UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FERNANDA MANAIA DEMARQUI

Efeito de eIF5A no Perfil Traducional em *Saccharomyces cerevisiae*

ARARAQUARA – SP

2020

FERNANDA MANAIA DEMARQUI

Efeito de eIF5A no Perfil Traducional em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

ARARAQUARA – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Demarqui, Fernanda Manaia
D372e Efeito de eIF5A no perfil traducional de *Saccharomyces cerevisiae* / Fernanda Manaia Demarqui. – Araraquara : [s.n.], 2020
71 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Proteínas - Síntese. 2. Enzimas. 3. Poliaminas. 4. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 5. Análise de microarranjo. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análise do Efeito de eIF5A no Perfil Traducional em Saccharomyces cerevisiae"

AUTORA: FERNANDA MANAIA DEMARQUI
ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. CAIO CESAR DE MELO FREIRE
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - São Carlos

Prof. Dr. FRANCIS DE MORAIS FRANCO NUNES
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 20 de fevereiro de 2020

Dados Curriculares

Nome: Fernanda Manaia Demarqui

e-mail: fmdemarqui@gmail.com

Nome em citações bibliográficas: Demarqui, F.M.

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos. Campus Ville 14800903 - Araraquara, SP – Brasil.

Formação acadêmica

Bacharel em biomedicina pela Universidade Paulista - UNIP em Araçatuba (Ano de conclusão: 2017)

Bolsas recebidas

Bolsa de Iniciação científica FAPESP no período de 07/2015 a 06/2016

Projeto: Avaliação dos mecanismos envolvidos na produção de MUC5A por células de linhagem epitelial de pulmão estimulada por histamina.

Bolsa de Mestrado CAPES no período de 02/2018 a 02/2020

Projeto: Efeito de eIF5A no perfil traducional de *Saccharomyces cerevisiae*

Participação em eventos científicos

48a. Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq.

Trabalhos apresentados em eventos

DEMARQUI, F. M.; Santoni, M. M.; ZANELLI, C. F. . LARGE-SCALE GENE EXPRESSION PROFILE TECHNIQUES IN ANALYZES OF TRANSLATIONAL PROFILE. 2019.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Carlos e Isabel Cristina, e minhas irmãs, Laís e Letícia, por serem meu alicerce e por sonharem meu sonho junto comigo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente meus pais pela oportunidade e apoio, mesmo nas horas que eu achava que não daria mais vocês acreditaram em mim e sempre me encorajaram. A confiança de vocês me fez chegar aqui.

À minha irmã Laís e meu cunhado João Henrique Araújo pelo suporte, pelos momentos de descontração e conversa e por entenderem minhas ausências. À minha irmã Letícia que mesmo tão longe se fez sempre tão presente, ouviu minhas explicações sem entender muita coisa e pelas tantas palavras. Ao meu afilhado João Lucas Demarqui Araújo que consegue recarregar minhas energias e me trazer paz como ninguém.

Ao meu orientador Cleslei Fernando Zanelli pela oportunidade de aprendizado e por todo conhecimento passado.

À Mariana Marchi Santoni Biasioli pelos ensinamentos científicos, culinários, ambientais e sobre a vida, pelas horas de conversa e discussão, pela companhia nos cursos e pela dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos Ana Carolina, Angélica, Bianca, Marco Aurélio, Maria Olívia, Suelén e Weslei pela amizade, troca científica, por tantos momentos alegres e pela convivência tão agradável nesse período.

Aos amigos do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Amanda, Aline, Jéssica, Murilo e Victor por terem uma participação tão especial no desenvolvimento de meu amor pela ciência. A amizade de vocês ficará sempre guardada em meu coração.

À banca examinadora pela disponibilidade em ler e contribuir com o aprimoramento do meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante”

Paulo Coelho

RESUMO

Os mecanismos essenciais da tradução ocorrem em associação com o ribossomo e são subdivididos em quatro etapas: iniciação, elongação, terminação e reciclagem ribossomal. Em cada fase, além de ribossomos, mRNAs e tRNAs carregados, são necessários também fatores proteicos que auxiliam o desenvolvimento do processo. eIF5A é um desses fatores presentes na tradução. Uma proteína altamente conservada em arqueas e eucariotos que sofre uma modificação pós-traducional exclusiva, chamada hipusinação, a qual é essencial para sua função. O uso de técnicas de perfil de expressão gênica em larga escala associadas à técnica de perfil polissomal possibilitam comparações quantitativas dos níveis de mRNA recrutados para a tradução. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão gênica global nos níveis de mRNA total e de mRNAs recrutados para a tradução de mutantes de Saccharomyces cerevisiae com função diminuída de eIF5A (depleção de eIF5A ou bloqueio da hipusinação). Inicialmente constatou-se que o perfil traducional analisado neste trabalho é equivalente ao perfil traducional obtido por outras técnicas. Em relação aos resultados biológicos, foi observado que o bloqueio da hipusinação leva a um aumento na formação de polissomos em ORFs mais longas e que possuem menor taxa de iniciação. Ainda, os resultados mostram uma relação íntima entre a falta de hipusinação e a via de biossíntese de poliaminas já que a mutação no gene DYS1 induz respostas celulares semelhantes a situações de aumento nos níveis intracelulares de poliaminas.

Palavras-chave: eIF5A, hipusinação, tradução

ABSTRACT

The essential mechanisms of translation occur in association with the ribosome and are subdivided into four stages: initiation, elongation, termination and ribosomal recycling. In each phase, besides ribosomes, mRNAs and loaded tRNAs, protein factors that favor the development of the process are also required. eIF5A, one of these factors present in translation, is a highly conserved protein in archaea and eukaryotes that undergoes a unique post-translational modification called hypusination, which is essential for its function. The use of large-scale gene expression profiling techniques associated with the polysomal profiling technique enables quantitative comparisons of mRNA levels recruited for translation. Thus, the aim of this work was to analyze the overall gene expression in the transcriptional and traslational profiles of Saccharomyces cerevisiae mutants with decreased eIF5A function (eIF5A depletion or blockade of hypusination). It has been observed that blockade of hypusination leads to an increase in polysome formation in longer ORFs with lower initiation rate. Moreover, the results show a close relationship between lack of hypusination and the polyamine biosynthesis pathway since the mutation in DYS1 gene induces cellular responses similar to situations of elevation in intracellular polyamine levels.

Keywords: eIF5A, hypusination, translation

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática da tradução em eucariotos.....14
Figura 2 A expressão gênica consiste em vários níveis que podem ser regulados individualmente e em conjunto.....15
Figura 3 Abordagens experimentais para estudo dos mRNAs recrutados para a tradução.....29
Figura 4 Correlação linear entre as réplicas dos valores de fold-change dos genes sequenciados.....30
Figura 5 PCA indicando a distribuição das réplicas no plano.....30
Figura 6 Correlações entre dados de perfis traducionais......32
Figura 7 Volcano plot das situações experimentais dos ensaios de RNASeq. A linha horizontal tracejada indica um p-value de 0,001.....33
Figura 8 Número de genes com diferença de expressão que se encontram up ou down regulados em ambos perfis.....33
Figura 9 Esquema da análise de expressão diferencial entre o perfil transcricional e traducional do mutante dys1-1.....34
Figura 10 Distribuição do log2 fold change do perfil transcricional e traducional.36
Figura 11 Gráfico de violino do comprimento das ORFs de mRNAs associados a polissomos no perfil traducional.....39
Figura 12 Gráfico de violino do comprimento das ORFs de mRNAs associados a polissomos no perfil traducional.....40
Figura 13 Histograma da taxa de início de tradução com base naquela estimada por Ciandrini et al, 2013.....42
Figura 14 Histograma do fluxo ribossomal divido em categorias de acordo com Ciandrini et al., 2013.....43
Figura 15 Ontologia genética dos genes diferencialmente expressos no perfil transcricional do mutante dys1-1.....45
Figura 16 Representação da via biossintética das poliaminas e hipusinação.....46
Figura 17 Espermidina e falta de hipusinação induzem genes envolvidos com metabolismo de metionina, arginina e lisina.....47
Figura 18 Simulação da ocupação ribossomal a partir da reanálise dos dados da referência SCHULLER et al., 2017.....49

Figura 19 Distribuição dos valores de fluorescência antes e após normalização entre arrays.....55
Figura 20 Gráfico PCA indicando a distribuição das réplicas nos planos.....56
Figura 21 Gráficos MA, cada um comparando duas situações experimentais.57
Figura 22 Volcano plot das situações experimentais dos ensaios de microarray.....58
Figura 23 Gráficos MA, cada um comparando duas situações experimentais.59
Figura 24 Número de genes com diferença de expressão significante (p<0,01) nas comparações relevantes.....60
Figura 25 Correlação de Pearson da expressão global de conjuntos de genes diferencialmente expressos.....61
Figura 26 Número de genes com diferença de expressão significante (p<0,01) nas comparações relevantes.....62
Figura 27 Correlação de Pearson da expressão global de conjuntos de genes diferencialmente expressos.....63
Figura 28 Gráfico de dispersão do log2 fold change do mRNA traduzido e total.64

Sumário

1. Introdução 14

2. Objetivos 19

3. Metodologia 20

3.1 Processamento dos dados de mRNA da linhagem selvagem e mutante dys1-1 obtidos por RNASeq 20

3.1.1 Obtenção e tratamento de dados de RNASeq 20

3.1.2 Normalização e identificação dos genes diferencialmente expressos no mutante dys1-1 21

3.2 Processamento dos dados de mRNA da linhagem selvagem e mutante *hyp2-1* obtidos por *microarray* 21

3.2.1 Extração dos dados brutos 21

3.2.2 Normalização de dados brutos de *microarray* 22

3.2.3 Identificação dos genes diferencialmente expressos no mutante hyp2-1 23

4. Resultados 24

4.1 Respostas transcricionais e traducionais em larga escala do mutante *dys1-1* de *Saccharomyces cerevisiae* 24

4.1.1 Introdução 24

4.1.2 Metodologia 25

4.1.3 Resultados e Discussão 28

4.2 Respostas transcricionais e traducionais em larga escala do mutante de hyp2-1 (ts) de *Saccharomyces cerevisiae* 51

4.2.1 Introdução 51

4.2.2 Métodos 54

4.2.3 Resultados 55

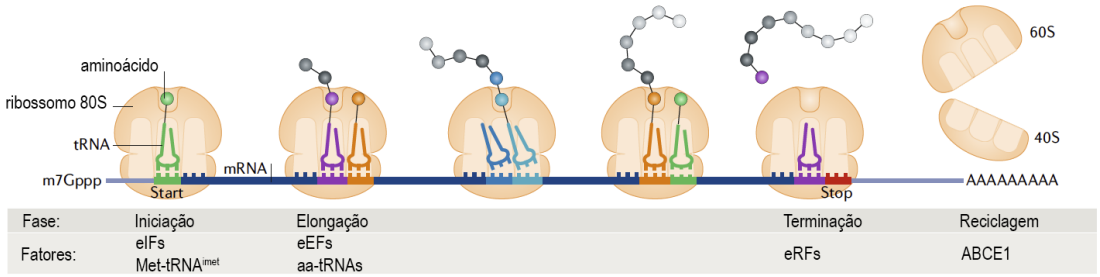
5. Conclusão 66

Bibliografia 67

1. Introdução

O mecanismo fundamental da tradução do código nucléico de RNAs mensageiros (mRNA) para a sequência de aminoácidos de uma proteína ocorre no ribossomo. Este é um processo altamente conservado ao longo da evolução (Shirokikh & Preiss, 2018) e subdividido em quatro etapas: iniciação, elongação, terminação e reciclagem ribossomal (Dever et al., 2016). Essas etapas estão resumidamente esquematizadas na Figura 1. Em cada fase, não apenas ribossomos, mRNAs e RNAs de transferência (tRNA) carregados de aminoácidos são necessários, mas também uma série de fatores proteicos solúveis e específicos que auxiliam o desenvolvimento do processo (Sasikumar et al., 2012).

Figura 1. Representação esquemática da tradução em eucariotos



Fonte: adaptado de Schuller & Green, 2018

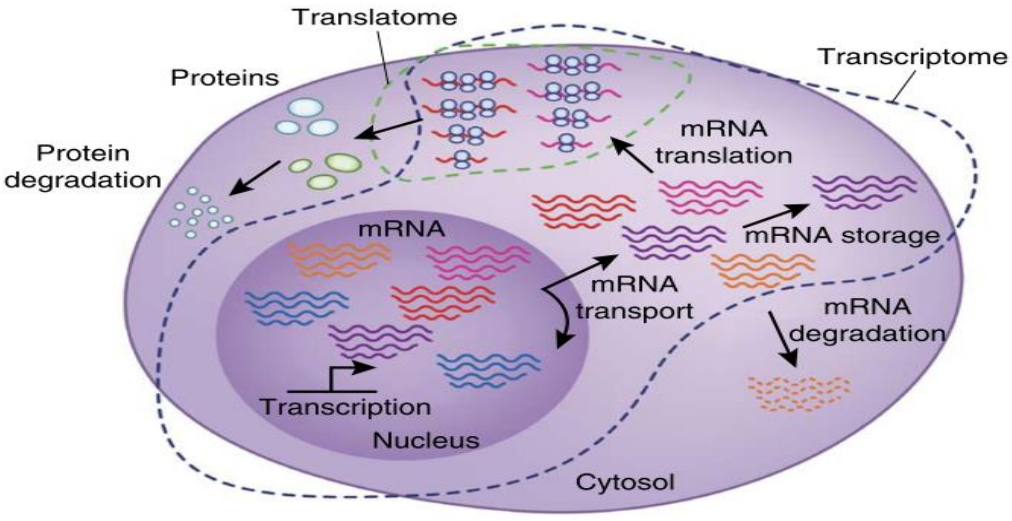
Além dos fatores canônicos eEF1A e eEF2 (e seus ortólogos em procariontes EF-Tu e EF-G, respectivamente), o fator de elongação eIF5A (homólogo estrutural de EF-P) também é encontrado durante a tradução, sendo este preservado entre eucariotos e bactérias ((Chen & Liu, 1997; Dever et al., 2018; Rossi et al., 2014; Schnier et al., 1991). No entanto, enquanto EF-P não é essencial em muitas bactérias, eIF5A é um fator essencial em todos os eucariotos testados, possivelmente, por apresentar uma função mais geral do que EF-P durante a tradução (Buskirk & Green, 2017).

eIF5A caracteriza-se por ser uma proteína pequena, constituída por apenas 157 resíduos de aminoácidos e, apesar de seu papel essencial nos eucariotos, apresenta um efeito direto na tradução global entre 30-75% (Henderson & Hershey, 2011; Kang & Hershey, 1994). Outra característica de

eIF5A é a hipusinação, uma modificação pós-traducional de um resíduo específico de lisina promovida por duas enzimas altamente conservadas, a desoxi-hipusina sintase (Dys1) e a desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1) (Mathews & Hershey, 2015; Nakanishi & Cleveland, 2016). A hipusina é um aminoácido exclusivo e essencial da proteína eIF5A (Dever et al., 2014; Park et al., 1981).

A síntese proteica, um processo celular complexo e altamente regulado, relaciona-se à expressão gênica, sendo importante para o seu controle. Além da tradução, a via regulatória da expressão gênica é também composta por diversas etapas, como mecanismos epigenéticos, transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais, que estão representados na Figura 2. Cada estágio dessa regulação pode contribuir para o rol de proteínas expressas em determinado tipo celular. Dentre mecanismos pós-transcricionais, a expressão gênica pode ser modulada pelo controle do splicing, da exportação de mRNA do núcleo para o citosol, da estabilidade do mRNA no citosol e da tradução do mRNA em proteínas e, como exemplos de mecanismos pós-traducionais, há também a degradação proteica (Chassé et al., 2017; Piccirillo et al., 2014).

Figura 2 A expressão gênica consiste em vários níveis que podem ser regulados individualmente e em conjunto. Após a transcrição, o mRNA é transportado para o citosol, onde pode ser degradado, armazenado ou utilizado para a síntese proteica. Pelo fato de que cada um desses níveis pode ser regulado separadamente para cada conjunto de mRNAs, mecanismos de expressão gênica podem agir de forma conjunta para orquestrar padrões de expressão em resposta a diferentes estímulos. As áreas delimitadas pelas linhas pontilhadas indicam populações de mRNA estudadas por perfil traducional (linha verde) e transcricional (linha azul).



Fonte: Piccirilo, et al 2014.

Apesar da contribuição precisa de cada um dos processos na expressão gênica, muitos estudos apontam o controle traducional como o mecanismo de maior impacto, sendo responsável por cerca de metade das variações na concentração proteica celular (Oertlin et al., 2018; Schwanhüusser et al., 2011). Desta maneira, estudar a tradução implica em um melhor entendimento da regulação da expressão gênica, permitindo explicações sobre diferenças existentes entre os níveis de mRNA e sua respectiva proteína (Chassé et al., 2017), uma vez que ambos apresentam baixa correlação entre si (Piccirillo et al., 2014). Uma das formas de entender a tradução é por meio de estudos com mutantes envolvidos diretamente neste processo, como depleção de eIF5A, a qual acarreta defeitos na síntese proteica e, consequentemente, implica em modificações de expressão em múltiplos processos celulares. Para se evitar ambiguidade com relação a termos utilizados, neste trabalho o termo perfil traducional foi utilizado para designar o conteúdo de mRNAS associados aos polissomos (Figura 3), como medida do transleitoma (Figura 2).

Em relação à função traducional de eIF5A, muitas foram as hipóteses sobre o seu comportamento específico. Em 2006, Zanelli e colaboradores, ao realizarem experimentos em *S. cerevisiae* demonstraram a interação de eIF5A com o complexo 80S e o fator de elongação eEF2, confirmando seu papel na elongação da tradução, assim como posteriormente demonstrado com ensaios complementares e independentes, por Greggio e colaboradores (2009) e por Saini e colaboradores (2009), que neste mesmo trabalho verificou uma influência de eIF5A em eventos de mudança de fase de leitura. Em 2013, Gutierrez e colaboradores, ao utilizarem ensaios *in vivo* em levedura e ensaios *in vitro*, que reconstituem o processo traducional, propuseram uma necessidade específica de eIF5A para resolver o *stalling* (atraso/parada) dos ribossomos em regiões que apresentam resíduos de prolina consecutivos, assim como demonstrado anteriormente para EF-P (Doerfel et al., 2013; Ude et al., 2013).

Estudos de Pelechano e Alepuz (2017) (ribosome profiling / RiboSeq / 5PSeq) e de Schuller e colaboradores (2017) (ribosome profiling / RiboSeq / 5PSeq), a partir de técnicas de sequenciamento em larga escala de fragmentos de RNAs protegidos pelo ribossomo, mostraram a atuação de eIF5A na tradução

de *motifs* não somente enriquecidos com prolinas, mas também, em glicina e resíduos de aminoácidos carregados. Tais resultados confirmam a participação de eIF5A na elongação ao estimular a ligação peptídica em pontos de *stalling* do ribossomo. Além disso, estes estudos apontam para um acúmulo de ribossomos em *stop* códons de células deficientes de eIF5A, evidenciando uma função de eIF5A no término da tradução.

Diferentes técnicas são dedicadas ao estudo específico de mRNAs recrutados para a tradução. Entre elas, o perfil polissomal é a mais comum. Esta técnica baseia-se na separação de mRNAs que se encontram associados a polissomos, de mRNAs livres de ribossomo (Chassé et al., 2017). A composição desses mRNAs é determinada por técnicas de perfil de expressão gênica em larga escala, como análises de *microarray* e RNASeq (Piccirillo et al., 2014). Tais metodologias, esquematizadas na figura 3, têm possibilitado tanto comparações quantitativas detalhadas dos níveis de mRNA total em muitos organismos, denominadas de transcriptomas, ou perfil transcricional e, quando associadas a análises de síntese proteica, como o perfil polissomal, também permitem a avaliação em larga escala de mRNAs recrutados para a tradução. Os resultados de tais análises são chamados com frequência de estudos de transleitoma (*translatome*), ou perfil traducional.

Experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório forneceram dados brutos de larga escala com dois mutantes de levedura envolvendo eIF5A em duas bibliotecas e metodologias diferentes. Ambos mutantes apresentam parada do crescimento e bloqueio da elongação da tradução em comparação ao selvagem (Galvão et al., 2013; Zanelli et al., 2006).

Por ser um fator envolvido na tradução, a depleção de eIF5A acarreta em defeitos na síntese proteica. Esse processo celular, extremamente complexo e altamente regulado, relaciona-se à expressão gênica, sendo um componente crucial para o seu controle. Uma vez que a tradução tem um papel importante na modulação da expressão de muitos genes que respondem a sinais endógenos ou exógenos, a depleção de eIF5A implica em modificações de expressão em múltiplos processos celulares.

Além da tradução, a via regulatória da expressão gênica é composta por diversas etapas, como mecanismos epigenéticos, transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais (Figura 2). Cada estágio dessa regulação pode contribuir para o conjunto de proteínas expressas em determinado tipo celular. Dentre mecanismos pós-transcricionais, a expressão gênica pode ser modulada pelo controle do *splicing*, da exportação de mRNA do núcleo para o citosol, da estabilidade do mRNA no citosol e da tradução do mRNA em proteínas e, como exemplos de mecanismos pós-traducionais, há também a degradação proteica (Chassé et al., 2017; Piccirillo et al., 2014).

Frente às novas hipóteses sobre o papel de eIF5A, dados obtidos pelo método de perfil polissomal em larga escala de diferentes mutantes de eIF5A de *S. cerevisiae* podem gerar resultados esclarecedores em relação à influência de cada mutação no perfil traducional, complementando os dados da literatura sobre sua influência no mecanismo de tradução e também focando em funções ainda não inteiramente exploradas, como eventos na mudança da fase de leitura e tendência de *stop* códons.

2. Objetivos

a) Identificação de genes diferencialmente expressos

A realização de ensaios como *microarray* e RNASeq gera dados de expressão gênica relativa em larga escala. Dessa forma, foram analisados os dados obtidos para os mutantes *hyp2-1* e *dys1-1* provenientes de RNA de frações polissomais e RNA total. Utilizando softwares de análise de expressão gênica, foram obtidos genes diferencialmente expressos na condição mutante em relação à selvagem, entre outras comparações.

b) Análises posteriores à identificação de genes diferencialmente expressos

Ferramentas estatísticas foram aplicadas às bibliotecas de genes diferencialmente expressos para análise de aspectos traducionais desse conjunto, assim como ontologia genética, fatores de transcrição, *motifs* de resíduos de aminoácidos, pares de códons inibitórios, *stop* códon e mudança da fase de leitura.

3. Metodologia

3.1 Processamento dos dados de mRNA da linhagem selvagem e mutante dys1-1 obtidos por RNASeq

3.1.1 Obtenção e tratamento de dados de RNASeq

O sequenciamento de RNA de triplicatas biológicas de linhagens selvagem e mutante para defeito em eIF5A em duas situações experimentais (RNA total e RNA proveniente de perfil polissomal) foi realizado em equipamento HiSeq, *paired-end* de 50 ciclos a partir de bibliotecas de cDNA preparadas pelo kit TrueSeq (Illumina), conforme orientações do fabricante.

Os dados de sequenciamento brutos (arquivos FASTQ) das 12 amostras foram confirmados quanto à qualidade pelo software FASTQC.

O fluxo de análises dos dados brutos de RNASeq com genoma de referência segue os passos: remoção de sequências e nucleotídeos de baixa qualidade, alinhamento com o genoma de referência, mapeamento e contagem das *reads*, normalização da contagem e identificação de genes diferencialmente expressos.

Após esta análise da qualidade, o *software TrimGalore!* foi utilizado para remover as *reads* com qualidade baixa (*Phred quality score* < 25) e também sequências de adaptadores. O arquivo *.*fastqsanger* gerado foi então mapeado contra um arquivo fasta de sequências de RNA não codificante (http://downloads.yeastgenome.org/sequence/S288C_reference/rna/archive/rna_coding_R64-1-1_20110203.fasta.gz), utilizando-se do *software Bowtie* que foi configurado com os seguintes parâmetros -v 2 –y –a –m 1 –*best* –*strata* –S –p 4, para que fossem retiradas as *reads* de RNAs não codificantes (ncRNA), gerando dois arquivos: um arquivo de *reads* mapeadas e outro arquivo de *reads* não mapeadas.

As *reads* que não se mapearam aos ncRNAs foram utilizadas para dar prosseguimento às análises. Neste momento, elas foram alinhadas ao genoma de referência de *Saccharomyces cerevisiae* pelo *software HiSat*.

Após serem alinhadas, as *reads* foram mapeadas e quantificadas pelo *software Stringtie* utilizando um arquivo de extensão **.gff* de referência de *S. cerevisiae*, com os parâmetros padrão.

3.1.2 Normalização e identificação dos genes diferencialmente expressos no mutante dys1-1

Para normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos no perfil traducional, foi utilizado o pacote *anota2seq* do *software R*, o qual utiliza um modelo de análise de variância parcial.

3.2 Processamento dos dados de mRNA da linhagem selvagem e mutante *hyp2-1* obtidos por *microarray*

3.2.1 Extração dos dados brutos

O ensaio de *microarray* desenvolvido na tese de doutorado do Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli (https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100606/zanelli_cf_dr_araiq.pdf?sequence=1&isAllowed=y), cujas imagens foram reanalisadas neste projeto, possui triplicatas biológicas de extrato total de RNA das linhagens selvagem e mutante *hyp2-1* (mutante que induz depleção de eIF5A) em situações experimentais de temperatura restritiva (37ºC) e permissiva (25ºC), fornecendo desta forma, dados transcricionais; e triplicatas biológicas de RNA extraído de frações de polissomo das mesmas linhagens e situações experimentais, fornecendo, portanto, dados de mRNAs mensageiros recrutados para a tradução.

O experimento aqui descrito foi realizado a partir da técnica de *microarray* de duas cores (*Cy3* - comprimento de onda de 532 nm, cor vermelha; e *Cy5* - comprimento de onda de 635 nm, cor verde), sendo que o mRNA das linhagens selvagem e mutante de cada condição experimental foram marcados com *Cy5* e *Cy3*, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas e hibridizadas às sequências presentes nas lâminas por competição. O experimento foi delineado

com um *Dye Swap*, situação em que os corantes utilizados nas amostras são invertidos em uma das réplicas experimentais.

Todas as lâminas de *microarray* foram escaneadas pelo equipamento 4200B (*Molecular Devices*), gerando dados brutos que correspondem a imagens de fluorescência e revelam o nível de expressão relativa de um mRNA alvo. As 12 lâminas eram compostas por 6.307 ORFs (*Open Reading Frames*) de *S. cerevisiae* em duplicata. Para que os dados de imagem (*pixels*) pudessem ser transformados em valores numéricos, o *software GenePix Pro* versão 3 (*Axon Instruments*) foi utilizado.

3.2.2 Normalização de dados brutos de *microarray*

O fluxo de análises dos dados brutos de *microarray* segue os passos: normalização pelo *background*, normalização dentro do *array*, normalização entre os *arrays*, construção de matrizes de contraste e identificação de genes diferencialmente expressos.

Neste projeto, os valores de intensidade de fluorescência foram analisados no *software R,* com o pacote *limma* (Ritchie et al., 2015). Esses dados foram corrigidos pela fluorescência de *background* e posteriormente, a normalização normalização interna foi realizada pelo método de Loess, como descrito no manual do pacote. Esse método de normalização considera os valores da diferença entre as duas cores (*log Cy3 – log Cy5*), ou seja, a diferença das duas amostras hibridizadas, assumindo que a maioria dos genes não são diferencialmente expressos, fazendo com que os valores desta diferença tenham tendência a se aproximar de zero.

Para a normalização entre os *arrays* os valores médios de cada comprimento de onda (0,5*(*log de Cy3 + log de Cy5*)) foram considerados, fazendo com que os valores de A tivessem a mesma distribuição empírica.

O pacote *limma* utiliza modelos lineares para que as análises de dados de *microarray* sejam realizadas. Para dados de *microarray* de duas cores, torna-se necessário o delineamento de dois tipos de matrizes: de *design* e de contraste. A matriz de *design* informa ao *software* com qual fluoróforo, *Cy3* ou *Cy5*, cada

linhagem foi marcada em cada *array*. A matriz de contraste especifica qual comparação deverá ser realizada. Dessa forma, após serem aplicadas todas as normalizações, os dados das réplicas de todas as situações experimentais tornam-se comparáveis entre si através do delineamento de matrizes de contraste.

3.2.3 Identificação dos genes diferencialmente expressos no mutante hyp2-1

Para identificar genes diferencialmente expressos, foi aplicado aos contrastes a análise estatística presente no *limma* que utiliza um método empírico bayesiano que pondera os erros padrão das diferenças entre as condições comparadas. A diferença de expressão de um gene entre duas condições pode ser representada pelo *fold change* (FC), que, por definição, é a média do valor de expressão de um gene de uma condição contra a outra.

4 Resultados

4.1 Respostas transcricionais e traducionais em larga escala do mutante *dys1-1* de *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1 Introdução

O mecanismo fundamental da tradução de RNAs mensageiros (mRNA) para a sequência de aminoácidos de uma proteína ocorre no ribossomo e é altamente conservado ao longo da evolução (Shirokikh & Preiss, 2018). Este processo é subdividido em quatro etapas: iniciação, elongação, terminação e reciclagem ribossomal (Dever et al., 2016). Ribossomos, mRNAs, RNAs de transferência (tRNA) carregados de aminoácidos e fatores proteicos são necessários para o desenvolvimento desse processo (Sasikumar et al., 2012).

O fator de elongação da tradução eIF5A (homólogo estrutural de EF-P) é preservado entre eucariotos e bactérias (Chen & Liu, 1997; Dever et al., 2018; Rossi et al., 2014; Schnier et al., 1991) e se mostrou essencial em todos os eucariotos testados (Buskirk & Green, 2017). Esta proteína promove uma estabilização da ligação peptídica durante a elongação de um conjunto de mRNAs, que se mostram dependentes desse fator por possuírem resíduos de aminoácidos consecutivos com menor processividade traducional (Schuller & Green, 2018). eIF5A passa por uma modificação pós traducional exclusiva, a hipusinação, em que um resíduo específico de lisina (K51 em *Saccharomyces cerevisiae*) é convertido em desoxihipusina através da ação da enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura), que age transferindo a fração aminobutil de uma espermidina para o grupo amino da lisina. À desoxihipusina é então adicionado um grupo hidroxila pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura), que completa a hipusinação. Essa modificação é rara, porém essencial e as enzimas que participam dessa síntese são evolutivamente conservadas (Park et al., 2010).

A espermidina, molécula precursora da hipusina, juntamente com putrescina e espermina, compõem a classe das poliaminas, pequenos policátions orgânicos que regulam a expressão gênica e canais iônicos, sendo responsáveis inclusive pela regulação de enzimas envolvidas em sua biossíntese (Igarashi & Kashiwagi, 2010). Muitos estudos reportam um efeito de

poliaminas na tradução, tanto por atuarem na modificação pós traducional de eIF5A, quanto por contribuírem para a eficiência e fidelidade da síntese proteica (Dever & Ivanov, 2018).

Neste estudo combinamos perfil polissomal a sequenciamento de nova geração como uma medida do perfil traducional para investigar o papel global da hipusinação na tradução. Essa técnica de caracterização do perfil traducional mostrou-se correlacionada à técnica de perfil ribossomal já consolidada (Ingolia et al., 2009). Utilizamos um mutante de desoxihipusina sintase de levedura (*dys1-1)* (Galvão et al., 2013) para identificar os transcritos dependentes da hipusinação de eIF5A em nível transcricional e traducional. Adicionalmente, constatamos a mutação gerou um desequilíbrio na via de poliaminas, que mimetiza o efeito causado pela adição de espermidina na célula.

4.1.2 Metodologia

4.1.2.1 Condições de crescimento da linhagem

As linhagens de levedura SVL613 (MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN - pSV520]) e SVL614 (MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1 ^{W75R,T118A,A147T} /TRP1/CEN - pSV730]), assim como as condições de crescimento, foram descritas em Galvão et al., 2013.

4.1.2.2 Perfil Polissomal.

Os extratos celulares para o perfil polissomal foram preparados de acordo com o descrito em Galvão et al., 2013. Brevemente, após crescimento das culturas até a fase mid-log (OD_{600nm} = 0,6) e adição de 1% de formaldeído por 1 hora em banho de gelo, 15 A_{260nm} unidades de extrato celular foram depositadas em gradiente de sacarose de 10 a 50% e centrifugadas por 3 horas. A absorbância a 254_{nm} do fracionamento dos gradientes foi continuamente

monitorada. As frações referentes ao polissomo foram coletadas, agrupadas e armazenadas a -80ºC para posterior isolamento do RNA.

4.1.2.3 Extração do RNA.

A partir de *pellets* celulares previamente congelados a lise celular com zimoliase e a extração de RNA total foram realizadas de acordo com o protocolo do *RNeasy mini kit* (número de catálogo 74104, *Qiagen*). O RNA proveniente das frações polissomais foi extraído com Trizol, seguindo o protocolo do fabricante (número de catálogo 15596026, *ThermoFisher Scientific*). A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria e sua integridade foi verificada por gel de eletroforese no equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA).

4.1.2.4 Preparo de bibliotecas e sequenciamento.

O preparo das bibliotecas de cDNA provenientes de RNA total e RNA de fracionamento polissomal extraídos de triplicatas biológicas das linhagens SVL613 e SVL614, foi realizado conforme orientações do fabricante para o kit TrueSeq (número de catálogo RS-1222001, Illumina) por seleção de mRNA por cauda poly-A. Essas 12 bibliotecas foram sequenciadas em equipamento HiSeq, paired-end de 50 ciclos.

4.1.2.5 Análise de dados do RNAseq.

Os dados de sequenciamento foram processados utilizando as ferramentas disponíveis na plataforma pública *Galaxy* (https://usegalaxy.org/). As sequências presentes nos arquivos FASTQ tiveram sua qualidade confirmada pelo *software* FastQC (*Galaxy Version 0.72*). O *software TrimGalore!* (*Galaxy Tool Version: 0.4.3.1+galaxy1)* foi utilizado para remover as *reads* com *Phred quality score* < 25 e sequências de adaptadores. Os arquivos gerados foram

mapeados contra um arquivo de sequências de RNA não codificante (ncRNA) de *S. cerevisiae* (http://downloads.yeastgenome.org/sequence/S288C_reference/rna/archive/rna_coding_R64-1-1_20110203.fasta.gz), pelo *software Bowtie (Galaxy Tool Version: 1.1.2)* com os parâmetros –v 2 –y –a –m 1 *–best –strata* –S –p 4. As *reads* que não se mapearam aos ncRNAs foram alinhadas ao genoma de referência de *S. cerevisiae* pelo *software HiSat (Galaxy Tool Version: 2.1.0+galaxy3)*, com os parâmetros padrão. O mapeamento e quantificação das *reads* foram realizados pelo *software Stringtie* (*Galaxy Tool Version: 1.3.4*) com os parâmetros padrão. A contagem normalizada das *reads* foram convertidas em RPM (*reads per million)*. Para normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos foi utilizado o pacote *anota2seq* do *software R* (Oertlin et al., 2018), a significância foi determinada utilizando um limite de *p-value* ajustado de 0,05.

4.1.2.6 Enriquecimento de Ontologia Genética.

Termos de ontologia genética (GO) dos genes diferencialmente expressos foram determinados utilizando a base de dados Yeastmine (Engel et al., 2014), considerando aqueles que tiveram p-value < 0,05 para o teste com correção Holm-Bonferroni.

4.1.2.7 Análise de Fatores de Transcrição

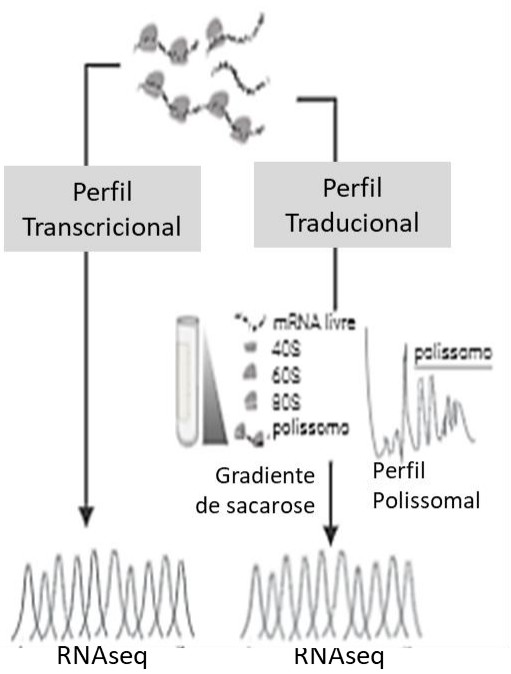
O enriquecimento de fatores de transcrição nas listas de genes diferencialmente expressos foi obtido através da ferramenta online PSCAN (v1.5, http://159.149.160.88/pscan/).

4.1.3 Resultados e Discussão

4.1.3.1 Perfil Polissomal Associado a Sequenciamento de Larga Escala como uma Análise do Perfil Traducional Global

Diferentes técnicas são dedicadas ao estudo específico de mRNAs recrutados para a tradução. Entre elas encontra-se o perfil polissomal, que se baseia na separação de mRNAs que se encontram associados a polissomos de mRNAs livres de ribossomo (Chassé et al., 2017). A composição desses mRNAs é determinada por técnicas de perfil de expressão gênica em larga escala, como análises de *microarray* e RNASeq (Piccirillo et al., 2014) que por sua vez têm possibilitado tanto comparações quantitativas dos níveis de mRNA total em muitos organismos, denominadas de transcriptomas, ou perfil transcricional (figura 3) e, quando associadas a análises de síntese proteica, como o perfil polissomal (figura 3), também permitem a avaliação em larga escala de mRNAs recrutados para a tradução. Os resultados de tais análises são denominados transleitoma (*translatome*), ou perfil traducional.

Figura 3 Abordagens experimentais para estudo dos mRNAs recrutados para a tradução. Perfil traducional: extratos são separados por ultracentrifugação através de um gradiente de sacarose. O gradiente é então fracionado enquanto sua absorbância é continuamente monitorada a 254 nm (A_{254}), permitindo a separação do RNA livre, das subunidades ribossomais 40S e 60S, dos monossomos 80S e dos polissomos. O RNA é isolado de frações do gradiente individualizadas e reunidas em um pool para análises posteriores por microarray ou RNASeq. Perfil transcricional: o RNA total é extraído, os mRNAs são separados e submetidos a sequenciamento de larga escala.



A qualidade das amostras e normalizações dos dados deste estudo foi caracterizada pela correlação linear dos valores de *fold change* de todos os transcritos sequenciados em triplicata (figura 4) e pela análise de componentes principais (Figura 5). Tanto os resultados do perfil transcricional quando do traducional mostraram-se altamente reprodutíveis nas réplicas biológicas.

Figura 4 Correlação linear entre as réplicas dos valores de fold-change dos genes sequenciados. A correlação linear dos valores de fold-change de réplicas experimentais dos genes sequenciados para o perfil transcricional variou entre 0,94.

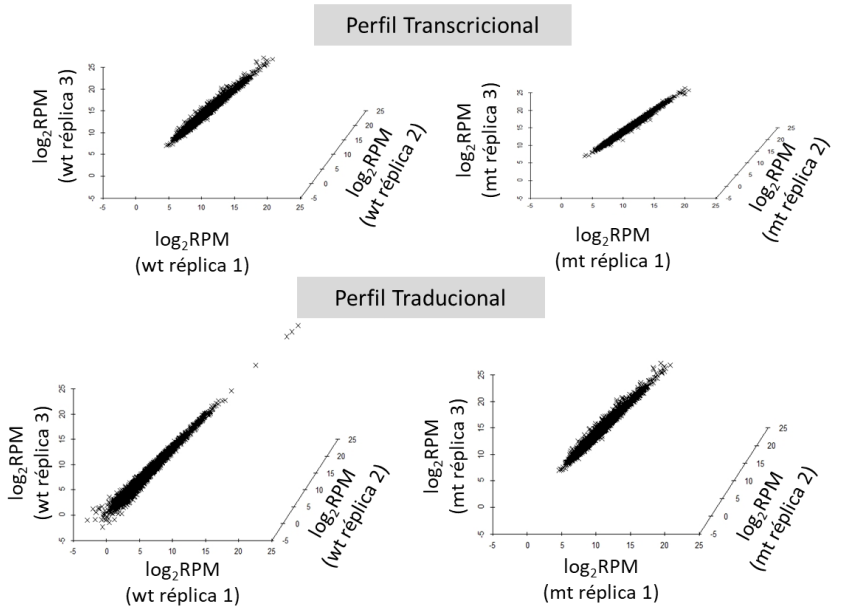
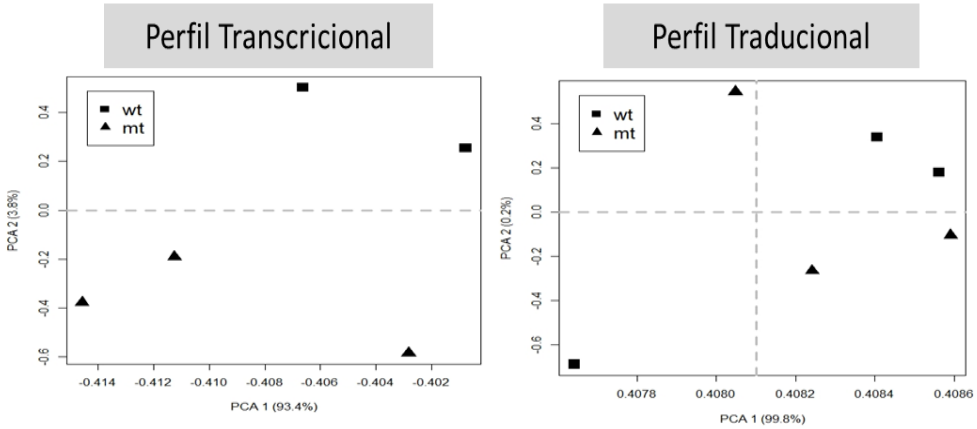


Figura 5 PCA indicando a distribuição das réplicas no plano. Três replicatas biológicas independentes das linhagens selvagem e mutante são representadas nos gráficos de distribuição ao longo de dois componentes principais, a partir dos valores normalizados de fold-change dos genes de cada perfil.



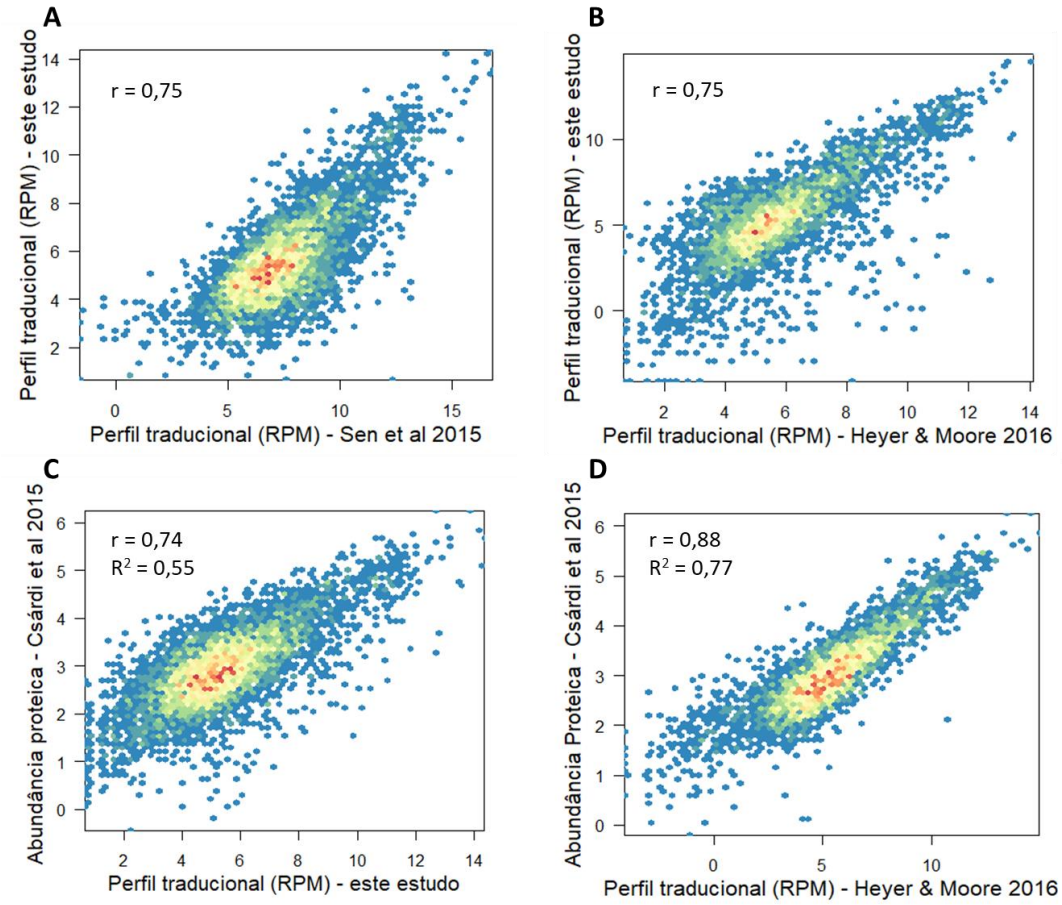
Além da associação de perfil polissomal a uma técnica de sequenciamento em larga escala, outra metodologia de delimitação do perfil traducional amplamente utilizada é o Riboseq, ou perfil ribossomal, que se baseia no sequenciamento de fragmentos de mRNAs protegidos por ribossomos (RPF, *ribosome protected fragment*), retornando a posição exata do ribossomo no mRNA, assim como a densidade ribossomal daquele mRNA (Ingolia et al., 2009). Buscando entender em que sentido estas técnicas se aproximam foram

realizadas correlações do perfil polissomal seguido de RNAseq da linhagem selvagem apresentado neste estudo com dados de perfil ribossomal e abundância proteica também de linhagens selvagens disponíveis na literatura.

A validação do perfil traducional deste estudo foi obtida pela comparação entre este e dados de perfil traducional e abundância proteica publicados. Foi possível observar alta correlação de *Pearson* (r = 0,75) do perfil traducional deste estudo com um perfil ribossomal obtido por Sen et al., 2015 utilizando Riboseq (figura 6A), assim como com o perfil polissomal associado a Riboseq de Heyer & Moore, 2016 (r =0,75) (figura 6B). Comparando o perfil traducional deste estudo com a quantificação da abundância proteica determinada por Csárdi et al., 2015, observa-se uma correlação de 0,74, e coeficiente de determinação (R^2) de 0,55 (figura 6C). Ao realizar a mesma comparação de abundância proteica com o perfil traducional obtido por perfil polissomal seguido de Riboseq (Heyer & Moore, 2016) tem-se r = 0,88 e o R^2, 0,77 (figura 6D).

Estes resultados indicam que ambas técnicas conseguem representar o cenário da tradução na célula de forma igualmente satisfatória. Enquanto a técnica de obtenção de perfil traducional caracterizada neste estudo foi pioneira em mostrar a regulação da expressão gênica em nível traducional, uma vez que a quantificação de mRNAs associados a ribossomos é uma medida confiável da síntese proteica, a associação do perfil polissomal a Riboseq torna os resultados mais explicativos do conteúdo de moléculas de proteína por célula (King & Gerber, 2014).

Figura 6 Correlações entre dados de perfis traducionais. Foram correlacionados dados de perfil traducional obtido por Riboseq e de abundância proteica disponíveis na literatura aos dados de perfil traducional deste estudo. (A) **Correlação do perfil traducional deste estudo ao perfil traducional de SEN et al., 2015 obtido por Riboseq.** (B) Correlação do perfil traducional deste estudo ao perfil traducional de HEYER; MOORE, 2016 obtido por uma combinação de perfil polissomal seguido de RIboseq. (C) Correlação da abundância proteica de CSÁRDI et al., 2015 ao perfil traducional deste estudo. Os dados de abundância proteica estão indicados em moléculas por célula. (D) Correlação da abundância proteica de CSÁRDI et al., 2015 ao perfil traducional de HEYER; MOORE, 2016.

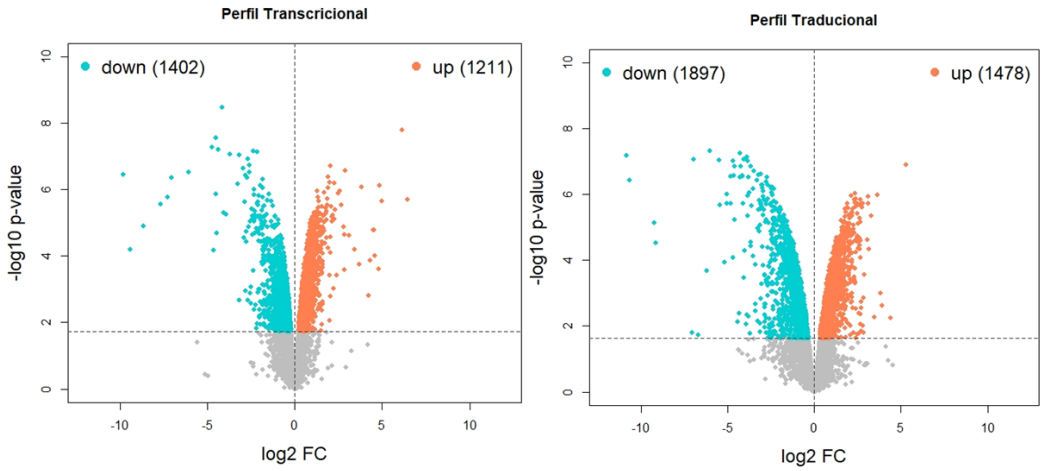


4.1.3.2 Respostas transcricionais e traducionais do mutante de hipusinação (dys1-1) em S. cerevisiae

Quando comparados, os dados entre células selvagem e mutante *dys1-1* de cada um dos perfis revelaram uma população de genes com alterações em sua expressão. A figura 7 apresenta os gráficos *volcano* da relação entre o *fold-change* e o *p-value* a ele associado para cada gene em cada situação

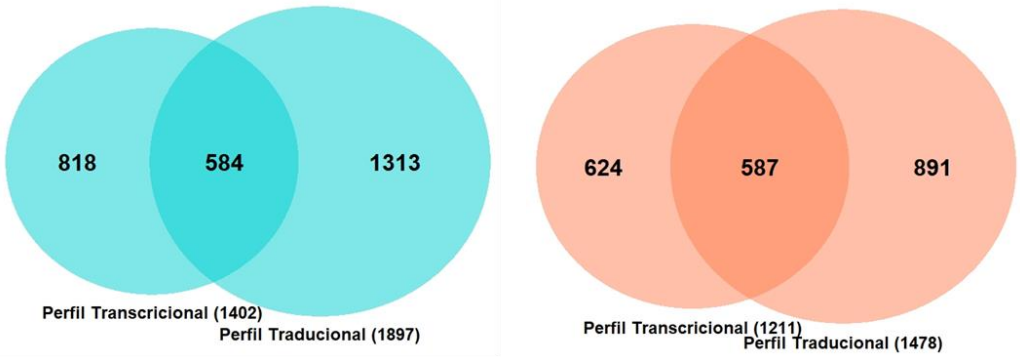
experimental. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram *p-value* ajustado menor do que 0,05.

Figura 7 Volcano plot das situações experimentais dos ensaios de RNASeq. A linha horizontal tracejada indica um p-value de 0,001.



Pode-se observar que, apesar de o mutante *dys1*-1 diminuir a função de um fator de tradução, o número de genes diferencialmente expressos em ambos perfis é quantitativamente semelhante. Os diagramas de *Venn* (figura 8) foram construídos de forma a relacionar os dois grupos e para que pudesse ser visualizada a quantidade de genes diferencialmente expressos que são coincidentes entre os perfis.

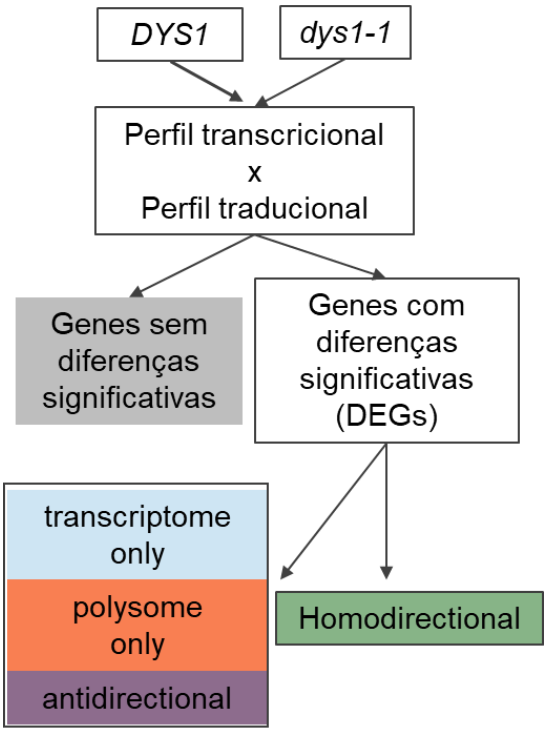
Figura 8 Número de genes com diferença de expressão que se encontram up ou down regulados em ambos perfis. O diagrama de Venn simboliza grafica e numericamente os genes diferencialmente expressos e como os conjuntos de dados se relacionam entre si.



Após a transcrição, o mRNA é transportado para o citosol, onde pode ser degradado, armazenado ou utilizado para a síntese proteica. Pelo fato de que

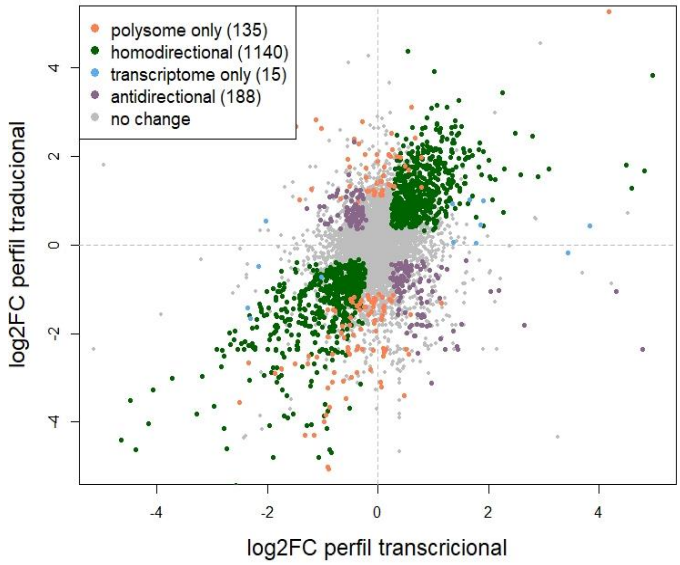
cada um desses níveis pode ser regulado separadamente para cada conjunto de mRNAs, mecanismos de expressão gênica podem agir de forma conjunta para orquestrar padrões de expressão em resposta a diferentes estímulos (Piccirillo – et al., 2014). Tendo em mãos os dois perfis de expressão gênica, foi realizada uma análise de variância parcial pelo pacote *anota2seq* dos mRNAs recrutados para a tradução em relação aos níveis de mRNA para identificar diferenças traducionais a partir de modos regulatórios da expressão gênica (Larsson et al., 2010). Essa análise permitiu a classificação dos genes diferencialmente expressos (DEG) em: a) *homodirectional* - alterações na abundância de mRNA (mudanças similares nos níveis de mRNA total e polissomal); b) *polysome only* - mudanças na eficiência traducional que possivelmente levariam a mudanças nos níveis proteicos (mudanças nos níveis de mRNA nos polissomos sem alterações no mRNA total); c) *transcriptome only* - situação de tamponamento em que os níveis de mRNA total se alteram enquanto os níveis de mRNA nos polissomos se mantêm estáveis e d) *antidirectional* – situação em que os níveis de mRNA total e traducional apresentam comportamentos opostos (figura 9).

Figura 9 Esquema da análise de expressão diferencial entre o perfil transcricional e traducional do mutante dys1-1. Genes classificados como diferencialmente expressos foram denominados como transcriptome only (azul), polysome only (laranja), antidirectional (roxo) – variações significativamente opostas entre perfil transcricional e traducional – e homodirectional (verde) – variações significativamente convergentes entre ambos os perfis.



A figura 10 apresenta os resultados desta análise estatística no mutante *dys1-1*. Neste gráfico é possível observar que foram identificados 1140 transcritos classificados como *homodirectional*. Este fato sugere que a maior parte dos genes com diferença de expressão apresenta regulação transcricional. Além disso, foi identificado aumento de 49 genes e diminuição de 86 exclusivamente no perfil traducional (*polysome only*); um total de 15 genes apresentou regulação traducional no mutante (*transcriptome only*) e 188 genes são classificados como *antidirectional*.

Figura 10 Distribuição do log2 fold change do perfil transcricional e traducional. Os genes que apresentaram diferenças estatísticas entre mutante e selvagem foram simultaneamente comparados nos dois perfis.



A tradução, juntamente com a transcrição, compõe os dois estágios de regulação da expressão gênica. Entre os mecanismos de regulação, encontram-se etapas transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais. A síntese proteica é uma mecanismo regulatório da expressão gênica em nível pós transcricional (Chassé et al., 2017; Piccirillo et al., 2014).

Por sua vez, a tradução é também dividida em quatro etapas: iniciação, elongação, terminação e reciclagem ribossomal, sendo que os dois últimos são considerados não limitantes para a formação do conjunto de proteínas em uma célula enquanto o papel da iniciação e da elongação no controle da expressão gênica ainda não foi claramente estabelecido (Ciandrini et al., 2013).

O conjunto de genes regulados transcricionalmente apresentou um enriquecimento de Ontologia Genética em termos como biogênese de ribossomos e transposição enquanto o conjunto de genes regulados traducionalmente apresentou enriquecimento em processos de oxido-redução (Tabela 1). O resultado da GO é refletido pelo enriquecimento encontrado na análise de fatores de transcrição deste mesmo grupo onde os fatores TOD6, DOT6 e SFP1 destacam-se por serem proteínas envolvidas com RNAs ribossomais e na biogênese de ribossomos.

Tabela 1 Análise de ontologia genética de genes regulados transcricionalmente e traducionalmente

Análises por variânica parcial - Modo regulatório *homodirectional*				
termo GO	descrição	*p-value*	dispensabilidade	nº de genes
GO:0042254	ribosome biogenesis	4,25E-29	0,00	179
GO:0090501	RNA phosphodiester bond hydrolysis	3,27E-21	0,00	102
GO:0032196	transposition	6,80E-18	0,03	41
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic process	2,13E-17	0,07	433
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	4,25E-17	0,10	425
Análises por variânica parcial - Modo regulatório *polysome only*				
termo GO	descrição	*p-value*	dispensabilidade	nº de genes
GO:0055114	oxidation-reduction process	8,00E-03	0,00	24

Tabela 2 Análise dos fatores de transcrição dos genes regulados transcricionalmente.

Fator de transcrição	*p-value*
TOD6	7,90E-33
DOT6	1,26E-31
SFP1	8,77E-06
STB3	1,23E-05
SUM1	2,39E-03
NHP6A	1,00E+00
NHP6B	3,44E+00
SPT15	3,90E+00
YKL222C	0.00942302
HAL9	0.0101566

4.1.3.3 Características dos mRNAs enriquecidos no perfil traducional do mutante de hipusinação (*dys1-1)*

Para investigar o mecanismo pelo qual eIF5A hipusinada está envolvida com a tradução, foram analisadas características dos mRNAs presentes no perfil traducional do mutante *dys1-1,* bem como aqueles que tiveram seu recrutamento para a tradução prejudicado em relação ao selvagem. Dentre os aspectos examinados, o comprimento da ORF e a taxa de início da tradução foram os que se mostraram mais interessantes.

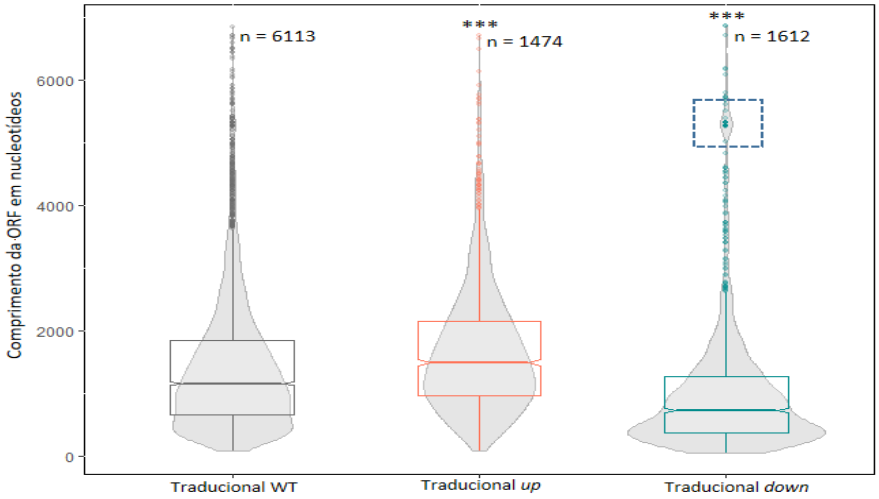
A eficiência traducional de um transcrito é muitas vezes relacionada a seu estado polissomal, ou seja, um transcrito é considerado mais eficientemente traduzido se possuir densidade ribossomal elevada (Li, 2015). Por sua vez, a

quantidade de ribossomos em uma ORF relaciona-se fortemente ao seu comprimento, sendo que a densidade ribossomal de uma ORF diminui conforme aumenta seu comprimento (Arava et al., 2003), o que aponta para um possível controle da tradução dependente do comprimento da ORF. Essa característica é conservada em organismos eucariotos, indicando que esta relação entre comprimento de ORF e densidade ribossomal é subjacente à tradução (Fernandes et al., 2017).

A partir desta informação, o próximo objetivo foi verificar se há diferenças no comprimento dos mRNAs recrutados para a tradução na célula selvagem e mutante *dys1-1*. Constatou-se que, entre as ORFs presentes no perfil traducional do mutante *dys1-1* em relação ao selvagem são ORFs de maior comprimento, ou seja, ORFs maiores estão enriquecendo este componente traducional (figura 11).

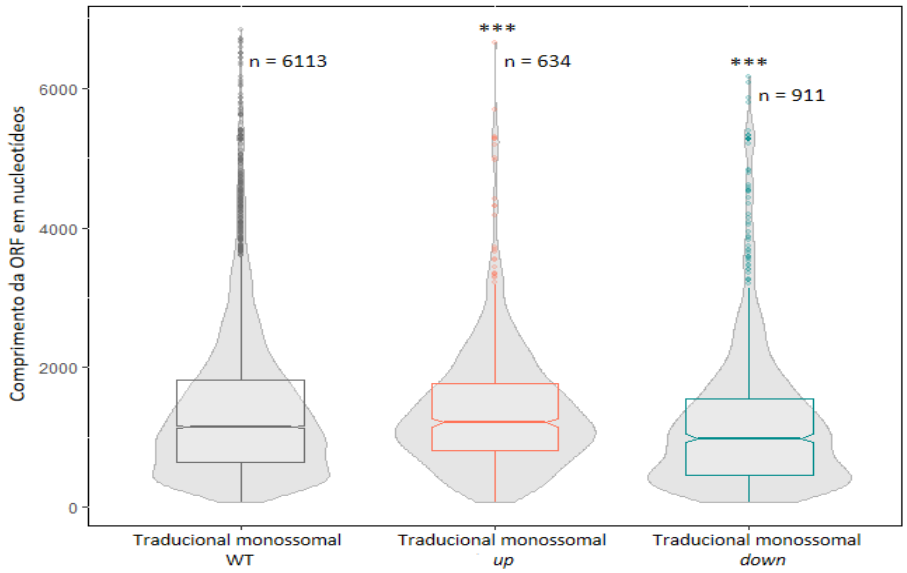
O enriquecimento de ORFs maiores observado no mutante pode sugerir que a tradução destas ORFs maiores esteja mais lenta e por esse motivo os ribossomos se acumulam ao longo do transcrito, formando um polissomo. Paralelamente, o conjunto de genes diminuídos no perfil traducional do mutante *dys1-1* em relação ao selvagem é composto por mRNAs cuja ORF é mais curta (figura 11).

Figura 11 Gráfico de violino do comprimento das ORFs de mRNAs associados a polissomos no perfil traducional. Os gráficos de violino mostram a distribuição das ORFs quanto a seus comprimentos. No primeiro gráfico tem-se a distribuição das ORFs do perfil traducional da célula selvagem. O segundo é composto pelas ORFs que se encontram com aumento de expressão no perfil traducional do mutante dys1-1 e o terceiro, pelas ORFs que tiveram sua expressão diminuída no mesmo perfil do mutante dys1-1, o quadrado pontilhado indica um conjunto de ORFs maiores que se destaca. *** indicam um p-value < 0,001.



Heyer e Moore, 2015, associaram ORFs curtas à atividade de monossomos na elongação da tradução. A diminuição da associação de múltiplos ribossomos em mRNAs com ORFs pequenas nos levou a verificar a possibilidade de que essas ORFs estivessem sendo traduzidas por monossomos. Assim, buscando uma resposta para esta indagação, o comprimento das ORFs presentes no monossomo foi também investigado. Os dados de monossomo são referentes ao mesmo experimento analisado neste trabalho e fazem parte do trabalho de iniciação científica em andamento do aluno Samuel Guariento. Interessantemente, para o perfil traducional de monossomos o mesmo padrão de comprimento foi observado, com a diminuição da tradução de ORFs pequenas, que por pressuposto estariam no monossomo (figura 12). Portanto, este outro resultado confirma que o mutante *dys1-1* está com dificuldades na tradução de ORFs pequenas e seu componente polissomal encontra-se composto por ORFs preferencialmente maiores.

Figura 12 Gráfico de violino do comprimento das ORFs de mRNAs associados a polissomos no perfil traducional. Os gráficos de violino mostram a distribuição do ORFs quanto a seus comprimentos. No primeiro gráfico tem-se a distribuição das ORFs do perfil traducional do monossomo da célula selvagem. O segundo é composto pelas ORFs que se encontram com aumento de expressão no perfil traducional do monossomo do mutante dys1-1 e o terceiro, pelas ORFs tiveram sua expressão diminuída no mesmo perfil do mutante dys1-1. *** indicam um p-value < 0,001.



Apesar de o enriquecimento para ORFs longas ser observado no perfil traducional *up,* chamou-nos a atenção a presença de transcritos de comprimento aproximado de 5000 nucleotídeos (figura 12, destacado). Uma análise de GO foi realizada para este conjunto de 204 genes, retornando um enriquecimento para genes pertencentes ao termo GO:0032197, que se refere à transposição mediada por RNA. De fato, essa GO é composta por 91 genes e 31 destes encontram-se entre ORFs com mais de 4000 nucleotídeos. Além disso, outros 30 genes relacionados a essa ontologia encontram-se *down* no perfil traducional. Curiosamente, em experimentos de perfil transcricional com um mutante de eIF5A sensível a temperatura, foi descrito um aumento de 10% no número de transcritos relacionados ao evento de transposição (Schrader et al., 2006). O perfil transcricional do mutante *dys1-1* não apresentou diferença significativa quando analisada a distribuição do comprimento de ORF entre os componentes *up* e *down* em relação ao selvagem (dado não apresentado). No entanto, verificando as ORFs referentes a GO de elementos transponíveis (91 genes), 51 genes encontram-se diferencialmente expressos, sendo 47 *down* regulados, resultado oposto ao já reportado pela literatura (Schrader et al., 2006).

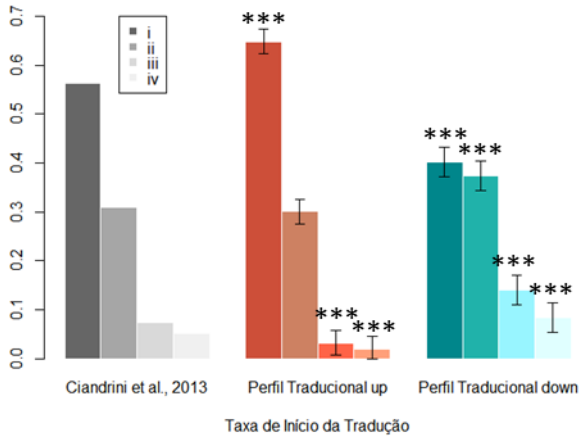
A tradução eficiente de mRNAs curtos relaciona-se à proteína Asc1, que é componente da subunidade ribossomal 40S, de forma que células de levedura com deficiência de Asc1 traduzem menos moléculas de mRNAs curtos do que células selvagens. Estes mRNAs codificam proteínas pequenas que tendem a desempenhar papéis importantes de manutenção na célula (Thompson et al., 2016). Interessantemente, o gene de Asc1, *YMR116C*, encontra-se em níveis normais no perfil transcricional, mas teve sua tradução diminuída no perfil traducional do mutante *dys1-1*. Sabe-se que a mutação de *dys1-1* é sinteticamente letal quando combinada à mutação de *asc1*D e a super expressão de *HYP2* ou *DYS1* é tóxica para uma cepa de *asc1*D (Galvão et al., 2013).

Ainda, este grupo de mRNAs curtos com tradução diminuída em mutantes de Asc1 inclui mRNAs que codificam para proteínas ribossomais citoplasmáticas e mitocondriais. De fato, estudos em mutantes de Asc1 sugerem que esta proteína tem um papel importante na respiração celular (Thompson et al., 2016). Neste sentido, pelo fato de o mRNA de *ASC1* encontrar-se *down* no perfil traducional deste trabalho, uma questão levantada foi como estariam os genes contidos nas GOs relacionadas à subunidades ribossomais mitocondriais (GO:0005762 e GO:0005763). Surpreendentemente, dos 84 genes englobados por essas GOs, 65 encontram-se diferencialmente expressos no perfil traducional sendo que apenas um deles está *up* regulado. Este fato observado sugere que, assim como a falta de Asc1 prejudica a respiração celular, o mutante *dys1-1* também pode ter sua respiração celular prejudicada. Fato semelhante foi encontrado em um estudo recente do laboratório com um mutante de eIF5A sensível à temperatura, assim como com células em que a hipusinação foi bloqueada pela ação do inibidor N 1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) (BARBOSA, N. M., 2019). Neste mesmo trabalho, foi evidenciado o envolvimento de eIF5A com a função mitocondrial, já que em tais condições foi observado um defeito de crescimento em meios com fonte de carbono não fermentável, caracterizando um fenótipo de deficiência respiratória (MELIS et al., 2017; BARBOSA, N. M., 2019).

Uma vez que ORFs grandes tem baixa taxa de início, os dados dos genes diferencialmente expressos no perfil traducional do mutante *dys1-1* descrito neste trabalho, separados quanto ao aumento ou diminuição de expressão e

categorizados segundo sua taxa de iniciação de tradução de acordo com Ciandrini et al. (2013), confirmam um desbalanço quanto a taxa de início de tradução (p < 0,001, teste de chi quadrado) (figura 13). Entre os genes mais expressos no mutante *dys1-1*, houve um enriquecimento na classe i. Em seu trabalho, Ciandrini e colaboradores relataram que os genes desta classificação, que possuem a menor taxa de início, pertencem a GOs envolvidas com tradução, biogênese de ribossomos e processos metabólicos (Ciandrini et al., 2013). O mesmo foi encontrado neste perfil traducional. Entre os termos de GO enriquecidos para os genes *up* regulados encontram-se: biogênese de ribossomos (GO:0042254), processos metabólicos de ácidos nucleicos (GO:0090304) e diversos outros processos metabólicos (GO:0006725, GO:1901360, GO:0016072, GO:0006139, GO:0051170, GO:0009066, GO:0000096, GO:0006555). Interessantemente, o teste de chi quadrado foi também realizado para o perfil transcricional e estes enriquecimentos não foram observados (dados não mostrados).

Figura 13 Histograma da taxa de início de tradução com base naquela estimada por Ciandrini et al, 2013. A partir dos dados de Ciandrini et al, 2013 foi realizado uma projeção de como estaria o comportamento das ORFs com diferentes taxas de início no perfil traducional do mutante dys1-1. A taxa de início foi divida em 4 categorias sendo que a categoria i é de início mais lento e a iv de início mais rápido. *** indicam um p-value < 0,001 para teste de chi quadrado.

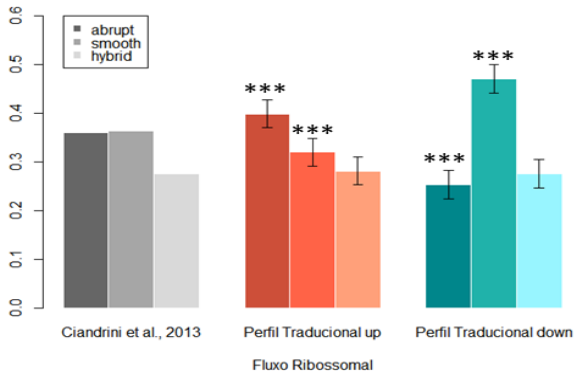


Uma vez que o mutante *dys1-1* está envolvido com um fator de elongação da tradução, os transcritos do perfil traducional deste mutante foram também caracterizados quanto a aspectos desta etapa, como por exemplo o fluxo

ribossomal, probabilidade de enfileiramento ribossomal, presença de pares de códons inibitórios e *motifs* de parada ribossomal.

Durante a tradução, diversos ribossomos podem traduzir o mesmo mRNA de modo a formar-se um tráfego ribossomal, que por sua vez é predito em função da taxa de início da tradução. Os transcritos celulares podem ser subdivididos em três categorias de fluxo ribossomal dependente da taxa de início de tradução: *smooth*, grupo de transcritos que apresentam um aumento gradual do fluxo ribossomal com o aumento da taxa de início; *abrupt,* grupo de transcritos cuja taxa de fluxo ribossomal apresenta um aumento abrupto com o aumento da taxa de início; e *hybrid*, quando as ORFs não apresentam características suficientes para separá-las nos grupos anteriores (Ciandrini et al., 2013) (figura 14). A origem dessas duas categorias de tráfego ribossomal é definida pela disposição dos códons. O comportamento *smooth* se caracteriza em mRNAS que não contém códons raros ou estes estão na extremidade 5', o que faz com que o fluxo ribossomal aconteça de forma fluida. Os transcritos pertencentes à categoria *abrupt* se caracterizam por possuírem em sua sequência códons raros que agem como gargalos e podem levar a formação de filas ribossomais (Ciandrini et al., 2013).

Figura 14 Histograma do fluxo ribossomal divido em categorias de acordo com Ciandrini et al., 2013. No gráfico são identificadas 3 categorias: abrupt, smooth e hybrid. Sequências classificadas como abrupt têm um aumento acentuado no fluxo ribossomal de acordo com o aumento na taxa de início. Por sua vez, sequências do tipo smooth aumentam seu fluxo ribossomal gradualmente de acordo com o aumento da taxa de início. *** indicam um p-value < 0,001 para teste de chi quadrado.



As ORFs enriquecidas no perfil traducional do mutante *dys1-1* são da configuração *abrupt* em detrimento da categoria *smooth* (figura 4D), ou seja, são

ORFs com maior densidade ribossomal, que apresentam alguma característica de parada em sua extensão e estão relacionadas a síntese de proteínas regulatórias, fatores de transcrição e proteínas de ciclo celular (Ciandrini et al., 2013).

O fluxo, a densidade e o enfileiramento ribossomal são aspectos traducionais que se relacionam uma vez que o congestionamento de ribossomos é menos provável de acontecer em transcritos de baixa densidade ribossomal (Diament et al., 2018a). Dessa forma, para o estudo da formação de filas ribossomais no mRNA, foi utilizada uma abordagem experimental e computacional baseada no sequenciamento de áreas englobadas por dois ribossomos em *S. cerevisiae*. Os resultados encontrados para células de levedura em crescimento em meio rico indicam que pausas traducionais ocorrem naturalmente no genoma deste organismo (Diament et al., 2018a).

Leveduras apresentam pontos de parada traducionais, que levam ao enfileiramento ribossomal, ocorrendo de forma frequente em uma dada condição, como uma forma de controle traducional (Diament et al., 2018b), então uma vez que temos um enriquecimento de ORFs com maior densidade ribossomal no mutante *dys1-1*, um novo ponto em questão foi investigar se estes transcritos apresentavam maior probabilidade de formação de filas ribossomais. Interessantemente, o perfil traducional do mutante *dys1-1* encontra-se enriquecido com ORFs com menor probabilida

O estudo de Diament e colaboradores (Diament et al., 2018b) leva em conta todos os tipos de paradas ribossomais em uma projeção computacional baseada em experimentos biológicos e a partir da comparação com o perfil traducional deste trabalho com o mutante *dys1-1* em relação ao selvagem, observa-se um enriquecimento para ORFs com baixa probabilidade de ocorrência de filas ribossomais.

Em contrapartida, o enriquecimento para a classe *abrupt* de fluxo ribossomal (figura 14) indica uma necessidade de eIF5A ativa e hipusinada para aliviar a formação de engarrafamentos de ribossomos. Nesse mesmo sentido, Gamble e colaboradores (Gamble et al., 2016) realizaram um estudo que aponta que a presença de dois códons específicos poderia modular a tradução em

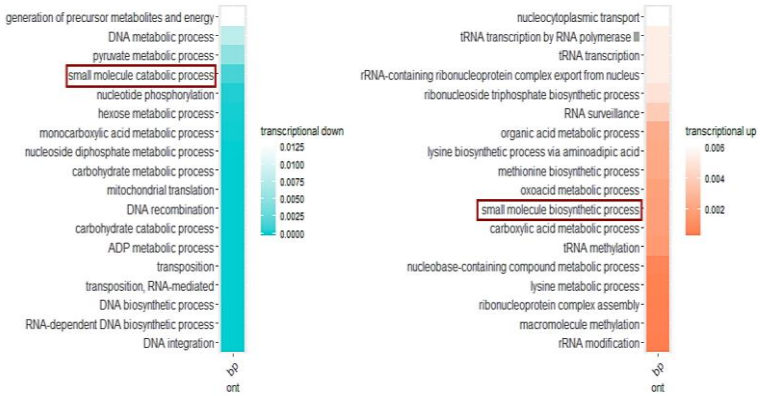
levedura. O trabalho indica 22 pares de códons que teriam esse poder de inibir a tradução. Uma varredura nos dados do perfil traducional do mutante *dys1-1* foi realizada buscando a presença de tais códons entre os genes *up* regulados porém nenhum enriquecimento foi encontrado.

Assim, nossos resultados podem sugerir que, sendo que algumas paradas ribossomais são ferramentas evolutivas para diminuir ou tornar mais lenta a tradução de algumas ORFs (Diament et al., 2018b), eIF5A não é recrutada para aliviar esse tipo de parada ribossomal.

4.1.3.4 Genes Envolvidos com a Via de Poliaminas

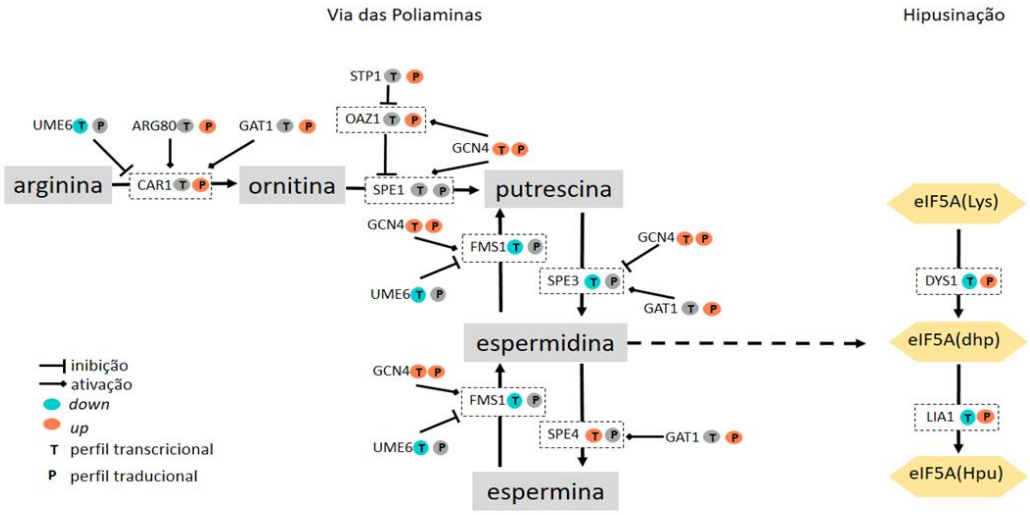
Tendo em vista que a espermidina é uma poliamina com papel importante na hipusinação, o mutante *dys1-1* estudado neste projeto relaciona-se à via biossintética das poliaminas. De fato, a partir da GO dos genes diferencialmente expressos no perfil transcricional, observou-se enriquecimento para o termo "catabolismo de moléculas pequenas" (GO:0044283) para os transcritos que tiveram sua expressão diminuída (figura 16) e genes envolvidos com a "biossíntese de moléculas pequenas" (GO:0044283) (figura 15), bem como enriquecimento estatístico para a via de biossíntese de arginina entre os mais transcritos no mutante *dys1-1*.

Figura 15 Ontologia genética dos genes diferencialmente expressos no perfil transcricional do mutante dys1-1. A análise da GO dos genes transcricionalmente regulados apresentou termos envolvendo processos de moléculas pequenas entre os genes up e down regulados.



A arginina relaciona-se à via das poliaminas sendo precursora da ornitina que, por sua vez, é descarboxilada gerando putrescina, primeira peça da via das poliaminas. A partir dos rastreamentos de larga escala do mutante *dys1-1* observamos que o nível de expressão da maioria dos genes envolvidos nesta rota biossintética e os fatores de transcrição que atuam sobre eles encontram-se alterados (figura 16). Assim sendo, verificamos se a mutação causa algum efeito nos níveis de expressão gênica dos genes envolvidos com essa via metabólica

Figura 16 Representação da via biossintética das poliaminas e hipusinação. Na figura tem-se representada a via das poliaminas bem como os genes envolvidos com as modificações, caracterizados pelos níveis de expressão dos dois perfis de larga escala analisados neste trabalho. Encontram-se também indicados os fatores de transcrição que tiveram sua expressão alterada no mutante dys1-1.

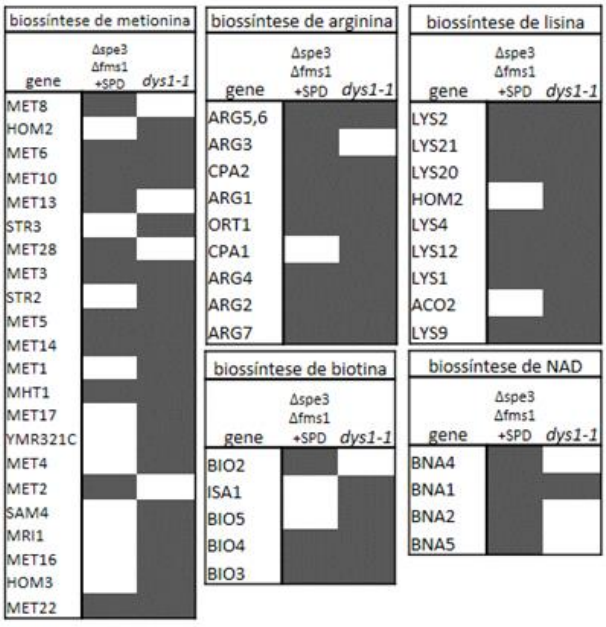


Dentre as enzimas reguladoras da biossíntese de poliaminas, destaca-se a antizima (gene *OAZ1*), inibidora do produto do gene *SPE1*, o qual codifica a enzima responsável pela conversão de ornitina a putrescina (ornitina descarboxilase). A tradução completa do mRNA de *OAZ1* é dependente de um *frameshift* traducional induzido por poliaminas, ocorrendo quando há um aumento nos níveis intracelulares destas moléculas. Especialmente, a espermidina foi descrita como um fator que estimula fortemente este evento (Rato et al., 2011). As altas concentrações de poliaminas na célula também inibem a degradação da proteína Oaz1 (Kurian et al., 2011). No contexto *frameshift,* 8 genes são englobados pelas GOs "*frameshift* traducional" e

“regulação negativa de *frameshift* traducional” (GO:0006452 e GO:2001125, respectivamente) e destes, 6 encontram-se diferencialmente expressos no perfil traducional do mutante *dys1-1,* sendo que 5 encontram-se *down.* O único gene destas listas que se encontra *up* regulado é o gene *OAZ1*.

Em 2018, Ivanov e colaboradores observaram que, em células de mamíferos, a redução de hipusinação mimetiza um efeito de acúmulo de poliaminas (Ivanov et al., 2018). Com a redução da hipusinação causada pelo mutante *dys1-1*, é provável que esteja havendo um acúmulo de espermidina na célula. Para verificar a ocorrência desse desbalanço de poliaminas, comparamos os dados do perfil transcricional de *dys1-1* a dados de *microarray* de duplo mutante de espermidina sintase e espermidina oxidase (*Δspe3* Δ*fms1*) tratados com excesso de espermidina (10^{-5} M). Nesse trabalho, Chattopadhyay e colaboradores (2009) verificaram que, em comparação à adição de espermina, no perfil transcricional global, a espermidina apresenta uma maior regulação na expressão gênica. Além disso, foram identificados genes com expressão aumentada envolvidos na biossíntese de metionina, arginina, lisina, NAD e biotina. Paralelamente, foi observado no mutante *dys1-1* genes dessas vias também com aumento de expressão (figura 17).

Figura 17 Espermidina e falta de hipusinação induzem genes envolvidos com metabolismo de metionina, arginina e lisina. As tabelas indicam os genes envolvidos nas vias biossíntéticas citadas. O destaque em cinza indica que neste perfil a expressão do gene encontra-se diferencialmente aumentada.



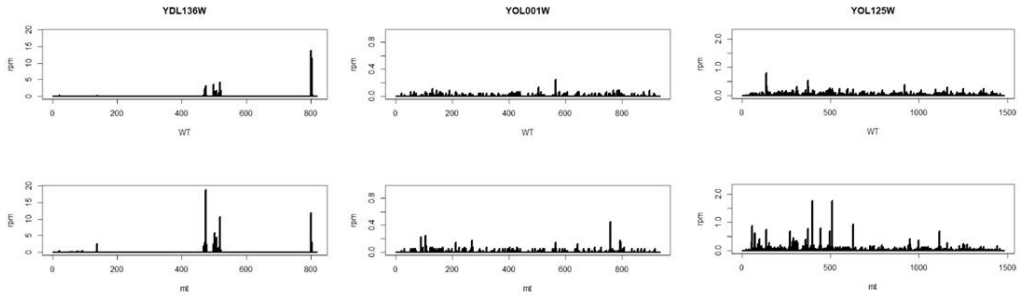
Além das vias biossintéticas mencionadas, observou-se também que o tratamento das células com espermidina aumentou a expressão de diversos genes relacionados a transporte. Na GO para transporte iônico de cobre, por exemplo, estão compreendidos 12 genes e, destes, 8 encontram-se diferencialmente expressos no perfil traducional do mutante *dys1-1*. Para o transporte de magnésio, uma situação semelhante é observada. Dos 5 genes englobados por esse termo de GO, 2 apresentam diferença de expressão no perfil traducional sendo um deles o gene Alr1, que teve sua expressão aumentada. Em 2019, Hanner e colaboradores propuseram que este gene é responsável pelo aumento dos níveis celulares de magnésio em células deficientes de poliaminas (Hanner et al., 2019).

Altas taxas de poliaminas na célula contribuem para a indução de uma parada ribossomal pois eIF5A e poliaminas competem pelo mesmo sítio de associação ao ribossomo (Venkataramanan & Floor, 2018). O enfileiramento ribossomal causado por esta parada, frequentemente observada em *motif* Pro-Pro-Trp (PPW) (Ivanov et al., 2018), promove a iniciação em códons de início que se localizam *upstream* à ORF principal (uORFs). Dessa forma, buscamos analisar se o possível desbalanço de poliaminas gerado pela não hipusinação de eIF5A do mutante *dys1-1* teria influência global sobre uORFs, mas não foi constatado um enriquecimento para esta situação. No entanto, das 5 uORFs com *motifs* PPW presentes em levedura, 3 apresentam-se diferencialmente expressas no perfil traducional: *RPL35B* (*YDL136W*), *PHO80* (*YOL001W*) e *TRM13* (*YOL125W*).

RPL35B codifica para uma proteína ribossomal da subunidade 60S e *PHO80* codifica para uma ciclina que regula a resposta a níveis de nutrientes e condições ambientais. Esses dois genes tiveram sua expressão diminuída no perfil traducional e possuem uma parada ribossomal no início de sua ORF (figura 5D). Já *TRM13*, que codifica para uma tRNA metiltransferase, teve sua expressão aumentada no perfil traducional e possui diversas paradas ribossomais, no entanto a mais proeminente que diferencia o mutante do selvagem é identificada na porção mediana de sua ORF (figura 19). A diminuição destes dois genes no perfil traducional pode ser reflexo de uma limitação da técnica, já que a existência de uma parada ribossomal no início da ORF pode ter

impedido a formação de um polissomo. Além disso, a detecção de um aumento de *TRM13* não significa que de fato esta ORF foi mais traduzida, já que foi identificada uma parada ribossomal nesta.

Figura 18 Simulação da ocupação ribossomal a partir da reanálise dos dados da referência SCHULLER et al., 2017. O mutante aqui considerado é o chamado eIF5Ad descrito na mesma referência. Pelos gráficos pode-se observar as paradas ribossomais ao longo da ORF.



Ainda sobre a relação de poliaminas e hipusinação, o gene *GCN4* apresenta-se como um ponto de destaque, tendo ação sobre 4 outros genes da via biossintética de poliaminas e, por se encontrar *up* regulado em ambos perfis transcricicional e traducional (figura 5A). O mRNA de *GCN4* possui 4 uORFs. Essa configuração tem papel importante no controle traducional pelo qual *GCN4* passa, que é exercido por proteínas que possuem função geral no início da síntese proteica, como é o caso de eIF2. Este fator de início de tradução forma o complexo ternário (TC) juntamente com tRNA aminoacilado e GTP e, em situações de baixos níveis de nutrientes, a quinase eIF2α fosforila eIF2, diminuindo sua capacidade de ligação a GTP, que é estimulada por eIF2B. A diminuição da formação do complexo ternário resulta em uma lentidão na ligação do tRNA à subunidade 40S, fazendo com que o códon iniciador das uORFs não sejam reconhecidos, favorecendo a tradução de *GCN4* (Hinnebusch, 2005).

Em levedura, a adição de espermidina também resultou em efeitos indiretos sobre a expressão de alguns genes, uma vez que 12 fatores de transcrição apresentaram-se significativamente aumentados (CHATTOPADHYAY et al., 2009). A comparação entre os fatores aumentados no perfil traducional de *dys1-1* e os da referência (CHATTOPADHYAY et al., 2009) indica a coincidência de 6: Nrg2, Ino2, Gat1, Pho4, Tfc4 e Tea1; o que nos leva a crer que uma fração dos genes diferencialmente expressos no perfil transcricional seja devido à alteração de expressão destes fatores.

Ainda, entre os genes que tiveram sua expressão diminuída encontram-se genes que codificam para fatores de transcrição. De fato, 33 fatores de transcrição têm efeito sobre os genes *down* regulados no perfil transcricional e destes, 9 encontram-se menos expressos no perfil traducional. Já sobre os genes mais expressos transcricionalmente, são 22 fatores de transcrição que possuem efeito. Destes, 10 encontram-se diferencialmente expressos no perfil traducional enquanto 7 estão *up* regulados.

O gene *CAR1*, cuja expressão foi positivamente afetada no perfil traducional pela mutação do *dys1-1*, é co-regulado transcricionalmente pelos fatores Ume6 e Gat1. Enquanto Ume6 (*down* regulado no perfil transcricional), inibe a transcrição de *CAR1*, *GAT1* (*up* regulado no perfil traducional), ativa a transcrição deste gene. O mesmo é observado para o gene *FMS1*, que tem sua transcrição inibida por Ume6 e Gcn4 (*up* regulado no perfil transcricional e traducional), levando a uma observada diminuição na transcrição de *FMS1. GCN4* inibe também *SPE3* que se encontra *down* no perfil transcricional. Por sua vez, Gat1 ativa esse gene.

Finalmente, considerando que a maioria dos genes da via de biossíntese de poliaminas, bem os fatores de transcrição envolvidos apresentam alteração de expressão em ambos os perfis do mutante *dys1-1,* com destaque para o gene OAZ1 que se encontra *up* regulado no perfil traducional, constatando coincidências deste rastreamento com o realizado com células tratadas com espermidina e o aumento de transcritos que possuem uORFs com *motifs* de PPW concluímos que este mutante apresenta um desbalanço de poliaminas e, consequentemente, assim como observado em mamíferos, em *S. cerevisiae* a diminuição da hipusinação mimetiza o efeito do excesso de poliamina na célula.

4.2 Respostas transcricionais e traducionais em larga escala do mutante de hyp2-1 (ts) de *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 Introdução

A tradução, processo pelo qual o código de RNAs mensageiros (mRNA) é convertido para a sequência de aminoácidos de uma proteína, ocorre no ribossomo, na presença de RNAs de transferência (tRNA) carregados de aminoácidos e fatores proteicos solúveis e específicos (Sasikumar et al., 2012). É um processo altamente conservado ao longo da evolução (Shirokikh & Preiss, 2018) e subdividido em iniciação, elongação, terminação e reciclagem ribossomal (Dever et al., 2016).

Além dos fatores canônicos eEF1A e eEF2 (e seus ortólogos em procariontes EF-Tu e EF-G, respectivamente), o fator de elongação eIF5A (homólogo estrutural de EF-P) também é encontrado durante a tradução, sendo este preservado entre eucariotos e bactérias ((Chen & Liu, 1997; Dever et al., 2018; Rossi et al., 2014; Schnier et al., 1991). No entanto, enquanto EF-P não é essencial em muitas bactérias, eIF5A é um fator essencial em todos os eucariotos testados, possivelmente, por apresentar uma função mais geral do que EF-P durante a tradução (Buskirk & Green, 2017).

eIF5A caracteriza-se por ser uma proteína pequena, constituída por apenas 157 resíduos de aminoácidos e, apesar de seu papel essencial nos eucariotos, apresenta um efeito direto na tradução global entre 30-75% (Henderson & Hershey, 2011; Kang & Hershey, 1994). Outra característica de eIF5A é a hipusinação, uma modificação pós-traducional de um resíduo específico de lisina promovida por duas enzimas altamente conservadas, a desoxi-hipusina sintase (Dys1) e a desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1) (Mathews & Hershey, 2015; Nakanishi & Cleveland, 2016). A hipusina é um aminoácido exclusivo e essencial da proteína eIF5A (Dever et al., 2014; Park et al., 1981).

Em relação à função traducional de eIF5A, muitas foram as hipóteses sobre o seu comportamento específico. Em 2006, Zanelli e colaboradores, ao realizarem experimentos em *S. cerevisiae* demonstraram a interação de eIF5A

com o complexo 80S e o fator de elongação eEF2, confirmando seu papel na elongação da tradução, assim como posteriormente demonstrado com ensaios complementares e independentes, por Greggio e colaboradores (2009) e por Saini e colaboradores (2009), que neste mesmo trabalho verificou uma influência de eIF5A em eventos de mudança de fase de leitura. Em 2013, Gutierrez e colaboradores, ao utilizarem ensaios *in vivo* em levedura e ensaios *in vitro*, que reconstituem o processo traducional, propuseram uma necessidade específica de eIF5A para resolver o *stalling* (atraso/parada) dos ribossomos em regiões que apresentam resíduos de prolina consecutivos, assim como demonstrado anteriormente para EF-P (Doerfel et al., 2013; Ude et al., 2013). Sabendo-se que ambos EF-P e eIF5A se associam ao ribossomo através do sítio E, a dissociação dos tRNAs do sítio E podem servir como um sinal de que a tradução está lenta e, portanto, que necessita intervenção (Buskirk & Green, 2017).

Estudos de Pelechano e Alepuz (2017) (ribosome profiling / RiboSeq / 5PSeq) e de Schuller e colaboradores (2017) (ribosome profiling / RiboSeq / 5PSeq), a partir de técnicas de sequenciamento em larga escala de fragmentos de RNAs protegidos pelo ribossomo, mostraram a atuação de eIF5A na tradução de *motifs* não somente enriquecidos com prolinas, mas também, em glicina e resíduos de aminoácidos carregados. Tais resultados confirmam a participação de eIF5A na elongação ao estimular a ligação peptídica em pontos de *stalling* do ribossomo. Além disso, estes estudos apontam para um acúmulo de ribossomos em *stop* códons de células deficientes de eIF5A, evidenciando uma função de eIF5A no término da tradução.

Diferentes técnicas são dedicadas ao estudo específico de mRNAs recrutados para a tradução. Entre elas, o perfil polissomal é a mais comum. Esta técnica baseia-se na separação de mRNAs que se encontram associados a polissomos, de mRNAs livres de ribossomo (Chassé et al., 2017). A composição desses mRNAs é determinada por técnicas de perfil de expressão gênica em larga escala, como análises de *microarray* e RNASeq (Piccirillo et al., 2014). Tais metodologias têm possibilitado tanto comparações quantitativas detalhadas dos níveis de mRNA total em muitos organismos, denominadas de transcriptomas, ou perfil transcricional e, quando associadas a análises de síntese proteica,

como o perfil polissomal, também permitem a avaliação em larga escala de mRNAs recrutados para a tradução.

Por ser um fator envolvido na tradução, a depleção de eIF5A acarreta em defeitos na síntese proteica. Esse processo celular, extremamente complexo e altamente regulado, relaciona-se à expressão gênica, sendo um componente crucial para o seu controle. Uma vez que a tradução tem um papel importante na modulação da expressão de muitos genes que respondem a sinais endógenos ou exógenos, a depleção de eIF5A implica em modificações de expressão em múltiplos processos celulares.

Além da tradução, a via regulatória da expressão gênica é composta por diversas etapas, como mecanismos epigenéticos, transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais. Cada estágio dessa regulação pode contribuir para o conjunto de proteínas expressas em determinado tipo celular. Dentre mecanismos pós-transcricionais, a expressão gênica pode ser modulada pelo controle do *splicing*, da exportação de mRNA do núcleo para o citosol, da estabilidade do mRNA no citosol e da tradução do mRNA em proteínas e, como exemplos de mecanismos pós-traducionais, há também a degradação proteica (Chassé et al., 2017; Piccirillo et al., 2014).

Frente às novas hipóteses sobre o papel de eIF5A, dados obtidos pelo método de perfil polissomal em larga escala do mutante *hyp2-1* de eIF5A de *S. cerevisiae* geraram resultados em relação à influência da mutação no perfil traducional.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Extração dos dados brutos.

Imagens do ensaio de *microarray* de duas cores desenvolvido na tese de doutorado do Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli (https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100606/zanelli_cf_dr_araiq.pdf?sequence=1&isAllowed=y) foram reanalisadas. Este experimento possui triplicatas biológicas de extrato total de RNA das linhagens selvagem e mutante *hyp2-1* (mutante que induz depleção de eIF5A) em situações experimentais de temperatura restritiva (37ºC) e permissiva (25ºC). Todas as lâminas de *microarray* foram escaneadas pelo equipamento 4200B (*Molecular Devices*. O *software GenePix Pro* versão 3 (*Axon Instruments*) foi utilizado para a extração dos dados.

4.2.2.2 Análise de dados de microarray*.*

O fluxo de análises dos dados brutos de *microarray* seguiu os passos: normalização pelo *background*, normalização dentro do *array*, normalização entre os *arrays*, construção de matrizes de contraste e identificação de genes diferencialmente expressos, realizados no *software R,* com o pacote *limma* (Ritchie et al., 2015). Para identificar genes diferencialmente expressos, a análise estatística presente no *limma* utiliza um método empírico bayesiano que pondera os erros padrão das diferenças entre as condições comparadas. A diferença de expressão de um gene entre duas condições foi representada pelo *fold change* (FC) e a significância foi determinada utilizando um limite de *p-value* de 0,01.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Respostas transcricionais e traducionais do mutante de eIF5A (*hyp2-1*) em *S. cerevisiae*

Este estudo traz dados de um experimento de perfil polissomal associado a *microarray*. A junção das duas técnicas traz dados de um perfil traducional do mutante *hyp2-1*. O experimento de *microarray* em questão é de duas cores, portanto os *arrays* devem ser normalizados internamente e entre si. Pode-se observar a variação das cores após a normalização de Loess dentro do *array* e após a normalização entre *arrays* (figura 20). A partir dessas normalizações os dados das réplicas de todas as situações experimentais tornam-se comparáveis entre si. O gráfico PCA foi confeccionado para que se tornasse possível a identificação de padrões de comportamento entre as réplicas (figura 21). Esse modelo de gráfico auxilia no reconhecimento de características em comum pela obtenção de combinações de valores de expressão gênica que melhor diferencia as amostras.

Figura 19 Distribuição dos valores de fluorescência antes e após normalização entre arrays. Gráficos de distribuição dos valores de fluorescência antes e após normalização entre arrays. A linha vermelha (R, red) representa a distribuição de intensidade do fluoróforo Cy5 e a linha verde (G, green), do fluoróforo Cy3 por todo o array. À esquerda, os 12 arrays deste estudo estão apenas normalizados internamente, sendo que o perfil de distribuição de cada amostra de um determinado array encontra-se pareado. À direita, após a normalização entre arrays, as 24 amostras, apresentam o mesmo perfil de distribuição.

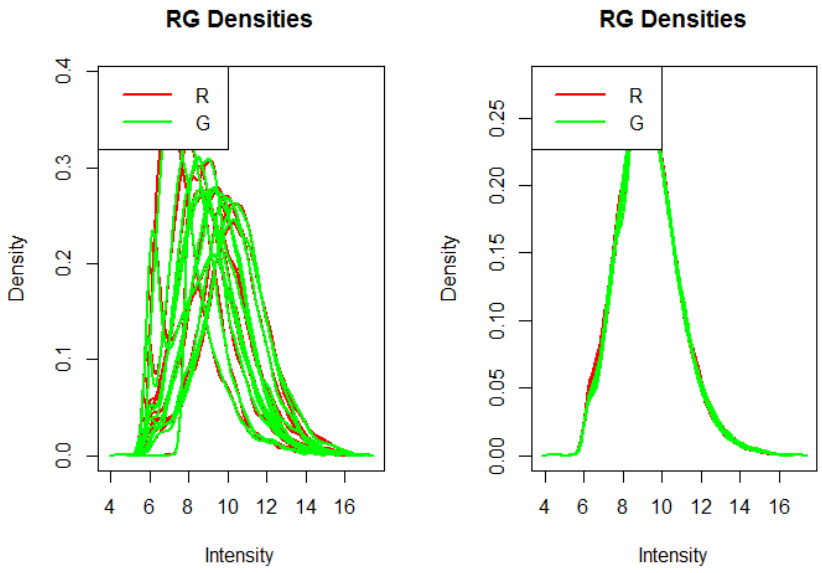
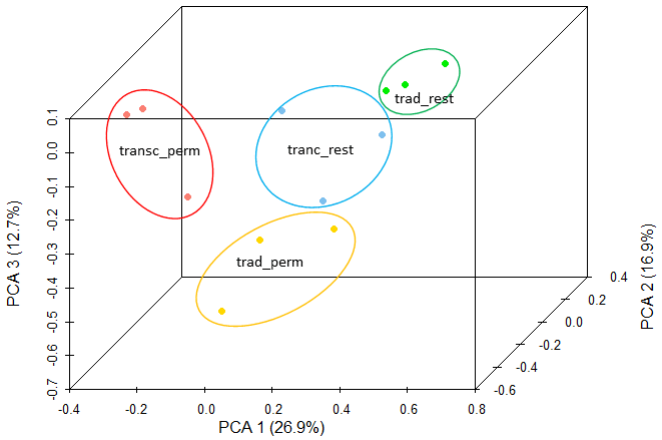


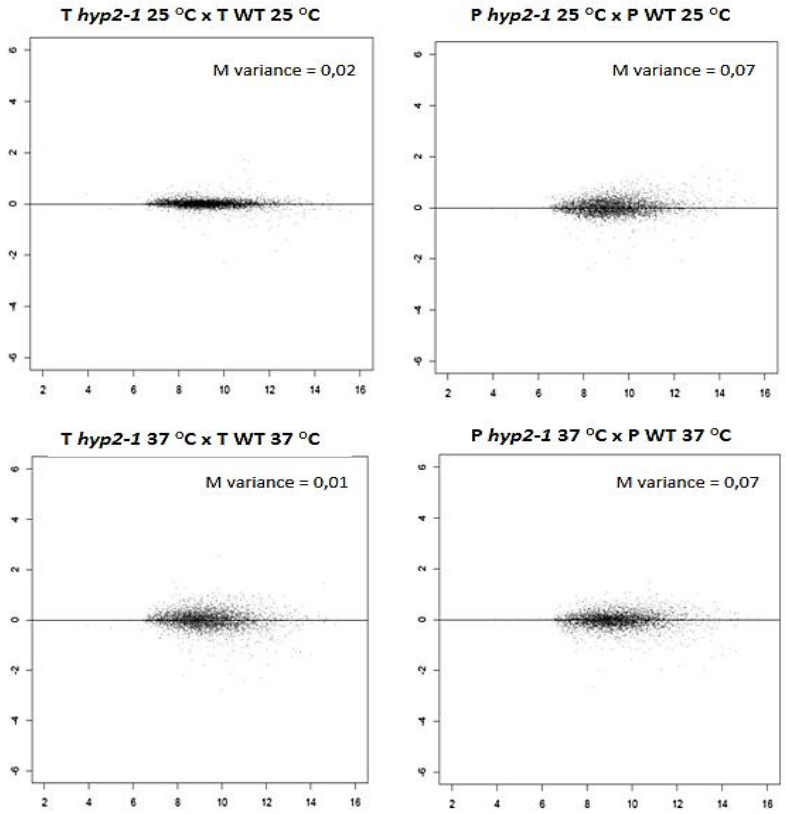
Figura 20 Gráfico PCA indicando a distribuição das réplicas nos planos. Cada ponto representa uma réplica dos perfis analisados. Gráfico de distribuição dos arrays ao longo dos três componentes principais, a partir dos valores normalizados de microarray.



A construção de gráficos MA para os dados de expressão gênica relativa, plota no eixo x a diferença da expressão gênica entre as linhagens e no eixo y a média dessa expressão. Uma forma de mensurar a diferença de expressão global entre duas condições é calcular a variância de M que, quando próxima a 0, indica que a maioria dos genes das linhagens comparadas não apresenta grandes diferenças de expressão. A não observância de uma variação de M pode ser interpretada por uma amplitude de variação entre os genes não muito elevada, no entanto, essa variação pode ser estatisticamente relevante.

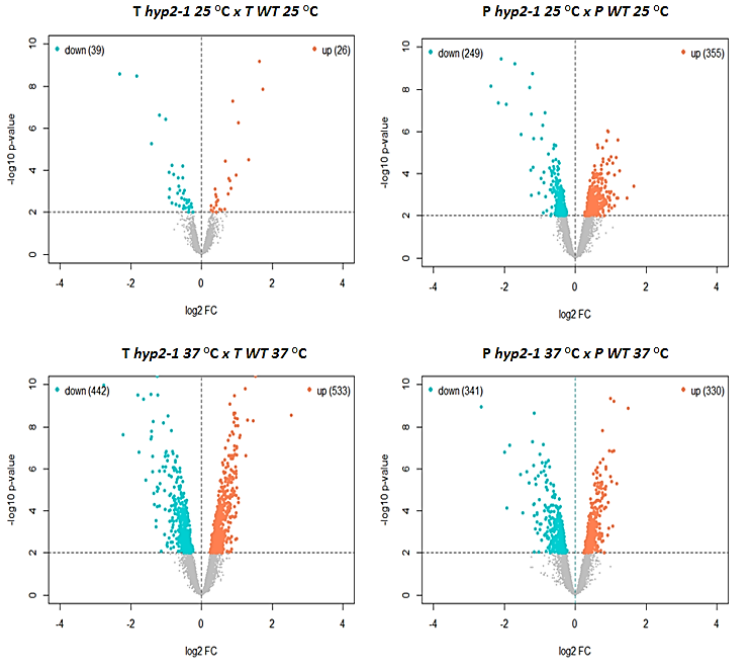
Prosseguindo com as análises, considerando o contraste entre selvagem (WT) e mutante *hyp2-1* separadamente nos perfis, transcricional (T) e traducional (P), e temperaturas de crescimento, permissiva (25 ºC) e restritiva (37 ºC), é possível observar que, de maneira global o efeito da mutação, em qualquer condição experimental, gera baixa amplitudade de variação (figura 22).

Figura 21 Gráficos MA, cada um comparando duas situações experimentais. Os valores de M são plotados no eixo y e resultam de log_2[mt/WT]. Portanto, M é igual a 0 quando os valores de expressão gênica entre as duas linhagens são semelhantes. Os valores de A são plotados no eixo x e resultam de 0,5*(log_2[mt] + log_2[WT]), esta é a média das intensidades entre os dois arrays. Em cada gráfico tem-se anotado, no canto superior direito, o valor da variação de M naquele contexto. Neste conjunto de gráficos pode-se observar que a variação de M se aproxima de 0 quando as linhagens selvagem e mutante são comparadas na mesma temperatura.



Finalizando as análises, tendo os valores de FC e os valores estatísticos associados a essa diferença. Os *volcano plots* evidenciam os genes diferencialmente expressos (*p-value* < 0,01) entre mutante e selvagem em cada situação experimental (figura 23). Pode-se depreender a partir dos *volcano plots* que quando comparados entre temperaturas de crescimento, ambos perfis apresentam maior quantidade de genes diferencialmente expressos na condição restritiva.

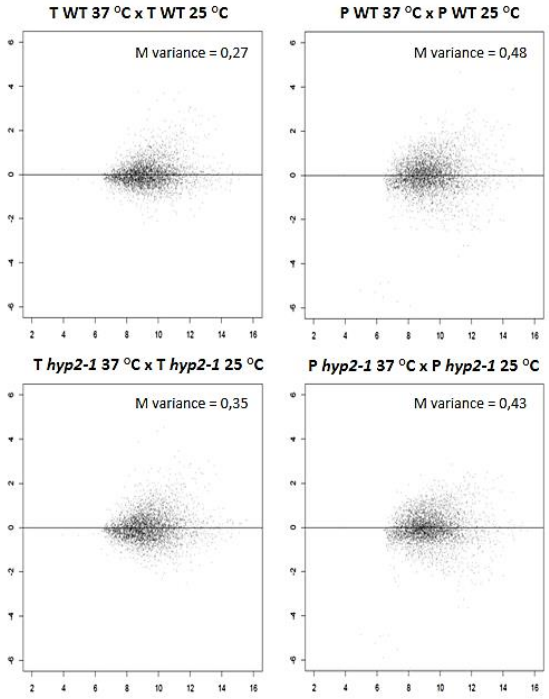
Figura 22 Volcano plot das situações experimentais dos ensaios de microarray. A linha horizontal tracejada indica um p-value de 0,01. Genes diferencialmente expressos com nível de expressão menor no mt estão representados em azul e genes diferencialmente expressos com nível de expressão maior no mt estão representados em laranja.



4.2.3.2 Comparação dos perfis transcricional e traducional das linhagens selvagem e mutante *hyp2-1* nas temperaturas permissiva e restritiva

Buscando entender por quais adaptações as células selvagens e mutantes passam com a troca de temperatura de crescimento, foram analisados os contrastes entre temperatura restritiva e permissiva, das linhagens selvagem e mutante *hyp2-1* separadamente nos perfis transcricional (T) e traducional (P). Foi possível observar que, de maneira global, há uma amplitude de variação elevada para o efeito da temperatura em ambas linhagens e perfis, como apresentado nos gráficos MA (figura 23).

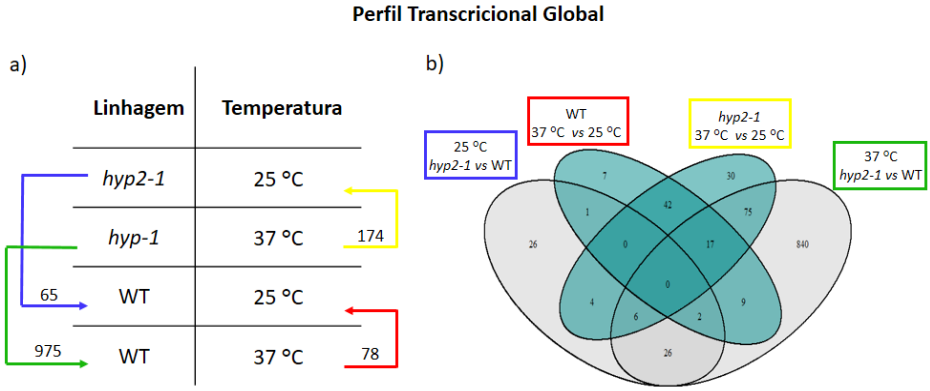
Figura 23 Gráficos MA, cada um comparando duas situações experimentais. Neste conjunto de gráficos pode-se observar que a variação de M se distancia de 0 quando as temperaturas restritiva e permissiva são comparadas na mesma linhagem.



Esta variação global pode ser explicada pelo fato de que o aumento na temperatura ocasiona mudanças na programação da expressão gênica, o que consiste em uma modificação imediata na transcrição de “genes de resposta precoce ao estresse” (*environmental stress response, ESR*). Essa é uma resposta comum a diversos tipos de estresses e é seguida por alterações na expressão de genes especificamente relacionados à resposta ao estresse térmico (Caspeta et al., 2016).

Com relação à resposta celular das duas linhagens frente a um estresse térmico, a Figura 25 apresenta uma análise quantitativa dos genes diferencialmente expressos no perfil transcricional. Na Figura 25a encontram-se esquematizados os contrastes entre selvagem e mutante na mesma temperatura e as comparações das linhagens separadamente quando há mudança na temperatura de cultivo. Na Figura 25b, o diagrama de Venn relaciona os genes que se encontram com diferença de expressão no perfil transcricional.

Figura 24 Número de genes com diferença de expressão significante (p<0,01) nas comparações relevantes. O esquema em A é representativo dos contrastes estudados: mt 25ºC vs WT 25ºC (seta azul), mt 37ºC vs WT 37ºC (seta verde), mtpt vs mtrt (seta amarela) e WTpt vs WTrt (seta vermelha). Em B, o diagrama de Venn simboliza grafica e numericamente os genes diferencialmente expressos e como os conjuntos de dados se relacionam entre si. Abreviações: WT: selvagem, mt: mutante, T: perfil transcricional, P: perfil traducional (P), pt: temperatura permissiva, rt: temperatura restritiva.



A partir dos números apresentados no diagrama pode-se dizer que a mudança na temperatura, de 25ºC para 37ºC, resultou na diferença de expressão de 78 genes no selvagem e 174 no mutante. Destes, 59 são coincidentes entre as duas linhagens, sendo que 27 deles já foram relatados em trabalhos anteriores por terem expressão aumentada no cultivo a 37ºC. Entre estes encontra-se o gene *HSP26*, que desempenha um papel importante nas vias que defendem a célula contra estresses ambientais suprimindo a agregação de proteínas mal enoveladas; o gene *HSP12,* que está envolvido na organização da membrana; o gene *COX5B*, subunidade Vb da citocromo c oxidase, que constitui o membro terminal da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna mitochondrial e o gene *VHS1*, que tem um papel sugerido na progressão da fase do ciclo cellular G1/S (Halbeisen & Gerber, 2009). Esse fato se alinha com resultados encontrados em outro estudo a respeito de genes *ESR* em que foi observado que células de *S. cerevisiae* respondem a alterações no ambiente adaptando a expressão gênica para um perfil que seja mais adequado às necessidades bioquímicas e estruturais celulares para a nova condição ambiental (Gasch et al., 2000).

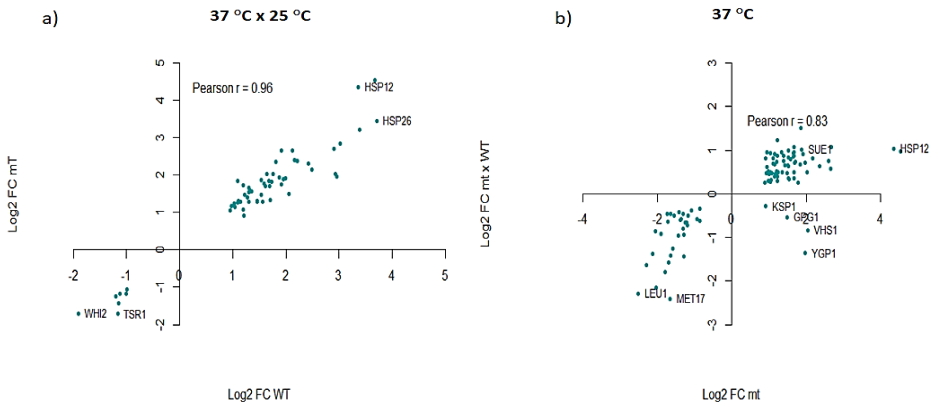
Além disso, tais genes se comportam de maneira equivalente em direção e magnitude, indicando que células selvagens e mutantes passam por adaptações similares para esse tipo de estresse, essa observação foi confirmada

com a correlação dos *fold changes* (Figura 25a). No entanto, a linhagem mutante apresenta mecanismos particulares de resposta a esse estresse, sendo 115 genes diferencialmente expressos exclusivamente nesta linhagem com a mudança na temperatura. Entre estes, encontram-se genes envolvidos no processamento metabólico de aminoácidos (GO:0006520, como: *GCV3*, *BAT1*, *SAM2*,).

Quando ambas linhagens são comparadas na temperatura restritiva, a quantidade de genes diferencialmente expressos é considerável, sendo um total de 975. Todavia, 98 desses genes devem ser considerados como uma resposta do mutante à temperatura elevada, já que também se encontram com diferença de expressão quando as células mutante e selvagem são analisadas separadamente em relação à troca de temperatura (81 e 17 genes, respectivamente). Este conjunto de genes, em sua maioria, se comporta de maneira semelhante em direção e magnitude (Figura 25b).

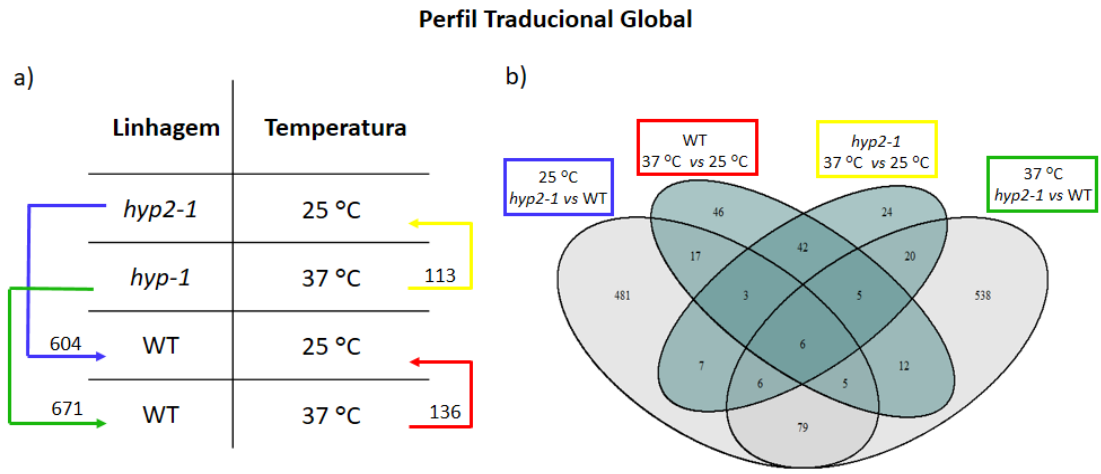
Quando analisado o efeito da mutação no perfil transcricional da célula, observou-se que a maioria dos genes encontrados como diferencialmente expressos na temperatura permissiva é coincidente com genes também diferencialmente expressos na temperatura restritiva, sendo que 31 possuem diferença de expressão na temperatura permissiva, exclusivamente. Por esse motivo, as análises posteriores serão realizadas nos dados referentes à temperatura restritiva.

Figura 25 Correlação de Pearson da expressão global de conjuntos de genes diferencialmente expressos. a) genes diferencialmente expressos no selvagem e mutante quando há troca de temperatura de 25ºC para 37ºC possuem elevada correlação entre si; b) genes diferencialmente expressos no mutante e no contraste do mutante pelo selvagem, na temperatura restritiva, possuem alta correlação entre si.



Para o perfil traducional, independentemente se em temperatura permissiva ou restritiva, a maior mudança que pode ser observada ocorre quando comparados selvagem e mutante. A Figura 26 apresenta o mesmo esquema presente na Figura 24, agora para o perfil traducional.

Figura 26 Número de genes com diferença de expressão significante (p<0,01) nas comparações relevantes. O esquema em A é representativo dos contrastes estudados: mtpt vs WTpt (seta azul), mtrt vs WTrt (seta verde), mtpt vs mtrt (seta amarela) e WTpt vs WTrt (seta vermelha). Em B, o diagrama de Venn simboliza gráfica e numericamente os genes diferencialmente expressos e como os conjuntos de dados se relacionam entre si. Abreviações: WT: selvagem, mt: mutante, T: perfil transcricional, P: perfil traducional (P), pt: temperatura permissiva, rt: temperatura restritiva.



Nesse contexto, 96 genes são coincidentes quando o contraste do mutante pelo selvagem na temperatura permissiva é comparado ao mesmo contraste na temperatura restritiva. Ainda, em tal comparação, 481 e 538 genes são diferencialmente expressos na temperatura permissiva e restritiva, respectivamente.

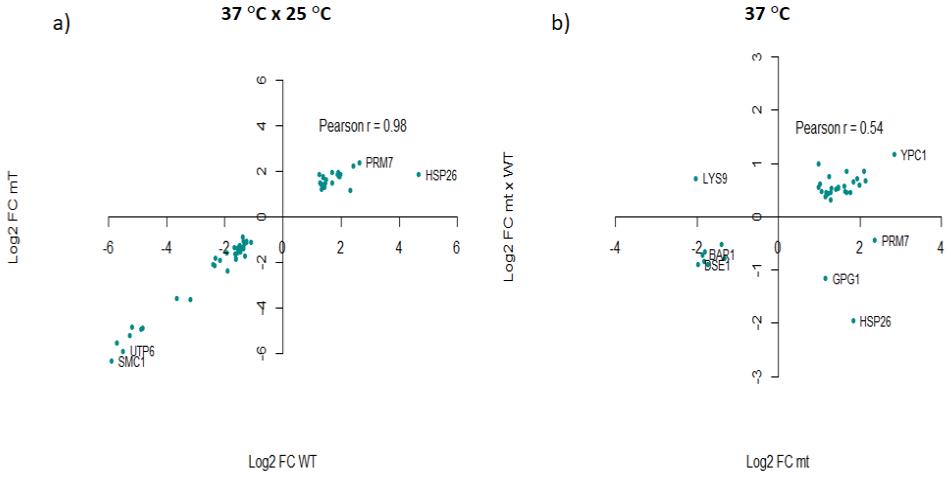
A mudança de temperatura leva à diferença de expressão de 136 genes na linhagem selvagem e 113 genes na linhagem mutante. Destes, 56 são coincidentes, ou seja, aproximadamente 41% e 49%, respectivamente, desses conjuntos são compostos pelos mesmos genes e entre estes, 21 já se encontram relacionados em trabalhos com aumento na temperatura de cultivo. Esses genes se comportam de maneira equivalente em direção e magnitude, entre eles se encontram *HSP26,* cuja função já foi comentada; *BAT1*, aminotransferase de cadeia ramificada mitocondrial; *VPS3*, proteína citoplasmática necessária para a triagem e processamento de proteínas vacuolares solúveis e *UTP6*, proteína

nucleolar; componente do processoma da subunidade pequena (SSU), envolvido no processamento do rRNA pré-18S; entre outros (Figura 26a).

Além disso, 37 desses genes devem ser considerados como uma resposta do mutante ao aumento na temperatura, já que também se encontram com diferença de expressão quando as células mutante e selvagem são analisadas separadamente em relação à troca de temperatura. Este conjunto de genes, em sua maioria, se comporta de maneira semelhante em direção e magnitude (Figura 26b).

Quando analisado o efeito da mutação no perfil traducional da célula, observou-se que poucos dos genes encontrados como diferencialmente expressos na temperatura permissiva é coincidente com genes também diferencialmente expressos na temperatura restritiva, e 634 genes apresentam diferença de expressão no mutante, quando há mudança de temperatura.

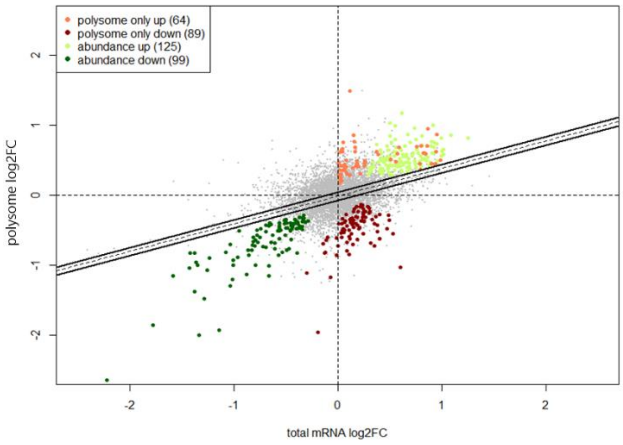
Figura 27 Correlação de Pearson da expressão global de conjuntos de genes diferencialmente expressos. a) genes diferencialmente expressos no selvagem e mutante quando há troca de temperatura de 25ºC para 37ºC possuem elevada correlação entre si; b) genes diferencialmente expressos no mutante e no contraste do mutante pelo selvagem, na temperatura restritiva, possuem correlação moderada, no entanto, 3 genes possuem comportamento divergente entre esses contrastes.



4.2.3.2 Análise dos modos regulatórios da Expressão Gênica para o mutante *hyp2-1*

Tendo os dados de genes do perfil traducional normalizados pelo transcricional, é possível classificar os genes de acordo com seus modos regulatórios, como descritos na metodologia. Sendo que, para o mutante *hyp2-1*, 213 estão diferenciamente expressos exclusivamente no perfil traducional normalizado pelo transcricional (classificado como *polysome only*) e 261 genes apresentam aumento dos níveis de mRNA para os dois perfis (*abundance*). Os gráficos da Figura 26 apresentam a separação e a quantidade de genes presentes em cada modo regulatório dos mutantes estudados.

Figura 28 Gráfico de dispersão do log2 fold change do mRNA traduzido e total. O número de genes identificados em cada modo regulatório encontra-se indicado.



No contexto mutante de eIF5A, os genes classificados como *polysome up* são aqueles em que a mutação causou um aumento no número de mRNAs associados a polissomos, sem alteração no nível de mRNA total. O aumento no número de mRNAs nos polissomos pode significar um aumento dos níveis de proteína ou um acúmulo de ribossomos no mRNA em virtude de um evento de *ribosomal stalling* (Pelechano & Alepuz, 2017; Schuller et al., 2017).

A classificação em *abundance up* é interpretada como um aumento nos níveis de mRNA total assim como de mRNA associado ao polissomo. O aumento destes mRNAs no polissomo pode levar a um real aumento nos níveis de proteína deste transcrito ou, em mutantes envolvidos na tradução, um acúmulo do mRNA no ribossomo. Os genes classificados em *abundance down* são

aqueles em que a mutação causou uma diminuição no número de mRNAs total e paralelamente uma diminuição nos níveis de mRNA associado ao polissomo, sendo, possivelmente genes que deixaram de ser transcritos e enviados para a tradução.

Nos genes em *buffering up* a mutação agiu de forma a levar a um aumento nos níveis de mRNA total que não foi observado nos níveis de mRNA no polissomo. Essas mudanças mantêm constante o nível de proteína e ela no contexto de eIF5A, podem ter sido causadas por um evento de *stall* no início que não permite o aumento da tradução e formação de polissomo (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER et al., 2017). Em *buffering down*, a mutação causou uma diminuição no número de mRNA total, sem alterar os níveis de mRNAs associados aos ribossomos (polissomo). Desta forma, espera-se que a proteína esteja com níveis normais ou esteja ocorrendo alguma situação que impeça a formação de polissomos.

5 Conclusão

O objetivo inicial do presente trabalho era realizar análises de dados de larga escala com dois mutantes relacionados a um fator de tradução.

Com o foco voltado para o mutante dys1-1, o primeiro resultado obtido foi a comparação de técnicas distintas para obtenção de perfil traducional. Constatou-se que a associação da técnica de perfil polissomal e RNASeq correlaciona-se fortemente a realização da técnica Riboseq, que vem sendo mais utilizada atualmente.

A análise dos aspectos traducionais como o comprimento das ORFs presentes no perfil traducional assim como a taxa de iniciação das mesmas e características de seus fluxos ribossomais e a possibilidade intrínseca de formação de filas ribossomais permitiu que fosse as ORFs enriquecidas no perfil traducional do mutante dys1-1 em relação ao selvagem pudessem ser caracterizadas: são ORFs longas, com taxa de início reduzida, que possivelmente não tem uma possibilidade intrínseca de formação de filas ribossomais mas no entanto possuem em sua formação códons raros, que tornam a tradução mais lenta e levam a formação engarrafamentos.

Além disso, a análise da GO do perfil transcricional do mutante com hipusinação reduzida mostrou que dys1-1 tem uma ligação próxima a via de biossíntese de poliaminas.

Em relação ao mutante hyp2-1, as análises se limitaram ao efeito da temperatura na célula selvagem e mutante. Nesse momento, percebeu-se que a mudança de temperatura gera uma maior amplitude de variação quando comparada a mutação de eIF5A em si.

Este fato não indica que o efeito da mutação não seja significativo, mas apenas menos perceptível que o efeito da mudança de 25 ºC para 37 ºC. Este fato pode ser atribuído à sensibilidade da técnica pois, além de se tratar de um mutante ts, a metodologia aplicada para este estudo (microarray) é menos robusta que um sequenciamento, diminuindo o poder estatístico. Além disso, a mudança de temperatura pode interromper a tradução, tornando estudos em larga escala com mutantes sensíveis a temperatura um experimento delicado.

Bibliografia

Arava, Y., Wang, Y., Storey, J. D., Long Liu, C., Brown, P. O., & Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in Saccharomyces cerevisiae. In *PNAS April 1* (Vol. 100, Issue 7). www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0635171100

Buskirk, A. R., & Green, R. (2017). Ribosome pausing, arrest and rescue in bacteria and eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0183

Caspeta, L., Chen, Y., & Nielsen, J. (2016). Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Scientific Reports*, *6*(1), 27003. https://doi.org/10.1038/srep27003

Chassé, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P., & Morales, J. (2017). Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkw907

Chattopadhyay, M. K., Chen, W., Poy, G., Cam, M., Stiles, D., & Tabor, H. (n.d.). Microarray studies on the genes responsive to the addition of spermidine or spermine to a Saccharomyces cerevisiae spermidine synthase mutant. https://doi.org/10.1002/yea.1703

Chen, K. Y., & Liu, A. Y. C. (1997). Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *NeuroSignals*. https://doi.org/10.1159/000109115

Ciandrini, L., Stansfield, I., & Romano, M. C. (2013). Ribosome Traffic on mRNAs Maps to Gene Ontology: Genome-wide Quantification of Translation Initiation Rates and Polysome Size Regulation. *PLoS Computational Biology*, *9*(1), e1002866. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002866

Csárdi, G., Franks, A., Choi, D. S., Airoldi, E. M., & Drummond, D. A. (2015). Accounting for Experimental Noise Reveals That mRNA Levels, Amplified by Post-Transcriptional Processes, Largely Determine Steady-State Protein Levels in Yeast. *PLoS Genetics*, *11*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005206

Dever, T. E., Dinman, J. D., & Green, R. (2018). Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a032649. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032649

Dever, T. E., Gutierrez, E., & Shin, B.-S. (2014). The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *49*(5), 413–425. https://doi.org/10.3109/10409238.2014.939608

Dever, T. E., & Ivanov, I. P. (2018). Roles of polyamines in translation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 293, Issue 48, pp. 18719–18729). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003338

Dever, T. E., Kinzy, T. G., & Pavitt, G. D. (2016). Mechanism and regulation of protein synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *203*(1), 65–107. https://doi.org/10.1534/genetics.115.186221

Diament, A., Feldman, A., Schochet, E., Kupiec, M., Arava, Y., & Tuller, T. (2018a). The extent of ribosome queuing in budding yeast. *PLoS Computational Biology*, *14*(1), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005951

Diament, A., Feldman, A., Schochet, E., Kupiec, M., Arava, Y., & Tuller, T. (2018b). The extent of ribosome queuing in budding yeast. *PLOS Computational Biology*, *14*(1), e1005951. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005951

Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., & Rodnina, M. V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1229017

Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., & Cherry, J. M. (2014). The Reference Genome Sequence of Saccharomyces cerevisiae: Then and Now. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *4*(3), 389–398. https://doi.org/10.1534/g3.113.008995

Fernandes, L. D., Moura, A. P. S. D., & Ciandrini, L. (2017). Gene length as a regulator for ribosome recruitment and protein synthesis: Theoretical insights. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-17618-1

Galvão, F. C., Rossi, D., Silveira, W. da S., Valentini, S. R., & Zanelli, C. F. (2013). The Deoxyhypusine Synthase Mutant dys1-1 Reveals the Association of eIF5A and Asc1 with Cell Wall Integrity. *PLOS ONE*, *8*(4), e60140. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060140

Gamble, C. E., Brule, C. E., Dean, K. M., Fields, S., & Grayhack, E. J. (2016). Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast. *Cell*, *166*(3), 679–690. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.070

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., & Brown, P. O. (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*. https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241

Halbeisen, R. E., & Gerber, A. P. (2009). Stress-dependent coordination of transcriptome and translatome in yeast. *PLoS Biology*. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000105

Hanner, A. S., Dunworth, M., Casero, R. A., MacDiarmid, C. W., & Park, M. H. (2019). Elevation of cellular Mg2+ levels by the Mg2+ transporter, Alr1, supports growth of polyamine-deficient Saccharomyces cerevisiae cells. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(45), 17131–17142. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009705

Henderson, A., & Hershey, J. W. B. (2011). The role of eIF5A in protein synthesis. In *Cell Cycle*. https://doi.org/10.4161/cc.10.21.17850

Heyer, E. E., & Moore, M. J. (2016). Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell*, *164*(4), 757–769. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.003

Hinnebusch, A. G. (2005). TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST . *Annual Review of Microbiology*, *59*(1), 407–450. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133833

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 42, Issue 1, pp. 39–51). https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009

Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., & Weissman, J. S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, *324*(5924), 218–223. https://doi.org/10.1126/science.1168978

Ivanov, I. P., Shin, B. S., Loughran, G., Tzani, I., Young-Baird, S. K., Cao, C., Atkins, J. F., & Dever, T. E. (2018). Polyamine Control of Translation Elongation Regulates Start Site Selection on Antizyme Inhibitor mRNA via Ribosome Queuing. *Molecular Cell*, *70*(2), 254-264.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.015

Kang, H. A., & Hershey, J. W. B. (1994). Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*.

King, H. A., & Gerber, A. P. (2014). Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Briefings in Functional Genomics*, *15*(1), 22–31. https://doi.org/10.1093/bfgp/elu045

Kurian, L., Palanimurugan, R., Gödderz, D., & Dohmen, R. J. (2011). Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature*, *477*(7365), 490–494. https://doi.org/10.1038/nature10393

Larsson, O., Sonenberg, N., & Nadon, R. (2010). Identification of differential translation in genome wide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. https://doi.org/10.1073/pnas.1006821107

Li, G. W. (2015). How do bacteria tune translation efficiency? In *Current Opinion in Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.001

Mathews, M. B., & Hershey, J. W. B. (2015). The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.05.002

Melis, N., Rubera, I., Cougnon, M., Giraud, S., Mograbi, B., Belaid, A., Pisani, D. F., Huber, S. M., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Blondeau, N., Vigne, P., Frelin, C., Hauet, T., Duranton, C., & Tauc, M. (2017). Targeting eIF5A hypusination prevents anoxic cell death through mitochondrial silencing and

improves kidney transplant outcome. *Journal of the American Society of Nephrology*, *28*(3), 811–822. https://doi.org/10.1681/ASN.2016010012

Nakanishi, S., & Cleveland, J. L. (2016). Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. In *Amino Acids*. https://doi.org/10.1007/s00726-016-2275-3

Oertlin, C., Lorent, J., Gandin, V., Murie, C., Masvidal, L., Cargnello, M., Furic, L., Topisirovic, I., & Larsson, O. (2018). Generally applicable transcriptome-wide analysis of translational efficiency using anota2seq. *BioRxiv*. https://doi.org/10.1101/106922

Park, M. H., Cooper, H. L., & Folk, J. E. (1981). Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(5), 2869–2873. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6789324

Park, M. H., Nishimura, K., Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids*, *38*(2), 491–500. https://doi.org/10.1007/s00726-009-0408-7

Pelechano, V., & Alepuz, P. (2017). eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Research*, *45*(12), 7326–7338. https://doi.org/10.1093/nar/gkx479

Piccirillo, C. A., Bjur, E., Topisirovic, I., Sonenberg, N., & Larsson, O. (2014). Translational control of immune responses: from transcripts to translatomes. *Nature Immunology*, *15*(6), 503–511. https://doi.org/10.1038/ni.2891

Rato, C., Amirova, S. R., Bates, D. G., Stansfield, I., & Wallace, H. M. (2011). Translational recoding as a feedback controller: Systems approaches reveal polyamine-specific effects on the antizyme ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Research*, *39*(11), 4587–4597. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1349

Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing

and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47–e47. https://doi.org/10.1093/nar/gkv007

Rossi, D., Kuroshu, R., Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2014). eIF5A and EF-P: Two unique translation factors are now traveling the same road. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. https://doi.org/10.1002/wrna.1211

Sasikumar, A. N., Perez, W. B., & Kinzy, T. G. (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *3*(4), 543–555. https://doi.org/10.1002/wrna.1118

Schnier, J., Schwelberger, H. G., Smit-McBride, Z., Kang, H. A., & Hershey, J. W. (1991). Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*. https://doi.org/10.1128/MCB.11.6.3105

Schrader, R., Young, C., Kozian, D., Hoffmann, R., & Lottspeich, F. (2006). *Temperature-sensitive eIF5A Mutant Accumulates Transcripts Targeted to the Nonsense-mediated Decay Pathway * □ S*. https://doi.org/10.1074/jbc.M601460200

Schuller, A. P., & Green, R. (2018). Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0011-4

Schuller, A. P., Wu, C. C. C., Dever, T. E., Buskirk, A. R., & Green, R. (2017). eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Molecular Cell*, *66*(2), 194-205.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.003

Schwanhüusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature10098

Sen, N. D., Zhou, F., Ingolia, N. T., & Hinnebusch, A. G. (2015). Genome-wide analysis of translational efficiency reveals distinct but overlapping functions of yeast DEAD-box RNA helicases Ded1 and eIF4A. *Genome Research*, *25*(8), 1196–1205. https://doi.org/10.1101/gr.191601.115

Shirokikh, N. E., & Preiss, T. (2018). Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, e1473. https://doi.org/10.1002/wrna.1473

Thompson, M. K., Rojas-Duran, M. F., Gangaramani, P., & Gilbert, W. V. (2016). The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *ELife*, *5*(APRIL2016). https://doi.org/10.7554/eLife.11154

Ude, S., Lassak, J., Starosta, A. L., Kraxenberger, T., Wilson, D. N., & Jung, K. (2013). Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1228985

Venkataramanan, S., & Floor, S. N. (2018). The Traffic Jam: Polyamine Prevalence Pauses Protein Production. In *Molecular Cell* (Vol. 70, Issue 2, pp. 191–192). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.005

Zanelli, C. F., Maragno, A. L. C., Gregio, A. P. B., Komili, S., Pandolfi, J. R., Mestriner, C. A., Lustri, W. R., & Valentini, S. R. (2006). eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *348*(4), 1358–1366. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.07.195