

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 13/09/2021.

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Campus de Araraquara**

**NATÁLIA MOREIRA BARBOSA**

**Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos  
(eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces  
cerevisiae***

**Araraquara, SP**

**2019**

**NATÁLIA MOREIRA BARBOSA**

**Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos (eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor, área de pesquisa em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

**Araraquara, SP**

**2019**

---

**B838e** Barbosa, Natália Moreira.  
Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos (eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae* / Natália Moreira Barbosa. – Araraquara: [s.n.], 2019.  
99 + xxi f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Biologia Molecular.

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.  
Coorientador: Sandro Roberto Valentini.

1. eIF5A. 2. Tradução de mRNA. 3. Ribossomos. 4. Mitocôndria. I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Valentini, Sandro Roberto, coorient. III. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** ESTUDO DO IMPACTO DA FUNÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS (eIF5A) NO PERFIL PROTEÔMICO CELULAR UTILIZANDO O MODELO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

**AUTORA:** NATALIA MOREIRA BARBOSA

**ORIENTADOR:** CLESLEI FERNANDO ZANELLI

**COORIENTADOR:** SANDRO ROBERTO VALENTINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA

Departamento de Bioquímica / Instituto de Química - USP - São Paulo

Prof. Dr. JORG KOBARG

Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Pesquisadora GLAUCIA NOELI MAROSO HAJJ

Centro Internacional de Pesquisa / AC Camargo Cancer Center

Prof. Dr. MARIO HENRIQUE BENGTON

Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade de Campinas - UNICAMP

Araraquara, 13 de setembro de 2019

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Silvana, cujo amor e orientação estão comigo em tudo o que eu busco.

## **Agradecimentos**

Especialmente aos meus pais, João e Silvana, por ensinarem os primeiros passos, oferecerem suporte para todas as minhas realizações e pelo amor conferido a mim.

Às minhas queridas irmãs, Rafaela e Carolina, verdadeiras companheiras da minha vida, exemplos de pura amizade.

Ao meu orientador, Professor Cleslei Zanelli, por todo o tempo dedicado a mim e a este trabalho, pela confiança depositada em mim desde o mestrado e pelas orientações e ensinamentos, que foram muito além do que essas páginas contam.

Um agradecimento especial ao Professor Sandro Valentini, pela oportunidade de crescimento e exemplo de professor.

À professora Judith Frydman pela oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório na Universidade de Stanford e pela brilhante participação nas discussões científicas. Sua criatividade, conhecimento e paixão pela ciência serão sempre um exemplo de inspiração para a minha vida. Obrigada pelo convite para juntar-me ao seu grupo. O melhor ainda está por vir.

Aos professores Dr. Mário Henrique de Barros, Dra. Valéria Valente e Dra. Carla Columbano pela participação e contribuição no exame geral de qualificação.

À UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Universidade de Stanford pelo apoio institucional de infraestrutura, o PADC-FCFAR, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

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

Novamente, à FAPESP pelas bolsas concedidas para realização do projeto no país (Processo Fapesp 2015/23203-0) e no exterior (Processo Fapesp 2017/23993-6).

Aos funcionários da seção de pós-graduação sempre dispostos a ajudar no que for preciso e a bibliotecária Irani, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

Indispensável agradecer aos amigos do lab BiomolVZ, aos atuais: Angel, Su, Marco, Anderson, Marô, Keylla, Luís, Ana e Fer, e à velha guarda, por terem calorosamente me acolhido para este grupo em 2013: Mari, Dan, Paulo, Tati Maria, Fábio, Boo, Kdu e Paulinha, cuja influência não se limitou às trocas de protocolos e reuniões científicas. Compartilhamos os momentos mais difíceis resolvendo os perrengues da vida real nos bastidores do lab e também os momentos prazerosos da vida, como os dias de glória com bons drinks, sol e piscina. Muito obrigada!

Aos meus estudantes Anderson e Vitor pela oportunidade de aprender a ensinar também.

Aos amigos do Frydman Lab pelo ótima receptividade em Stanford, pelo ambiente de trabalho proporcionado, por sempre contribuírem com discussões produtivas e também pelos “off-hours” bem vividos.

Igualmente aos amigos que Stanford me trouxe que foram muito importantes para o momento longe de casa. Lili, nunca esquecerei o resgate que me deu no momento mais difícil.

À Neuza, por todo o suporte no período de escrita da tese, pela cumplicidade e toda força positiva que me recarregou para seguir até o tão sonhado fim.

Por fim, um agradecimento especial aos queridos amigos Mariana e Patrick, pelo envolvimento diário, por estarem ao meu lado enfrentando os piores obstáculos na construção de novos conhecimentos ao longo dessa tese, sem vocês eu não chegaria até aqui. Admiro muito vocês!!!

## **O sonho**

(Clarice Lispector)

Sonhe com aquilo que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem  
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

## Resumo

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado em arqueas e eucariotos e essencial para a viabilidade celular. eIF5A sofre uma modificação pós-traducional exclusiva e essencial para sua função, em que um resíduo específico de lisina é convertido em uma hipusina. Apesar eIF5A já ter sido relacionado com o início da tradução, uma quantidade crescente de estudos recentes têm estabelecido sua função na etapa de alongação da tradução, mais especificamente na alongação de sequências que são capazes de induzir um *stalling* (atraso ou parada) do ribossomo. Entretanto, existem ainda poucos trabalhos realizados com perfil proteômico na ausência de função de eIF5A, de maneira que atualmente pouco se sabe sobre as proteínas que têm sua tradução dependente de eIF5A. Desta forma, o presente projeto visa a busca de proteínas que têm sua tradução dependente de eIF5A através da comparação de perfil proteômico entre linhagens selvagens e mutantes de eIF5A em *Saccharomyces cerevisiae*. Para isto, utilizamos neste trabalho uma estratégia de perfil proteômico celular *in vivo* por fluorescência de GFP utilizando uma coleção de 4.156 linhagens, cada uma contendo uma ORF diferente em fusão com GFP no C-terminal, e uma proteína RFP (variante E2Crimson) constitutivamente produzida como normalizador, tanto no *background* selvagem (*HYP2*) como mutante para eIF5A (*hyp2-3*). Esta tese apresenta a análise dos dados de GFP/RFP e a validação desta análise utilizando-se *western blot*. Os resultados demonstram um grupo de proteínas diferencialmente menos produzidas, das quais a maioria se relaciona com processos mitocondriais. Para confirmar o envolvimento de eIF5A com função mitocondrial, caracterizou-se a fisiologia mitocondrial em mutantes de eIF5A. Revelou-se a incapacidade de crescimento do mutante de eIF5A em fontes de carbono não fermentáveis, ou seja, que dependem da mitocôndria para sua oxidação. O mutante de eIF5A também apresentou atividade respiratória reduzida, aumento no potencial de membrana e na quantidade de DNA mitocondrial, embora a morfologia não pareça estar afetada. Majoritariamente, as proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo, traduzidas no citoplasma e importadas para mitocôndria como um polipeptídeo desnovelado ou então são translocadas de maneira cotraducional para mitocôndria, e, de alguma maneira, eIF5A pode estar regulando a tradução dessas proteínas especificamente. Interessantemente, a desaceleração das taxas de alongação da tradução por códons raros ou outras sequências causadoras de parada ou atraso na tradução podem facilitar a ligação de Partícula Reconhedora de Sinal (SRP) ao ribossomo, o que pode interferir com o direcionamento ao RE. Assim, existem diferentes caminhos pelos quais eIF5A poderia interferir com a tradução de proteínas direcionadas à mitocôndria ou ao RE e trabalhos futuros são necessários para abordar os mecanismos subjacentes ao papel de eIF5A na célula.

**Palavras-chave:** eIF5A. Tradução de mRNA. Ribossomos. Mitocôndria.

## **Abstract**

The translation factor 5A (eIF5A) is conserved and essential for cell viability. This is the only protein known to contain the amino acid residue hypusine, essential for eIF5A function, generated by a post-translational modification. Although it was initially suggested a function for eIF5A in the translation initiation, eIF5A has been demonstrated to have a role in translation elongation. More recent studies have established that eIF5A is necessary for the elongation of specific sequences, which are able to induce a ribosome stalling. Still, there are few studies with proteomic profile in the absence of eIF5A function and the proteins which syntheses are dependent on eIF5A are not well known. Thus, the present study aims to search for the proteins which syntheses are dependent on eIF5A by proteomic profile comparison between wild-type strains and eIF5A mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. We present a proteomic profile for GFP fluorescence using a 4156 collection of strains, each one containing a different ORF fused to the C-terminal GFP and a protein RFP constitutively produced as normalizing, both in the wild and eIF5A mutant background. This thesis presents GFP / RFP data analysis and data validation using western blot. Our data using an *in vivo* proteome profile of the ORFs-GFP collection in a *hyp2-3* mutant background demonstrating that yeast eIF5A shows several mitochondrial proteins downregulated in the eIF5A mutant. To confirm eIF5A involvement with mitochondrial function, we characterized mitochondrial physiology in eIF5A mutants. We revealed the inability of the eIF5A mutant to grow in non-fermentable carbon sources, where they depend on mitochondria for its oxidation. eIF5A mutant also showed reduced respiratory activity, increased membrane potential and mitochondrial DNA amount, although morphology does not appear to be affected. Mostly, mitochondrial proteins are either coded into the nucleus, translated into the cytoplasm and imported into mitochondria as an unfolded polypeptide, or are translocated in a conventional manner to mitochondria, and somehow eIF5A may be regulating the translation of these proteins specifically. Interestingly, the slowdown of translation elongation rates by rare codons or other translation stalling motifs can facilitate binding of the Signal Recognition Particle (SRP) to the ribosome, which may interfere with ER targeting. Thus, there are different ways by which eIF5A could interfere with translation of proteins targeted to the mitochondria or the ER and further work are necessary to address the mechanisms underlying this role of eIF5A in the cell.

**Keywords:** eIF5A. mRNA translation. Ribosomes. Mitochondria.