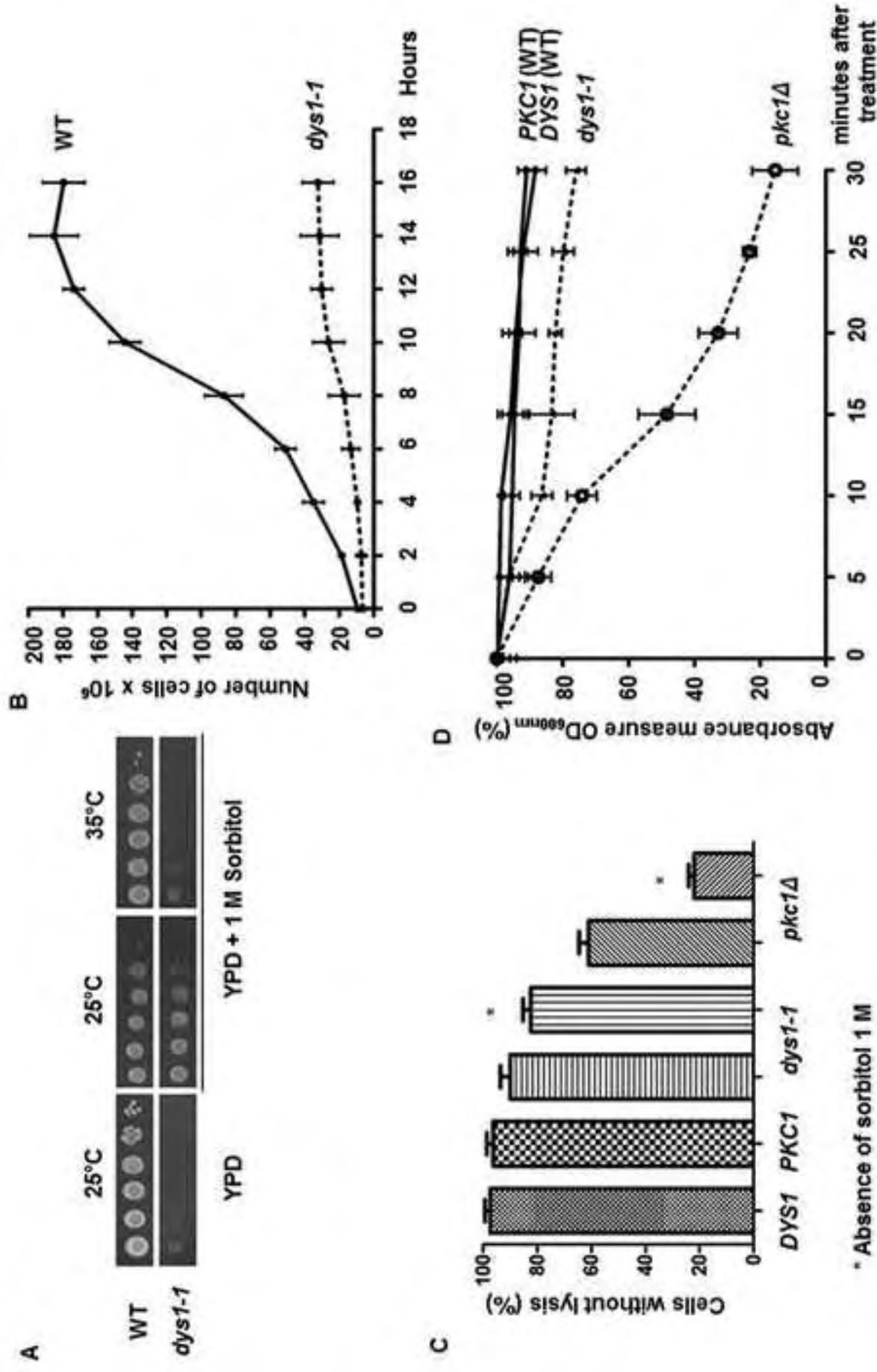
The cells from 200-mL cultures were grown to mid-log phase and treated with 10 µg/mL of cycloheximide for 5 min. The extracts were used for each sucrose gradient. Briefly, 20 A_{260nm} units of cell lysates were layered onto 7-47% sucrose gradients containing 10 µg/mL of cycloheximide and centrifuged for 3 h at 39,000 rpm at 4°C in a Beckman SW41-Ti rotor. The analysis of the gradients, collections of the fractions and quantification were performed as in the protocol for polysome profiling using crosslinking.

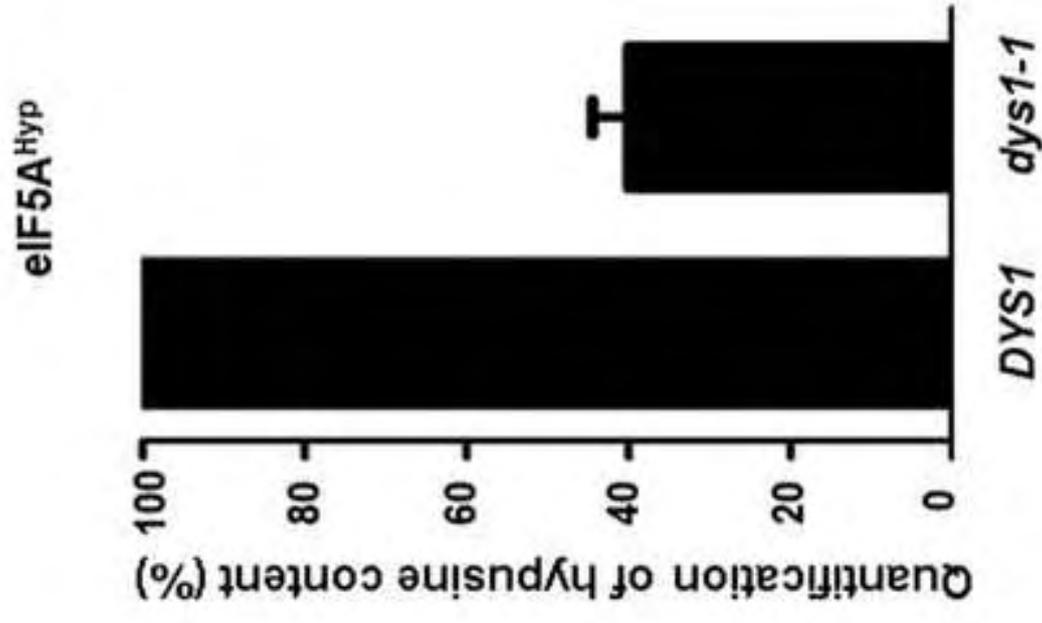
Supplementary Figure S1. The *dys1-1* mutant grows only in the presence of *ASC1*. The indicated strains harboring *DYS1*, *dys1-1* or empty vector were transformed with *ASC1* (without *SNR24*), *SNR24* alone, the entire *ASC1* gene (*ASC1* + *SNR24*) or the empty vector and plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle.

Supplementary Figure S2. High-copy *ASC1* did not suppress the *dys1-1* and *tif51A-1* growth defects. The *dys1-1* and *tif51A-1* mutants harboring *ASC1* in high-copy plasmid (2µ) were grown at permissive and restrictive conditions for 3 days.

Supplementary Figure S3. Overexpression of eIF5A^{K51R} does not affect growth of wild type cells. Serial dilutions of wild type SVL272 transformed with vector pYES2, pSV975 (pYES2-*TIF51A*) and pSV976 (pYES2-*tif51A*^{K51R}) were plated onto SC-ura supplemented with 2% glucose (growth control) or galactose (to induce heterologous eIF5A expression) and incubated at permissive temperature for 2 days.

Supplementary Figure S4. Polysome profiling of *dys1-1* mutant after treatment with cycloheximide reveals the same defect found following formaldehyde crosslinking. Whole cell extracts (WCE) of the indicated strains, after treatment with cycloheximide, were fractionated through centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254nm}) of the gradients are shown. The areas of the 80S and polysome peaks were compared to calculate the P/M ratio.





C

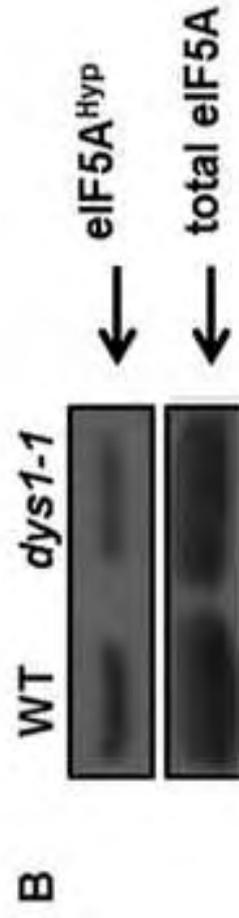
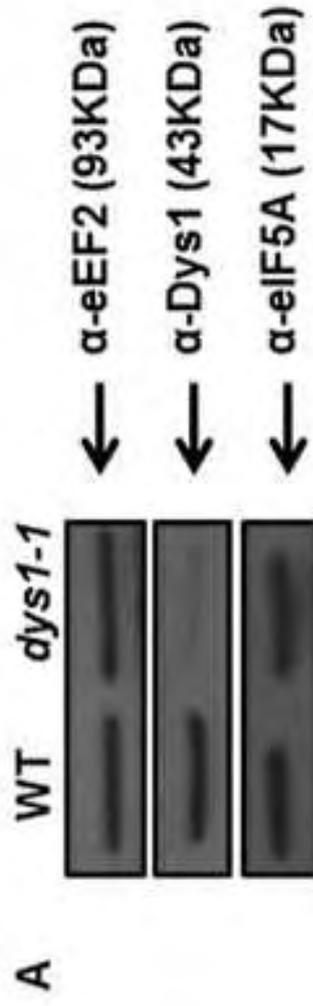


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

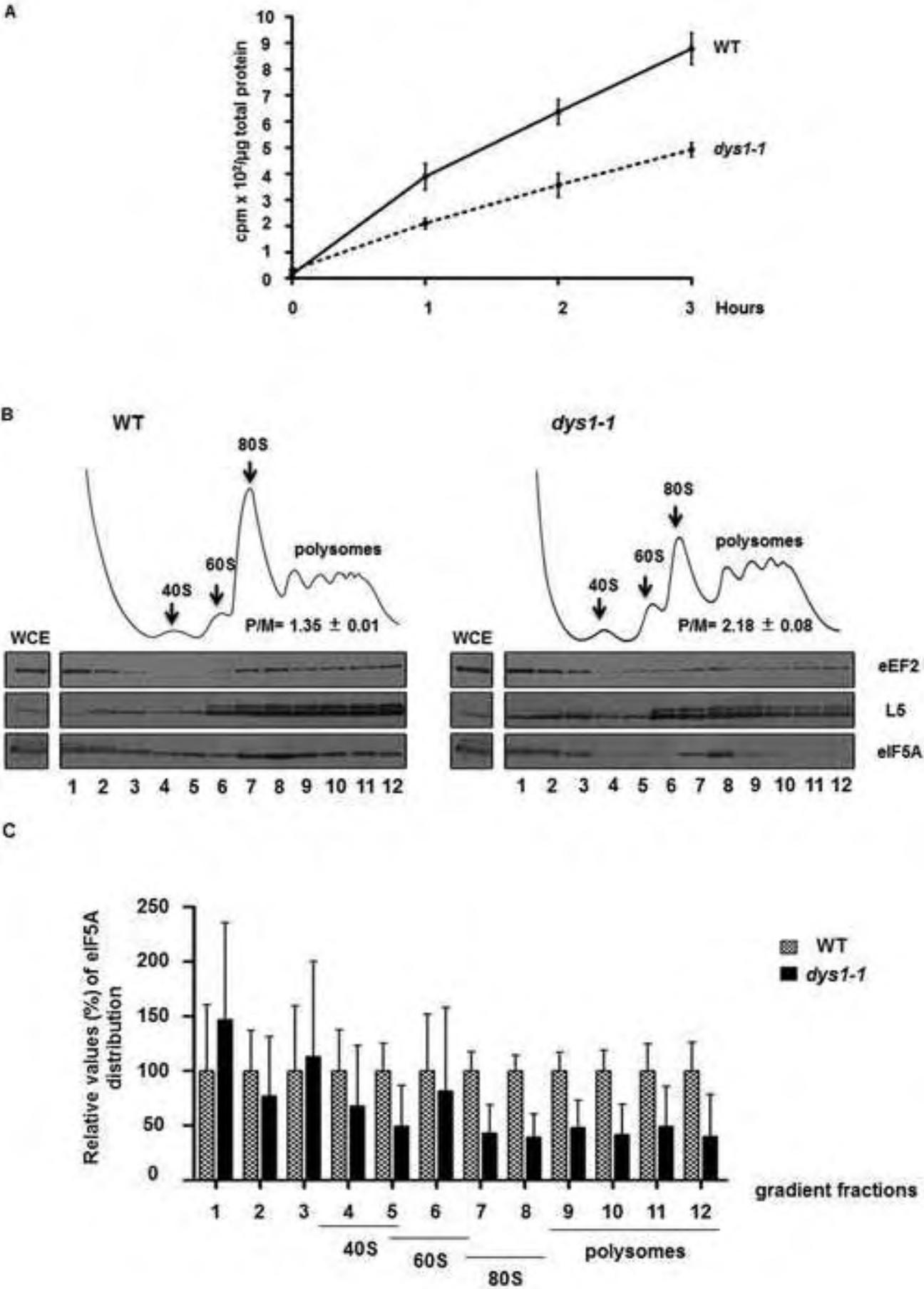


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

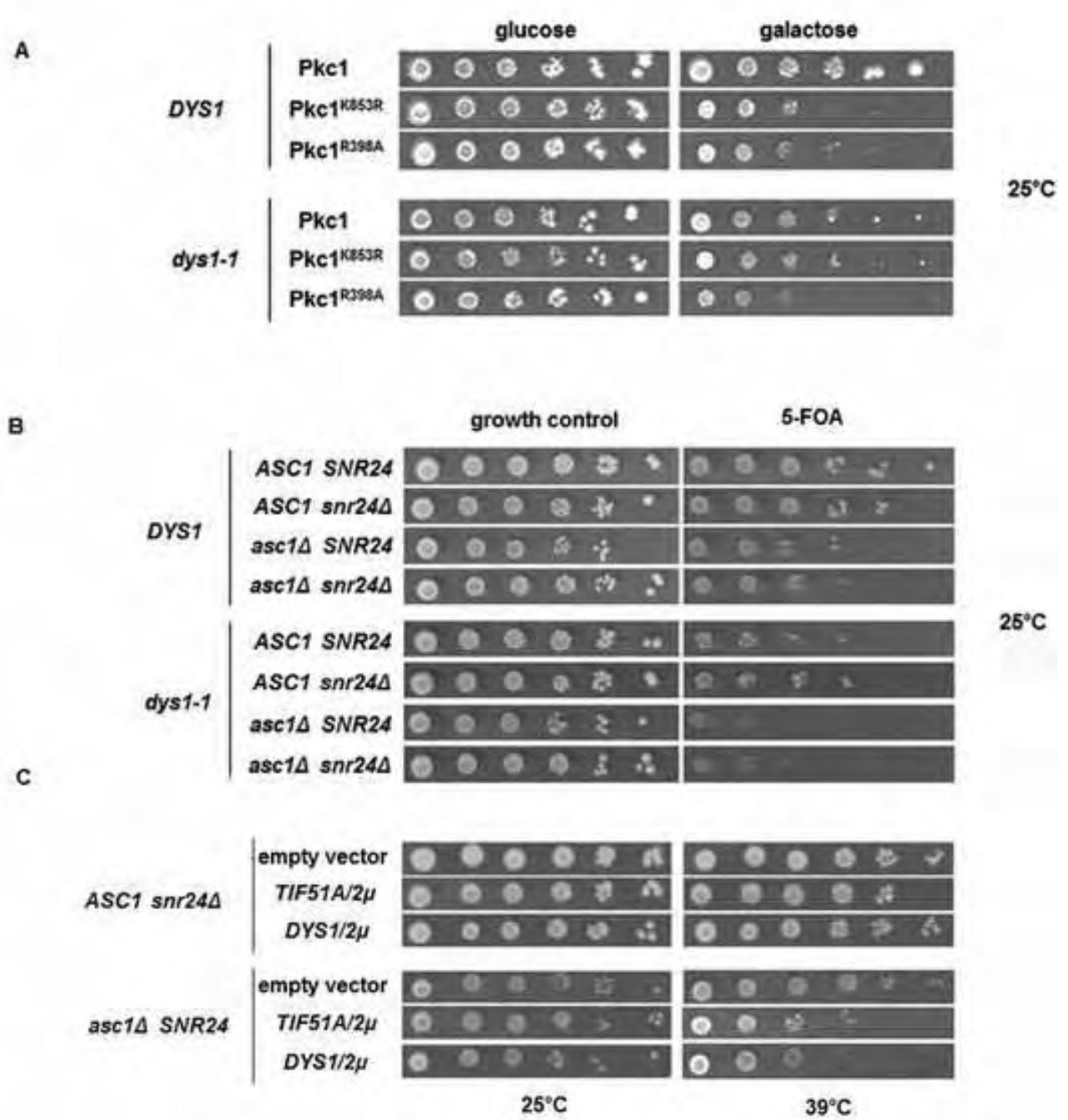
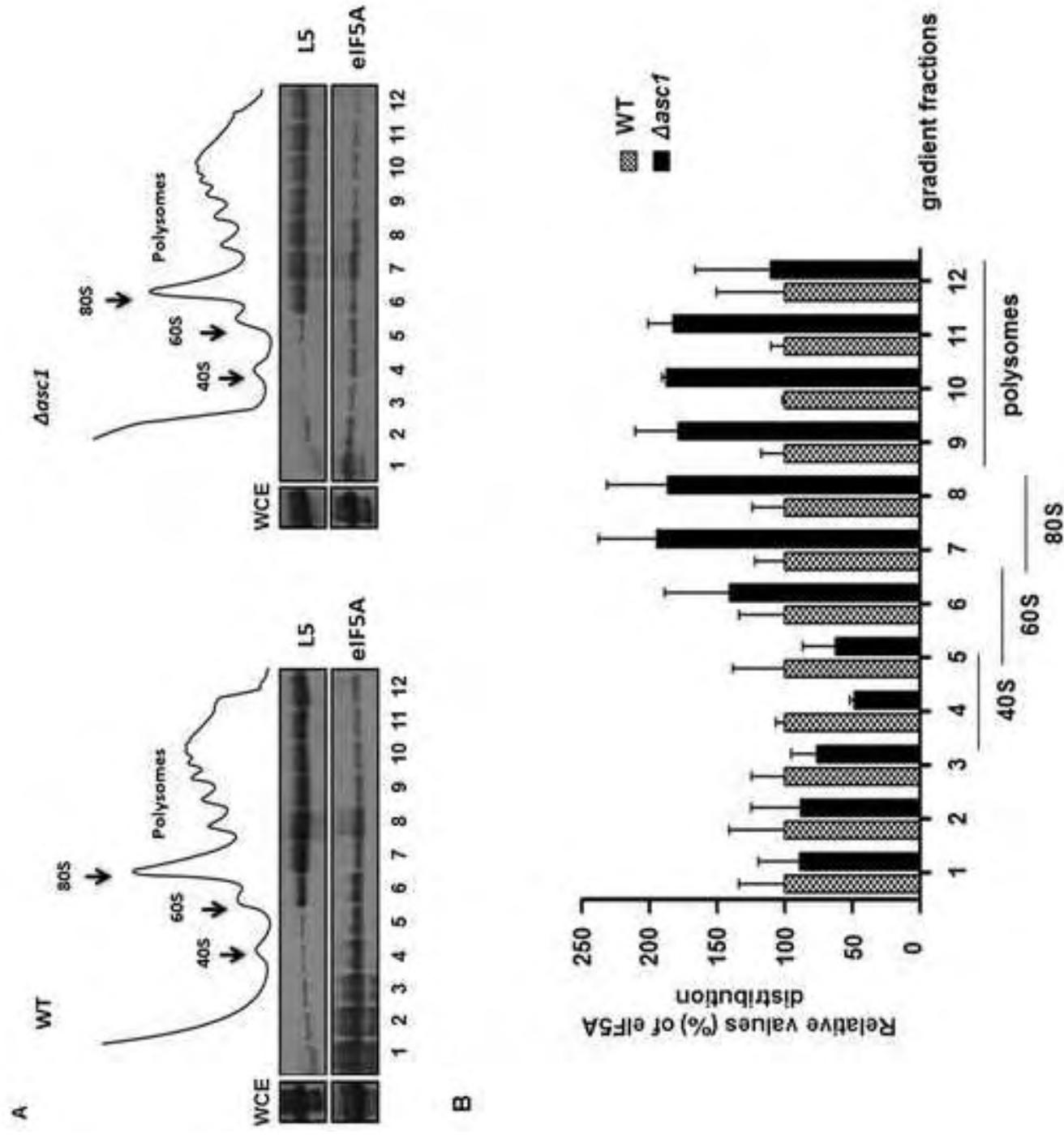


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)



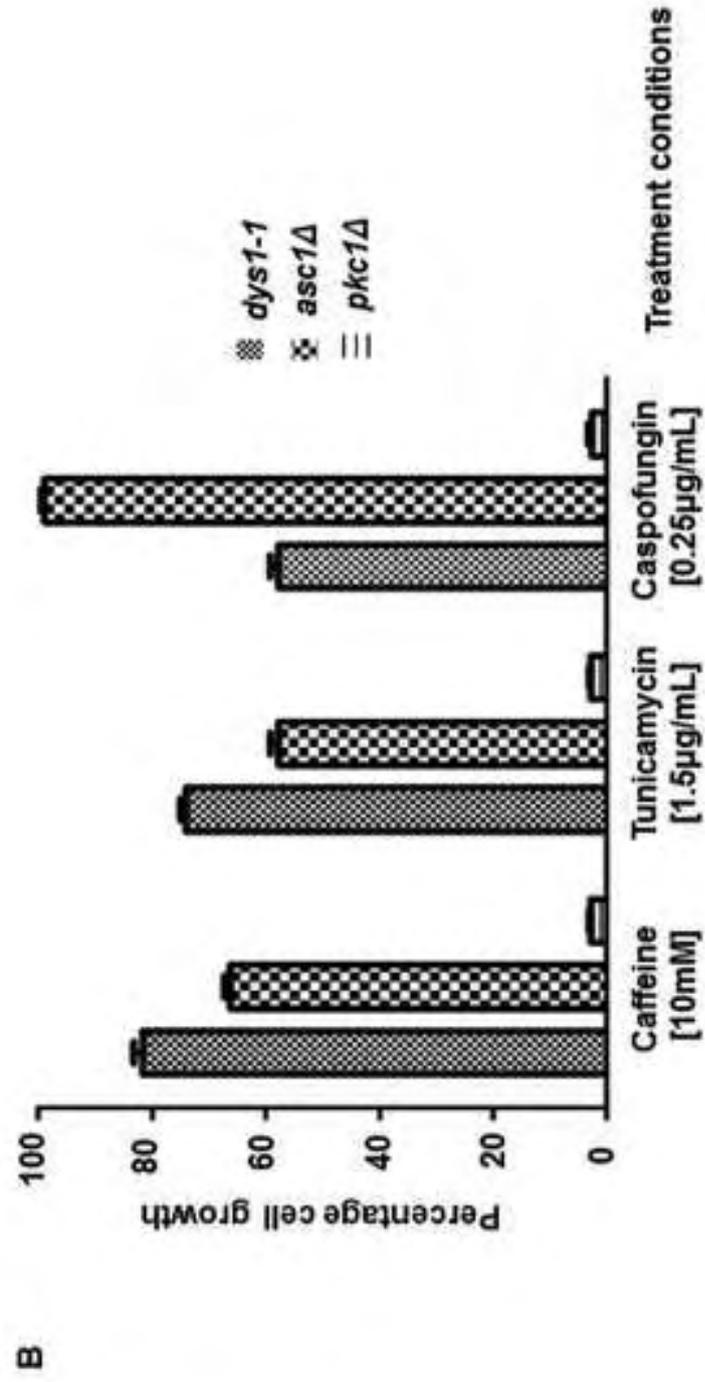
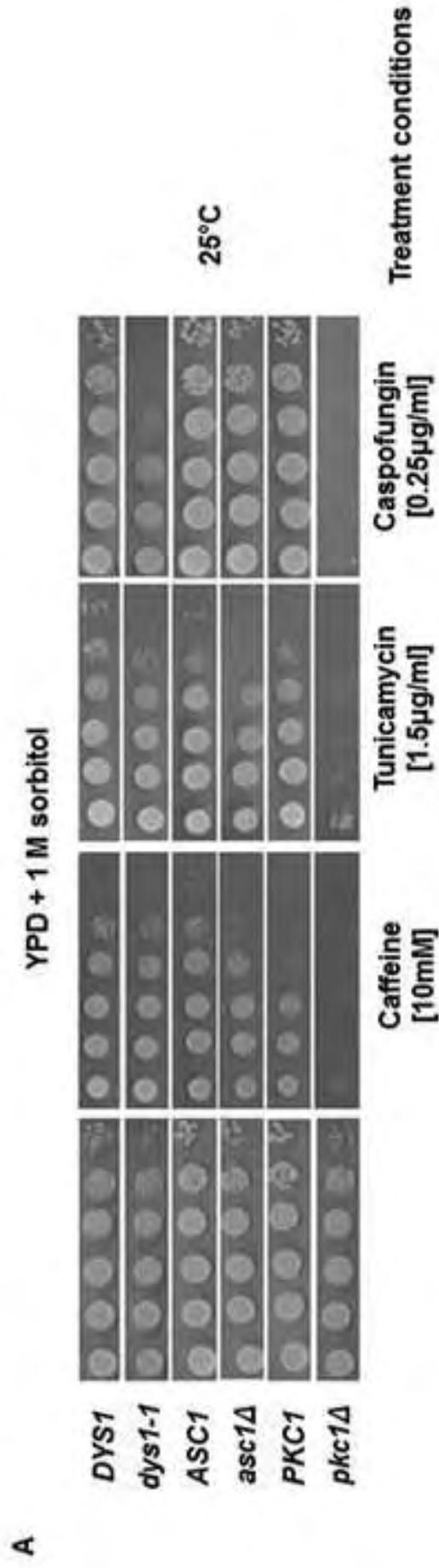


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

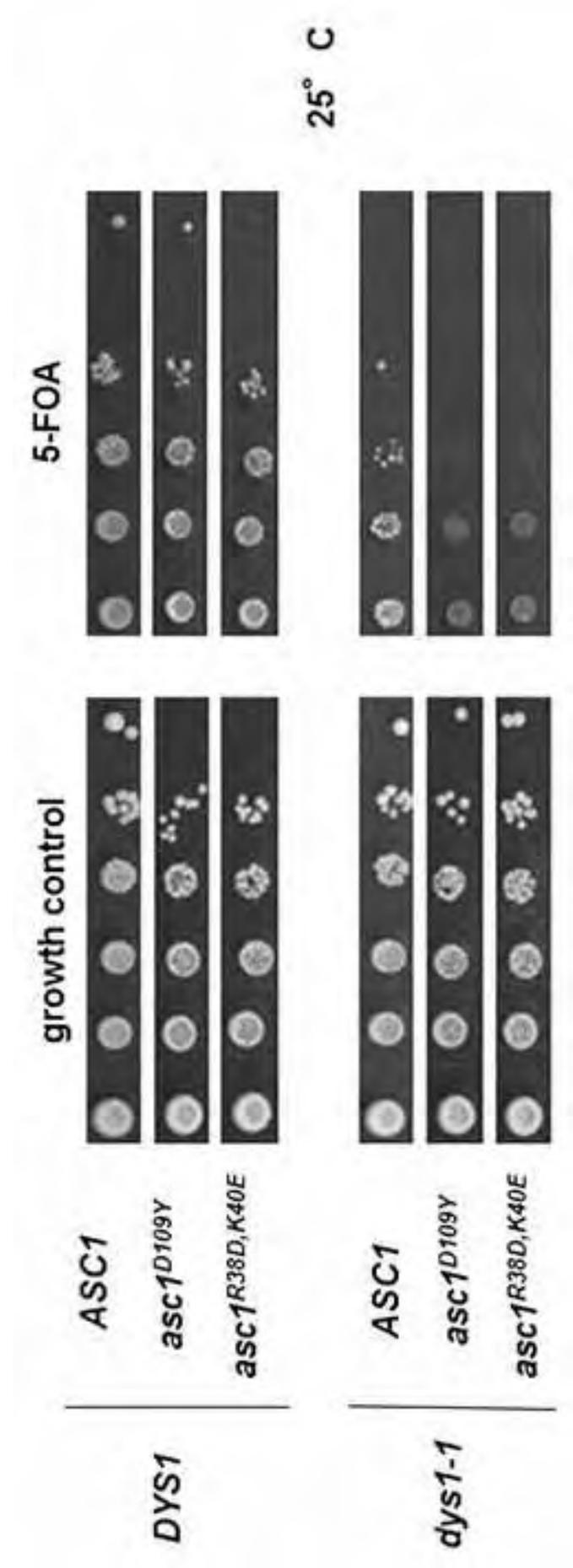


Figure S1

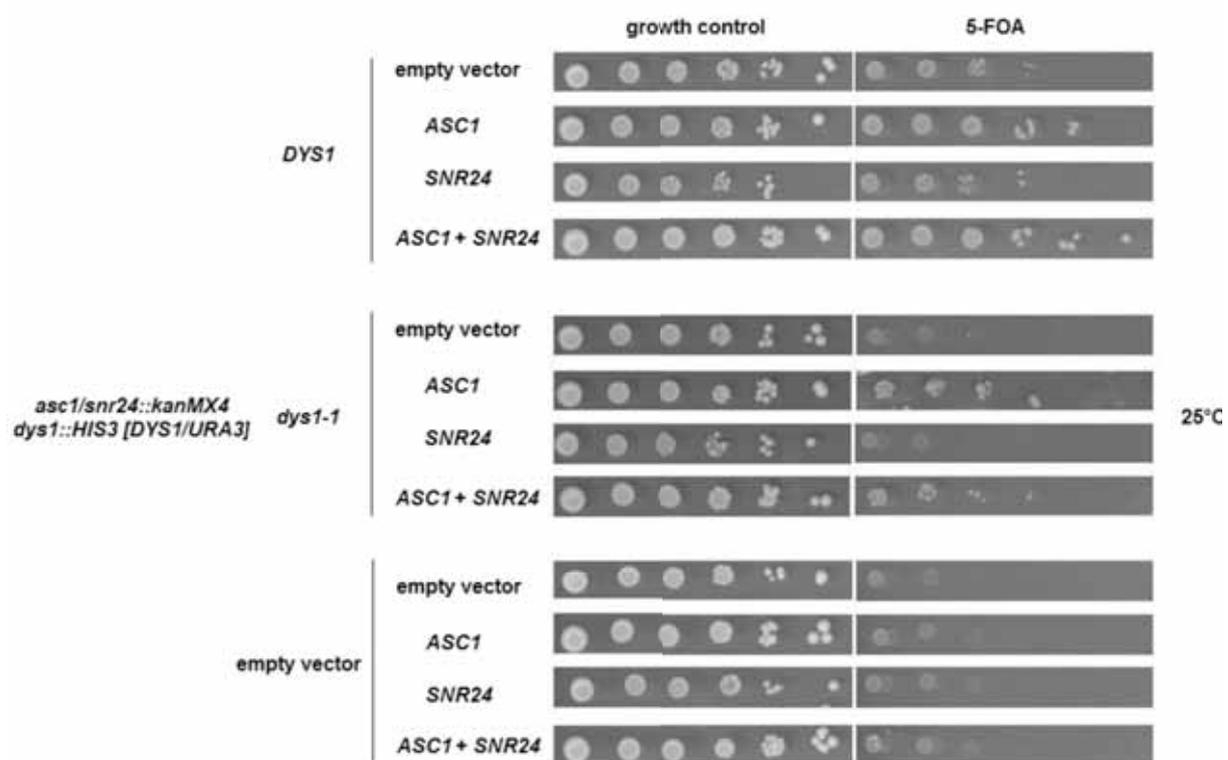


Figure S2

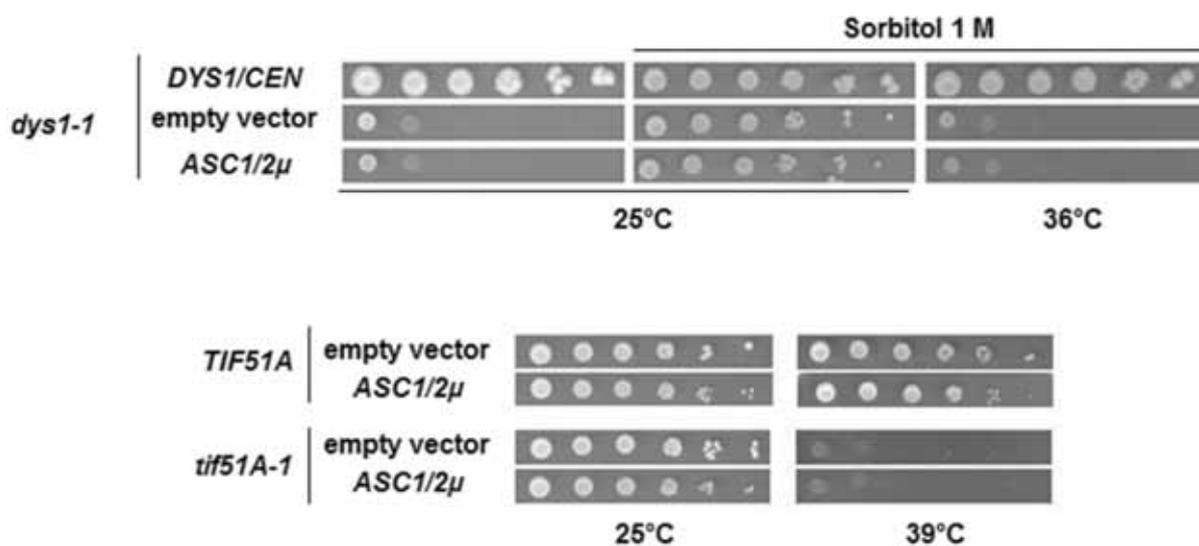


Figure S3

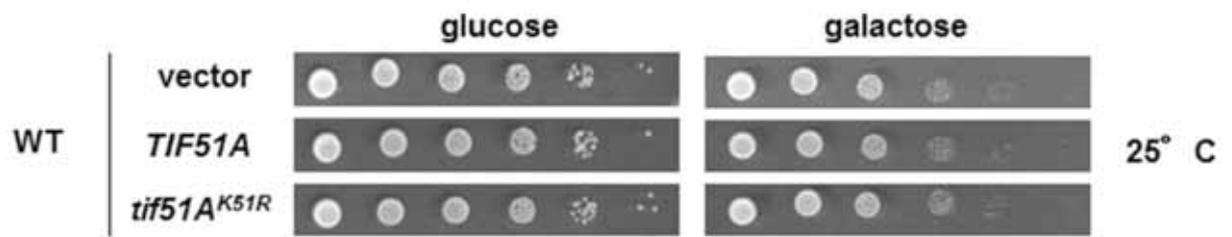
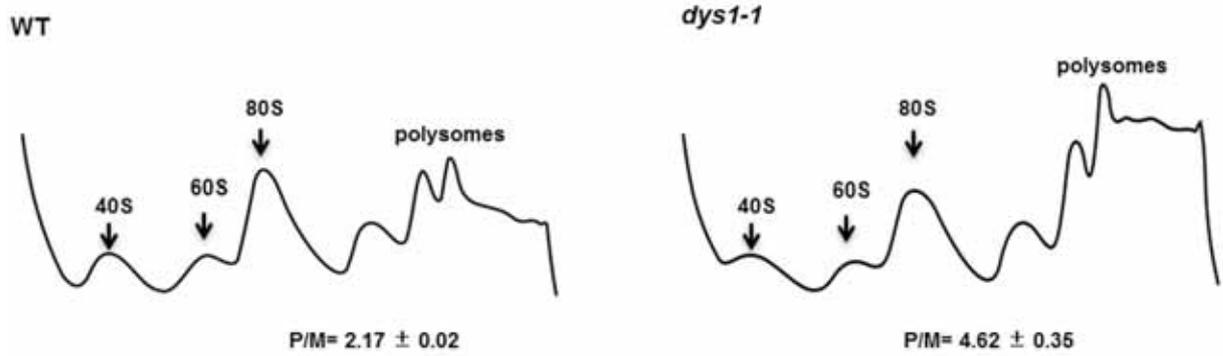


Figure S4



ANEXO II

Tabela 1. Resumo das proteínas identificadas na primeira análise DIGE do mutante *dys1-1*.

Spot ID	score ¹	nº PC ²	Proteína	DYS1/dys1-1	Descrição
836, 1073, 1369	-	-	Pgk1	1,88	3-phosphoglicerato kinase, principal enzima da glicólise e gliconeogênese
836	-	-	Cit1	1,72	Citrato sintase, proteína mitocondrial
1065, 1145	-	-	Cdc19	1,96	Piruvato kinase, envolvida na glicólise
1073	-	-	Iiv5	1,43	Acetohidroxiácido reductoisomerase, proteína mitocondrial
1145, 1150, 1171, 1389	-	-	Tdh1	1,9	Gliceraldeído-3-phosphate desidrogenase, envolvida na glicólise e gliconeogênese, localização citoplasmática e parede celular
1189, 1284	-	-	Tdh2	2,64	Homólogo de Tdh1
1189, 1284	-	-	Tdh3	2,64	Homólogo de Tdh1
1224	-	-	Pdb1	3,43	Subunidade da enzima piruvato desidrogenase mitocondrial
1237, 1389,	-	-	Ssa1	2,28	ATPase, envolvida no "folding" de proteínas e no transporte nuclear, membro da família HSP70
1256, 1237	-	-	Rhr2	2	DL-glicerol-3-phosphatase, envolvida na biosíntese de glicerol
1265	-	-	Ssb1	1,77	ATPase associada a ribossomo, envolvida no "folding" de cadeias peptídicas recém sintetizadas, membro da família HSP70
1265	-	-	Ssb2	1,77	Homólogo de Ssb1
1284, 1256	-	-	Asc1	2,19	Proteína G componente da subunidade 40S, suprime expressão de Gcn4p na ausência de aminoácido
1369	-	-	Adh1	2,5	Álcool desidrogenase atuante na via glicolítica
1541	-	-	Eno2	1,43	Enolase II, fosfopiruvato hidratase na glicólise e gliconeogênese
1572, 1597	-	-	Tsa1	1,62	Thioredoxina peroxidase, associa-se a moléculas de alto peso molecular para compor complexo chaperona

1. Score limite considerado na análise de cada proteína foi de 30

2. Número de peptídeos analisados por colisão no espectrômetro MALDI/ESI Q-Tof (Waters)

Tabela 2. Resumo das proteínas identificadas na segunda análise DIGE do mutante *dys1-1*.

Spot ID	score ¹	nº PC ²	Proteína	<i>DYS1/dys1-1</i>	Descrição
200, 198, 187	43	2	Sse1	2,1	ATPase, componente do complexo chaperona Hsp90, se ligando em proteínas "unfolded". Membro da família HSP70
236, 237, 239, 244, 248, 259, 242, 247, 241, 245, 240, 290	150 a 502	4 a 11	Ssa1	2,2	ATPase, envolvida no "folding" de proteínas e no transporte nuclear, membro da família HSP70
236, 237, 244, 248, 242, 247, 241, 245, 290, 298	104 a 156	2 a 5	Ssb1	2,2	ATPase associada a ribossomo, envolvida no "folding" de cadeias peptídicas recém sintetizadas, membro da família HSP70
244, 248, 247, 241, 245, 245	172 a 138	3 a 4	Ssb2	2,3	homólogo de Ssb1
298	177	2	Pdc1	1,84	Piruvato descarboxilase é a principal enzima da fermentação alcoólica
344	51	2	Tef1 (eEF1A)	1,72	Fator da elongação da tradução, orienta a ligação entre o tRNA aminoacilado e o ribossomo
315	37	1	Hxk2	1,89	Hexokinase que fosforila glicose no citoplasma
554	190	3	Tdh2	-1,14	Gliceraldeído-3-phosphato desidrogenase, envolvida na glicólise e gliconeogênese
664	122	2	Tpi1	-1.4	Triose phosphato isomerase, enzima envolvida na via glicolítica
1099	64	2	Rpl36A	-2.06	Proteína ribossomal de 60S
1099	469	4	Sui1 (eIF1)	-2.06	Fator de início de tradução, componente do complexo de reconhecimento de codon iniciador
259	49	2	Eno2	2,2	Posfopiruvato-hidratase, envolvida na glicólise e gliconeogênese

1. Score limite considerado na análise de cada proteína foi de 30

2. Número de peptídeos analisados por colisão no espectrômetro MALDI/ESI Q-ToF (Waters)

Tabela 3. Resumo das proteínas identificadas na terceira análise DIGE do mutante *dys1-1*.

Spot ID	score ¹	nº PC ²	MW (kDa)	pI	Proteína
1334	378	20	Rpp0	1.6	Proteína ribossomal P0, envolvida na ligação de fatores da elongação ao ribossomo
1901	290	13	Hmf1	-2.5	Proteína membro da família p14.5, ativa quando é direcionada para a mitocôndria e é induzida em condição de choque térmico
1346	189	15	Rpl5	1.8	Proteína ribossomal de 60S, envolvida na montagem da subunidade maior do ribossomo
1556	189	12	Paa1	-2.5	Poliamina acetil-transferase, envolvida na transcrição e replicação do DNA
1958, 1962, 2059	38 a 353	3 a 21	Rps21A	-4	Proteína ribossomal componente da subunidade 40S do ribossomo
1391	379	18	Rhr2	-3.4	Glicerol-3-fosfatase, envolvida na biossíntese de glicerol, induzida sob anaerobiose e estresse osmótico
1627, 1678	56 a 83	3 a 7	Rpl16A	2.5	Proteína ribossomal componente da subunidade 60S do ribossomo
2059	353	21	Rps21B	-4.1	Proteína ribossomal componente da subunidade 40S do ribossomo, idêntica à Rps21A
	53	21	Rps15	-4.1	Proteína ribossomal componente da subunidade 40S do ribossomo
1139	695	25	Eno2	2	Posfopiruvato-hidratase, envolvida na glicólise e gliconeogênese
	130	15	Pgk1	2	3-fosfoglicerato-quinase, proteína essencial envolvida na glicólise e gliconeogênese
1481, 1495, 1503	93 a 137	8 a 25	Tpi1	-3.5	Triose-fosfato-isomerase, enzima abundante da via glicolítica
	83	3	Rpl16B	3.1	Proteína ribossomal componente da subunidade 60S do ribossomo, similar à Rpl16A
2067	177	20	Trx2	-2.3	Tioredoxina, envolvida na proteção celular frente ao estresse oxidativo. Também age como co-fator de Tsa1, importante para o tráfego vesicular RE-Golgi
1277	894	27	Ado1	-1.6	Adenosina-quinase, requerida para a reciclagem de adenosina
1563	42	5	Cpr5	-2.5	Peptidil prolil cis-trans isomerase de retículo endoplasmático
1514	158	13	Hsp31	1.7	Chaperona
1678	33	3	Arf1	2.4	GTPase de superfamília Ras
1789	143	7	Pgi1	2,0	Isomerase da via glicolítica
1901	47	5	Cdc48	-2.5	ATPase de diversos processos celulares
1891	76	4	Zeo1	2	Proteína de membrana, envolvida na regulação da integridade celular via Pkc1

1. Score limite considerado na análise de cada proteína foi de 30

2. Número de peptídeos analisados por colisão no espectrômetro MALDI/ESI Q-Tof (Waters)

Tabela 4: Agrupamento dos genes identificados nas análises proteômicas por DIGE, de acordo com processos metabólicos e componente celular, após análise por ontologia genética

Processo	GO term	Frequency	Genome Frequency	Gene(s)
carbohydrate metabolic process	11 out of 36 genes, 30.6%	268 of 6333 genes, 4.2%	CDC19,PGK1,TPI1,HXK2,TDH3,ENO2,RHR2,TDH1,TDH2,PDC1,ADH1	
generation of precursor metabolites and energy	10 out of 36 genes, 27.8%	161 of 6333 genes, 2.5%	CDC19,PGK1,TPI1,HXK2,TDH3,ENO2,TDH1,TDH2,PDC1,ADH1	
cytoplasmic translation	10 out of 36 genes, 27.8%	172 of 6333 genes, 2.7%	SSA1,SSB1,RPL16A,RPS21B,RPS21A,RPP0,RPL16B,SSB2,RPS9A,RPL5	
rRNA processing	6 out of 36 genes, 16.7%	296 of 6333 genes, 4.7%	RPS9B,SSB1,RPS21B,RPS21A,SSB2,RPS9A	
protein folding	5 out of 36 genes, 13.9%	89 of 6333 genes, 1.4%	SSA1,SSB1,TSA1,SSB2,SSE1	
response to chemical stimulus	5 out of 36 genes, 13.9%	361 of 6333 genes, 5.7%	CDC48,HXK2,TRX2,TSA1,ASC1	
translational elongation	4 out of 36 genes, 11.1%	332 of 6333 genes, 5.2%	RPS9B,SSB1,RPP0,SSB2	
ribosomal small subunit biogenesis	4 out of 36 genes, 11.1%	126 of 6333 genes, 2%	RPS9B,RPS21B,RPS21A,RPS9A	
regulation of translation	4 out of 36 genes, 11.1%	89 of 6333 genes, 1.4%	RPS9B,SSB1,ASC1,SSB2	
mitotic cell cycle	3 out of 36 genes, 8.3%	300 of 6333 genes, 4.7%	CDC48,RAD61,CDC25	
cellular amino acid metabolic process	3 out of 36 genes, 8.3%	242 of 6333 genes, 3.8%	PDC1,ILV5,ADH1	
nuclear transport	3 out of 36 genes, 8.3%	165 of 6333 genes, 2.6%	SSA1,SSB1,SSB2	
response to starvation	3 out of 36 genes, 8.3%	86 of 6333 genes, 1.4%	CDC48,SSB1,SSB2	
membrane fusion	3 out of 36 genes, 8.3%	74 of 6333 genes, 1.2%	CDC48,TRX2,ENO2	
vacuole organization	2 out of 36 genes, 5.6%	69 of 6333 genes, 1.1%	TRX2,ENO2	
regulation of cell cycle	2 out of 36 genes, 5.6%	191 of 6333 genes, 3.0%	CDC25,TSA1	
chromosome segregation	2 out of 36 genes, 5.6%	132 of 6333 genes, 2.1%	CDC48,RAD61	
ribosome assembly	2 out of 36 genes, 5.6%	56 of 6333 genes, 0.9%	RPP0,RPL5	
mitochondrion organization	2 out of 36 genes, 5.6%	338 of 6333 genes, 5.3%	SSA1,ILV5	
cofactor metabolic process	2 out of 36 genes, 5.6%	132 of 6333 genes, 2.1%	PDB1,ADH1	
nucleobase-containing small molecule metabolic process	2 out of 36 genes, 5.6%	187 of 6333 genes, 3%	ADO1,ADH1	
organelle assembly	2 out of 36 genes, 5.6%	79 of 6333 genes, 1.2%	RPP0,RPL5	
response to oxidative stress	2 out of 36 genes, 5.6%	86 of 6333 genes, 1.4%	TRX2,TSA1	
organelle fission	2 out of 36 genes, 5.6%	130 of 6333 genes, 2.1%	CDC48,RAD61	
signaling	2 out of 36 genes, 5.6%	229 of 6333 genes, 3.6%	CDC25,ASC1	
ribosomal large subunit biogenesis	2 out of 36 genes, 5.6%	83 of 6333 genes, 1.3%	RPP0,RPL5	
ribosomal subunit export from nucleus	2 out of 36 genes, 5.6%	43 of 6333 genes, 0.7%	SSB1,SSB2	
cell wall organization or biogenesis	1 out of 36 genes, 2.8%	186 of 6333 genes, 2.9%	ZEO1	
cytoskeleton organization	1 out of 36 genes, 2.8%	220 of 6333 genes, 3.5%	CDC48	
translational initiation	1 out of 36 genes, 2.8%	58 of 6333 genes, 0.9%	SUI1	
regulation of organelle organization	1 out of 36 genes, 2.8%	151 of 6333 genes, 2.4%	ENO2	
carbohydrate transport	1 out of 36 genes, 2.8%	33 of 6333 genes, 0.5%	HXK2	
membrane invagination	1 out of 36 genes, 2.8%	43 of 6333 genes, 0.7%	CDC48	
Golgi vesicle transport	1 out of 36 genes, 2.8%	188 of 6333 genes, 3%	TRX2	

Componente	GO term	Frequency	Genome Frequency	Gene(s)
cytoplasm	39 out of 40 genes, 97.5%	3872 of 6333 genes, 61.1%	SSA1,CDC19,PGI1,PDB1,PGK1,CDC48,ARF1,SSB1,TPI1,PAA1,CPR5,HMF1,HXK2,TDH3,TRX2,ENO2,RHR2,RPL16A,TDH1,RPS21B,TDH2,ADO1,RPS21A,PDC1,RPP0,ILV5,TSA1,ASC1,RPL36A,RPL16B,SSB2,SUI1,CIT1,RPS15,ADH1,ZEO1,SSE1,RPL5,TEF1	
mitochondrion	15 out of 40 genes, 37.5%	1143 of 6333 genes, 18.0%	PGI1,PDB1,PGK1,CDC48,TPI1,HMF1,HXK2,TDH3,ENO2,TDH1,TDH2,ILV5,CIT1,ZEO1,TEF1	
membrane	14 out of 40 genes, 35%	1557 of 6333 genes, 24.6%	SSA1,CDC19,PGI1,PGK1,CDC48,SSB1,TPI1,TDH3,ENO2,TDH1,TDH2,SSB2,ADH1,ZEO1	
plasma membrane	13 out of 40 genes, 32.5%	372 of 6333 genes, 5.9%	SSA1,CDC19,PGI1,PGK1,SSB1,TPI1,TDH3,ENO2,TDH1,TDH2,SSB2,ADH1,ZEO1	
ribosome	10 out of 40 genes, 25%	354 of 6333 genes, 5.6%	RPL16A,RPS21B,RPS21A,RPP0,ASC1,RPL36A,RPL16B,RPS15,RPL5,TEF1	
cell wall	4 out of 40 genes, 10%	95 of 6333 genes, 1.5%	SSA1,TDH3,TDH1,TDH2	
mitochondrial envelope	3 out of 40 genes, 7.5%	352 of 6333 genes, 5.6%	CDC48,HMF1,ZEO1	
vacuole	3 out of 40 genes, 7.5%	240 of 6333 genes, 3.8%	SSA1,TRX2,ENO2	
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	1 out of 40 genes, 2.5%	108 of 6333 genes, 1.7%	ARF1	