

Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho

Estudo da relação entre o Fator de Início de Tradução de eucariotos 5A (eIF5A) e a etapa de alongação da tradução

Rodolfo Bortolozo Serafim

**Araraquara
2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

RODOLFO BORTOLOZO SERAFIM

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O FATOR DE INÍCIO DE
TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A (eIF5A) E A ETAPA DE
ELONGAÇÃO DA TRADUÇÃO**

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

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara
2011

SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS	5
2. LISTA DE TABELAS	6
3. LISTA DE ABREVIATURAS	7
4. RESUMO	9
5. INTRODUÇÃO	10
6. MATERIAIS E MÉTODOS	17
6.1 MATERIAIS	17
6.2 MÉTODOS	20
6.2.1 Transformação de Leveduras	20
6.2.2 Preparação de plasmídeos em pequena escala (MINIPREP)	20
6.2.3 Eletroforese em gel de agarose	21
6.2.4 Teste de sensibilidade à temperatura (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>)	22
7. OBJETIVOS	23
7.1 OBJETIVO GERAL	23
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7.2.1 Análise da reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura de mutantes de início ou de alongação da tradução	23
7.2.2 Análise da existência de complementação alélica entre <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} e <i>tif51A</i> ^{K56A}	23
7.2.3 Estudo de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (eIF5A ^{K56A} e eIF5A ^{Q22H/L93F}) e outros fatores de alongação da tradução	24

7.2.4	Observação da ocorrência de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (<i>tif51A</i> ^{K56A} e <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}) e o mutante do fator de alongação 2, <i>eft2</i> ^{H699K}	25
8.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
8.1	Análise da reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura de mutantes de início ou de alongação da tradução	26
8.2	Análise da existência de complementação alélica entre <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} e <i>tif51A</i> ^{K56A}	32
8.3	Estudo de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (eIF5A ^{K56A} e eIF5A ^{Q22H/L93F}) e outros fatores de alongação da tradução	34
8.4	Observação da ocorrência de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (<i>tif51A</i> ^{K56A} e <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}) e o mutante do fator de alongação 2, <i>eft2</i> ^{H699K}	36
9.	CONCLUSÃO	38
10.	REFERÊNCIAS	39

1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Teste de reversibilidade ao fenótipo de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na alongação da tradução, incubadas por 72 horas a 25°C	-----28
Figura 1.2	Teste de reversibilidade ao fenótipo de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na alongação da tradução, incubadas por 68 horas a 25°C e 4 horas a 38°C	-----29
Figura 1.3	Teste de reversibilidade ao fenótipo de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na alongação da tradução, incubadas por 64 horas a 25°C e 8 horas a 38°C	-----30
Figura 1.4	Teste de reversibilidade ao fenótipo de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na alongação da tradução, incubadas por 48 horas a 25°C e 24 horas a 38°C	-----31
Figura 2	Teste de sensibilidade a temperatura de linhagens que combinam os alelos <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} e <i>tif51A</i> ^{K56A} e linhagens que possuem cada alelo isoladamente	-----33
Figura 3.1	Análise de interação genética entre o mutante estável de eIF5A, <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} e fatores de alongação	-----35
Figura 3.2	Análise de interação genética entre o mutante estável de eIF5A, <i>tif51A</i> ^{K56A} e fatores de alongação	-----35
Figura 4	Figura 4 Análise de interação genética entre os mutantes estáveis de eIF5A e o mutante eEF2 ^{H699K}	-----37

2. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Leveduras a serem utilizadas nos experimentos realizados ----- 17

Tabela 2 Plasmídeos a serem utilizados nos experimentos realizados ----- 19

3. LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

%	porcentagem
μg	micrograma
μL	microlitro
°C	graus Celcius
μM	micromolar
C-terminal	carboxi-terminal
D.O.	densidade ótica
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
SC	meio sintético completo para levedura

SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris-hidroximetilaminometano
UV	ultra violeta
xg	aceleração gravitacional
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)

4. RESUMO

O fator de início de tradução 5A (eukaryotic translation initiation factor 5A, eIF5A) é altamente conservado entre arqueas a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas. eIF5A sofre uma modificação pós-traducional única na célula, a hipusinação de um resíduo de lisina. Essa proteína já foi relacionada ao início da tradução, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA e proliferação celular, mas a função crítica de eIF5A ainda não foi esclarecida. A depleção deste fator em *S. cerevisiae* leva a uma diminuição (30%) da taxa de síntese protéica, sugerindo que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros. Dados do laboratório demonstram interação física entre eIF5A e proteínas ribossomais bem como com o fator de alongação 2 da tradução (eEF2). A interação com eEF2, sugere que eIF5A atua na etapa de alongação da tradução, ao invés do início da tradução, como proposto inicialmente. Com o objetivo de avaliar a relação de eIF5A com a etapa de alongação, foram realizadas análises de interações genéticas entre o gene codificador de eIF5A (*TIF51A*) e diversos genes codificadores de proteínas envolvidas na tradução. Através de análises de interações genéticas, foi observado que o mutante estável de eIF5A, *tif51A^{K56A}*, apresenta um defeito de crescimento quando o mutante de eEF2, *eft2^{H699K}*, está expresso em alto número de cópias, enquanto que o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* não apresenta defeitos nesta condição. Foi observado também que o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* apresenta um defeito de crescimento mais severo quando ocorre superexpressão de *EFT2*, gene codificador de eEF2. Foi observado ainda que não há complementação alélica entre os mutantes estáveis de eIF5A e que a reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada do crescimento não reflete claramente o tipo de defeito apresentado pelo mutante quanto à sua função relacionada à tradução.

5. INTRODUÇÃO

O entendimento da função de fatores altamente conservados e essenciais para a viabilidade celular tem-se mostrado de grande importância para a compreensão dos processos biológicos que ocorrem em uma célula. O fator de início de tradução de eucariotos 5A é um destes fatores.

eIF5A é altamente conservado entre arqueas a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas (Schnier e cols., 1991; Chen e Liu, 1997). Originalmente, eIF5A foi purificado a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho (Benne e Hershey, 1978) e relacionado ao início da tradução devido à capacidade de estimular a síntese proteica *in vitro*.

O início da tradução em eucariotos é uma etapa complexa da síntese protéica e do processo da expressão gênica de uma maneira geral, sendo amplamente regulado na célula (Pestova e cols., 2001). O início de tradução em eucariotos compreende uma série de passos, subsequentes e paralelos, que levam à montagem de um ribossomo com um mRNA, o qual, por sua vez, precisa estar corretamente posicionado com seu códon iniciador, comumente AUG, interagindo com o anti-códon de um Met-tRNA_i no sítio ribossomal P (peptidil). O antibiótico puromicina é um análogo estrutural da extremidade 3' de um tRNA aminoacilado e pode ocupar o sítio ribossomal A (aminoacil) possibilitando que seu radical amino primário interaja com um Met-tRNA_i, reproduzindo a formação de uma ligação peptídica. O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de Met-tRNA_i, à puromicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes fatores no início da tradução.

Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, assim, de resultados obtidos

na ausência dos outros fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, também testados (Benne e Hershey, 1978). Além disso, eIF5A não pareceu influenciar a formação *in vitro* de complexo ternário ou a ligação do mRNA de globina ou do Met-tRNA_i à subunidade 40S (Benne e Hershey, 1978). A possibilidade de eIF5A atuar na elongação da tradução também foi considerada, mas nenhum efeito positivo foi observado com a adição de eIF5A em um sistema de síntese protéica para polimerização de poli-fenilalanina a partir de ácido poli-uridílico, ribossomos 80S e fatores de elongação eEF1 e eEF2 purificados (Benne e Hershey, 1978). Em concordância com esse trabalho inicial de caracterização funcional de eIF5A em sistemas *in vitro*, foram publicados posteriormente estudos mostrando que a inibição da maturação funcional de eIF5A (discutida abaixo) não se correlaciona a uma repressão da tradução em células de mamífero, e que a depleção deste fator em *S. cerevisiae* leva a uma pequena diminuição (30%) da taxa de síntese protéica (Duncan e Hershey, 1986; Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

S. cerevisiae possui no seu genoma dois genes que codificam para eIF5A, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*). Estes genes são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos, respectivamente, em condições aeróbicas e anaeróbicas. *TIF51A* é essencial para o crescimento em condições aeróbicas (Schnier e cols., 1991; Wohl e cols., 1993; Valentini e cols., 2002).

eIF5A possui 17 kDa em levedura e sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas consiste na fosforilação do resíduo de serina acetilado do N-terminal (Kang e cols., 1993; Klier e cols., 1993). A remoção deste resíduo revelou que a forma não fosforilada deste fator é suficiente para promover o crescimento de células *tif51AΔ* haplóides (Klier e cols., 1993), sugerindo que a fosforilação de eIF5A não seja essencial para o seu

funcionamento *in vivo*.

A segunda modificação deste fator é única na célula e corresponde à hipusinação de um resíduo de lisina (Chen e Liu, 1997; Park e cols., 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês “hypusine: hydroxyputrescine-lysine”) ocorre através da transferência, pela desoxi-hipusina sintase, de um grupo aminobutil da espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica, seguido de hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase. O grau de conservação, nas diferentes espécies, dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação revela a grande importância deste aminoácido raro (Chen e Liu, 1997; Magdolen e cols., 1994). Mutação neste resíduo (K51R em *S. cerevisiae*) leva à produção de eIF5A não hipusinado, que não permite o crescimento de células onde *TIF51A* foi nocauteado (Schnier e cols., 1991). Adicionalmente, o gene codificador da enzima desoxi-hipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* (Park e cols., 1997; Sasaki e cols., 1996). O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação fortalece a idéia de que este fator seja de fundamental importância no metabolismo celular.

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de três espécies de arqueas, de dois protozoários, de humano (3CPF) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (3ERO) foram determinadas e revelaram várias características comuns (Kim e cols., 1998; Peat e cols., 1998; Yao e cols., 2003; 3CPF; 3ERO). Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como “*Translation Protein SH3-like motif*”, o qual também está presente em várias proteínas ribossomais (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough e cols., 2001). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (“*Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold*”), o qual está presente em

proteínas de diferentes funções celulares que se ligam a RNA ou DNA fita simples (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough e cols., 2001). De fato, dois trabalhos publicados tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém a extensão de tais estudos ainda necessita ser ampliada para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu e Chen, 2001; Xu e cols., 2004).

A função de eIF5A permanece obscura, apesar de quase trinta anos de estudo sobre este fator. Como apresentado acima, embora eIF5A tenha sido considerado inicialmente um fator de início de tradução (Benne e cols., 1978), a depleção deste fator em leveduras causa uma pequena redução (30%) nos níveis de síntese protéica (Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Este dado sugere que eIF5A não seja um fator essencial na síntese protéica de forma geral. Alternativamente, foi proposto que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, por exemplo, daqueles envolvidos na transição G1/S do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994; Park e cols., 1997). Esta hipótese foi levantada devido à observação de que a inibição das duas enzimas envolvidas na hipusinação de eIF5A bloqueia a proliferação celular de diferentes linhagens de células de mamíferos (Hanuske-Abel e cols., 1994; Park e cols., 1994; Chen e cols., 1996; Shi e cols., 1996). Outras observações também evidenciam o envolvimento de eIF5A com proliferação celular. Por exemplo, a expressão de eIF5A é induzida em linfócitos T ativados (Bevec e cols., 1994). Experimentos utilizando *D. melanogaster* mostraram uma perda do controle no ciclo celular no início do desenvolvimento deste inseto em consequência da alteração dos níveis de eIF5A (Lee e cols., 2001). E, por fim, um aumento no número de células paradas na fase G1 do ciclo celular é observado após a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* (Kang e Hershey, 1994).

Embora proposto previamente que eIF5A seja um cofator celular da proteína Rev de HIV-1 e esteja envolvido na exportação dos mensageiros tardios deste vírus (Ruhl e cols., 1993; Bevec e cols., 1996; Bevec e Hauber, 1997; Elfgang e cols., 1999; Rosorius e cols.,

1999), outros estudos não evidenciam o envolvimento de eIF5A com transporte nucleocitoplasmático (Shi e cols., 1997; Henderson e Percipale, 1997; Valentini e cols., 2002; Jao e Chen, 2002).

Três mutantes condicionais de *S. cerevisiae* para o gene *TIF51A* (*tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3*) foram descritos e caracterizados em nosso laboratório (Valentini e cols., 2002). A caracterização destes alelos de *TIF51A* mostrou que todos são mutantes sensíveis a temperatura com perda de função na temperatura não permissiva devido à rápida degradação de eIF5A (Valentini e cols., 2002). Nesse estudo foi mostrado que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear, o que está de acordo com sua localização em células de mamíferos, onde eIF5A localiza-se principalmente no citoplasma (Shi e cols., 1997; Jao e Chen, 2002). Esta localização perinuclear não é alterada em leveduras contendo um alelo sensível a temperatura de *XPO1*, gene que codifica para CRM1/exportina 1 em leveduras, na temperatura não permissiva. Assim como acontece em mamíferos, o bloqueio da ação de exportina 1 em leveduras leva a um acúmulo da proteína Rev de HIV-1 no núcleo. No entanto, não ocorre acúmulo de eIF5A nas mesmas condições onde ocorre acúmulo de Rev no mutante de *Xpo1*, e também não ocorre acúmulo de Rev no núcleo em mutantes de eIF5A, o que compromete o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas através do receptor CRM1/exportina 1 (Valentini e cols., 2002).

O fator eIF5A está ainda envolvido com o decaimento de mRNA. Foi mostrado que mutantes condicionais de *S. cerevisiae* exibem defeito na degradação de RNA mensageiros na temperatura não permissiva (Zuk e Jacobson, 1998; Valentini e cols., 2002). Entretanto, os resultados de decaimento de mRNA obtidos para os mutantes de nosso laboratório sugerem que esse possível papel de eIF5A seja secundário, pois o fenótipo de inibição do crescimento não se correlaciona com o defeito na degradação de RNA mensageiros (Valentini e cols., 2002).

Utilizando um dos nossos mutantes já descritos (*tif51A-1*) e buscando clonar supressores do fenótipo de sensibilidade a temperatura, nove genes foram obtidos: *PAB1*, *PKC1*, *WSC1*, *WSC2*, *WSC3*, *SIA1*, *HSP150*, *GIC1* e *ZDS1* (Valentini e cols., 2002; Zanelli e Valentini, 2005). Até o momento, os estudos foram concentrados principalmente no gene supressor *PKC1* (e seus ativadores *WSC1*, *WSC2*, *WSC3*). Foi mostrado que a supressão por *Pkc1* é independente da via de MAP quinases e foi descrita uma via de sinalização intracelular que atua abaixo de *Pkc1* e que envolve as proteínas *Zds1* e *Gic1* (Zanelli e Valentini, 2005). Como é improvável que *eIF5A* esteja diretamente relacionado ao processo de brotamento celular, do qual participam os genes supressores *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1*, é provável que *eIF5A* esteja envolvido com a progressão no ciclo celular em levedura de maneira indireta, através do controle da expressão gênica.

Resultados do nosso laboratório demonstraram que *eIF5A* interage com componentes estruturais ribossomais 80S, bem como com *eEF2*, de modo dependente de hipusina e que mutantes de *eIF5A* apresentam alterações de perfil polissomal e sensibilidade a inibidores de tradução. Tais resultados restabelecem uma função de *eIF5A* na tradução e sugerem um papel para este fator na elongação da tradução ao invés de no início da tradução (Zanelli et al., 2006).

De maneira interessante, embora não exista proteína homóloga a *eIF5A* em eubactérias, o fator de elongação da tradução de bactérias EF-P é um homólogo estrutural de *eIF5A* de arqueas (Hanawa-Seutsugu e cols., 2004). Além disto, a função de EF-P é especificamente afetada *in vitro* por inibidores da atividade peptidil-transferase (Aoki e cols., 1997), analogamente à sensibilidade de mutantes caracterizados por nosso laboratório a esparsomicina e anisomicina (Zanelli e cols., 2006). É também importante lembrar que a parada da elongação da tradução leva à estabilização de mRNA (Wilusz e cols., 2001),

justificando assim o efeito secundário de diminuição da degradação de mRNA nos mutantes de eIF5A.

Pesquisas realizadas em nosso laboratório produziram 40 novos mutantes, sendo que 19 não complementaram o nocaute do gene selvagem, 13 apresentaram fenótipo de termossensibilidade e 8 não apresentaram nenhuma alteração nos fenótipos investigados (Dias e cols., 2008).

A maioria dos novos alelos mutantes de *TIF51A* produz eIF5A instável na temperatura não permissiva, característica que explica o fenótipo de sensibilidade a temperatura destes mutantes, uma vez que eIF5A é essencial para a viabilidade celular, e, ainda, revela resíduos importantes para a estrutura secundária e terciária de eIF5A. No entanto, essa característica dificulta a procura de proteínas que interagem com eIF5A através de rastreamentos genéticos realizados na temperatura não permissiva, uma vez que a compensação da perda total da proteína é muito mais difícil de ser alcançada do que a perda de interações físicas específicas. Felizmente, dentre os novos alelos de *TIF51A* obtidos, dois (*tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}*) apresentam eIF5A estável na temperatura não permissiva, indicando que, ao contrário dos outros mutantes, seus fenótipos podem ser decorrentes da perda de interações físicas específicas entre eIF5A mutada e seus ligantes celulares (Dias e cols., 2008).

Como apresentado aqui, apesar do grande número de estudos realizados com eIF5A, o mecanismo pelo qual eIF5A exerce sua função permanece ainda indeterminado. Através de estudos de interação entre eIF5A e fatores envolvidos com a etapa da elongação da tradução, espera-se ampliar os dados que relacionam eIF5A com a elongação e esclarecer a função que este fator desempenha na síntese protéica.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Material

Tabela 1 – Leveduras utilizadas nos experimentos realizados

Levedura	Genótipo	Origem
SVL14	MATa <i>ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1 tif51A-1</i>	Coleção do laboratório
SVL32	MATa <i>ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1 tif51A-3</i>	Coleção do laboratório
SVL59	MATα <i>ade2 leu2 trp1 ura3 pab1::HIS3</i> [<i>pab1-53 TRP1 CEN</i>]	Pamela Silver
SVL60	MATα <i>ade2 leu2 trp1 ura3 pab1::HIS3</i> [<i>PAB1 TRP1 CEN</i>]	Pamela Silver
SVL82	MATa <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3</i>	Coleção do laboratório
SVL136	MATa <i>ade2 his3 tyr1 ura3</i>	Allan Jacobson
SVL138	<i>ade2 his3 tyr1 ura3 grc5</i>	Allan Jacobson
SVL140	<i>ade2 his3 tyr1 ura3 mrt4</i>	Allan Jacobson
SVL142	MATa <i>ade3 his3 leu2 ura3</i>	Howard Bussey
SVL272	MATa <i>his3 leu2 ura3 met15</i>	Anita H. Corbett
SVL346	MATa <i>ura3 trp1 ade2 his3 cdc33::LEU2</i> [<i>CDC33 CEN TRP1</i>]	Altmann e cols., 1989
SVL347	MATa <i>ura3 trp1 ade2 his3 cdc33::LEU2</i> [<i>cdc33-42 CEN TRP1</i>]	Altmann e cols., 1989
SVL473	MATα <i>ade2 ura3 trp1 xpo1::LEU2</i> [<i>xpo1-1 HIS3</i>]	Anita H. Corbett
SVL700	MATα <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 cca1-1</i>	Deng et al., 2000

SVL732	MAT α <i>ade2 his4 leu2 lys2 met2 trp1 ura3 yef3::LEU2 [YEF3 TRP1 CEN]</i>	Anand e cols., 2003
SVL733	MAT α <i>ade2 his4 leu2 lys2 met2 trp1 ura3 yef3::LEU2 [yef3^{F650S} TRP1 CEN]</i>	Anand e cols., 2003
VZL821	MAT α <i>leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A^{Q22H/L93F} CEN TRP1]</i>	Coleção do laboratório
VZL822	MAT α <i>leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A^{K56A} CEN LEU2]</i>	Coleção do laboratório
VZL829	MAT α <i>ade1 leu2 ura3 prt1-1</i>	Heikkinen et al., 2003
VZL837	MAT α <i>leu2 trp1 his3 ura3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [TIF51A CEN LEU2]</i>	Coleção do laboratório
VZL838	MAT α <i>leu2 trp1 his3 ura3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [TIF51A CEN TRP1]</i>	Coleção do laboratório
VZL839	MAT α <i>ade3 his3 leu2 ura3 fun12::kanMX4</i>	Sunnie Thompson
VZL855	MAT α <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 [LEU2 CEN]</i>	Coleção do laboratório
VZL857	MAT α <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 [eft2^{H699K} LEU2 CEN]</i>	Coleção do laboratório
VZL904	MAT α <i>leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A-1 URA3 CEN]</i>	Coleção do laboratório
VZL987	MAT α <i>leu2 trp1 his3 ura3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A^{K56A} CEN TRP1]</i>	Coleção do laboratório
VZL999	MAT α <i>leu2 trp1 his3 ura3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A-3 CEN TRP1]</i>	Coleção do laboratório

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados nos experimentos realizados

Plasmídeo	Descrição	Origem
pRS314 (pSV58)	<i>TRP1 CEN</i>	Coleção do laboratório
pRS315 (pSV59)	<i>LEU2 CEN</i>	Coleção do laboratório
pRS425 (pSV64)	<i>LEU2 2μ</i>	Coleção do laboratório
pACT (pSV149)	<i>LEU2 2μ</i>	Coleção do laboratório
pACT (pSV274)	<i>EFT2 LEU2 2μ</i>	Coleção do laboratório
pSV708	<i>tif51A^{Q22H/L93F} CEN TRP1</i>	Coleção do laboratório
pSV734	<i>tif51A^{K56A} CEN LEU2</i>	Coleção do laboratório
pVZ1041	<i>TEF2 LEU2 2μ (pACT-TEF2)</i>	Coleção do laboratório
pVZ1043	<i>YEF3 LEU2 2μ (pACT-YEF3)</i>	Coleção do laboratório
pVZ1104	<i>eft2^{H699K} LEU2 2μ</i>	Coleção do laboratório

6.2. Métodos

6.2.1. Transformação de Leveduras

O processo visa inserir um plasmídeo de interesse na levedura. Realiza-se todo o processo em fluxo laminar vertical para evitar contaminação. Em 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e ágar 20 g/L) líquido faz-se um inóculo de células e cultiva-se durante a noite. Uma alíquota de 1 mL da cultura celular é centrifugada durante 5 segundos na velocidade de 16100 xg e, após a centrifugação, o sobrenadante é descartado. Suspende-se as células em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e, posteriormente, incuba-se durante 15 minutos sob agitação a 25°C. Concomitantemente, incuba-se à temperatura de 96°C por 10 minutos uma alíquota de ssDNA (DNA carreador) e a transfere para o gelo. Após a incubação sob agitação, realiza-se novamente a centrifugação das células durante 5 segundos na velocidade de 16100 xg. O sobrenadante é descartado. São adicionados ao tubo os seguintes componentes, nesta ordem: 240 µL de polietileno glicol (50% m/v) – estabilizador de membrana, 36 µL de LiAc 1 M, 50 µL de ssDNA (2,0 mg/mL) - carreador, 5,0 µL de DNA plasmidial (100 ng a 5 µg) e 20 µL de água milli-Q estéril. Ressuspende-se as células e as incuba durante 10 minutos a 42°C em banho úmido para realizar um choque térmico. A seguir, centrifuga-se as células durante 1 minuto. O sobrenadante é descartado. O precipitado é ressuspendido em 150 µL de água milli-Q estéril pipetando devagar. Plaqueia-se em meio SC apropriado, que selecione para a presença do plasmídeo. As colônias devem aparecer em 2 a 4 dias a 30°C.

6.2.2. Preparação de plasmídeos em pequena escala (MINIPREP)

As bactérias contendo o plasmídeo de interesse são inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 50 µg/mL, ou antibiótico adequado. Após isso, são incubadas a 37°C sob agitação durante a noite. Uma alíquota de 1 mL da cultura é centrifugada durante 1 minuto a 12.000 xg. Após a centrifugação, descarta-se

o sobrenadante. Prepara-se solução 1:1 de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%/hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M e adiciona-se 200 μ L ao precipitado de células, além de 150 μ L de solução de acetato de sódio (NaAc) 3M pH 4,8. A mistura resultante é homogeneizada por inversão até a formação de “grumos”. Este processo deve ser realizado cautelosamente para que a precipitação das proteínas celulares seja eficaz. Ao final, deve-se fazer a centrifugação por 10 minutos a 12.000 xg. O sobrenadante é transferido para outro tubo (próprio para armazenamento de DNA) e neste adiciona-se 1 mL de isopropanol. Mistura-se por inversão e centrifuga-se por 10 minutos novamente. Em seguida, o sobrenadante é descartado e o precipitado restante é lavado duas vezes com etanol 75% gelado. Realiza-se a secagem do precipitado utilizando o equipamento Speed Vac (Eppendorf) a 45°C durante 20 minutos. Posteriormente, faz-se sua suspensão em 50 μ L de água milli-Q.

6.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Para o preparo do gel de agarose 0,8%, é adicionado a um erlenmeyer, 0,8 g de agarose e 100 ml do tampão Tris-acetato-EDTA 1X. Em seguida, a solução é aquecida durante 1 minuto e meio para solubilização completa da agarose. Promove-se o resfriamento à temperatura ambiente desta solução e, a seguir, adiciona-se 5 μ L de brometo de etídeo (10 mg/ml), o qual se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA, permitindo sua visualização por UV (Alfa Imager - Alpha Innotech Corporation). O conteúdo, ainda líquido, é vertido em um suporte de eletroforese previamente vedado com fita adesiva e aguarda-se a solidificação do gel. Quanto maior a concentração do gel, mais densa será a rede formada, o que possibilita uma melhor separação de pequenos fragmentos de DNA. Desta forma, o processo de eletroforese consiste na aplicação de uma diferença de potencial elétrico. As amostras são posicionadas no pólo negativo e migram para o pólo positivo devido às cargas negativas do DNA (grupos fosfato). Antes da aplicação, 3 μ L de cada amostra são misturados a 1 μ L de loading buffer 5x [para 50mL; Glicerol (50%) 25,0mL; Azul de Bromofenol (0.125%) 0,0625g; Xileno Cianol

(0.125%) 0,0625g; TE pH8,0 q.s.p. 50,0mL]. Após a corrida, o gel é visualizado com auxílio de um transluminador (Alfa Imager - Alpha Innotech Corporation).

6.2.4. Teste de sensibilidade a temperatura

Primeiramente, cultivam-se as leveduras desejadas em 5,0 mL de meio de cultura apropriado até que atinjam $D.O._{600nm}=0,6$ a $0,9$. Para medir a D.O., devem ser adicionados em uma cubeta 900 μ L de meio e 100 μ L de células. Para o branco, 1000 μ L do meio apenas. Realiza-se a centrifugação das células durante 1 minuto a 16100 xg. Estas são ressuspendidas em glicerol 50%. Em uma microplaca, transfere-se 200 μ L da suspensão de células para o primeiro poço. Nos 5 poços seguintes, adicionam-se 180 μ L de uma solução de glicerol 50%. A seguir, transfere-se 20 μ L da cultura do primeiro para o segundo poço, homogeneizando bem e repetindo-se o procedimento para os poços seguintes, de forma que sejam realizadas cinco diluições 1:10. Com um pipetador multicanal, aplica-se 4 μ L de cada diluição nos meios a serem testados e incuba-se por 1 a 3 dias na temperatura adequada.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GERAL

Ampliar os dados que envolvem eIF5A com a alongação da tradução, possibilitando o estudo da relação de eIF5A com esta etapa da tradução.

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7.2.1 Análise da reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura de mutantes de início ou de alongação da tradução

Com o objetivo de analisar se há diferenças na reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura entre mutantes de início e alongação da tradução, e também se há semelhança na reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura entre os mutantes de eIF5A e diferentes mutantes de início da tradução ou mutantes de alongação da tradução, as linhagens foram cultivadas em meio YPD até que tenham atingido $D.O_{600nm}=0,6$ a $0,9$ e então foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura. Foi feita incubação a $38^{\circ}C$ por 4, 8, 12 e 24 horas e então, transferência da cultura para $25^{\circ}C$, para análise da retomada do crescimento. Espera-se observar se os mutantes de eIF5A apresentam fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada do crescimento semelhante aos mutantes de início da tradução ou aos mutantes de alongação da tradução.

7.2.2 Análise da existência de complementação alélica entre *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}

Com o objetivo de avaliar se diferentes mutações em *TIF51A* causam diferentes defeitos na função de eIF5A e se ocorre alguma relação de dominância entre diferentes alelos desse gene, os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} foram combinados em uma mesma linhagem de levedura cujo gene *TIF51A* encontra-se nocauteado. Para isso, as linhagens de

levedura foram transformadas com as construções *tif51A*^{Q22H/L93F}/*CEN/TRP1* (pSV708) ou *tif51A*^{K56A}/*CEN/LEU2* (pSV734) e *CEN/TRP1* (pSV58) ou *CEN/LEU2* (pSV59) e foram cultivadas em meio SC-leu-trp até que atinjam D.O._{600nm}=0,6 a 0,9. Em seguida, foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura. Espera-se observar se a linhagem que possui os alelos *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} combinados apresenta uma melhora no crescimento em relação às linhagens que possuem apenas *tif51A*^{K56A} ou *tif51A*^{Q22H/L93F} individualmente.

7.2.3 Estudo de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}) e outros fatores de alongação da tradução

Como demonstrado, GST-eIF5A é capaz de copurificar eEF2, P0 e L11, enquanto que o mesmo não é observado quando apenas GST é utilizado. Este resultado sugere que eIF5A interage fisicamente *in vivo* com as proteínas testadas relacionadas à tradução (Zanelli et al., 2006).

Os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} produzem eIF5A estável na temperatura não permissiva. Além disso, apresentam defeitos de crescimento e de síntese protéica, além de possuir defeito no perfil polissomal característico de mutantes envolvidos na alongação da tradução. Estudos mostram que a proteína mutada *tif51A*^{Q22H/L93F} interage com eEF2, independentemente de RNA e ribossomos (Camila A. O. Dias, dados não publicados).

Diante da possível interação física entre eIF5A e eEF2, pretende-se analisar a interação genética entre os genes codificadores desses fatores, e também dos genes codificadores de eEF1A (*TEF2*) e eEF3 (*YEF3*). Para isso, as linhagens de interesse foram transformadas com as construções *2μ/LEU2* (pSV149) ou *EFT2/2μ/LEU2* (pSV274) ou *TEF2/2μ/LEU2* (pSV1041) ou *YEF3/2μ/LEU2* (pSV1043) e foram cultivadas em meio SC-leu até que atinjam D.O._{600nm}=0,6 a 0,9 e, então, foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura. Assim,

espera-se observar se *TIF51A* interage com EFT2, bem como *TEF2* e *YEF3* e buscar esclarecer em qual etapa da elongação da tradução eIF5A atua.

7.2.4 Observação da ocorrência de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}) e o mutante do fator de elongação 2, *eft2*^{H699K}

Resultados recentes do nosso laboratório descreveram a interação genética do mutante de eIF5A *tif51A-3*, com o mutante de eEF2, *eft2*^{H699K}. Análises de perfil polissomal revelaram que o mutante de eIF5A reduz a fração polissomal e que o perfil polissomal do mutante de eIF5A é bastante semelhante ao perfil de *eft2*^{H699K}. Tanto o mutante *tif51A-3* quanto o mutante *eft2*^{H699K} apresentaram aumento da porcentagem de polissomos e diminuição do pico 80S, comparado à linhagem selvagem. A similaridade entres os perfis polissomais dos mutantes de eIF5A e eEF2 está de acordo com uma possível função de eIF5A na elongação da tradução. O mutante duplo *tif51A-3 eft2*^{H699K} apresentou perfil polissomal semelhante aos perfis dos mutantes únicos de eIF5A e eEF2, sugerindo uma relação muito próxima entre eIF5A e eEF2. Esses resultados não só reforçam o envolvimento de eIF5A na tradução, como também propõe um envolvimento na elongação da tradução (Gregio e cols., 2009).

Uma vez que o mutante de eIF5A, *tif51A-3*, apresentou uma relação com o mutante de eEF2, *eft2*^{H699K}, pretende-se analisar agora, se existe uma interação genética entre os mutantes estáveis de eIF5A *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} e *eft2*^{H699K}. Para isso, as leveduras foram transformadas com as construções $2\mu/LEU2$ (pSV64) ou *eft2*^{H699K}/ $2\mu/LEU2$ (pVZ1104) e foram cultivadas em meio SC-leu até que atinjam a D.O._{600nm}=0,6 a 0,9 e então foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura. Assim, espera-se observar se os mutantes estáveis de eIF5A apresentam uma relação com *eft2*^{H699K}, assim como foi observado entre o mutante *tif51A-3* e *eft2*^{H699K}.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Análise da reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura de mutantes de início ou de alongação da tradução

Com o objetivo de analisar se há diferenças na reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura entre mutantes de início e alongação da tradução, e se os mutantes de eIF5A retomam seu crescimento e possuem fenótipo de sensibilidade a temperatura semelhantes aos mutantes de início ou mutantes de alongação da tradução, foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura utilizando mutantes de eIF5A como as linhagens SVL14 (*tif51A-1*), SVL32 (*tif51A-3*), VZL821 (*tif51A^{Q22H/L93F}*), VZL822 (*tif51A^{K56A}*) e VZL904 (*tif51A-1*), mutantes de início da tradução como as linhagens SVL59 (*pab1-53*) e SVL347 (*cdc33-42*), VZL829 (*prt1-1*) e VZL839 (*fun12::kanMX4*), mutantes de alongação da tradução como as linhagens SVL733 (*yef3^{F650S}*) e VZL857 (*eft2^{H699K}*), mutantes com defeito no processo de montagem do ribossomo como as linhagens SVL138 (*grc5*) e SVL140 (*mrt4*) e um mutante que possui defeito no processo de exportação do núcleo (proteínas, RNAs e subunidades ribossomais), a linhagem SVL473 (*xpo1-1*). As linhagens foram incubadas por 4, 8, 12 e 24 horas a 38°C e em seguida transferidas para a temperatura de 25°C para análise da retomada de crescimento.

Como pode ser observado na figura 1.1, todas as linhagens apresentam crescimento quando incubadas a 25°C.

A figura 1.2 mostra as linhagens incubadas a 38°C, temperatura não permissiva, por 4 horas e, em seguida, transferidas para 25°C. Pode ser observado que apenas a linhagem VZL700 (*cca1-1*), que possui mutação na tRNA-3'-terminal adenilil transferase (maturação de tRNA), apresentou defeito na retomada de crescimento.

Na figura 1.3 são mostradas as diferentes linhagens incubadas por 8 horas a 38°C e transferidas para 25°C. Pode ser observado que, além da linhagem VZL700 (*cca1-1*), a

linhagem SVL140 (*mrt4*) também apresentou diminuição de crescimento. Esta linhagem possui mutação no gene para Mrt4 (fator envolvido na montagem de ribossomo).

A figura 1.4, em que as linhagens foram incubadas por 24 horas a 38°C e em seguida, transferidas para 25°C, mostra que, além das linhagens destacadas no parágrafo anterior, as linhagens SVL32 (*tif51A-3*), SVL733 (*yef3^{F650S}*) e VZL829 também apresentaram defeitos na retomada de crescimento. A linhagem SVL32 é um mutante de eIF5A, a linhagem SVL733 possui uma mutação no gene que codifica eEF3 e a linhagem VZL829 (*pri1-1*) possui uma mutação no gene de eIF3b.

Portanto, apenas uma linhagem com defeito em eIF5A apresentou defeito na retomada de crescimento, a SVL32. Duas linhagens que apresentam defeitos no início da tradução também apresentaram defeito na retomada de crescimento, SVL59 (*pab1-53*) e VZL829 (*pri1-1*). E uma linhagem que apresenta defeito na elongação da tradução apresentou defeito na retomada de crescimento, SVL733 (*yef3^{F650S}*). Como pode ser observado nas figuras 1.1, e 1.4, as linhagens VZL821 e VZL822, que são mutantes de eIF5A, retomaram seu crescimento. As linhagens VZL855 e SVL138, que apresentam, respectivamente, mutação em eEF2, um fator de elongação, e um defeito na montagem do ribossomo, também retomaram seu crescimento. Desta maneira, não foi possível observar diferenças na reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura entre mutantes de início e elongação da tradução, e não há relação entre defeitos de eIF5A e defeitos de início ou elongação da tradução na reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada do crescimento.

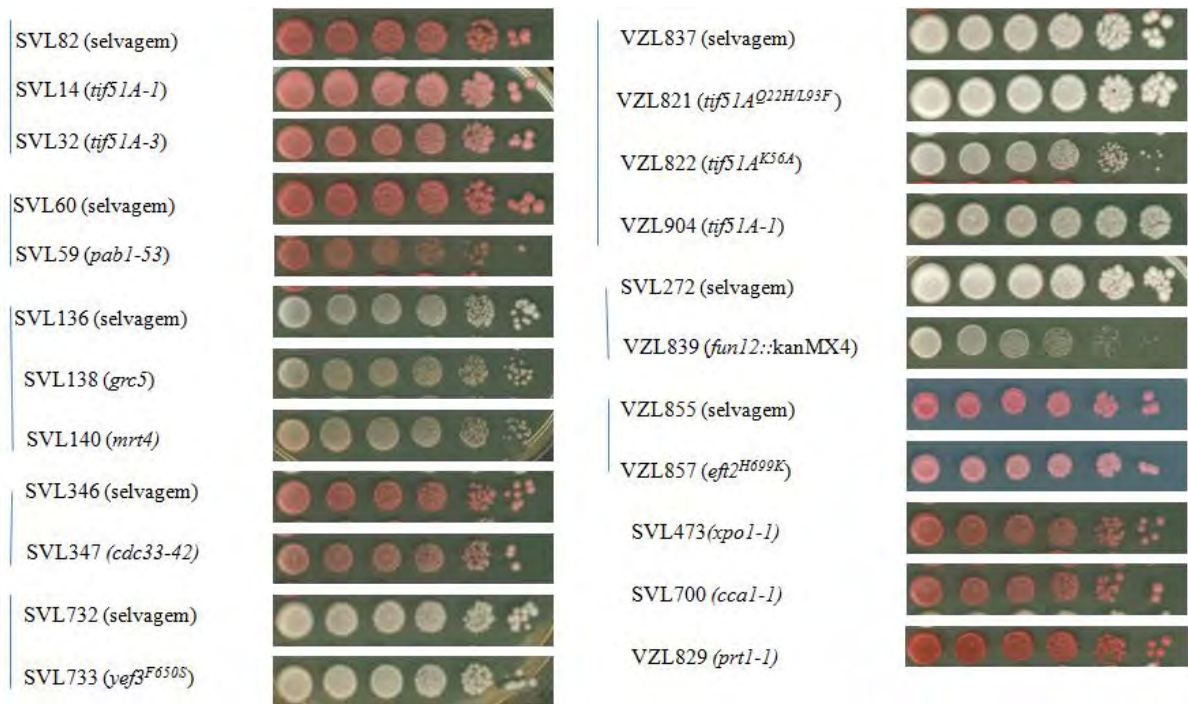


Figura 1.1 Teste de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na elongação da tradução entre outros fatores. As linhagens foram incubadas por 72 horas a 25°C.

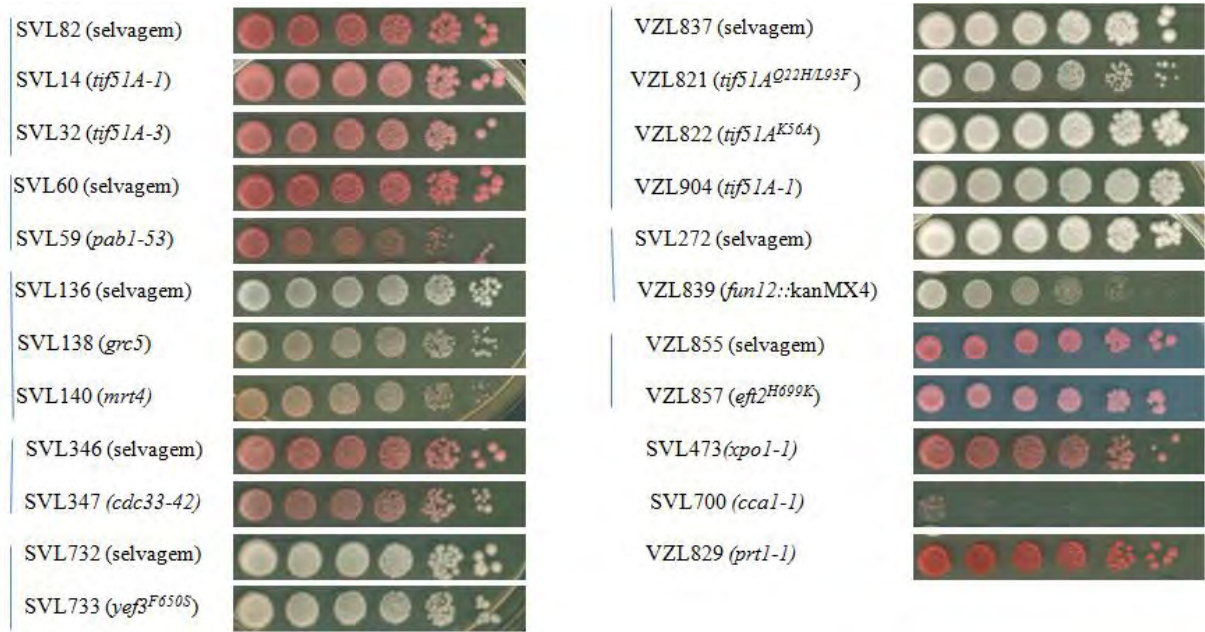


Figura 1.2 Teste de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na elongação da tradução entre outros fatores. As linhagens foram incubadas por 4 horas a 38°C e em seguida, transferidas para 25°C por 68 horas para análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada de crescimento.

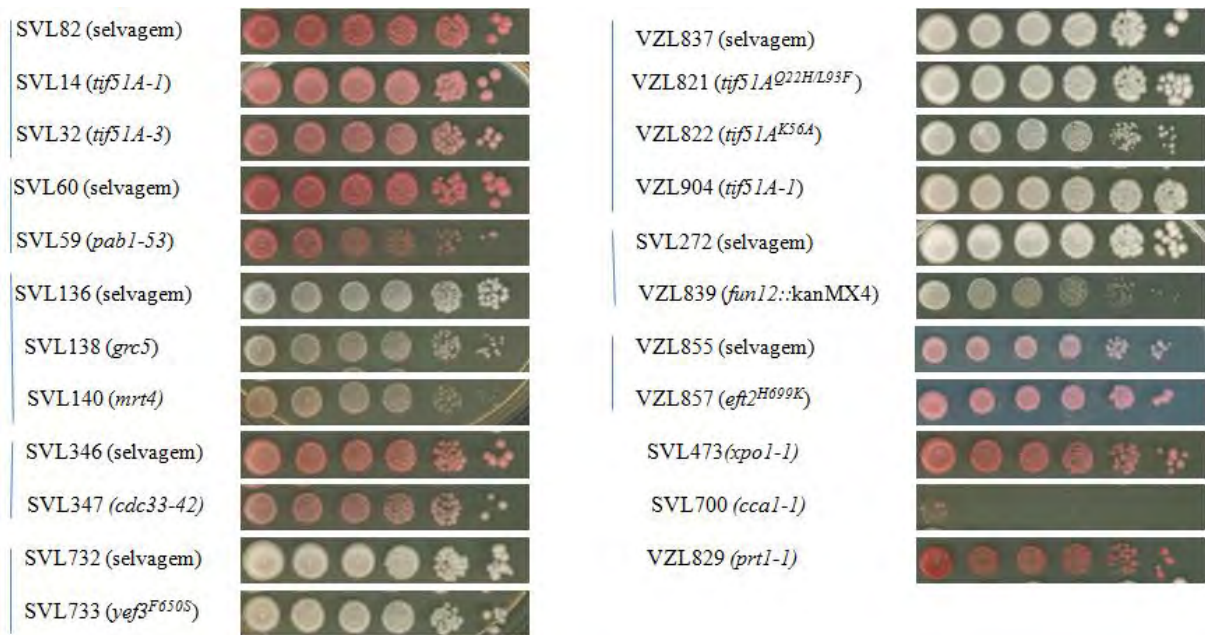


Figura 1.3 Teste de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na elongação da tradução entre outros fatores. As linhagens foram incubadas por 8 horas a 38°C e em seguida, transferidas para 25°C por 64 horas para análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada de crescimento.

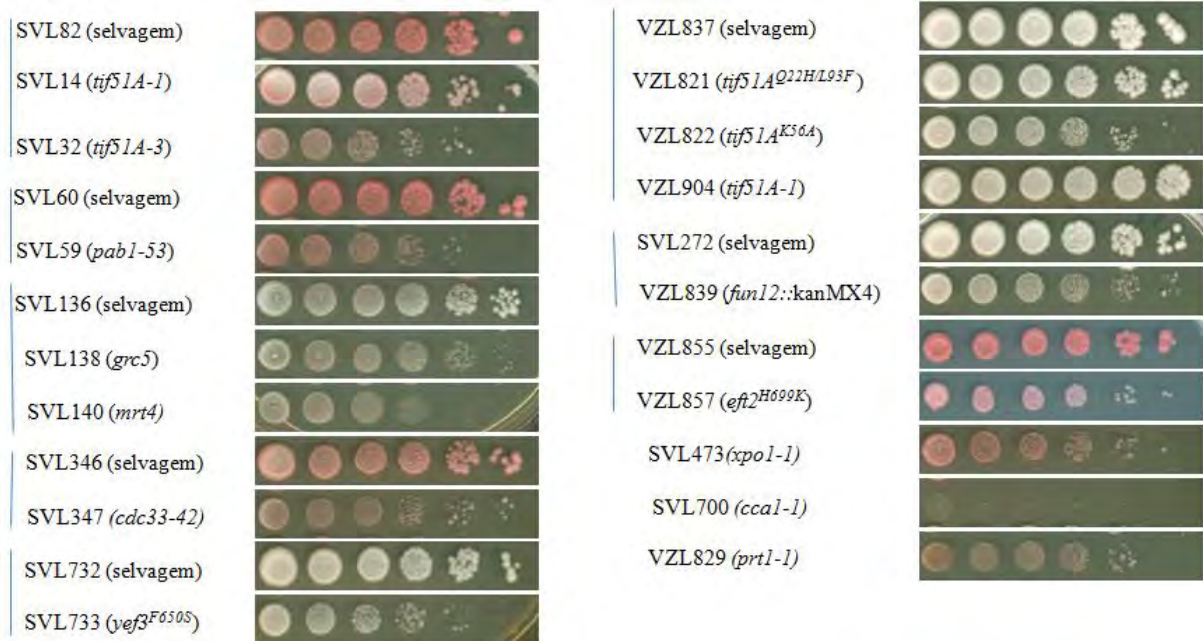


Figura 1.4 Teste de sensibilidade a temperatura de linhagens que possuem defeitos em eIF5A, no início da tradução ou na elongação da tradução entre outros fatores. As linhagens foram incubadas por 24 horas a 38°C e em seguida, transferidas para 25°C por 48 horas para análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada de crescimento.

8.2 Análise da existência de complementação alélica entre *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}

Com o objetivo de avaliar se diferentes mutações em *TIF51A* causam diferentes defeitos na função de eIF5A e se ocorre alguma relação de dominância entre diferentes alelos desse gene, os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} foram combinados em uma mesma linhagem de levedura cujo gene *TIF51A* encontra-se nocauteado e as linhagens submetidas ao teste de sensibilidade a temperatura.

A linhagem que combina os alelos *tif51A*^{K56A}, que possui uma mutação na alça de hipusinação, e *tif51A*^{Q22H/L93F}, que apresenta mutações nos domínios N-terminal e C-terminal, apresenta um fenótipo de sensibilidade a temperatura tão severo quanto as linhagens que possuem apenas um dos alelos, como pode ser observado na figura 2. Este resultado indica que não há complementação entre os dois alelos e que as mutações K56A e Q22H/L93F provocam defeitos semelhantes em eIF5A. Apesar da figura 2 mostrar pequenas variações, estas não se mostraram importantes na triplicata.

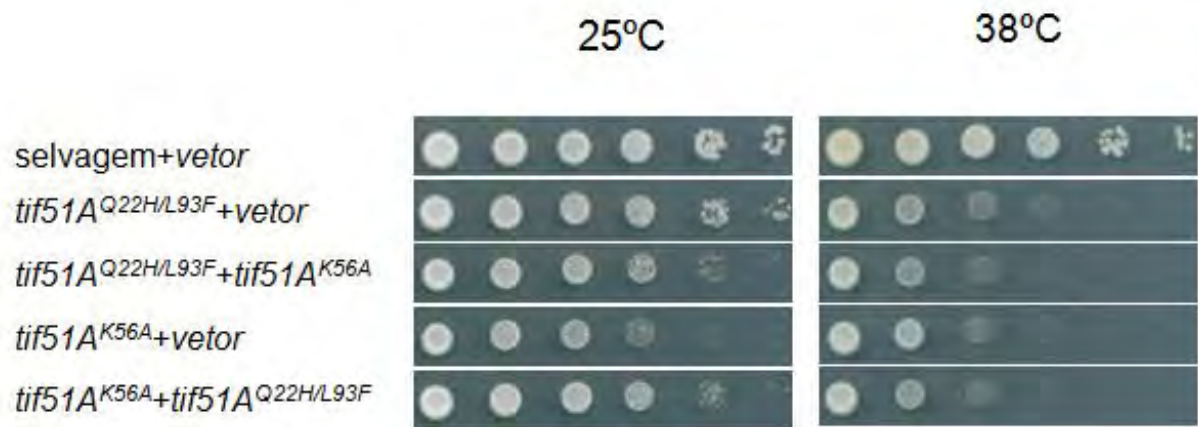


Figura 2. Teste de sensibilidade a temperatura de linhagens que combinam ambos os alelos e linhagens que possuem cada alelo isoladamente.

8.3 Estudo de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}) e outros fatores de alongação da tradução

Como já citado, eIF5A possivelmente interage fisicamente com eEF2, portanto foi realizado o teste de sensibilidade a temperatura para analisar a interação genética entre os mutantes estáveis de eIF5A e o mutante de eEF2. Foi realizado também o teste de sensibilidade a temperatura para analisar a interação genética entre os mutantes estáveis de eIF5A e outros genes que codificam fatores de alongação, como *TEF2* (eEF1A) e *YEF3* (eEF3), para verificar se eIF5A interage especificamente com eEF2 ou também com outro fator de alongação. Foram utilizadas para este objetivo construções pACT-*EFT2*, pACT-*TEF2* e pACT-*YEF3*, as quais já estavam disponíveis no laboratório.

Como pode ser observado na figura 3.1, o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} expressando *EFT2* em alto número de cópias apresentou um defeito de crescimento mais severo do que o observado para a mesma linhagem contendo apenas o vetor vazio. Entretanto, não foi observado nenhum efeito quando o mutante *tif51A*^{K56A} expressa *EFT2* em alto número de cópias, como pode ser observado na figura 3.2. Esse resultado era inesperado, pois outros dados de nosso laboratório demonstraram que *tif51A*^{K56A} é suprimido por *EFT2* em alto número de cópias (Dias et al., 2011). Essa diferença pode ter ocorrido pelo fato de ter sido utilizado um vetor diferente neste trabalho, além de que o vetor pACT também ocasiona a formação de uma proteína de fusão de eEF2 com domínio de ativação de Gal4 (AD-eEF2), o que poderia também interferir com a capacidade de supressão do fenótipo do mutante *tif51A*^{K56A}. Ambas as figuras mostram que não há qualquer interação genética entre os mutantes de eIF5A e *TEF2* ou *YEF3*. A diferença de crescimento observada nas linhagens selvagens expressando *EFT2*, *TEF2* e *YEF3* em alto número de cópias e a linhagem selvagem contendo vetor vazio pode ser devida ao fato que as proteínas devem estar em equilíbrio no ambiente celular, assim a superexpressão destes fatores prejudicam o crescimento.

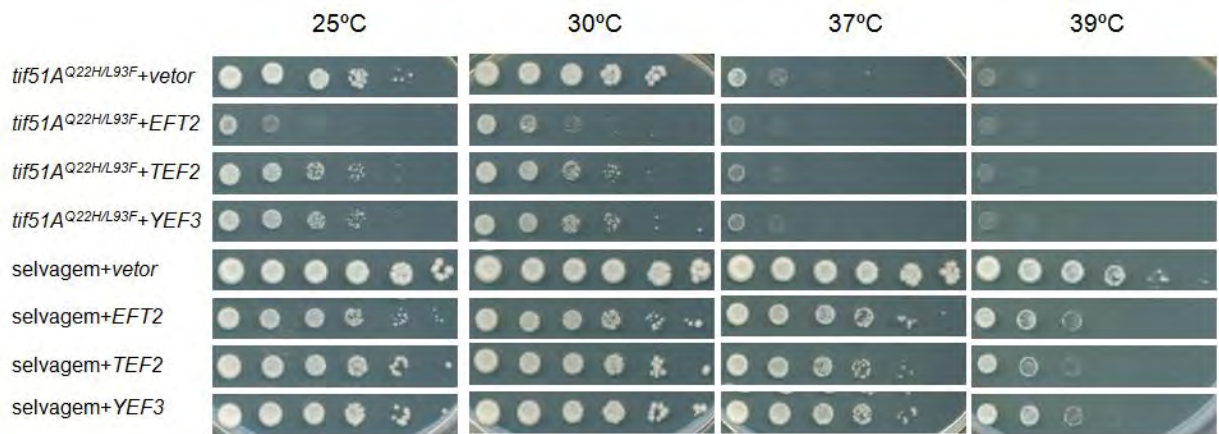


Figura 3.1 Teste de sensibilidade a temperatura para análise de interação genética entre o mutante estável de eIF5A, *tif51A*^{Q22H/L93F} e fatores de elongação.

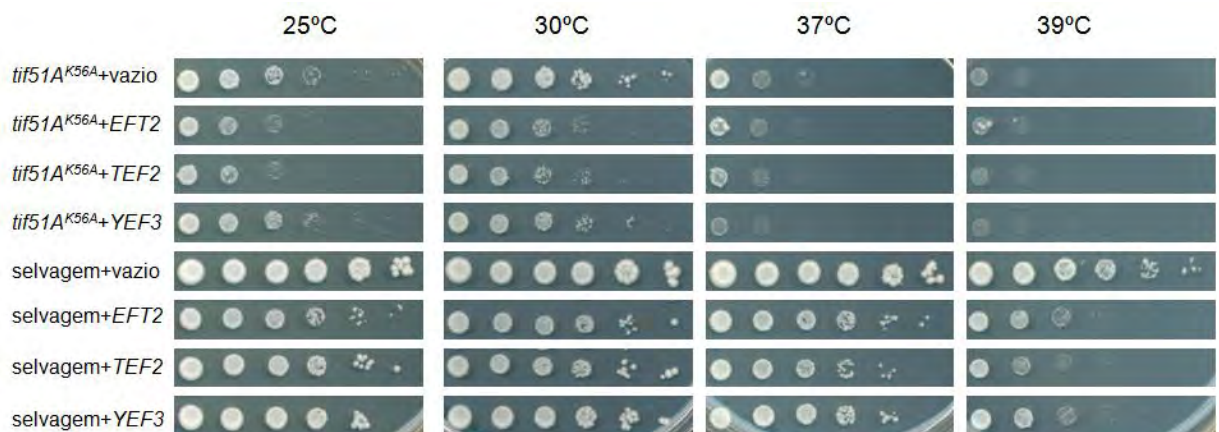


Figura 3.2 Teste de sensibilidade a temperatura para análise de interação genética entre o mutante estável de eIF5A, *tif51A*^{K56A} e fatores de elongação.

8.4 Teste de interação genética entre mutantes estáveis de eIF5A (eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}) e o mutante do fator de alongação 2, *eft2*^{H699K}

Foi observado que o mutante de eIF5A (*tif51A-3*) apresenta perfil polissomal semelhante ao mutante de eEF2 (*eft2*^{H699K}) e estes alelos possuem interação genética do tipo sintética doente, sugerindo uma possível função de eIF5A na alongação da tradução. Portanto, para ampliar os estudos da interação entre eIF5A e eEF2 foi realizado a interação genética entre os mutantes estáveis de eIF5A (*tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}) e o mutante de eEF2 (*eft2*^{H699K}).

A superexpressão de *eft2*^{H699K} na linhagem *tif51A*^{K56A} apresentou um fenótipo de crescimento mais severo do que a linhagem que possui apenas o vetor vazio, como pode ser observado na figura 4. O mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} com *eft2*^{H699K} superexpresso não apresentou alterações no crescimento celular, concordando com o dado anterior, onde a expressão em alto número de cópias de eEF2 causou um defeito de crescimento.

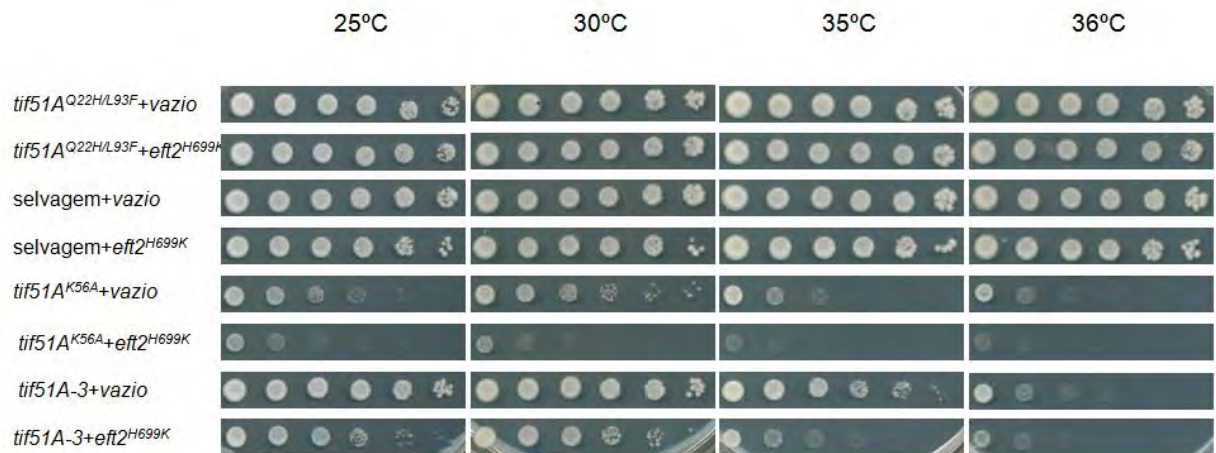


Figura 4. Teste de sensibilidade à temperatura para análise de interação genética entre os mutantes estáveis de eIF5A e o mutante de eEF2 *eft2^{H699K}*.

9. CONCLUSÕES

- A reversibilidade do fenótipo de sensibilidade a temperatura e retomada do crescimento não reflete claramente o tipo de defeito apresentado pelo mutante quanto à sua função relacionada à tradução.
- Não há complementação alélica entre os mutantes estáveis de eIF5A.
- O mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} apresenta um defeito de crescimento mais severo quando ocorre superexpressão de *EFT2*.
- O mutante *tif51A*^{K56A} apresenta um defeito de crescimento mais severo quando superexpressa *eft2*^{H699K}, enquanto o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} não apresenta defeitos de crescimento nessa condição.

10. REFERÊNCIAS

- AOKI, H.; ADAMS, S. L.; TURNER, M. A. & GANOZA, M. C. - Molecular characterization of the prokaryotic efp gene product involved in a peptidyltransferase reaction. **Biochimie**, **79**:7-11, 1997.
- BENNE, R. & HERSHEY, J. W. - The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **J. Biol. Chem.**, **253**:3078-87, 1978.
- BEVEC, D.; JAKSCHE, H.; OFT, M.; WOHL, T.; HIMMELSPACH, M.; PACHER, A.; SCHEBESTA, M.; KOETTNITZ, K.; DOBROVNIK, M.; CSONGA, R.; LOTTSPREICH, F. & HAUBER, J. - Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the rev cofactor eIF-5A. **Science**, **271**:1858-60, 1996.
- BEVEC, D.; KLIER, H.; HOLTER, W.; TSCHACHLER, E.; VALENT, P.; LOTTSPREICH, F.; BAUMRUKER, T.; HAUBER, J. Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, p. 10829-33, 1994.
- BEVEC, D. & HAUBER, J. - Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 rev function. **Biol. Signals**, **6**: 124-133, 1997.
- CHEN, K. Y. & LIU, A. Y. - Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biol. Signals**, **6**:105-9, 1997.
- CHEN, Z. P.; YAN, Y. P.; DING, Q. J.; KNAPP, S.; POTENZA, J. A.; SCHUGAR, H. J. & CHEN, K. Y. - Effects of inhibitors of deoxyhypusine syntase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Lett.**, **105**:233-9, 1996.

DIAS, C. A. O.; CANO, V. S. P.; RANGEL, S. M.; APPONI, L. H.; FRIGIERI, M. C.; MUNIZ, J. R. C.; GARCIA, W.; PARK, M. H.; GARRATT, R. C.; ZANELLI, C. F. and VALENTINI, S. R. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **FEBS Journal**, **275**: 1874-88, 2008.

DIAS, C.A.; GREGIO, A.P.; ROSSI, D.; GALVÃO, F.C.; WATANABE, T.F.; PARK, M.H.; VALENTINI, S.R. & ZANELLI, C.F. eIF5A interacts functionally with eEF2. **Amino Acids**, 2011.

ELFGANG, C.; ROSORIUS, O.; HOFER, L.; JAKSCHE, H.; HAUBER, J. & BEVEC, D. - Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **96**: 6229-6234, 1999.

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

GREGIO, A.P.; CANO, V.P.; AVACA, J.S.; VALENTINI, S.R. & ZANELLI, C.F. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **380**: 785-790, 2009.

HANAUSKE-ABEL, H. M.; PARK, M. H.; HANAUSKE, A. R.; A. POPOWICZ, M.; LALANDE, M. & FOLK, J. E. - Inhibition of G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim. Biophys. Acta**, **1221**:115-24, 1994.

HANAWA-SUETSUGU, K.; SEKINE, S.; SAKAI, H.; HORI-TAKEMOTO, C.; TERADA, T.; UNZAI, S.; TAME, J. R.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M. & YOKOYAMA, S. - Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **101**:9595-600, 2004.

- HENDERSON, B.R. & PERCIPALLE, P. – Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localization signal mediates specific binding to human importin-beta. **J. Mol. Biol.**, **274**:693-707, 1997.
- JAO, D. L. E. & CHEN, K. Y. - Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. **J. Cell. Biochem.**, **86**: 590-600, 2002.
- JAO, D. L. E. & CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translation 80S ribosomal complex, *J. Cell Biochem.* 97 (2006) 583-598.
- KANG, H. A. & HERSHEY, J. W. - Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, **269**:3934-40, 1994.
- KANG, H. A.; SCHWELBERGER, J.W. & HERSHEY, J. W. - Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, **268**:14750-6, 1993.
- KIM, K.K.; HUNG, L.W.; YOKOTA, H.; KIM, R.; KIM, S.H. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 18, p. 10419-24, 1998.
- KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V.; LOTTSPREICH, F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Lett.**, v. 334, n. 3, p. 360-4, 1993.
- LEE, L.A.; ELFRING, L.K.; BOSCO, G.; ORR-WEAVER, T.L. A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. **Genetics**, v. 158, p. 1545-56, 2001.

- MAGDOLEN, V.; KLIER, H.; WOHL, T.; KLINK, F.; HIRT, H.; HAUBER, J. & LOTTSPREICH F. - The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Mol. Gen. Genet.**, **244**:646-52, 1994.
- PARK, M. H.; WOLFFI, E. C.; LEE, Y. B. & FOLK J. E. - Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of chinese hamster ovary cells by guanidyl diamines. **J. Biol. Chem.**, **369**:27827-30, 1994.
- PARK, M. H., LEE, Y. B. & JOE, Y. A. - Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol. Signals**, **6**:115-23, 1997.
- PEAT, T. S.; NEWMAN, J.; WALDO, G. S.; BERENDZEN, J. & TERWILLIGER, T. C - Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. **Structure**, **6**: 1207-1214, ; 1998.
- PESTOVA, T.V.; KOLUPAEVA, V.G.; LOMAKIN, I.B.; PILIPENKO, E.V.; SHATSKY, I.N.; AGOL, V.I.; HELLEN, C.U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 13, p. 7029-36, 2001.
- ROSORIUS, O.; KRATZER, F.; HEGER, P.; DABAUVALLE, M. C. & HAUBER, J. - Nuclear pore localization and nucleocytoplasmatic transport of eIF5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. **J. Cell Sci.**, **112**:2369–80, 1999.
- RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G. M.; HAMMERSCHMID, F.; JAKSCHE, H.; WOLFF, B.; ASCHAUER, H.; FARRINGTON, G. K.; PROBST, H.; BEVEC, D. & HAUBER, J. - Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 rev activation domain mediating transactivation. **J. Cell Biol.**, **123**:1309-20, 1993.
- SASAKI, K.; ABID, M.R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 384, p. 151-4, 1996.

- SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H. G.; SMIT-MACBRIDE, Z.; KANG, H. A. & HERSHEY, J. W. - Translational initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, **11**:3105-14, 1991.
- SHI, X. P.; YIN, K. C.; AHERN, J.; DAVIS, L. J.; STERN, A.M. & WAXMAN, L. - Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochim. Biophys. Acta**, **1310**:119-26, 1996.
- SHI, X.P.; YIN, K.C. & WAXMAN, L. - Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the subcellular distribution of the eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, and the HIV-1 Rev protein. **Biol. Signals**, **6**:143-9, 1997.
- VALENTINI, S. R.; CASOLARI, J.M.; OLIVEIRA, C. C.; SILVER, P. A. & McBRIDE, A. E. - Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) reveal connections to Poly (A) – binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, **7**:393-405, 2002.
- XU, A.; CHEN, K.Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 4, p. 2555-61, 2001.
- XU, A.; JAO, D.L.; CHEN, K.Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. **Biochem. J.**, v. 384, p. 585-90, 2004.
- YAO, M.; OHSAWA, A.; KIKUKAWA, S.; TANAKA, I. & KIMURA, M. - Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). **J Biochem.**, **133 (1)**: 75-81, 2003.
- ZANELLI, C. F. & VALENTINI, S. R. - Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. **Genetics**, **171**:1571-1581, 2005.

- 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. - eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, In Press, Available online 7 August 2006.
- ZUK, D. & JACOBSON, A. - A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **EMBO J.**, **17**:2914-25, 1998.